



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo de un biosensor enzimático para
cuantificación de mercurio(II) en medio acuoso**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

Q.F.B. ELBA SOCORRO ROSAS TATE

DIRIGIDA POR

DRA. PATRICIA BALDERAS HERNÁNDEZ

DRA. MARÍA TERESA RAMÍREZ SILVA

DR. JORGE JUÁREZ GÓMEZ



TOLUCA, MÉXICO; 2017

Agradecimiento a CONACyT por la beca No. 424124 otorgada durante el periodo en que se llevaron a cabo los estudios de Maestría en Ciencias Químicas.

Se agradece el financiamiento del proyecto a la UAEMéx por el apoyo 245 3736/2014/CID, y a CONACyT por el apoyo 237327 y por la cátedra 2159.

El presente trabajo forma parte del área de Química Analítica del posgrado en Ciencias Químicas, realizándose en las instalaciones del Laboratorio de Química Analítica de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. Patricia Balderas Hernández, Dra. María Teresa Ramírez Silva y Dr. Jorge Juárez Gómez.

RESUMEN

El problema de la contaminación en los efluentes de agua de origen antropogénico es sin duda, uno de los aspectos más preocupantes de la degradación de los medios naturales por parte de la civilización contemporánea. Dentro de la contaminación del agua, uno de los contaminantes más importantes es el mercurio, metal con alta toxicidad, el cual es altamente biodisponible y de alta exposición en el ambiente. Éste metal presenta diferentes grados de toxicidad dependiendo de su estado de oxidación, así como sus efectos en el sistema nervioso, digestivo e inmunológico, pulmones, riñones, piel y ojos.

Dentro de los efectos adversos de éste metal, el mercurio puede reducir la actividad enzimática de los organismos vivos, por lo cual, entre otras cosas, es de suma importancia su cuantificación. En este trabajo se estudió la inhibición de laccasa de *Trametes versicolor* por mercurio(II) en medio acuoso, tomando como base la evaluación de la cinética de Michaelis-Menten en sistema acuoso, siguiendo la inhibición mediante espectroscopía UV-Vis, mediante la formación de cafeoquinona a partir de ácido cafeico, obteniendo como parámetros cinéticos una $K_m = 43 \pm 6 \mu\text{M}$ y $V_{max} = 90 \pm 3 \mu\text{M s}^{-1}$, otros sustratos empleados durante esta prueba fueron catecol y ácido gálico, sin embargo la laccasa de *Trametes versicolor* muestra una mayor afinidad por ácido cafeico.

Se probaron tres tiempos de contacto para el inhibidor, observándose una diferencia no significativa entre ellos, por lo cual el tiempo de incubación para los siguientes experimentos fue de 2 minutos. Para observar el efecto de los iones mercurio sobre la enzima se probaron concentraciones desde 0 a 4 mM de Hg(II), decreciendo los valores de V_{max} al aumentar la concentración de mercurio(II). Con base a los valores calculados de K_m se construyó una curva de inhibición observándose un máximo de inhibición de 45% a partir de 2mM. Por otro lado,

para la determinación de muestras sintéticas se construyó una curva de calibración con un intervalo lineal de 0.05 a 0.7 mM, la cual posee un valor de $R^2 = 0.9695$.

El electrodo serigrafiado de carbono se logró modificar empleando una solución de glutaraldehído al 2.5% mezclado con laccasa de *Trametes versicolor*. De igual manera que en los estudios espectrofotométricos se probaron varios sustratos (ácido cafeico, hidroquinona, catecol y ácido gálico) tendiendo la enzima una mayor afinidad por ácido cafeico, siendo sus parámetros cinéticos K_m 47.8 ± 0.7 y su V_{max} de 354.3 ± 1.6 . Posterior a ello se cuantificó la actividad enzimática para concentraciones de 0 a 1000 μM , en este caso el tiempo de contacto para el electrodo modificado fue de 20 minutos. Con base a los valores de V_{max} obtenidos se construyó una curva de inhibición con un porcentaje máximo de inhibición de 95%. Posterior a ello se realizó una curva de calibración con un intervalo lineal de 0 a 0.8 μM con una $R^2 = 0.9956$, mientras que su límite de detección es de 0.0729 μM .

ABSTRACT

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	lii
ÍNDICE	lv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	1
CONTAMINACIÓN DEL AGUA Y MERCURIO	2
MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE METALES	5
ELECTRODOS SERIGRAFIADOS	6
BIOSENSORES	7
ENZIMAS	10
LACCASA DE <i>TRAMETES VERSICOLOR</i>	12
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
CAPITULO 2 ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LACCASA DE <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> PARA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS E INHIBICIÓN ENZIMÁTICA	21
INTRODUCCIÓN	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
CAPITULO 3 FABRICACIÓN DE BIODENSORES, CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA, DETERMINACIÓN DE CONSTANTES CINÉTICAS Y CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO(II)	42
INTRODUCCIÓN	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
CAPITULO 4 CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS	59
ANEXOS	A

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del mercurio en diferentes ambientes (agua, aire, suelo)

Figura 2. Representación de un electrodo serigrafiado.

Figura 3. Esquema de un biosensor.

Figura 4. Métodos comunes de inmovilización en biosensores: (A) Enlace covalente, (B) Adsorción, (C) Atrapamiento, (D) Entrecruzamiento.

Figura 5. Fotografía de *Trametes versicolor* (Fuente: Galería de Beatrix M. Varga, internet)

Figura 6. Estructura del sitio activo multicobre en laccasa de *T. versicolor*

Figura 7. Ejemplos de reacciones enzimáticas, a) con un solo sustrato, b) con dos sustratos.

Figura 8. a) Representación gráfica de la velocidad de una reacción enzimática donde se puede observar los parámetros básicos de la ecuación de Michaelis-Menten. b) Diagrama de Lineweaver-Burk, observándose los parámetros cinéticos a partir de los recíprocos de velocidad y concentración de sustrato.

Figura 9. Oxidación de ácido caféico a cafeoquinona catalizada por laccasa de *Trametes versicolor*.

Figura 10. Molécula de glutaraldehído.

Figura 11. Descripción gráfica de la operación de un biosensor enzimático empleando amperometría.

Figura 12. Electrodo serigrafiado contituidos por electrodo de trabajo y contraelectrodo en tinta de de carbono y electrodo de referencia con tinta de $\text{Ag}^{\circ}/\text{AgCl}$.

Figura 13. Reacción de oxidación y reducción electroquímica del ácido caféico que se lleva a cabo sobre la superficie del electrodo serigrafiado.

Figura 14. VC de ácido caféico 2 mM, utilizando como referencia un electrodo de Ag^0/AgCl , la pseudoreferencia es el electrodo impreso con tinta de Ag/AgCl en el electrodo serigrafiado, a $v = 100 \text{ mV/s}$ en buffer de acetatos (0.1 M pH = 4.5) a 30°C .

Figura 15. Esquema de modificación del electrodo serigrafiado empleando glutaraldehído y temperatura para la formación de la membrana.

Figura 16. Mecanismo de acción de los electrodos modificados enzimáticamente con laccasa de *Trametes versicolor* para la cuantificación de compuestos fenólicos (Ph y Q son compuestos fenólicos).

Figura 17. Determinación amperométrica de la cinética de Michaelis-Menten para la reducción de ácido caféico en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

Figura 18. Determinación amperométrica de la cinética de Michaelis-Menten para la reducción de hidroquinona en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

Figura 19. Determinación amperométrica de la cinética de Michaelis-Menten para la reducción de catecol en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

Figura 20. Determinación amperométrica de la cinética de Michaelis-Menten para la reducción de ácido gálico en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

Figura 21. Grado de reacción enzimática como función de la concentración de ácido caféico para diferentes concentraciones de mercurio(II).

Figura 22. Gráfica de inhibición para el sistema laccasa de *Trametes versicolor*, con base a los valores de V_{max} .

Figura 23. Curva de calibración para el grado de oxidación inicial de ácido caféico por 10 µg de laccasa de *Trametes versicolor* en función de la concentración de mercurio(II). Las cinéticas para monitorear la producción de cafeoquinona se realizó en buffer de acetatos (0.1M, pH = 4.5)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de algunos métodos básicos de inmovilización.

Tabla 2. Valores de potencial e intensidad de corriente para los picos de oxidación y reducción de ácido caféico en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C.

Tabla 3. Parámetros cinéticos para laccasa de *Trametes versicolor* para diferentes sustratos, llevándose la reacción en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

Tabla 4. Biosensores electroquímicos para cuantificación de Hg(II) encontrados en la literatura.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Contaminación del agua por mercurio

Las masas receptoras de agua han sido incapaces, por sí mismas, de absorber y neutralizar la carga de contaminante que se produce. Como consecuencia de esto, en numerosas ocasiones pierden aquellas condiciones mínimas que les son exigidas para su racional y adecuado aprovechamiento como agua potable, uso industrial, agricultura, recreativa [1], fuentes de abastecimiento de agua, como vías de transporte o aún como fuentes de energía.

Cualquier cambio físico, biológico o químico en la calidad de agua que produzca efectos adversos en los organismos vivos o haga el agua no apta para los usos deseados puede ser considerado como contaminación [2].

Existen diversos contaminantes que se pueden encontrar en estos tipos de agua residual, tales como elementos traza metálicos, combinaciones metal-orgánica, inorgánicos, radio núcleos, alta demanda bioquímica de oxígeno, contaminantes orgánicos traza, pesticidas, carcinógenos, patógenos [3], variando la naturaleza de cada uno de ellos.

Algunos iones metálicos se encuentran en forma natural en la corteza terrestre. Estos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas. [4, 5]. Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación del suelo, agua superficial y subterránea y de ambientes acuáticos. Junto con las demás sustancias tóxicas en los desechos industriales, los metales tóxicos están considerados como uno de los principales contaminantes en el medio ambiente, ya que tienen un efecto significativo sobre su calidad ecológica. Los iones metálicos, aún en cantidades muy bajas, pueden llegar a ser tóxicos debido a su alta biodisponibilidad; ya que se acumulan en órganos blandos y persisten allí por muchos años.

La mayoría de los metales de transición son tóxicos para los organismos vivos, ya sean plantas o animales, por lo cual un exceso de ellos en el ambiente puede causar un descontrol en el equilibrio ecológico y en el metabolismo de los seres vivos. Dentro de los iones metálicos con alta toxicidad se encuentra el mercurio, el cual es altamente biodisponible y de alta exposición en el ambiente.

El ciclo del mercurio es el flujo continuo del mercurio en la atmósfera, tierra y agua, se basa en el comportamiento de este metal en los tres diferentes medios, las reacciones químicas que presentan, parámetros de transporte y su destino final (Fig. 1). El ciclo del mercurio se va a ver afectado en función del ciclo global natural, el ciclo global perturbado por la actividad humana, fuentes regionales de mercurio y fuentes locales de mercurio.

El mercurio existe en tres estados de oxidación; metálico (Hg^0), mercurioso (Hg^+) y mercúrico (Hg^{2+}) [6, 7]. Estas formas difieren en el grado de toxicidad y los efectos en el sistema nervioso, digestivo e inmunológico, así como en pulmones, riñones, piel y ojos [8,9]. El mercurio se encuentra de forma natural en la corteza terrestre, siendo liberado al ambiente mediante actividad volcánica, erosión de rocas y por actividad humana; esta última es la mayor causa de emisión, principalmente en las centrales eléctricas de carbón, quema de carbón, procesos industriales, incineración de desechos y extracción de mercurio, oro y otros metales [10].

La mayor parte del mercurio presente en el medio ambiente (exceptuando la atmósfera) se encuentra en forma de sales mercúricas inorgánicas y compuestos organomercuriales. Así los compuestos más comunes del mercurio son: especies inorgánicas de Hg(II) , HgCl_2 , Hg(OH)_2 y HgS ; los compuestos de metilmercurio CH_3HgCl y CH_3HgOH ; y en menores proporciones, otros organomercuriales como dimetilmercurio o difenilmercurio [11].

Los compuestos de mercurio suelen permanecer en fase acuosa como moléculas o disociadas, dando lugar a valores bajos de solubilidad. Las especies organomercuriales no son solubles en agua a menos que presenten grupos polares que pueden interaccionar por puente de

hidrógeno con el agua [12]. Por otro lado, las especies inorgánicas presentan diferentes solubilidades dependiendo del contra-ion que presenten.

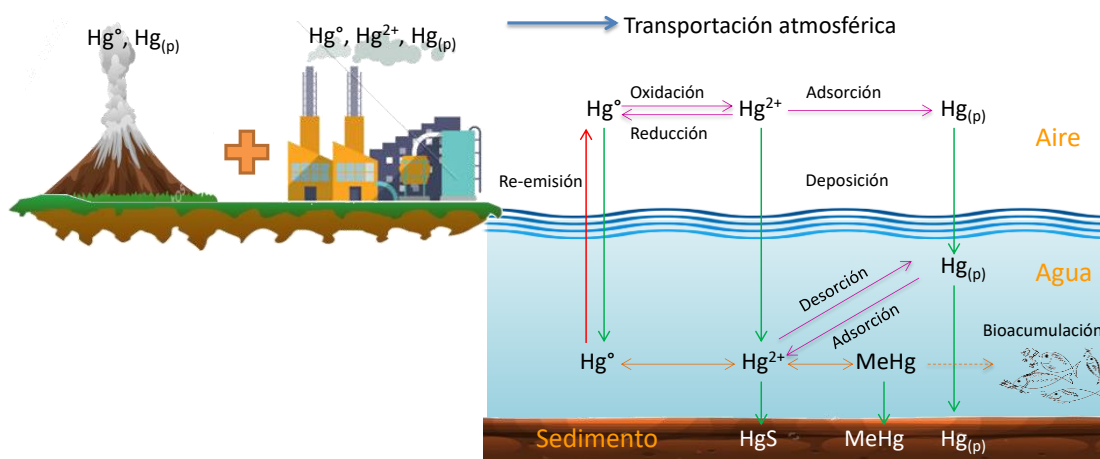


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del mercurio en diferentes ambientes (agua, aire, suelo)

La manera en que el mercurio regresa a la superficie de la tierra no ha sido dilucidado completamente, se cree que el mercurio atmosférico se transforma en mercurio soluble principalmente por la oxidación del mismo, depositándose por medio de la lluvia, conservándose ahí y en los sedimentos como metilmercurio [13].

El mercurio se puede biomagnificar de manera rápida, presentando altas concentraciones de este metal en los depredadores más altos de la cadena trófica en ambientes marinos, ya que $Hg(II)$ puede unirse a las proteínas de los organismos de forma covalente. [14, 15] La exposición humana al mercurio se lleva a cabo principalmente por el contacto con vapores de mercurio e ingesta, en forma de metilmercurio o mercurio inorgánico [13]; produciendo efectos adversos en el organismo. En caso de una intoxicación aguda el mayor efecto adverso es directo para los riñones y el sistema nervioso central, así como efectos en el sistema gastrointestinal y respiratorio. Por otro lado, en intoxicaciones crónicas el daño se ve reflejado en sistema nervioso central, riñones, presencia de acrodinia (enfermedad eruptiva con

sensación de hormigueo, piel). No existe información completa para demostrar que el mercurio afecta los órganos reproductivos o produce cáncer, por lo cual la EPA lo clasifica en el grupo D, no clasificable como carcinogénico humano basado en datos inadecuados en humanos y animales [16].

Métodos de cuantificación de metales

Debido a los límites permisibles que establece la legislación ambiental (NOM-002-ECOL-1996, 0.01 ppm Hg total; NOM-001-SEMARNAT-1996, 0.01 ppm), y a la existencia de normas con parámetros más estrictos para su detección (NOM-127-SSA1-1994, 0.001 ppm Hg) se requieren técnicas capaces de medir concentraciones de metales a nivel de trazas. Diversas técnicas de análisis han sido desarrolladas, como son la Espectrometría de Masas (ICP-MS), Análisis de Activación de Neutrones (AAN), Espectrometría de Absorción Atómica (EAA), y la Espectrometría de Emisión. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas requieren tiempos largos de manipulación, instrumentos sofisticados y entrenamiento especial [17]. Además, estas técnicas no pueden ser utilizadas para monitoreo de rutina in-situ de un gran número de muestras. Por lo tanto, se requiere desarrollar sensores que resuelvan estos problemas, siendo las técnicas electroquímicas una posible solución debido a su rapidez de respuesta y su facilidad de transporte [18].

La electroquímica es una herramienta analítica poderosa y sensible, que puede ser empleada para el análisis cualitativo y cuantitativo. La utilidad de los métodos electroquímicos no proviene sólo de su sensibilidad a pequeñas cantidades y la sencillez de la instrumentación, sino también porque estos métodos se pueden utilizar para la detección y separación de especies iónicas [19].

Aunque con la espectroscopia de absorción atómica (EAA) es posible detectar una mayor variedad de iones metálicos, la sensibilidad de los métodos electroquímicos es comparable. Otra ventaja del electroanálisis es su capacidad para determinar varios iones de metales simultáneamente con análisis rápidos e instrumentación de bajo costo [17, 20]. Además, la posibilidad de contar con instrumentos portátiles y compactos para el análisis y su bajo consumo de energía la hacen atractiva para el seguimiento *in situ* de trazas de metales [21]. La técnica analítica a ser empleada durante el proyecto será amperometría, la cual produce una corriente eléctrica a un potencial impuesto, proporcional a la concentración de la sustancia detectada.

Electrodos serigrafiados

En la actualidad es necesario el diseño y uso de técnicas analíticas que permitan realizar cuantificación *in situ* de una forma rápida y fiable. Años atrás los sensores electroquímicos comenzaron a ser populares empleando técnicas electroquímicas. Los sensores electroquímicos tienen la capacidad de brindar información continua del ambiente donde se encuentre [22], brindando sensibilidad y selectividad. Por otro lado, se ha buscado la miniaturización de sensores, así como integrar o evitar el proceso de pre tratamiento de las muestras con la finalidad de analizar volúmenes pequeños, una posible automatización del proceso, análisis rápidos y reproducibles [23]. Con base a las necesidades anteriores se desarrollaron electrodos pequeños, baratos y versátiles: los electrodos serigrafiados.

Los electrodos serigrafiados son dispositivos construidos mediante la tecnología de serigrafiado, empleando diferentes tipos de tintas y sustratos plásticos y cerámicos [24, 25]. Un electrodo serigrafiado consta de un electrodo de trabajo, contraelectrodo, electrodo de pseudoreferencia, un sustrato sólido en donde se colocan las tintas y los conductores (Fig. 2).

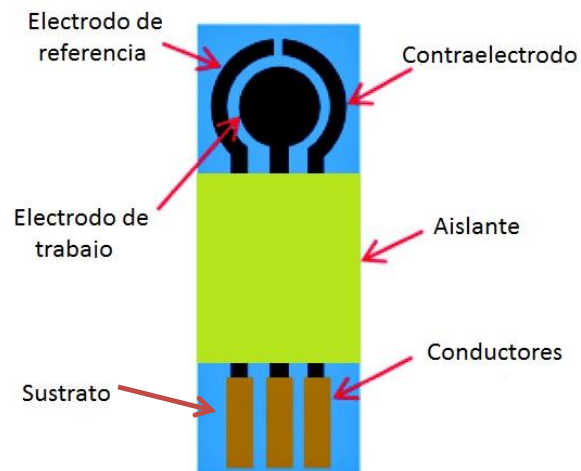


Figura 2. Representación de un electrodo serigrafiado.

En general existen dos tipos de electrodos serigrafiados, aquellos construidos con carbono y los basados en metales (oro, platino, etc.) [25], siendo los electrodos de carbono más empleados debido a su bajo costo, alta reproducibilidad, químicamente inertes y fáciles de modificar.

Los electrodos serigrafiados de carbono, debido a su gran versatilidad, permiten ser modificados por diversos materiales, como nano partículas y materiales estructurales, sustratos, polímeros y biomoléculas [26], empleando diversas técnicas para su deposición en la superficie del sensor.

Biosensores

Un biosensor es un artefacto compuesto por dos elementos (Fig. 3) altamente asociados:

- *Bioreceptor*. Elemento biológico sensible. Se encuentra inmovilizado y se encarga de reconocer al analito. Los anticuerpos y oligonucleótidos son ampliamente usados, sin embargo las enzimas son los bioreceptores más comunes en biosensores.

- *Transductor*. Es usado para convertir la señal de la interacción entre el analito y el bioreceptor a una señal electrónica.

La intensidad de dicha señal es proporcional o inversamente proporcional a la concentración del analito [24]. Los transductores electroquímicos son usados comúnmente para desarrollar biosensores, su uso implica un bajo costo, dimensiones pequeñas y diseño sencillo.

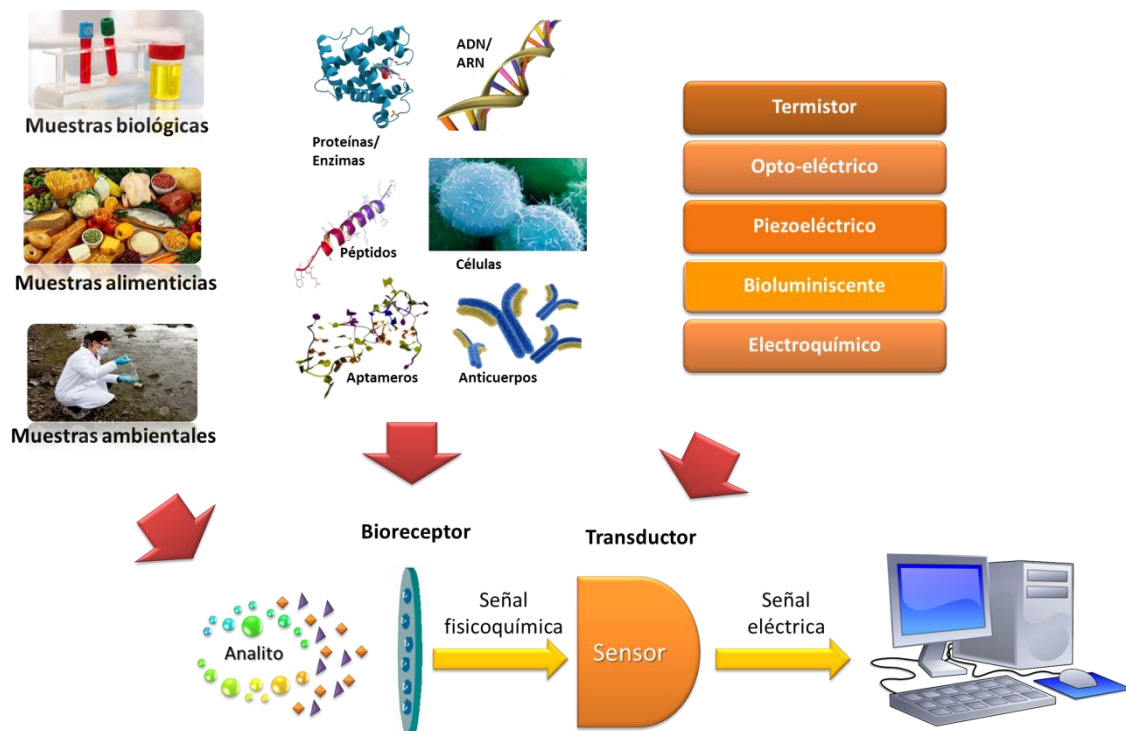


Figura 3. Esquema de un biosensor.

La inmovilización de las enzimas es un paso importante en el diseño y reconocimiento del bioreceptor en los biosensores. Existen varias estrategias de inmovilización, dentro de las cuales se encuentran: adsorción, acoplamiento covalente, atrapamiento, entrecruzamiento o afinidad (Tabla 1). Inmovilizar correctamente las enzimas es un factor clave en la eficiencia del biosensor como robustez, reproducibilidad, sensibilidad y estabilidad de almacenaje. Este procedimiento debe mantener las propiedades de la biomolécula, como estructura, función y actividad.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de algunos métodos básicos de inmovilización (Adaptado de [25, 27])

Método de inmovilización	Naturaleza de enlace	Ventajas	Desventajas
Adsorción	Enlaces débiles	Simple y sencillo Baja pérdida de actividad enzimática	Desorción Adsorción no específica
Enlace covalente	Formación de un enlace químico entre grupos funcionales de la enzima y el soporte	No hay barrera de difusión Estable Tiempo corto de respuesta	Matriz no regenerable Enlaces con productos tóxicos Pérdida de actividad enzimática
Atrapamiento	Incorporación de la enzima con un gel o polímero	No hay reacción química entre el monómero y la enzima que pueda afectar la actividad Muchas enzimas se pueden inmovilizar con el mismo polímero	Barrera de difusión Filtración de la enzima Para electropolimerización se requiere de altas concentraciones de monómeros y enzimas
Entrecruzamiento	Enlace entre enzima y entrecruzador	Sencillo	Pérdida de actividad enzimática
Afinidad	Enlaces por afinidad entre grupos funcionales del soporte y la enzima	Inmovilización controlada y orientada	Requiere la presencia de grupos funcionales específicos

Las enzimas son versátiles, eficientes y con actividad catalítica específica bajo condiciones suaves de reacción. La laccasa de *Trametes versicolor* presenta algunas ventajas sobre otras enzimas, como su capacidad de catalizar las reacciones de transferencia de electrones sin requerir cofactores adicionales y buena estabilidad [28].

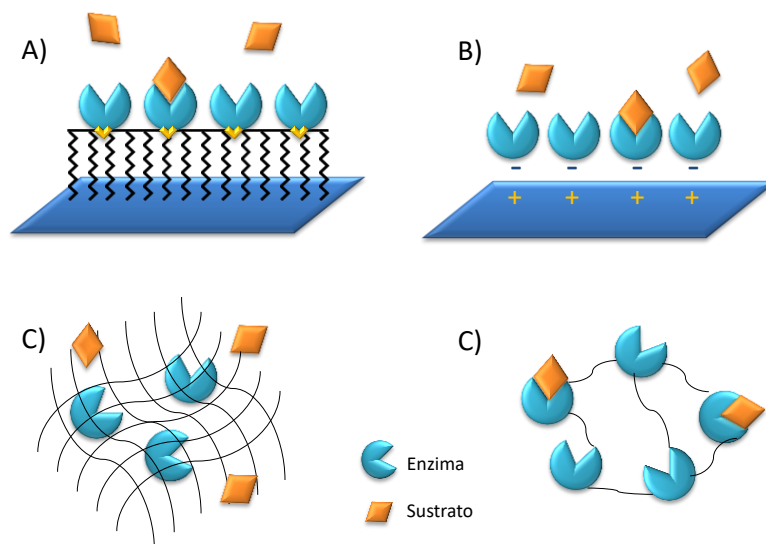


Figura 4. Métodos comunes de inmovilización en biosensores: (A) Enlace covalente, (B) Adsorción, (C) Atrapamiento, (D) Entrecruzamiento.

Enzimas

La vida depende de una serie de reacciones perfectamente acopladas, de las cuales, la mayoría de ellas se lleva a cabo tan lentamente que no podría existir la vida. El poder catalítico de las enzimas facilita procesos esenciales de la vida en todas las formas de vida, desde los virus al hombre [29].

Las enzimas son catalizadores proteicos que regulan y controlan la mayoría de los procesos en los organismos. Estas moléculas aumentan la velocidad de la reacción notablemente y presentan reactivos específicos (sustratos). Normalmente, las concentraciones de enzima son muy pequeñas en relación con el reactivo. Mientras que la velocidad de reacción se incrementa en presencia de una enzima, la energía total utilizada para formar el producto no cambia [30].

La variedad de nombres diferentes que habían sido utilizados para la misma enzima y el hecho de que algunas enzimas diferentes eran conocidas con el mismo nombre hicieron necesario el desarrollo de un sistema racional para su clasificación y nomenclatura. La Unión Internacional

de bioquímica ideó un sistema de clasificación que permite la identificación inequívoca de las enzimas en las reacciones que catalicen [31].

Los grupos principales y su definición son [32]:

1. Oxidorreductasas. Son aquellas enzimas que catalizan las reacciones de oxidorreducción, o sea, la transferencia de electrones o sus equivalentes entre un donante y un aceptor.
2. Transferasas. Catalizan la transferencia de un grupo químico entre un donante y un aceptor; se excluyen aquellas que transfieren electrones o sus equivalentes, pues pertenecen a la clase anterior, y aquellas en que el aceptor del grupo es el agua, pues pertenecen a la clase siguiente.
3. Hidrolasas. Catalizan la ruptura de enlaces químicos con la participación de las moléculas del agua.
4. Liasas. Catalizan reacciones en las cuales se produce la adición o sustracción de grupos químicos a dobles enlaces.
5. Isomerasas. Catalizan la interconversión de dos isómeros.
6. Ligasas. Catalizan la unión covalente de dos sustratos mediante la energía de hidrólisis de nucleósidos trifosfatados, generalmente el ATP.

El estudio de las enzimas sigue siendo de gran importancia para el desarrollo científico, empleando estos productos biológicos en muchas aplicaciones industriales, como en la fabricación de bebidas y alimentos, así como en la producción de detergentes, síntesis estereoespecífica, desarrollo de fármacos, remediación de ambientes contaminados y, como se menciona en este trabajo, sensores; sin dejar de lado las muchas otras aplicaciones.

Laccasa

La laccasa es una enzima multi-cobre presente de forma amplia tanto en plantas, hongos y bacterias [33], es una polifenol oxidasa con código EC 1.10.3.2. Esta enzima se relaciona con diversas funciones de dichos organismos, tales como síntesis de lignina y estructuras de protección (plantas); esporulación, degradación de lignina y patogénesis (hongos) [30,35].



Figura 5. Fotografía de Trametes versicolor (Fuente: Galería de Beatrix M. Varga, internet)

Las laccasas han sido estudiadas para posibles aplicaciones en industria papelera debido a su capacidad de degradación de lignina [36], así como el tratamiento de aguas residuales contaminadas con compuestos fenólicos [37]. Esta enzima tiene la capacidad de oxidar polifenoles, fenoles metoxi sustituidos, diaminas y otro tipo de compuestos [38].

En general las laccasas poseen un peso molecular entre 60-80 kDa y un punto isoeléctrico entre 4 y 7, dependiendo de la glicosilación. El centro activo de esta enzima, donde se lleva a cabo la transformación del sustrato mediante procesos redox, posee 4 átomos de cobre distribuidos en tres centros catalíticos:

- Tipo 1, se encuentra ligada con una Cys y dos His, con fuerte absorción en la región visible $\epsilon > 3,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 600 nm, espectro de EPR con $A|| < 95 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. Es responsable por el intenso color azul de la enzima.

- Tipo 2 o centro normal, ligada con dos His, con absorción indetectable en UV, línea de EPR con forma típica correspondiente a complejos de Cu de bajo peso molecular.
- Tipo 3 o centro binuclear acoplado, cada átomo de cobre ligado con tres His, absorción fuerte en el UV cercano con $\lambda_{max} = 330 \text{ nm}$, no hay señal de EPR, lo cual ocurre por el acoplamiento de dos iones cobre antiferromagnéticos [28, 39, 40].

Estos centros catalíticos se han caracterizado mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR) y espectroscopia de UV-Visible [40, 41]. La laccasa tiene actividad sobre grupos orto- y para-difenol, aminofenoles, metoxifenoles, aminas aromáticas y ascorbato, con la reducción concomitante de oxígeno a agua [42].

Siendo una enzima oxido reductasa, la laccasa de *Trametes versicolor* posee sitios de Cu con potenciales redox definidos, Para cobre T1 y T3, algunas laccasas tienen un $E^\circ \approx 0.7-0.8 \text{ V}$. Para cobre T2 su potencial aparece en 0.4 V [43].

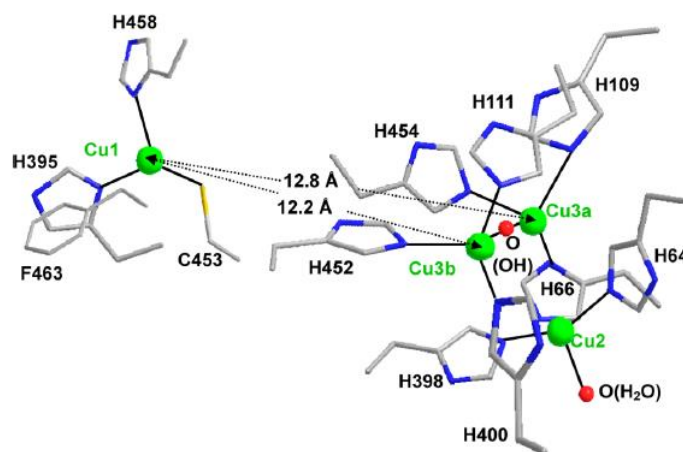


Figura 6. Estructura del sitio activo multicobre en laccasa de *T. versicolor* [44].

El uso de laccasa de *Trametes versicolor* como elemento de reconocimiento en el desarrollo de biosensores ha permitido obtener mejoras en las propiedades fisicoquímicas de la enzima, pues comparado con la enzima libre la inmovilización de la misma suele dar como resultado

una mejor actividad y un decremento en la constante de Michaelis-Menten lo que implica una buena inmovilización en la elaboración de biosensores [45].

Las enzimas han sido el principal elemento de bioreconocimiento empleado en la modificación de sensores (biosensores) y, hasta ahora, continúa siendo base de diferentes publicaciones relacionadas a este campo debido a sus características catalíticas y su manipulación sencilla bajo condiciones suaves de trabajo; debido a estas características la laccasa *de Trametes versicolor* presenta ventajas para su uso en biosensores.

La medición de la actividad enzimática y los efectos de inhibidores nos permiten un mejor conocimiento del catalizador biológico y sus posibles aplicaciones futuras. Existen ciertos compuestos orgánicos e inorgánicos que inhiben la actividad enzimática, como Mn^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , y Cd^{2+} , sulfatos, nitratos y cloruros, ácidos grasos, agentes con grupos sulfhidrilo, detergentes cuaternarios de amonio, cisteína [46, 47, 48].

JUSTIFICACIÓN

Los estudios de calidad de las cuencas hidrológicas han adquirido gran interés en las últimas décadas, debido al incremento de población en sus riberas, el creciente grado de industrialización y los aportes del sector primario que se presentan. La importancia que tiene el estudio de metales en aguas y sedimentos está dada por sus características: elevada toxicidad, alta persistencia y rápida acumulación por los organismos vivos. La investigación de la presencia de metales, permite conocer las rutas de contaminantes y su interacción con otras sustancias presentes [49]. El aporte de información contribuye al diagnóstico de cada cuenca y por consiguiente a facilitar la toma de decisiones en proyectos posteriores, sobre todo en decisiones de carácter gubernamental.

El buscar nuevos métodos para determinar metales en concentraciones bajas o traza son nuevas rutas de estudio y retos que se deben enfrentar debido a la gran complejidad que el problema de contaminación ha provocado, así como al impacto ambiental negativo y los daños a la salud generados.

Así para poder resolver estos problemas, en este trabajo se plantea la utilización de electrodos serigrafados de carbono modificados enzimáticamente con laccasa de *Trametes versicolor*, para poder realizar la cuantificación de mercurio(II) en solución acuosa cuando se tienen concentraciones traza. Este tipo de electrodos tiene un rango de sensibilidad muy alto, puede ser usado *in situ* y es una técnica de bajo costo, comparado con las técnicas analíticas clásicas en el análisis de metales, como Absorción Atómica, Espectrometría de emisión acoplada a plasma y Cromatografía de iones; en donde las técnicas requieren de equipos más sofisticados e insumos de alto valor comercial.

HIPÓTESIS

Es posible lograr la cuantificación de mercurio(II) en solución acuosa, empleando electrodos serigrafiados modificados con laccasa de *Trametes versicolor* como sistema de reconocimiento biológico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un biosensor serigrafiados modificado con laccasa de *Trametes versicolor* de *Trametes versicolor* para la cuantificación electroquímica de mercurio(II) en solución acuosa.

Objetivos particulares

1. Obtención de parámetros cinéticos para laccasa de *Trametes versicolor*.
2. Desarrollar un electrodo modificado enzimáticamente, empleando laccasa de *Trametes versicolor*.
3. Obtención de parámetros cinéticos para laccasa de *Trametes versicolor* inmovilizada.
4. Estudiar el comportamiento electroquímico del mercurio(II) con el electrodo modificado.
5. Determinar las condiciones óptimas de cuantificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudios espectrofotométricos

Laccasa de *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2), con actividad de 13.6 U/mg, de Sigma, acetato de sodio trihidrato (JT Baker), ácido acético glacial (Laboratorios Lutz, México) 60.05%; ácido caféico, ácido gálico y catecol (Fluka); etanol (Sigma-Aldrich) grado HPLC, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ de Sigma Aldrich; agua desionizada obtenida de equipo MilliQ.

Análisis cinéticos

La laccasa de *Trametes versicolor* ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue incubada por separado con cada uno de los sustratos evaluados (ácido caféico, catecol y ácido gálico) a temperatura ambiente, en concentraciones que varían de 0 a $250 \mu\text{M}$ para ácido caféico y de 0 a $1400 \mu\text{M}$ para catecol y ácido gálico, para cada caso se siguió el aumento en la concentración del producto de reacción (cafeoquinona, o-quinona y ácido gálico oxidado) a 410, 390 y 385 nm respectivamente; empleando para su medición un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20. Todos los experimentos se realizaron en buffer de acetatos 0.1 M y pH = 4.5.

Inhibición enzimática

Para determinar el efecto de los iones mercurio en la actividad enzimática se evaluó el tiempo de incubación y la concentración del inhibidor.

Tiempo de incubación

La enzima (laccasa de *Trametes versicolor*, [$10 \mu\text{g mL}^{-1}$]) fue incubada a una concentración de iones $\text{Hg}(\text{II})$ de 2 mM durante tres diferentes tiempos (2, 5 y 10 min) en un medio de buffer 0.1 M de acetatos pH = 4.5. Después de este procedimiento realizado a temperatura ambiente, se

adicionaron concentraciones de 0 a 250 μM de ácido caféico como sustrato, con la finalidad de probar la actividad enzimática.

Concentración de inhibidor

El efecto de la concentración de Hg(II) sobre la actividad enzimática fue evaluado variando las concentraciones del ion metálico durante el proceso de incubación (0.001 a 4 mM de Hg(II)) colocándose a 2 minutos de contacto. La actividad residual de la enzima se probó agregando ácido caféico en concentraciones de 0 a 250 μM .

Modificación del sensor

Para la modificación del sensor se emplearon electrodos serigrafados, con una conformación de tres electrodos, siendo el electrodo de trabajo y contraelectrodo impresos en tinta de carbono, mientras que el pseudoelectrodo de referencia en tinta de plata-cloruro de plata ($\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$).

El método de inmovilización de la enzima se llevó a cabo mediante un proceso de reticulado, usando para este fin glutaraldehído como reticulante, y temperatura (40 °C) durante 20 h. Se colocan 5 μL de la solución de glutaraldehído (2.5%) y enzima (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre el electrodo de trabajo, posterior a ello se colocan a temperatura bajo las condiciones antes mencionadas.

Caracterización electroquímica

Se colocaron 5 mL de buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5)^[50] en una celda termostatada (30°C) a la cual se le adicionaron 100 μL [100 mM] de hidroquinona, se agitó por 30 s y posteriormente se realizó un barrido de potencial desde -800 a 1000 mV comenzando con la oxidación del sustrato y una posterior reducción electroquímica usando un potenciostato - galvanostato BASi Epsilon.

Determinación de constantes cinéticas

En una celda termostatada (30°C) se colocaron 5 mL de buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5), imponiendo un potencial de -300 mV. Se adicionaron alícuotas de ácido caféico, hidroquinona, catecol y ácido gálico, cada sustrato por separado, a diferentes concentraciones con el fin de observar el comportamiento cinético del sensor para cada sustrato. Se empleó un detector amperométrico BAS LC-4C.

Las constantes cinéticas fueron obtenidas mediante el procesamiento de los datos experimentales, utilizando el software OriginPro 2016 con el modelo de Michaelis-Menten. Estas constantes cinéticas se evalúa siguiendo la reducción de los productos de la reacción enzimática formados por la laccasa de *Trametes versicolor* a diferentes concentraciones de cada uno de ellos.

Determinación de mercurio(II) con el biosensor

Todos los sensores se modificaron con laccasa de *Trametes versicolor* (4 µg, 0.054 UE). Cada sensor fue incubado a concentraciones diferentes de iones Hg(II) (0.2 a 1000 µM) durante 20 minutos como tiempo de contacto en un medio de buffer 0.1 M de acetatos pH = 4.5 para todos los casos. Después de este procedimiento realizado a temperatura ambiente, se colocó cada sensor en una celda termostatada (30° C) agregando alícuotas de ácido cafeico aumentando la concentración de 0 a 3166 µM, con la finalidad de probar la actividad enzimática después de la inhibición.

Con los valores de $V_{m\acute{a}x}$ obtenidos del experimento anterior se construirá la curva de inhibición, de la cual será tomada la parte lineal para desarrollar una curva de calibración posterior.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LACCASA DE *TRAMETES VERSICOLOR* PARA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS E INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LACCASA DE *TRAMETES VERSICOLOR* PARA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS E INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Introducción

Las enzimas representan un tipo especial de catalizador homogéneo. Se caracterizan por ser proteínas grandes capaces de incrementar altamente las velocidades de reacción en condiciones de reacción suaves, las cuales muestran una especificidad y capacidad de regulación muy alta [51] en donde la especificidad es dada por la estructura de la enzima (sitio activo) para llevar a cabo las rutas metabólicas [52].

La cinética enzimática es la disciplina que estudia cómo se llevan a cabo las reacciones enzimáticas, la velocidad de transformación y la influencia de las condiciones ambientales en el proceso de la reacción [53]. La función de desarrollar un modelo cinético es conocer los factores experimentales que determinan la respuesta del sensor, para determinar la concentración del analito, sustrato y su respuesta. [54]

Una reacción enzimática se lleva a cabo mediante la formación de un complejo formado entre la enzima y el sustrato [55], así tomando en cuenta los pasos de la reacción enzimática (Figura 7) se puede obtener que el grado de reacción total está dado por las reacciones individuales.

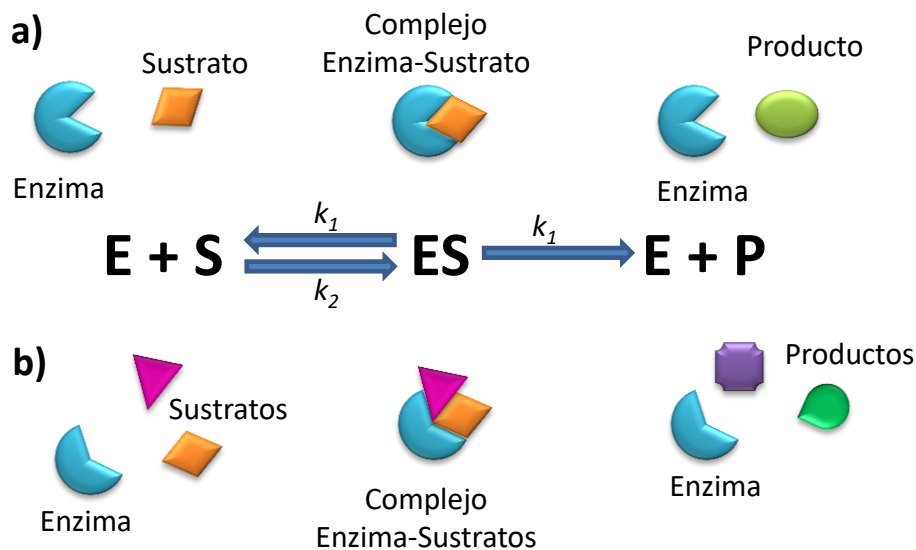


Figura 7. Ejemplos de reacciones enzimáticas, a) con un solo sustrato, b) con dos sustratos.

Para entender la acción de la enzima es necesario estudiar la velocidad de la reacción y el estudio de la velocidad de la reacción, así como la relación de la cantidad disponible del sustrato. Michaelis y Menten publicaron un artículo [56] en el cual establecen la relación entre la velocidad de una reacción enzimática y la concentración del sustrato de acuerdo con la ecuación:

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad [1]$$

En donde V_o es la velocidad de reacción a una concentración de sustrato dada, V_{max} se refiere a la velocidad máxima de transformación de la enzima, $[S]$ es la concentración de sustrato y K_m es la constante de Michaelis-Menten [57], su valor corresponde a la concentración de sustrato en la que la velocidad de reacción es la mitad del máximo (Figura 8 a).

La velocidad de reacción aumenta a medida que la concentración del sustrato incrementa con tendencia a alcanzar un máximo [58] de acuerdo con la Ecuación 1, es en ese momento cuando la enzima se encuentra saturada, es decir que todos los sitios activos están ocupados.

En 1934, Hans Lineweaver y Dean Burk describieron una modificación de la ecuación de Michaelis-Menten [59] (Ecuación 2). En la representación gráfica de esta nueva ecuación, la función de $1/V_o$ contra $1/[S]$ es una línea recta (Figura 8 b), donde la intersección con el eje x es $1/V_{max}$, mientras que la pendiente representa K_m/V_{max} [60].

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad [2]$$

El análisis de datos experimentales mediante la regresión de Lineweaver-Burk se convirtió en una herramienta útil para calcular los parámetros cinéticos enzimáticos. Actualmente gracias a los softwares computacionales se ha facilitado el uso de la ecuación de Michaelis-Menten para el cálculo de valores precisos de K_m y V_{max} , sin embargo, el diagrama de Lineweaver-Burk se mantiene útil para corroborar el comportamiento enzimático y el estudio del efecto de inhibidores enzimáticos.

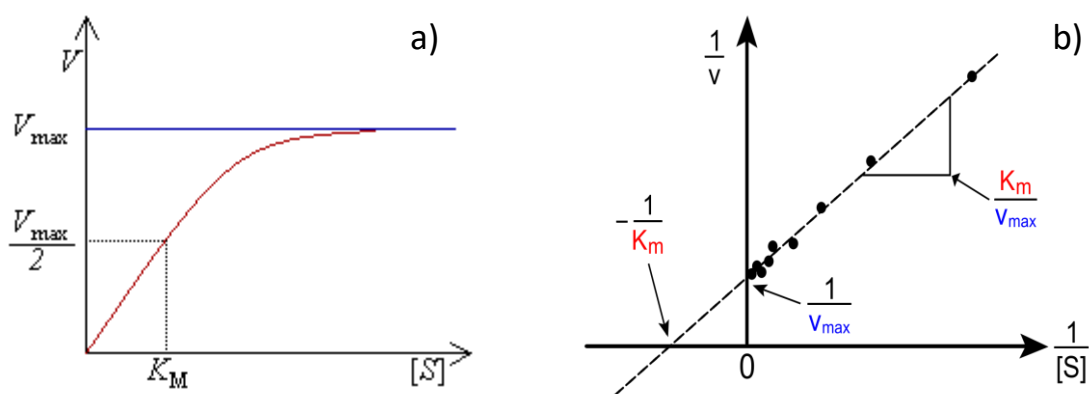


Figura 8. a) Representación gráfica de la velocidad de una reacción enzimática donde se puede observar los parámetros básicos de la ecuación de Michaelis-Menten. b) Diagrama de Lineweaver-Burk, observándose los parámetros cinéticos a partir de los recíprocos de velocidad y concentración de sustrato.

Resultados

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1 Spectrophotometric quantification of mercury(II) by Laccase inhibition: Kinetics and
2 inhibition mechanism.
3
4
5 Elba Socorro Rosas-Tate^a, María Teresa Ramírez-Silva^b, Gabriela Roa-Morales^a,
6 Patricia Balderas-Hernández^a, Mario Romero-Romo^c, Carlos Eduardo Barrera-Díaz^a
7 and Jorge Juárez-Gómez^{a,b,*}
8
9
10
11
12 ^a Universidad Autónoma del Estado de México, UAEMex, Centro Conjunto de
13 Investigación en Química Sustentable CCIQS, UAEM-UNAM, Carretera Toluca-
14 Atlacomulco, km 14.5, C.P. 50200 Toluca, México.
15
16 ^b Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Química, Área de
17 Química Analítica, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340
18 Ciudad de México, México.
19
20 ^c Departamento de Materiales, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, Av.
21 San Pablo 180, Col. Reynosa-Tamaulipas, Azcapotzalco, C.P. 02200, Ciudad de
22 México, México.
23
24 * Corresponding author. Tel.: +52 55 58 04 46 70.
25 E-mail address: el_inge85@hotmail.com(J. Juárez-Gómez).
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

This work proposes a spectrophotometric method to determine mercury (II) ions in aqueous solution. This method is based on the metallic ions effect over the *Trametes versicolor* Laccase enzyme catalytic activity. The enzymatic kinetics was obtained for different substrates (caffeic acid, gallic acid and catechol), where caffeic acid displayed the greatest enzymatic activity. The Laccase inhibition by mercury ions permitted to establish the inhibition effect through a mixed model (that actually displayed a behavior closer to that of the non competitive inhibitors) when evaluated by means of UV-Vis spectrophotometry, using caffeic acid as an electron donor. A mercury concentration of 2 mM led to 45% enzymatic inhibition after only a 2-minute incubation period. This method was used for quantification of mercury ions in aqueous solution, showing a detection limit of $3.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$. Therefore, this work presented a novel perspective for the determination of the toxic Hg(II) ions that can be readily implemented into environmental remediation methods.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

35 **Keywords:** Mercury quantification; Laccase inhibition; Enzymatic kinetic; Inhibition
36 mechanism.

37

38 **1. Introduction**

39 Laccase is a multicopper enzyme commonly found in plants, fungi and bacteriae [1];
40 this enzyme is related to the diverse functions, such as lignine synthesis and plant
41 protection structures, sporulation, lignine degradation and pathogenesis (fungi), of the
42 previously mentioned organisms [2,3]. The laccases have been studied for possible
43 applications in the paper industry, due to their lignine degradation capacity [4], as well
44 as in the treatment of wastewater contaminated by phenol compounds [5]. This enzyme
45 also has the capacity to oxidize polyphenols, phisenols, metoxy substitutes, diamines
46 and other types of compounds [6]. The transformation of the substrate is carried out by
47 means of redox processes of the copper atoms distributed in three catalytic centers:
48 Type 1, strong absorption in the visible region $\epsilon > 3,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 600 nm, spectrum
49 of EPR with $A_{\parallel} < 95 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$; Type 2 or normal center, undetectable UV absorption,
50 line of the EPR having a typical shape corresponding to low molecular weight Cu
51 complexes; and Type 3 or coupled binuclear center, strong absorption in the near-UV
52 with $\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$, with no EPR signal, which occurs through coupling the two
53 antiferromagnetic copper ions [7,8]. These catalytic centers have been characterized by
54 means of electron paramagnetic resonance (EPR) [8, 9].

55 The measurement of the enzymatic activity and the inhibiting effects should lead to a
56 betterment of the biologic catalyst knowledge and its possible applications in the near
57 future. There are certain organic and inorganic compounds that inhibit the enzymatic
58 activity, like Mn^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , sulphates, nitrates and chlorides, fatty acids,
59 sulfhydryl groups agents, quaternary ammonium detergents and cysteine [10-12].

60 The presence of these metal ions in the environment has dangerously damaged it and
61 given rise to various harmful effects to human health, all of them sharing a common
62 anthropogenic origin, since they derive from mining and coal burning industrial
63 activities [13]. Mercury exists in various forms: inorganic (ionic and metallic), to which
64 humans are exposed to as an occupational hazard; and organic (ethylmercury,
65 methylmercury and phenylmercury, mainly). These forms differ in their degree of
toxicity and the effects on the nervous, digestive and immunologic systems, as well as
on lungs, kidneys, skin and eyes [14-16].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

68 Several mercury(II) ions inhibition studies have been reported using various enzymes,
69 such as Laccase (*Daedalea quercina*; *Leptographium qinlingensis*), where mercury
70 turned out to be the most potent inhibitor, attaining up to 98% inhibition at an ion
71 concentration of 10 mM [10,11]; cellulase (*Schizophyllum commune*), which exhibits
72 high sensibility toward mercury, modifying the spectrophotometric features of the
73 enzyme [17]; invertase (yeast), which gives a larger inhibition respect to Ag⁺ ions, and a
74 inhibition from 10⁻⁷ M [18], α -amylase (*Paecilomyces variotii*), displaying a relative
75 activity of 77% when adding a 10 Mm Hg²⁺ concentration [19], 5-aminolevulinic
76 dehydratase acid (corn), where the mercury(II) ions modify the affinity toward the
77 substrate and reaction rate, with the results based on the evaluation of K_m and V_{max} [20],
78 xylanase (*Trichoderma inhamatum*), displaying an enzymatic activity of 14.4% (2 mM)
79 and 4.0% (10 mM) for xylanase type 1, as well as an activity of 15.6% (2 mM) and
80 5.9% (10 mM) mercury(II) [21].

81 This work presents the results concerning the spectrophotometric study of Laccase from
82 *Trametes versicolor* with three different substrates (caffeic acid, gallic acid and catechol);
83 evaluating their activity and inhibition degrees in presence of mercury(II), observing
84 that millimolar mercury concentrations can reduce the Laccase reaction extent. The
85 assessment of the enzymatic activity and the effects of the inhibitors will allow a better
86 knowledge of the biologic catalyst and its possible future applications, like the indirect
87 quantification of the inhibitor itself.

88 89 **2. Materials and methods**

90 Laccase from *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2), with an activity of 13.6 U/mg, from
91 Sigma, sodium acetate trihydrate (JT Baker), acetic acid glacial (Laboratorios Lutz,
92 México) 60.05%; caffeic acid, gallic acid and catechol (Fluka); ethanol (Sigma-Aldrich)
93 HPLC degree, Hg(NO₃)₂ from Sigma Aldrich; deionized water from a MilliQ Millipore
94 equipment.

95 **Kinetic Analyses and enzymatic inhibition**

96 The kinetic UV-Vis tests were carried out in a Perkin Elmer Spectrometer Lambda 20.
97 The absorbance of the caffeic acid oxidation was monitored at 410 nm using different
98 substrate concentrations (10-250 μ M); the catechol oxidation absorbance was monitored
99 at 390 nm with different substrate concentrations (100-1400 μ M); the gallic acid
100 oxidation absorbance was monitored at 385 nm with different substrate concentrations
101 (100-1400 μ M). The Hg(II) concentrations for Laccase inhibition were: 0.05, 0.1, 0.5, 1,

102 2, 3 and 4 mM. The incubation times for inhibition were 2, 5 and 10 minutes of contact.
103 The Laccase concentration was $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for all cases. All tests were carried out at
104 ambient temperature in 1 cm optical path quartz cells in an acetate buffer (0.1 M pH
105 4.5).

106

107 3. Results and discussion

108 The Laccase is considered a nonspecific enzyme, capable of oxidizing a wide variety of
109 phenolic compounds, which is why this work used substrates like the caffeic acid, gallic
110 acid and catechol for the kinetic studies.

111

112 3.1. Characterization of the system and enzymatic kinetics

113 The system was characterized through UV-Vis spectroscopy from 800 to 200 nm; the
114 results are shown in **Figure 1a**: it can be observed that *Trametes versicolor* Laccase
115 (TvL), displayed two maximum absorption bands, at 210 and 275 nm; whereas the
116 caffeic acid (CA) shows three maximum absorption bands at 241, 285 and 322 nm. The
117 (CA) oxidation product (caffeo-quinone, labeled as CAQ) presents three absorption
118 maxima at 250, 322 and 410 nm. The signal of the CAQ at 410 nm allows quantifying
119 the enzymatic reaction product to enable the kinetic studies without interferences. The
120 remaining substrates were also characterized as well as the oxidation products: the
121 catechol (CT) exhibited two absorption bands with maxima at 227 and 270 nm, while
122 the o-quinone (Q) presents a maximum absorption at 390 nm. The gallic acid (GA)
123 showed only one maximum absorption at 260 nm, and its oxidation product showed
124 absorption maxima at 256 and 395 nm.

125 **Figure 1b** shows the absorbance at 410 nm as a function of time for different CA
126 concentrations. It can be observed that for each CA concentration the absorbance
127 increases linearly until attaining reaction equilibrium, where the absorbance remains
128 constant; the time to reach equilibrium increases with the substrate concentration,
129 although it can be stated that at 8 minutes all concentrations have reached equilibrium.
130 Furthermore, it is also observed that the slope of the linear segment increases with
131 substrate concentration up to $100 \mu\text{M}$, where the said slope ceases to increase,
132 indicating then enzymatic saturation. The slope of the linear segments in these kinetic
133 plots represents the absorbance change as a function of time, hence, in accordance with
134 the Lambert-Beer law [22], the slope represents also a concentration change of the
135 reaction product as a function of time, in other words, the enzymatic reaction rate.

136
137 **Figure 1c** shows the results of fitting the Michaelis-Menten kinetic model into the
138 initial enzymatic reaction rate as a function of the CA concentration [23-27], giving a
139 $K_m = 43 \pm 6 \mu\text{M}$ and a $V_{max} = 90 \pm 3 \mu\text{M s}^{-1}$. **Figure 1d** shows the initial enzymatic
140 reaction rate as a function of the GA and CT concentration also with the Michaelis-
141 Menten fitting; the kinetic constants obtained for these substrates were: $85 \pm 1 \mu\text{M}$ and
142 $307 \pm 18 \mu\text{M}$, respectively, whereas the maximal rates were: 24 ± 7 and $33 \pm 6 \mu\text{M s}^{-1}$.
143 These results indicate that the TvL exhibits a greater affinity toward CA since the K_m for
144 this substrate is the smallest. Notwithstanding the saturation for the GA and CT
145 happened at higher substrate concentrations, for both cases the initial rates are small as
146 compared with those of the CA, which exhibits high rates at small concentrations.
147 Therefore, the CA was chosen as the substrate for all subsequent studies.

148 149 **3.2. Inhibition time**

150 In order to enable an adequate proposal for the same incubation time for TvL inhibition
151 by Hg (II) ions, a study was carried out at 2, 5 and 10 incubation minutes with constant
152 concentrations of 1 mM mercury. The results are shown in **Figure 2**, where it can be
153 graphically observed that the kinetic behaviors did not display a significant change for
154 the studied inhibition times. It can also be observed that the 1 mM mercury
155 concentration was capable of inhibiting by about 35% the catalytic activity of the TvL.
156 The Michaelis-Menten (K_m) constants for the different inhibition times are shown in
157 **Table 1** together with their maximal rates (V_{max}), the catalytic constants (K_{cat}) and the
158 catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m). All these values show that there is no meaningful
159 difference among the different inhibition times since all the constants values are
160 statistically equal. Therefore, 2 incubation minutes will be the contact time for
161 forthcoming studies section.

162 163 **3.3. Effect of the inhibitor concentration**

164 **Figure 3a** show the effect of the mercury ions concentration on the TvL catalytic
165 efficiency as a function of varying concentrations of the metal ion (0 - 4 mM). The
166 enzyme contact time with the inhibitor was 2 minutes for all concentrations with $10 \mu\text{g}$
167 mL^{-1} TvL, for each experiment. It can be clearly noted that the mercury concentration
168 increments resulted in V_{max} decrements (**Figure 3a** and **Table 2**). Further, the
169 Michaelis-Menten constant increased lightly, which indicates a mixed inhibition

170 mechanism [28, 29]. In order to further clarify this inhibition mechanism, the
171 Lineweaver-Burk double reciprocal plots were evaluated for different inhibitor
172 concentrations (Figure 3b). The convergence of the data series on the Y axis of the
173 Lineweaver-Burk plots is typical of a competitive inhibition mechanism, in which the
174 value of K_m increases although V_{max} does not; whereas the data convergence on the X
175 axis indicates a noncompetitive mechanism, where in this case K_m does not change but
176 V_{max} diminishes. The analyses of the Lineweaver-Burk double reciprocal plots indicate
177 that the mercury inhibition mechanism by TvL is carried out through a mix of the
178 previous models (mixture of the competitive and noncompetitive), even if the nonlinear
179 regressions (Figure 3a and Table 2) seem to suggest that the inhibition model is closer
180 to the model. It can also be observed from Figure 3c that for a mercury concentration of
181 0.5 mM the enzymatic response was inhibited to 30 %, whereas the 1 mM
182 concentration was inhibited to a 35%. Lastly, for 2, 3 and 4 mM metal concentrations an
183 inhibition of approximately 45 % was attained without significant change.

184
185 Table 2 shows the enzymatic activity parameters for TvL after being inhibited with
186 different mercury ion concentrations, from which it can be said that at 2, 3 and 4 mM
187 inhibitor concentrations, effectively the response remains constant. Also, the Michaelis-
188 Menten constant increases with the mercury concentration and from 2 mM mercury it is
189 statistically identical. As expected, the maximum rate value decreases with increasing
190 inhibitor concentration, which proves also that the enzyme is being inhibited. It can also
191 be noted that the catalytic constant (k_{cat}) and the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) diminish
192 with increasing mercury concentration until it remained constant at higher inhibitor
193 concentrations. All these results reveal the possibility to use the TvL inhibition for the
194 mercury (II) quantification in aqueous solution.

195 196 3.4. Mercury (II) determination in synthetic samples

197 Several calibration plots were built in order to determine mercury (II) in synthetic
198 samples as a function of the metal ion concentration, keeping the TvL concentration
199 constant at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ and 2 minutes in contact with the inhibitor. Figure 4 shows the
200 calibration plot; the method rendered a detection limit of $3.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ and a linear
201 range of 0.05 to 0.7 mM. A summary of the results of the mercury (II) determination in
202 synthetic samples is shown in Table 3. For mercury concentrations of 0.15, 0.55 and
203 1.00 mM the percent recover were as follows: 97.3, 101.6 and 102.1 %, respectively,

204 with errors smaller than 7%.
205
206 **3.5. Comparison with the literature**
207 **Table 4** shows a comparison between the methods proposed in the literature and that
208 described in the present work for determining mercury (II) in aqueous solution, all of
209 them based on the same enzymatic inhibition principle. It is worthwhile to state that
210 there are only a few methods based on this principle of using free enzymes (not
211 immobilized). Conversely, there are numerous methods reported using enzymes
212 immobilized on a polymer network to modify Pt, Au, glassy carbon, carbon paste and
213 printed electrodes, among others. It is also important to point out that a large number of
214 works have used enzymes like glucose oxidase (Gox), invertase, urease, and others, to
215 be inhibited by mercury, although Laccase has been much less studied. The method
216 reported here is comparable with some other methods reported insofar as their detection
217 limit, even though this is not the case for the majority of them, because they report
218 detection limits inferior to those in this work. However, the method reported here
219 presents other advantages because the enzyme is free in solution, apart from the fact that
220 the amount of Laccase needed for each analysis is very small ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) as well as
221 the buffer solution (2 mL), and lastly, the analyses cost is indeed small, but in particular
222 because they are coupled to a quick and simple procedure.
223
224 **4. Conclusions**
225 The Laccase enzymatic inhibition through mercury(II) ions was reported, establishing a
226 mixed inhibition model (preferable to a non competitive inhibition model) by means of
227 UV-Vis spectrophotometry. The TvL enzyme presents higher activity when using
228 caffeic acid as a substrate, in comparison to gallic acid and catechol, fitting in the
229 Michaelis-Menten with constants of: 43 ± 6 , 85 ± 1 and $307 \pm 18 \mu\text{M}$, respectively.
230 Small mercury (II) ions concentrations did inhibit the TvL enzymatic activity in only 2
231 contact minutes, without meaningful difference at greater times. Then, the mercury
232 Laccase inhibition was used for quantification of the metal ion. The method reported
233 here exhibited a detection limit of $3.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ with a linear dynamic interval of 0.05 -
234 0.7 mM mercury ($R^2=0.9685$). Further, the method is fast and simply implemented into
235 other procedures of environmental remediation.
236
237 **5. Acknowledgements**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

238 Rosas-Tate and Juárez-Gómez thank CONACyT for the grant given for the Master's
239 degree and postdoctoral research, respectively. MTRS, GRM, PBH, MRR, CEBD and
240 JJG wish to thank the SNI for the distinction of their membership and the stipend
241 received. The authors thank the UAEM for financial support through the project
242 3736/2014/CID. MTRS and JJG thanks CONACyT for the “Cátedra” 2159 and for
243 support through project 237327. Finally, the authors would like to thank Manuel López
244 Segundo who proofread the English text.

245 6. References

- 246 [1] C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales-Álvarez, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-
247 Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, J.M. Delgado-Boada, Fungal laccases, Fungal Biol.
248 Rev. 27 (2013) 67-82.
- 249 [2] U.N. Dwivedi, P. Singh, V.P. Pandey, A. Kumar, Structure–function relationship
250 among bacterial, fungal and plant laccases, J. Mol. Catal. B-Enzym. 68 (2011) 117-128.
- 251 [3] A. Messerschmidt. Chapter 8.14 Copper Metalloenzymes in Comprehensive Natural
252 Products II, Chemistry and Biology, L. Mander, H.W. Liu (eds.) Elsevier Oxford, Italy,
253 2010, pp 530-532.
- 254 [4] H. Catherine, M. Penninckx, D. Frédéric, Product formation from phenolic
255 compounds removal by laccases: A review, Environ. Technol. & Innovation. 5 (2016)
256 250-66.
- 257 [5] J.A. Majeau, S.K. Brar, R.D. Tyagi, Laccases for removal of recalcitrant and
258 emerging pollutants, Bioresource Technol. 101 (2010) 2331-50.
- 259 [6] C.F. Thurston, The structure and function of fungal laccases, Microbiology. 140
260 (1994) 19-26.
- 261 [7] E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin, Multicopper Oxidases and
262 Oxygenases, Chemical Reviews. 96 (1996) 2563-2606.
- 263 [8] I. Bento, M.A. Carrondo, P.F. Lindley, Reduction of dioxygen by enzymes
264 containing copper, J. Biol. Inorg. Chem. 11 (2006) 539-47.
- 265 [9] E.I. Solomon, M.J. Baldwin, M.D. Lowery, Electronic structures of active sites in
266 copper proteins: contributions to reactivity. Chemical Reviews. 92 (1992) 521-42.
- 267 [10] P. Baldrian, Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus
268 *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme, Appl. Microbiol.
269 Biotechnol. 63 (2004) 560-563.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

304 [26] A. Cornish-Bowden, One hundred years of Michaelis–Menten kinetics,
305 Perspectives in Science. 4 (2015) 3-9.

306 [27] G. Wang, W.M. Post, A note on the reverse Michaelis Menten kinetics, Soil Biol.
307 Biochem. 57 (2013) 946-949.

308 [29] A. Cornish-Bowden, A simple graphical method for determining the inhibition
309 constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors, Biochem. J. 137
310 (1974) 143–144.

311 [30] H. Lineweaver, D. Burk, The determination of enzyme dissociation constants, J.
312 Am. Chem. Soc. 56 (1934) 658-666.

313 [31] H. Mohammadi, M.E. Rhazi, A. Amine, A.M. Oliveira Brett, C.M.A. Brett,
314 Determination of mercury(II) by invertase enzyme inhibition coupled with batch
315 injection analysis, Analyst. 127 (2002) 1088–1093.

316 [32] S. Pirvutoiu, I. Surugiu, E.S. Dey, A. Ciucu, V. Magearu, B. Danielsson, Flow
317 injection analysis of mercury(II) based on enzyme inhibition and thermometric
318 detection, Analyst. 2016 (2001) 1612–1616.

319 [33] A. Samphao, H. Rerkchai, J. Jitcharoen, D. Nacapricha, K. Kalcher, Indirect
320 determination of mercury by inhibition of Glucose Oxidase immobilized on a carbon
321 paste electrode, Int. J. Electrochem. Sci. 7 (2012) 1001 – 1010.

322 [34] O.O. Soldatkin, I.S. Kucherenko, V.M. Pyeshkova, A.L. Kukla, N. Jaffrezic-
323 Renault, A.V. El'skaya, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, Novel conductometric
324 biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal
325 ions, Bioelectrochemistry. 83 (2012) 25–30.

326 [35] A. Ciucu, Fast spectrometric method for mercury(II) determination based on
327 glucose-oxidase inhibition, Anal. Lett. 43 (2010) 1377–1386.

328 [36] K. Deshpande, R.K. Mishra, S. Bhand, A high sensitivity micro format
329 chemiluminescence enzyme inhibition assay for determination of Hg(II), Sensors. 10
330 (2010) 6377-6394.

331 [37] H. Mohammadi, A. Amine, S. Cosnier, C. Mousty, Mercury–enzyme inhibition
332 assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix,
333 Anal. Chim. Acta. 543 (2005) 143–149.

334 [38] C. Malitesta, M.R. Guascito, Heavy metal determination by biosensors based on
335 enzyme immobilised by electropolymerisation, Biosens. Bioelectron. 20 (2005) 1643–
336 1647.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

337 [39] S. Cosnier, C. Mousty, A. Guelorget, M. Sanchez-Paniagua Lopez, D. Shan, A fast
338 and direct amperometric determination of Hg^{2+} by a bienzyme electrode based on the
339 competitive activities of Glucose Oxidase and Laccase, *Electroanalysis*. 23 (2011) 1776
340 – 1779.
341 [40] M.R. Guascito, C. Malitesta, E. Mazzotta, A. Turco, Inhibitive determination of
342 metal ions by an amperometric glucose oxidase biosensor: Study of the effect of
343 hydrogen peroxide decomposition, *Sens. Actuators B*. 131 (2008) 394–402.

Table 1. Kinetic constants for different inhibition times of TvL by mercury(II) monitoring the CAQ absorbance at 410 nm in acetates buffer (n = 3).

Inhibition times /(minutes)	K_m /(μM)	V_{max} / ($\mu\text{M s}^{-1}$)	K_{cat} / ($\mu\text{MmL } \mu\text{g}^{-1}$)	k_{cat}/K_m / ($\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$)
0	43 ± 6	90 ± 3	9.0 ± 0.3	0.28 ± 0.03
2	48 ± 5	67 ± 2	6.7 ± 0.2	0.14 ± 0.02
5	48 ± 7	64 ± 3	6.4 ± 0.3	0.13 ± 0.04
10	47 ± 5	70 ± 3	7.0 ± 0.3	0.15 ± 0.03

Table 2. Kinetic parameters for the system TvL-CA as a function of the mercury(II) concentration (n = 3).

[Hg(II)] / (mM)	K_m / (μM)	V_{max} / ($\mu\text{M s}^{-1}$)	K_{cat} / ($\mu\text{MmL } \mu\text{g}^{-1}$)	k_{cat}/K_m / ($\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$)
0	43 ± 4	90 ± 3	9.0 ± 0.3	0.28 ± 0.03
0.01	46 ± 3	85 ± 3	8.7 ± 0.2	0.20 ± 0.01
0.05	49 ± 3	80 ± 2	9.6 ± 0.3	0.20 ± 0.02
0.1	57 ± 4	77 ± 2	6.8 ± 0.2	0.13 ± 0.01
1	53 ± 4	54 ± 2	6.7 ± 0.2	0.11 ± 0.01
2	55 ± 5	53 ± 2	7.3 ± 0.2	0.06 ± 0.01
3	56 ± 6	52 ± 5	7.9 ± 0.5	0.06 ± 0.01
4	54 ± 5	53 ± 3	7.3 ± 0.3	0.07 ± 0.01

Table 2. Kinetic parameters for the system TvL-CA as a function of the mercury(II) concentration (n = 3).

[Hg(II)] / (mM)	K_m / (μM)	V_{max} / ($\mu\text{M s}^{-1}$)	K_{cat} / ($\mu\text{MmL } \mu\text{g}^{-1}$)	k_{cat}/K_m / ($\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$)
0	43 ± 4	90 ± 3	9.0 ± 0.3	0.28 ± 0.03
0.01	46 ± 3	85 ± 3	8.7 ± 0.2	0.20 ± 0.01
0.05	49 ± 3	80 ± 2	9.6 ± 0.3	0.20 ± 0.02
0.1	57 ± 4	77 ± 2	6.8 ± 0.2	0.13 ± 0.01
1	53 ± 4	54 ± 2	6.7 ± 0.2	0.11 ± 0.01
2	55 ± 5	53 ± 2	7.3 ± 0.2	0.06 ± 0.01
3	56 ± 6	52 ± 5	7.9 ± 0.5	0.06 ± 0.01
4	54 ± 5	53 ± 3	7.3 ± 0.3	0.07 ± 0.01

Table 3. Percent recoveries for the mercury determination in synthetic samples (n = 3).

[Hg(II)] ₀ / (mM)	V / (μM s ⁻¹)	% Inhibition	[Hg(II)] _{cal} / (mM)	% recovery
0.15	63.9 ± 0.6	16.4 ± 0.3	0.15 ± 0.01	97.3 ± 5.7
0.55	54.7 ± 0.4	28.5 ± 0.4	0.56 ± 0.03	101.6 ± 5.9
1.00	44.3 ± 1.3	42.1 ± 1.4	1.02 ± 0.07	102.1 ± 6.7

Table 4. Indirect analytical methods for quantification of Hg(II) found in the literature that are based on the principle of enzymatic inhibition.

	Detection Method	LOD / (μM)	Linear interval / (μM)	pH	Incubation time / (min)	Comment	Ref.
Invertase biosensor	Amperometric	0.005- 0.008	0.05-0.2	0.1 M NaOH	10	Biosensor coupled to a batch injection analysis	[31]
Invertase immobilized	Thermometric	0.025	0.025-0.4	7.0	2-6	Coupling to FIA	[32]
Gox biosensor	Amperometric	2.5	10-162	7.0	---	Nafion & MnO ₂ -modified CPE	[33]
Invertase- mutarotase- Gox biosensor	Conductimetric	0.025	---	6.5	10-20	---	[34]
Gox free	Colorimetric	0.075	0.025-5	5.0	2	---	[35]
Alcohol ox. and horseradish peroxidase free	Fluorecence	1.25x10 ⁻⁵	2.5x10 ⁻⁵ - 2.5x10 ⁻¹	7.5	20	---	[36]
Sucrose biosensor	Amperometric	--	10 ⁻² -1.0	6.0	20	---	[37]
Gox biosensor	Amperometric	--	---	7.0	30	---	[38]
Gox and Laccase biosensor	Amperometric	0.15	---	5.0	---	---	[39]
Gox	Amperometric	2.5	2-180	7.0	---	---	[40]
Laccase free	Colorimetric	3.6	50-700	4.5	2	---	This work

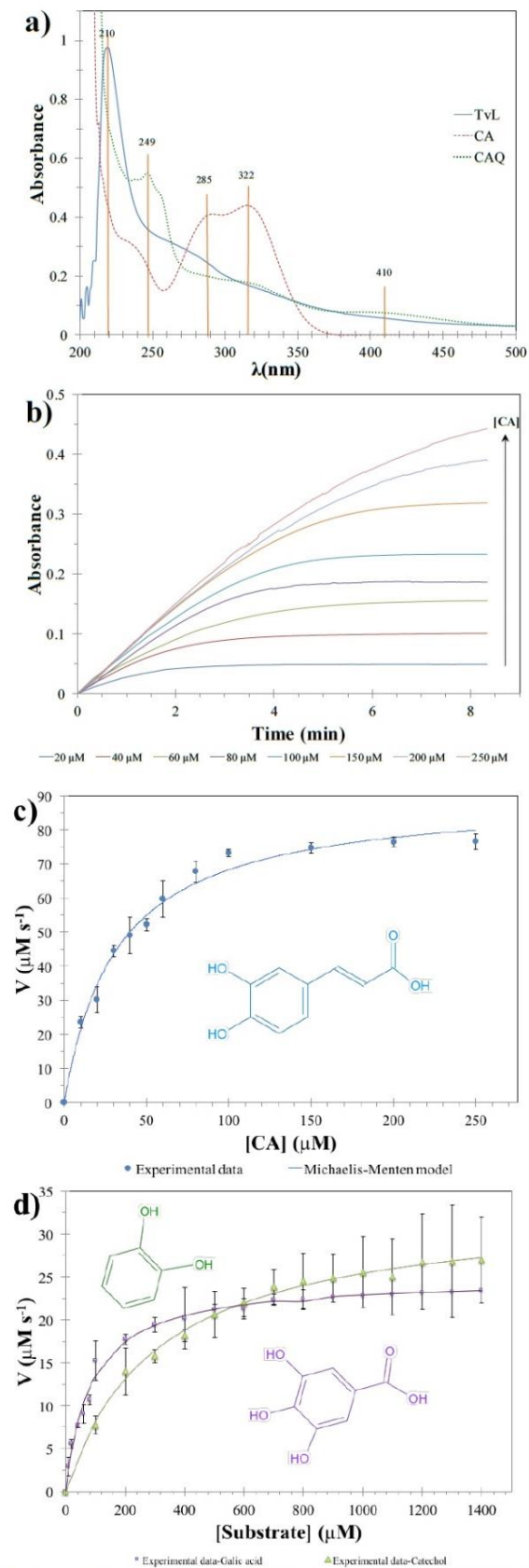


Figure 1. a) Absorption spectra of the TvL, CA and CAQ. b) Absorbance as a function of time for the oxidation reaction of different CA concentrations ($\lambda=410\text{nm}$). c) Spectrophotometric determination of the Michaelis-Menten kinetics for CA oxidation by TvL. d) Spectrophotometric determination of the Michaelis-Menten kinetics for GA and CT oxidation by TvL. All tests were carried out at ambient temperature in acetate buffer (0.1 M pH 4.5).

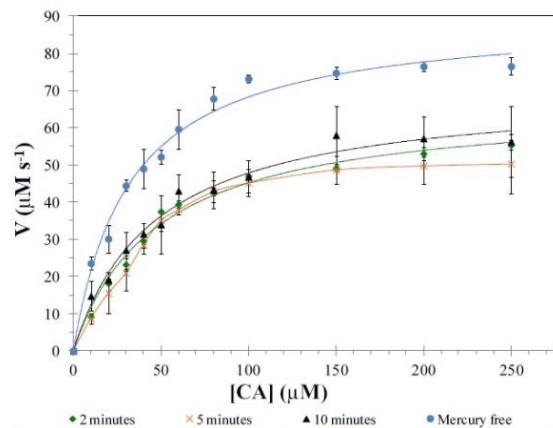


Figure 2. Shows the spectrophotometric determination of the Michaelis-Menten

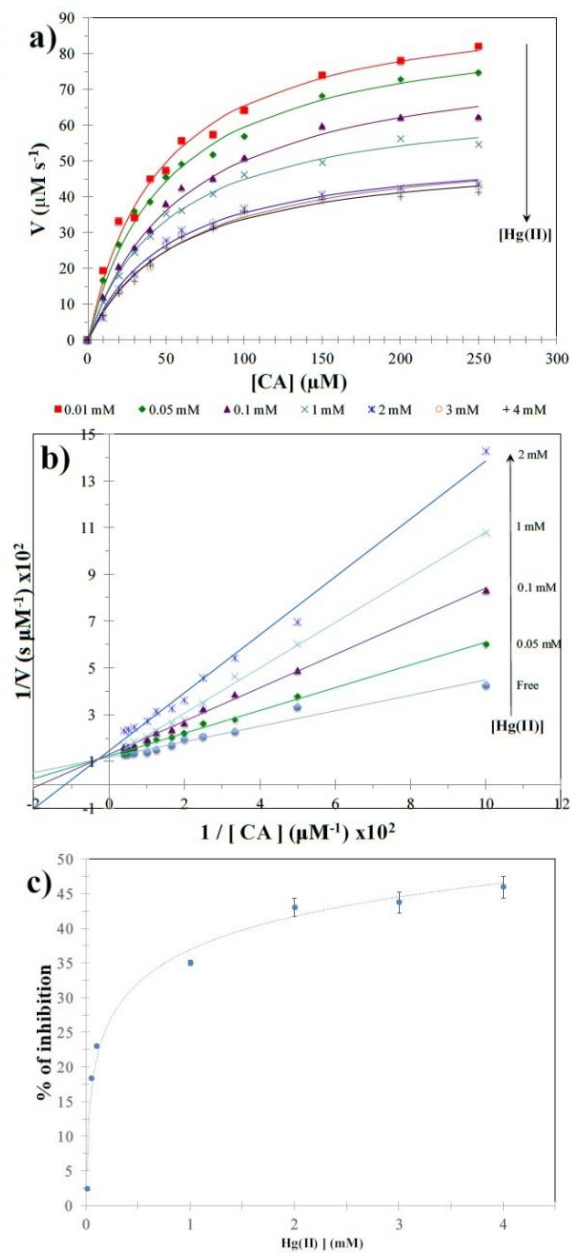


Figure 3. a) Enzymatic reaction rate as a function of caffeic acid concentration for different mercury (II) concentrations. b) Double reciprocal plot ($1/V$ vs. $1/[CA]$) for the system TvL-CA inhibited for different Hg (II) concentrations. c) Inhibition plot of the system TvL-CA at 200 μM of CA and 2 incubation minutes.

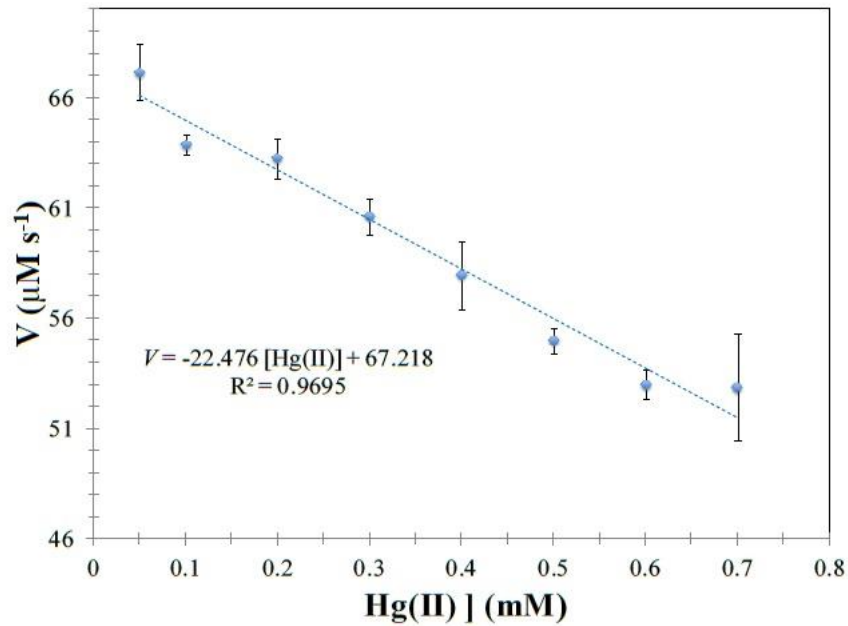


Figure 4. Calibration plot for the initial oxidation rate of 200 μM CA per 10 TvL $\mu\text{g mL}^{-1}$ as a function of mercury concentration. The kinetics were obtained in acetates buffer 0.1 M pH 4.5 monitoring the enzymatic oxidation of CA at 410 nm with 2 incubation minutes.

Discusión general

Al mezclar laccasa de *Trametes versicolor* en solución con ácido caféico se mide la cantidad de cafeoquinona generada por la reacción de oxidación (Figura 9). En los primeros tiempos de reacción, la concentración de producto se ve aumentada notoriamente ya que la reacción enzimática es rápida debido a que la enzima está libre, pero este incremento disminuye, llegando a cero la velocidad de reacción cuando se ha llegado al equilibrio, es decir, la concentración de producto se mantiene constante.

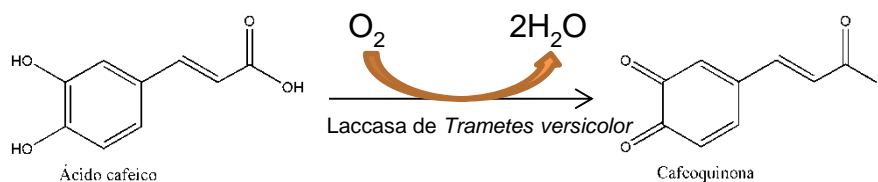


Figura 9. Oxidación de ácido cafeico a cafeoquinona catalizada por laccasa de *Trametes versicolor*.

La determinación de estas constantes cinéticas se basa en la capacidad de medir la velocidad inicial de la reacción enzimática LTV-ácido caféico, así pues las velocidades de reacción están dadas por la pendiente de cada curva, que se encuentra en los primeros instantes de formación de producto. Este comportamiento se ajusta a una función lineal donde la concentración inicial se ha convertido a producto.

En la Figura 1b del artículo se muestra el gráfico de la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato y se observa que los datos experimentales se ajustan bien al modelo cinético de Michaelis-Menten por lo tanto podemos decir que reacción de oxidación de ácido caféico catalizada por LTV se lleva a cabo de la siguiente forma:



La constante de Michaelis es una relación entre las constantes de la Ecuación [1] y viene dada por:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad [4]$$

Entonces a partir del modelo de Michaelis-Menten es posible conocer los parámetros cinéticos V_{\max} y K_m . Conocer la constante de Michaelis es importante ya que a menores valores de K_m la reacción de formación de producto se ve favorecida, por lo cual la afinidad que presentan los sustratos probados de manera experimental es mayor en la siguiente manera: Ácido caféico > Catecol > Ácido gálico.

Inhibición de LTV con Hg(II)

La reacción de oxidación de ácido caféico catalizada con LTV se inhibió con concentraciones de Hg(II) de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 2, 3 y 4 mM y los resultados se muestran en la Figura 3a del artículo. Se observa que la reacción enzimática se ve inhibida con la presencia de iones mercurio. Esta inhibición por iones metálicos puede darse por tres mecanismos [61]:

- a) Oxidación de residuos de aminoácidos que contienen tiol, por iones metálicos.
- b) Pérdida de la estructura terciaria de la proteína debido al desdoblamiento de la enzima.
- c) El tercer mecanismo es la competición entre iones metálicos y sustratos para ocupar los sitios de unión de la enzima.

Para verificar el tipo de inhibidor en función a su competitividad con el sustrato, se linearizan los valores obtenidos del ajuste de Michaelis-Menten, empleando la regresión de Lineweaver-Burk, en donde se grafican los recíprocos de la concentración de sustrato ($1/[S]$) y velocidad ($1/V_0$).

Con base a los datos obtenidos por estas cinéticas y al comportamiento de las pendientes observadas en la gráfica de Lineweaver-Burk se ha determinado que el tipo de inhibición causada por el mercurio(II) es de tipo mixto, acercándose más al tipo no competitivo.

CAPITULO 3

FABRICACIÓN DE BIOSENSORES, CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE CONSTANTES CINÉTICAS

Introducción

Un biosensor es un dispositivo que cuenta con dos partes básicas, una molécula biológica de reconocimiento y un transductor que llevará la señal análoga hasta el dispositivo electrónico. Dentro de las principales moléculas de reconocimiento biológico se encuentran las enzimas, ya que existen varias ventajas asociadas, como son alta selectividad, su actividad catalítica y las condiciones suaves de reacción [62,63].

Para lograr exitosamente el desarrollo de un biosensor es necesaria la inmovilización de enzimas. Estas moléculas catalizan selectivamente la reacción de un analito; modificando el medio donde se lleva a cabo la reacción, siendo necesaria la estabilización de la enzima en la superficie del electrodo para mejorar su eficiencia [64].

Las técnicas de inmovilización enzimática se centran en soportar una enzima en una superficie, con la finalidad de reutilizar la enzima, o bien, restringirla. Existen cuatro tipos generales de inmovilización de enzimas: Enlace covalente, Adsorción, Atrapamiento y Reticulado.

La inmovilización por reticulado es un proceso en el cual se unen químicamente dos o más moléculas mediante enlaces covalentes. Los reactivos empleados para este proceso poseen grupos funcionales específicos en sus extremos con la finalidad de unirse sobre proteínas y otras moléculas.

Uno de los reticulantes más empleados para inmovilización de enzimas es el glutaraldehído (Figura 9), que ha sido utilizado ampliamente en la fabricación de dispositivos médicos, bioprótesis de tejidos y como agente esterilizante. Este reticulante reacciona principalmente

con grupos aminos de proteínas [65], por lo cual es utilizado directamente en la inmovilización de enzimas.

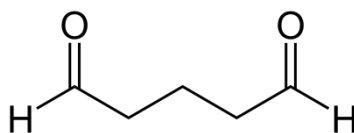


Figura 10. Molécula de glutaraldehído.

Los biosensores se clasifican por los parámetros de medición del transductor, ya sea térmico, óptico, electroquímico, etc. Muchos biosensores emplean técnicas electroquímicas para debido a su fácil construcción y bajo costo [66].

Además de elegir apropiadamente el método de inmovilización es necesario realizar una selección de la enzima como molécula de reconocimiento. En el desarrollo de biosensores electroquímicos se requiere que la enzima sea estable bajo las condiciones de operación, es decir, posea una buena estabilidad [67], para este fin se han empleado diversas oxidorreductasas, proponiéndose en este trabajo el uso de laccasa de *Trametes versicolor* de *Trametes versicolor*.

Las oxidorreductasas son prácticamente la única familia de enzimas con la capacidad de catalizar el consumo y producción de especies electroactivas, como es la oxidación del sustrato en presencia de oxígeno molecular, reduciéndose a H_2O_2 [68].

Las técnicas electroanalíticas pueden ser empleadas en el estudio de diferentes aspectos de las enzimas, como su actividad enzimática, inhibidores y química de su sitio activo. Una de las técnicas más empleadas para la cuantificación de analito empleando biosensores es la amperometría, hablando entonces de biosensores amperométricos.

Los biosensores amperométricos son dispositivos que miden la corriente producida de la oxidación o reducción de un elemento electroactivo, lo cual permite su cuantificación analítica [69], dando como resultado una señal proporcional a la cantidad de especies oxidadas o reducidas en el electrodo (Figura 11). El potencial se mantiene constante a través del electrodo de referencia durante la medición, mientras que se cuantifica la corriente generada por la oxidación o reducción del analito.

En un biosensor el potencial de detección se selecciona de forma que el proceso no se limite por la cinética electroquímica, sino por la reacción enzimática; así, las gráficas de respuesta del biosensor en función del sustrato son parecidas a la gráfica de Michaelis-Menten (velocidad de reacción enzimática [68]).

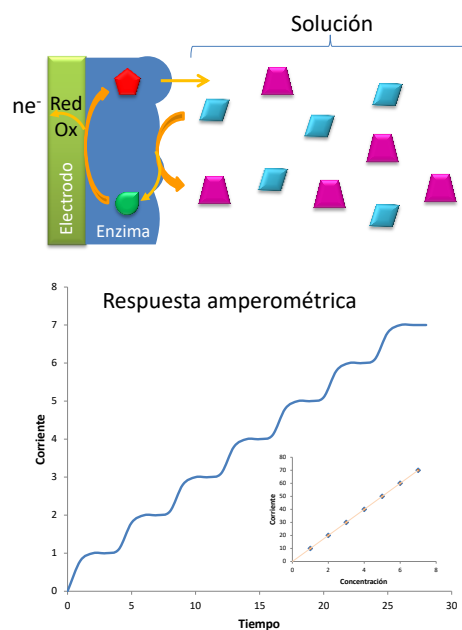


Figura 11. Descripción gráfica de la operación de un biosensor enzimático empleando amperometría.

Resultados y discusión

Para realizar la caracterización electroquímica se empleó un electrodo serigrafiado con tinta de grafito y $\text{Ag}^{\circ}/\text{AgCl}$. Este electrodo posee una configuración de tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y contra electrodo, como se muestra en la [Figura 12](#).

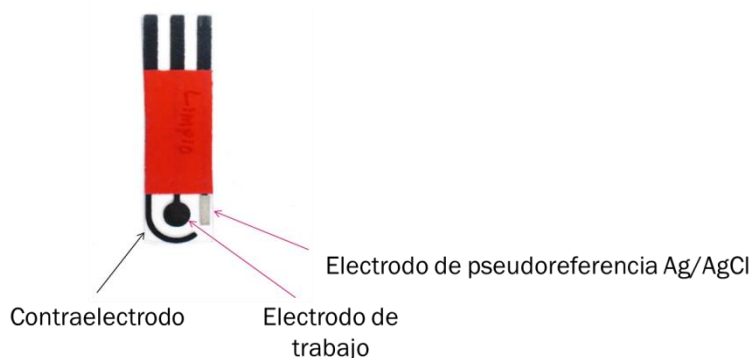


Figura 12. Electrodo serigrafiado contituidos por electrodo de trabajo y contraelectrodo en tinta de de carbono y electrodo de referencia con tinta de $\text{Ag}^{\circ}/\text{AgCl}$.

Para determinar el potencial de oxidación y reducción del ácido caféico se realizaron voltamperogramas cíclicos (Figura 14) en un medio de buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5), a una velocidad de barrido de 0.1 V/s. El primer voltamperograma (línea roja) corresponde a un Electrodo serigrafiado sin ácido caféico, llevándose a cabo un barrido de potencial desde potencial de corriente nula (0.0 mV) en dirección a potenciales positivos hasta 1000 mV, para posteriormente realizar una inversión de potencial, pasando por el potencial de corriente nula hasta llegar a -800 mV. Durante este intervalo de potencial no se observó ningún proceso electroquímico que pudiese intervenir con la medición del sustrato. Este barrido de potencial se realizó bajo las mismas condiciones empleando el electrodo de referencia externa (línea verde), mientras que para el electrodo de pseudoreferencia (línea azul) se realizó comenzando en potencial de corriente nula (0.0 mV) hacia potencial positivo (800 mV), regresando a potencial inicial y llegando a -800 mV.

Los potenciales de oxidación y reducción para cada una de las referencias (externa y pseudoreferencia) se muestran en la Tabla 2, observándose una diferencia tanto en valor de potencial de 0.224 mV, debido a que no existe el equilibrio termodinámico como en el electrodo de referencia [70]. Debido a esta diferencia, se impondrá un potencial de reducción de -300 mV para los estudios amperométricos.

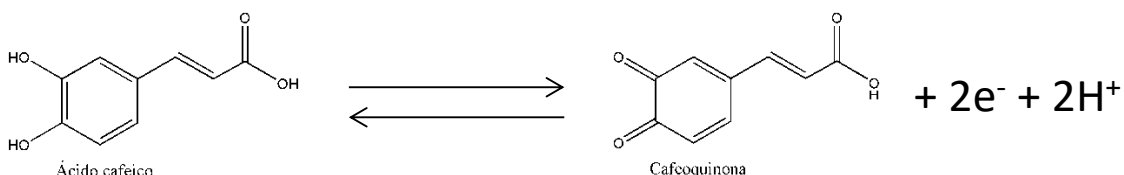


Figura 13. Reacción de oxidación y reducción electroquímica del ácido caféico que se lleva a cabo sobre la superficie del electrodo serigrafiado.

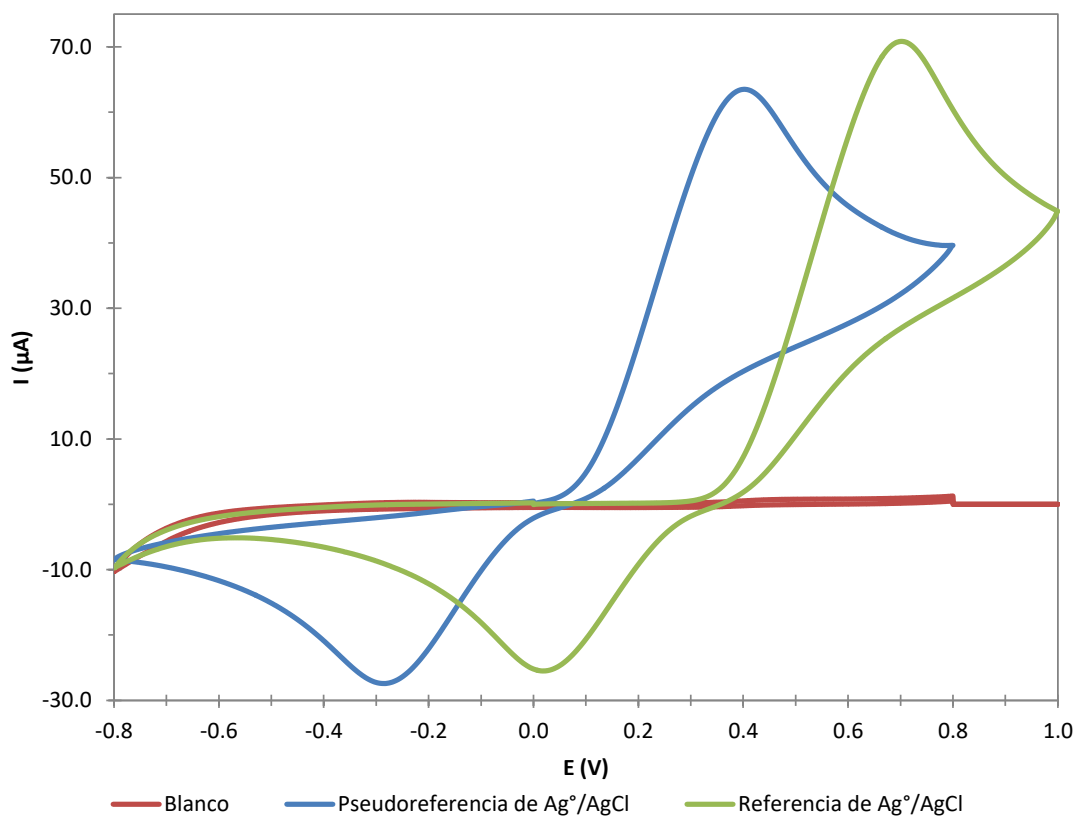


Figura 14. VC de ácido caféico 2 mM, utilizando como referencia un electrodo de $Ag^0/AgCl$, la pseudoreferencia es el electrodo impreso con tinta de $Ag/AgCl$ en el electrodo serigrafiado, a $v = 100$ mV/s en buffer de acetatos (0.1 M pH = 4.5) a 30 °C.

Tabla 2. Valores de potencial e intensidad de corriente para los picos de oxidación y reducción de ácido caféico en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C.

Tipo de referencia	Pico de reducción		Pico de oxidación	
	E (V)	I(μA)	E (V)	I(μA)
<i>Pseudoreferencia</i>	0.385	63.5	-0.244	-27.4
<i>Referencia externa</i>	0.703	70.8	0.0.20	-25.5

Modificación de los electrodos

Para la modificación del electrodo se empleó como técnica de inmovilización de la enzima la reticulación, produciéndose mediante esta técnica sensores robustos y con mejores parámetros analíticos [71]. Para su preparación se usó glutaraldehido como reticulante, y temperatura (40°C) durante 20 h.

Se colocan 5μL de la solución de glutaraldehido (2.5%) y enzima (4μg/μL) sobre el electrodo de trabajo, posterior a ello se colocan a temperatura bajo las condiciones antes mencionadas.

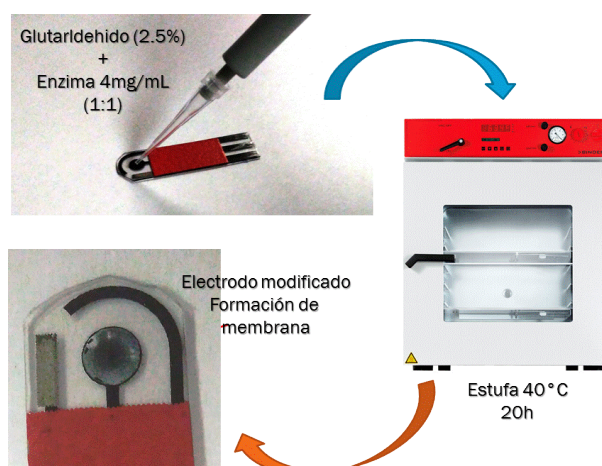


Figura 15. Esquema de modificación del electrodo serigrafiado emplenado glutaraldehido y temperatura para la formación de la membrana.

Determinación de parámetros cinéticos

Para el caso de laccasa de *Trametes versicolor* de *Trametes versicolor* se analizaron cuatro sistemas, los cuales se pueden resumir en la Figura 16. En todos los casos se observa la reacción de óxido-reducción de los grupos fenólicos en presencia de oxígeno.

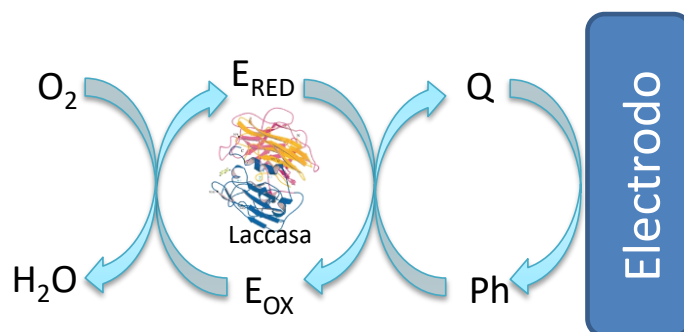


Figura 16. Mecanismo de acción de los electrodos modificados enzimáticamente con laccasa de *Trametes versicolor* para la cuantificación de compuestos fenólicos (Ph y Q son compuestos fenólicos).

Con el fin de conocer los parámetros cinéticos correspondientes a los sustratos estudiados (ácido caféico, hidroquinona, catecol y ácido gálico) se realiza la medición de la corriente producida por el proceso de óxido-reducción que se lleva a cabo en el sistema laccasa de *Trametes versicolor*-sustrato mediante amperometría. Para realizar los experimentos se ocupó un detector amperométrico BAS LC-4C, aplicándose un potencial de -300 mV al electrodo modificado enzimáticamente. En la celda electroquímica se colocó 5 mL de buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) manteniendo una temperatura de 30°C. Para los biosensores amperométricos, la corriente de reducción es proporcional a la concentración de sustrato presente en el medio [72]

La cinética enzimática para el sistema laccasa de *Trametes versicolor* - ácido caféico se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, mostrando un intervalo lineal a concentraciones de 4-27.2 μM , mostrando un ajuste lineal (R^2) de 0.9941, mientras que los parámetros cinéticos obtenidos

para la enzima inmovilizada son $K_m' = 47.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 354.3 \pm 1.6 \mu\text{M/s}$, siendo la intensidad máxima leída de 306.7 nA.

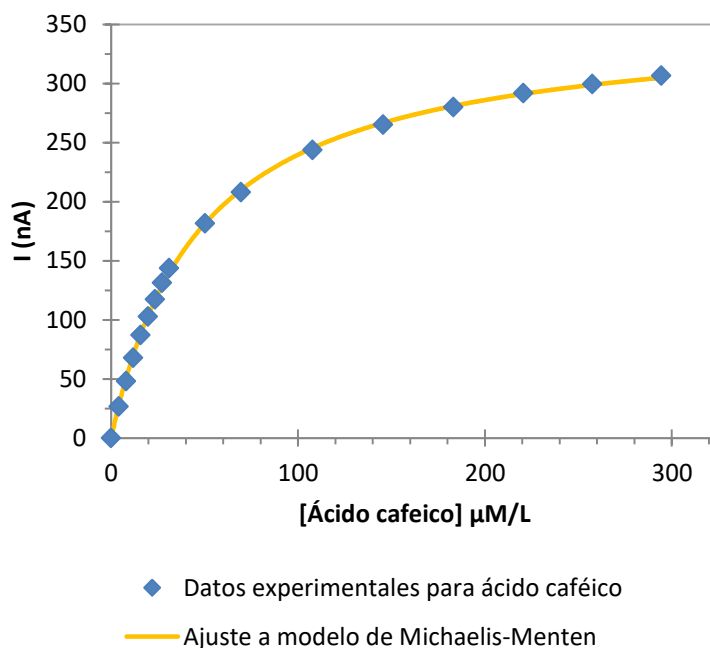


Figura 17. Determinación amperométrica de la cinética de Michaelis-Menten para la reducción de ácido caféico en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

En el caso del sistema laccasa de *Trametes versicolor* - hidroquinona se observa un ajuste al modelo de Michaelis-Menten, mostrando un intervalo lineal a concentraciones de 39.8-196.2 μM, mostrando un ajuste lineal (R^2) de 0.9742, mientras que los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima inmovilizada son $K_m' = 240.1 \pm 11.4 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 143.6 \pm 2.2 \mu\text{M/s}$, siendo la intensidad máxima leída de 135 nA.

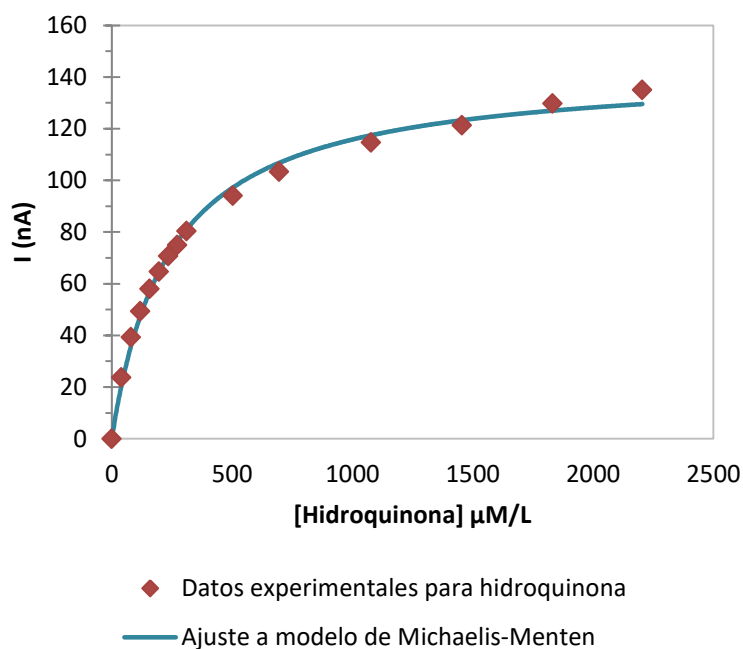


Figura 18. Determinación amperométrica de la cinética de Michaelis-Menten para la reducción de hidroquinona en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

Empleando catecol como sustrato, la cinética de reacción con laccasa de *Trametes versicolor* se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, mostrando un intervalo lineal a concentraciones de 0-310.1 μM , mostrando un ajuste lineal (R^2) de 0.9943, mientras que los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima inmovilizada son $K_m' = 618.7 \pm 26.8 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 83.0 \pm 1.1 \mu\text{M/s}$, siendo la intensidad máxima leída de 74 nA.

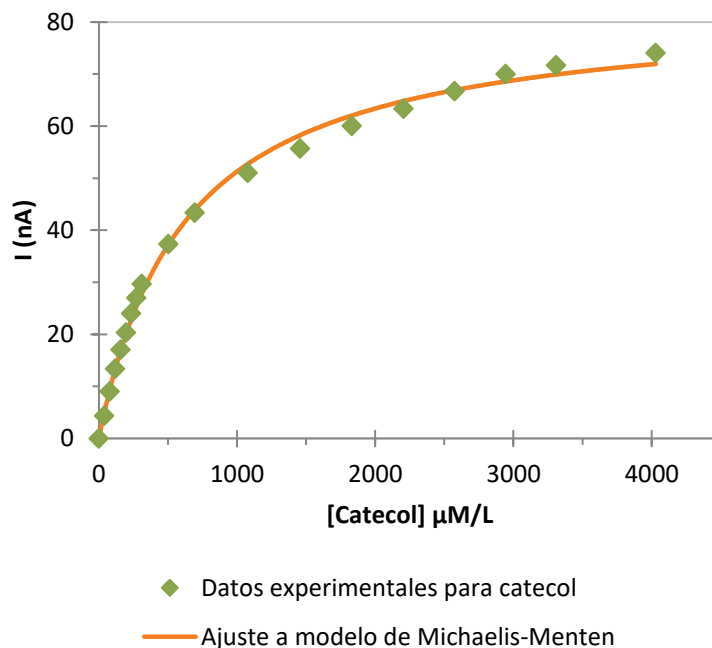


Figura 19. Determinación amperométrica de la cinética de Michaelis-Menten para la reducción de catecol en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

Finalmente la cinética enzimática para el sistema laccasa de *Trametes versicolor* – ácido gálico presenta un ajuste al modelo de Michaelis-Menten, mostrando un intervalo lineal a concentraciones de 0-196.1 μM , mostrando un ajuste lineal (R^2) de 0.9913, mientras que los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima inmovilizada son $K_m' = 715.1 \pm 58.1 \mu\text{M}$ y $V_{max} = 222.3 \pm 3.6 \mu\text{M/s}$, siendo la intensidad máxima leída de 229 nA.

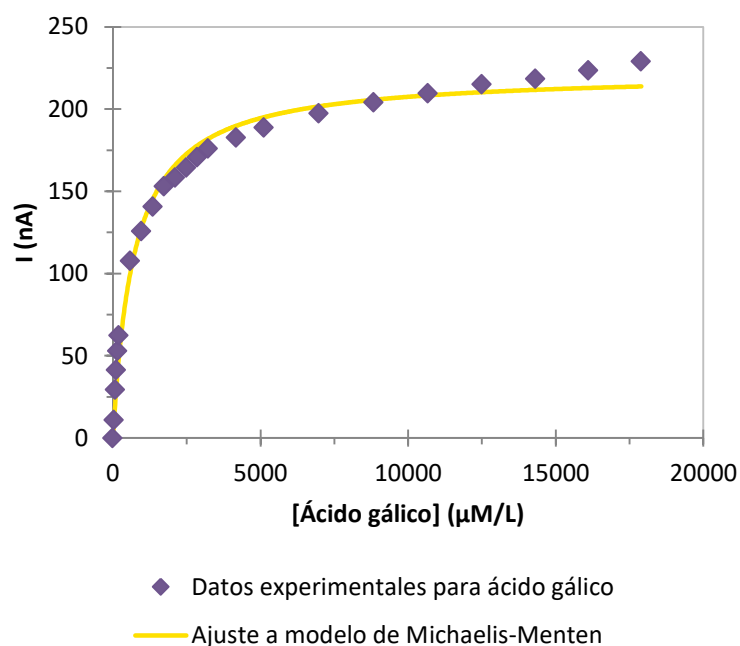


Figura 20. Determinación amperométrica de la cinética de Michaelis-Menten para la reducción de ácido gálico en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

En la Tabla 3 se resumen los parámetros cinéticos arrojados de las pruebas amperométricas para laccasa de *Trametes versicolor* inmovilizada sobre el electrodo serigrafado de carbono. Con base a ellos y a los datos obtenidos mediante los estudios espectrofotométricos se puede determinar que la enzima laccasa de *Trametes versicolor* posee una mayor afinidad hacia ácido caféico aun estando inmovilizada.

Tabla 3. Parámetros cinéticos para laccasa de *Trametes versicolor* para diferentes sustratos, llevándose la reacción en buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5) a 30°C

Sustrato	K_m' (μM)	V_{max} ($\mu\text{M/s}$)	K_{cat} ($\mu\text{MmL}/\mu\text{g}$)	K_{cat}/K_m' ($\mu\text{L}/\mu\text{g}$)
Ácido caféico	47.8 ± 0.7	354.3 ± 1.6	17.72 ± 0.08	0.37 ± 0.11
Hidroquinona	240.1 ± 11.4	143.6 ± 2.2	7.18 ± 0.11	0.02 ± 0.01
Catecol	618.7 ± 26.8	83.0 ± 1.1	4.15 ± 0.05	0.01 ± 0.001
Ácido gálico	715.1 ± 58.1	222.3 ± 3.6	11.11 ± 0.18	0.02 ± 0.003

Determinación de mercurio(II) con el biosensor

A partir del modelo de Michaelis-Menten es posible conocer los parámetros cinéticos V_{max} y K_m' . Conocer la constante de Michaelis es importante ya que a menores valores de K_m' la reacción de formación de producto se ve favorecida, por lo cual la afinidad que presentan los sustratos probados de manera experimental es mayor en la siguiente manera: Ácido caféico > Catecol > Ácido gálico, de la misma manera que se comportaba la enzima libre en solución acuosa.

Conociendo los parámetros cinéticos y conociendo cuál es el sustrato que presenta mayor afinidad hacia laccasa de *Trametes versicolor* inmovilizada se procede a determinar iones mercurio (II) en solución acuosa empleando este sensor para tal fin.

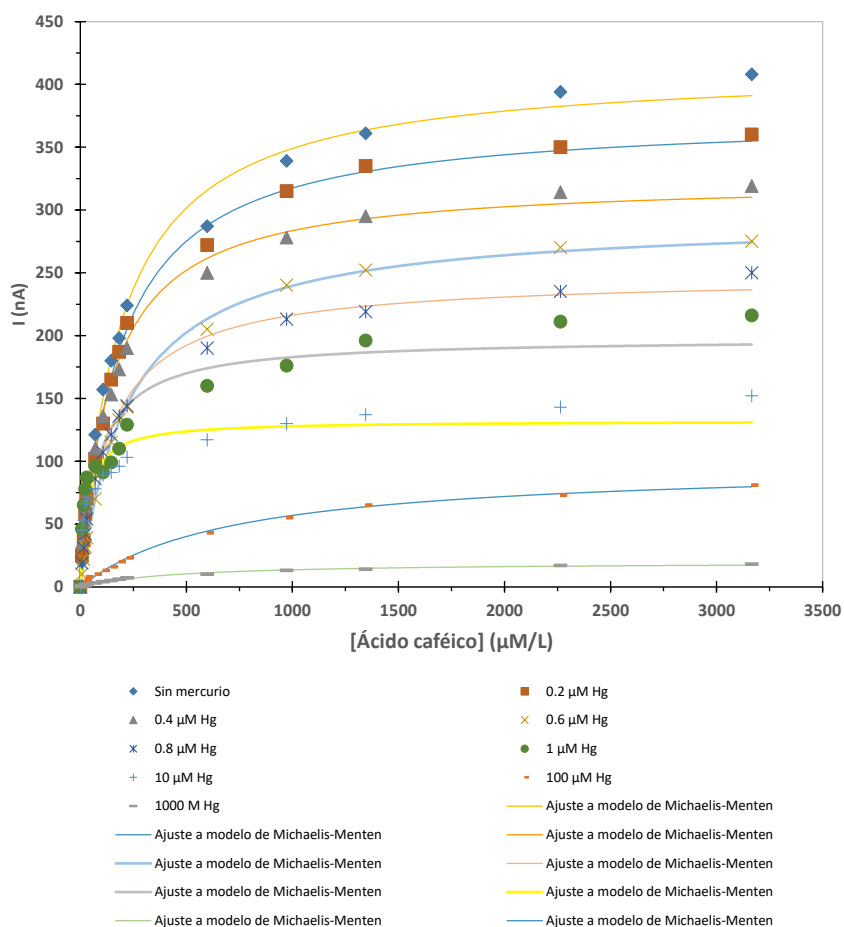


Figura 21. Grado de reacción enzimática como función de la concentración de ácido caféico para diferentes concentraciones de mercurio(II).

Como un biosensor inhibitorio, la cuantificación del mercurio(II) se realiza midiendo el decremento de la respuesta hacia el sustrato (ácido caféico), causado por la inhibición de mercurio(II) en la actividad enzimática.

En la Figura 21 se pueden observar las gráficas de velocidad en función de la concentración de ácido caféico (de 0 a 3166 μM). Se puede observar un decremento en la señal de cada gráfica cuando la concentración de mercurio aumenta, la señal que se produce cuando el sensor está libre de mercurio se toma como 100% de la respuesta del sensor, representada en la Figura 20 como rombos azules.

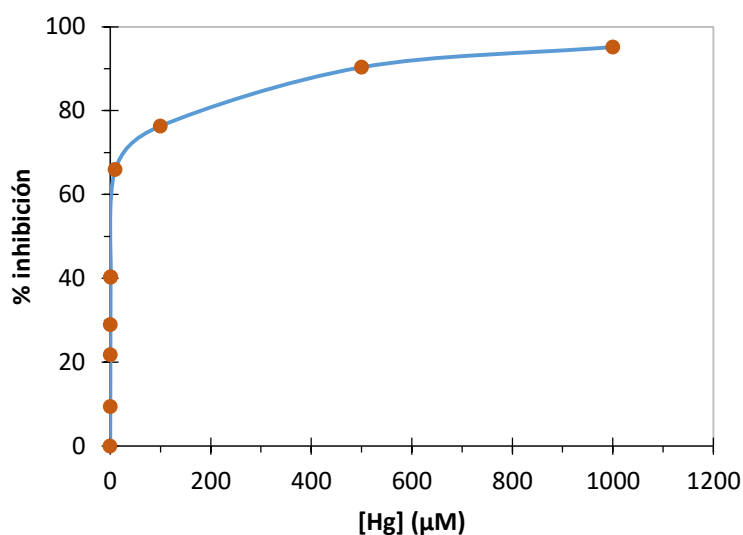


Figura 22. Gráfica de inhibición para el sistema laccasa de *Trametes versicolor*, con base a los valores de V_{max} .

El grado de inhibición (Figura 22) se determinó empleando los valores de V_{max} para cada concentración de mercurio, las cuales van de 0.2 a 1000 μM , observándose una inhibición máxima de 95% a una concentración de 1000 μM .

Tomando la gráfica anterior se construyó una curva de calibración (Figura 23) basada en el porcentaje de inhibición en función de la concentración de mercurio empleando el electrodo modificado empleando el electrodo modificado, en el cual se mantiene la concentración de

laccasa de *Trametes versicolor* constante. Se muestra un rango lineal de 0 a 0.8 μM de Hg(II) , con una correlación (R^2) de 0.9956, lo cual indica un ajuste apropiado al de la línea recta, así como un límite de detección de 0.0729 μM .

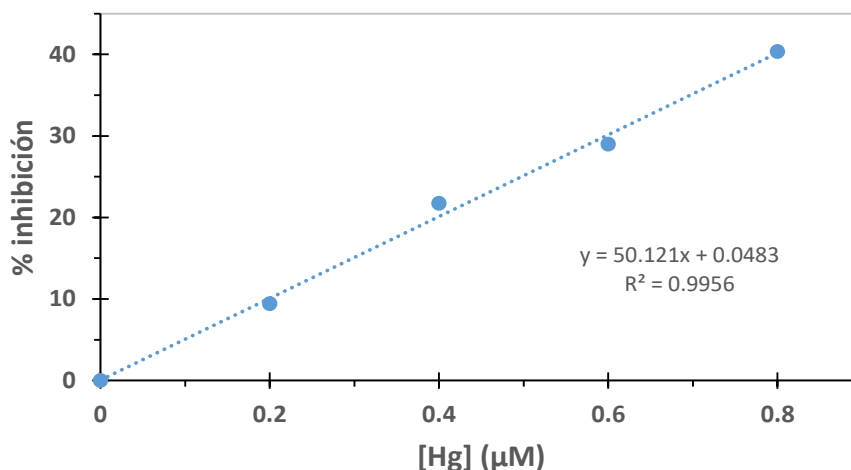


Figura 23. Curva de calibración para el grado de oxidación inicial de ácido caféico por 10 μg de laccasa de *Trametes versicolor* en función de la concentración de mercurio(II). Las cinéticas para monitorear la producción de cafeoquinona se realizó en buffer de acetatos (0.1M, pH = 4.5)

La tabla 4 muestra la comparación de varios biosensores electroquímicos para detección de Hg(II) en solución acuosa. Todos ellos están basados en métodos electroquímicos (impedancia y amperometría principalmente), y la mayoría de ellos emplea como bioreceptor ADN para la detección del ion metálico, ya que en los últimos años se ha empleado como un receptor selectivo de mercurio(II), sin embargo son pocos aquellos que emplean enzimas durante el proceso de desarrollo, las cuales, a comparación de las técnicas empleadas en el desarrollo de biosensores basados en ADN, presentan técnicas más sencillas para su inmovilización en el electrodo, teniendo así mismo la robustez de poderse implementar sobre electrodos de carbono.

Tabla 4. Biosensores electroquímicos para cuantificación de Hg(II) encontrados en la literatura.

Bioreceptor	LD (μM)	Intervalo lineal (μM)	Ref.
Invertasa	5×10^{-7}	$5 \times 10^{-7} - 12.5 \times 10^{-7}$	[73]
Oligonucleotidos	---	$1 \times 10^{-3} - 1000$	[74]
Hemina (oligonucleótido bifuncional)	0.0005	0-1	[75]
Endonucleasas	8.7×10^{-8}	$1 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-4}$	[76]
ADN	0.016×10^{-3}	0.0001 - 0.001	[77]
Catalasa	3.5×10^{-8}	$5 \times 10^{-8} - 2.5 \times 10^{-6}$	[78]
ADN	0.0004	0.0004 - 0.0064 0.0064 - 0.0512	[79]
Laccasa	0.07	0-0.8	Este trabajo

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Mediante estudios espectrofotométricos UV-Vis, se logró la inhibición de laccasa de *Trametes versicolor* por iones mercurio(II), la cual se llevó a cabo mediante un modelo de inhibición mixta, la cual se acerca mayormente al modelo no competitivo. A su vez los sustratos empleados para la determinación espectrofotométrica (ácido cafeico, catecol y ácido gálico) se ajustan al modelo de Michaelis –Menten, siendo el ácido cafeico aquel sustrato al que la enzima Laccasa de *Trametes versicolor* presenta mayor afinidad.

La actividad enzimática se vio disminuida por efecto de iones mercurio(II) desde concentraciones bajas, colocándose en incubación por 2 minutos de contacto; éste tiempo de inhibición no muestra diferencias significativas a valores más altos.

Para la cuantificación de Hg(II) se empleó la inhibición de laccasa de *Trametes versicolor* obteniéndose un límite de detección de 0.074 ± 0.003 mM con un intervalo dinámico lineal de 0.05 – 0.6 mM de mercurio ($R^2 = 0.9893$).

El electrodo serigrafiado fue modificado empleando una solución de glutaraldehído al 2.5%, la cual fue mezclada con la enzima para su inmovilización sobre el soporte. Durante la caracterización electroquímica se determinaron los potenciales de reducción y oxidación electroquímica para ácido cafeico en medio de buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5), siendo estos de 0.385 y -0.244V respectivamente. Para los estudios posteriores mediante amperometría se empleó un potencial de trabajo de -0.3V.

La reacción enzimática de laccasa de *Trametes versicolor* con ácido cafeico, catecol, ácido gálico e hidroquinona como sustratos, presentó un comportamiento michaeliano para cada uno de ellos. Por otro lado, la enzima sigue presentando una afinidad mayor hacia ácido cafeico respecto a los demás sustratos, siendo su K_m 47.8 ± 0.7 y su V_{max} de 354.3 ± 1.6 .

La cuantificación de mercurio(II) se realizó midiendo el decremento de la respuesta hacia el sustrato (ácido caféico), causado por la inhibición de mercurio(II) en la actividad enzimática. Tomando como referencia los valores de V_{max} para cada concentración de mercurio se construyó una gráfica de porcentaje de inhibición, siendo el máximo de 95% a una concentración de 1000 μM empleando ácido cafeico como sustrato en medio de buffer de acetatos (0.1 M, pH = 4.5).

Con base en los resultados obtenidos de la curva de inhibición se desarrolló una curva de calibración mostrando un rango lineal de 0 a 0.8 μM de Hg(II), con una correlación (R^2) de 0.9956, lo cual indica que el sensor desarrollado presenta un rango de cuantificación apto para concentraciones del orden de parte por trillón, exhibiendo un límite de detección de 0.0729 μM .

CAPITULO 5

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- [1] Krishna AK, Satyanarayanan M, Govil PK. (2009) Assessment of heavy metal pollution in water using multivariate statistical techniques in an industrial area: A case study from Patancheru, Medak District, Andhra Pradesh, India. *J. Hazard Mater.*, 167: 366-373
- [2] Cunningham WP, Cunningham MA. (2009) Principles of environmental science: inquiry & applications. 6 Ed. New York: McGraw-Hill Higher Education.
- [3] Manahan SE. (2007) Introducción a la química ambiental. México: Reverté-UNAM. p 666
- [4] Akbar Jana F, Ishaqa M, Ihsanullahb I, Asim SM. (2010) Multivariate statistical analysis of heavy metals pollution in industrial area and its comparison with relatively less polluted area: A case study from the City of Peshawar and district Dir Lower. *J. Hazard Mat.*, 176: 609–616
- [5] Wang Q, Li Z, Cheng S, Wu Z. (2010) Effects of humic acids on phytoextraction of Cu and Cd from sediment by *Elodea nuttallii*. *Chemosphere*, 78: 604–608.
- [6] Grandjean P. (2014) Mercury. Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier. International Encyclopedia of Public Health, 434-442
- [7] Satoh H. Occupational and Environmental Toxicology of Mercury and Its Compounds. *Ind. Health*. 38: 153-164
- [8] Valko M, Morris H, Cronin MTD. (2005) Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.*,12: 1161-1208

- [9] Bradberry SM. (2016) Metals (cobalt, copper, lead, mercury). *Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1016/>
- [10] OMS. (2016) Mercurio y salud. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/en/> citado el 08/06/2016
- [11] (EPA) Mercury Study Report to Congress, Volume III, Fate and Transport of Mercury in the Environment, (1997) online <https://www3.epa.gov/ttn/atw/112nmerc/volume3.pdf> consultado el 21/03/2017 20:47 h
- [12] Kim MK, Zoh KD. (2012) Fate and transport of mercury in environmental media and human exposure. *J. Prev. Med. Public Health* 45: 335-343
- [13] Clarkson TW. (1992) Mercury, Major issues in environmental health. *Environmental Health Perspectives* 100:31-38
- [14] Morel FMM, Kraepiel AML, Amyot M. (1998) The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 543–66
- [15] Mahbub KR, Krishnan K, Naidu R, Andrews S, Megharaj M. (2017) Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecol. Indic.* 74: 451-462.
- [16] EPA. Mercury compounds-US EPA. (2000) <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/mercury-compounds.pdf> Consultado el 20/03/17
- [17] Roa G, Ramírez-Silva MT, Romero-Romo MA, Galicia L. (2003) Determination of lead and cadmium using a polyclodextrin-modified carbon paste electrode with anodic stripping voltammetry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*

- [18] Li, N.B., Luo, H.Q., Chen, G.N., Differential pulse Anodic Stripping Voltammetric Determination of Traces of Copper with Tobramycin-Nafion Modified Electrode. *Analytical Sciences*, 2004. 20.
- [19] Greenlief, M., *Instrumental Methods of Analysis with Lab*. 2009, Columbia: University of Missouri. 76.
- [20] Bioanalytical Systems Inc. Instruction Manual for BASi EPSILON for Electrochemistry. 2000 7 de Octubre de 2010]; Available from: http://www.basinc.com/mans/EC_epsilon/index.html.
- [21] Ghiaci, M., Rezaei, B., Kalbasi, R.J., High selectivity SiO₂-Al₂O₃ mixed-oxide modified carbon paste electrode for anodic stripping voltammetric determination of Pb(II). *Talanta*, 2007. 73: p. 37-45.
- [22] Stradiotto NR, Yamanaka H, Zaroni MVB. (2003) Electrochemical Sensors: A Powerful Tool in Analytical Chemistry. *J. Braz. Chem. Soc.* 14(2): 159-173.
- [23] Couto RAS, Lima JLFC, Quinaz MB. (2016) Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta* 146: 801-814
- [24] Mohamed HM. (2016) Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. *Trends Anal. Chem.* 82: 1:11
- [25] Domínguez-Renedo O, Alonso-Lomillo MA, Arcos Martínez MJ. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* 73: 202-219
- [26] Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. (2008) Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *ITBM-RBM* 29: 171–180
- [27] Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD. (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* 30: 489-511.

- [28] Rodríguez-Delgado MM, Aleman-Nava GS, Rodríguez-Delgado JM, Dieck-Assad G, Martínez-Chapa SO, Barcelo D, Parra R. (2015) Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *Trends Anal. Chem.* 74: 21-45.
- [29] Copeland RA. (2000) *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. 2^oed. EUA, Wiley-VCH, Inc. p 1
- [30] Enderle J, Bronzino J. (2012) *Introduction to biomedical engineering*. 3^o ed. EUA, Academic Press. p 459
- [31] Mc Donald AG, Boyce S, Tipton KF. (2015) *Enzyme Classification and Nomenclature* en *Encyclopedia of Life Science*. Wiley-Blackwell
- [32] NC-IUBMB (1992) *Enzyme nomenclature. Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes*. EUA, Academic Press. p 9-13
- [33] Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM. (2013) Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*. 27(3-4):67-82.
- [34] Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, Kumar A. (2011) Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J Mol Catal B-Enzym* 68: 117-128
- [35] Messerschmidt A. (2010) 8.14 Copper Metalloenzymes in *Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology*. Oxford:Elsevier. p. 530-532
- [36] Catherine H, Penninckx M, Frédéric D. (2016) Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environ Technol & Innovation*. 5:250-66.
- [37] Majeau J-A, Brar SK, Tyagi RD. (2010) Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technol.* 101(7):2331-50

- [38] Thurston CF. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140:19-26.
- [39] Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. (1996) Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*. 96(7):2563-606.
- [40] Bento I, Carrondo MA, Lindley PF. (2006) Reduction of dioxygen by enzymes containing copper. *J Biol Inorg Chem*. 11(5):539-47
- [41] Solomon EI, Baldwin MJ, Lowery MD. (1992) Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chemical Reviews*. 92(4):521-42.
- [42] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. (2010) Laccases: a never-ending story *Cell. Mol. Life Sci*. 67: 369–385
- [43] Shleeva S, Tkaca J, Christensona A, Ruzgasa T, Yaropolovb AI, Whittakerd JW, Gortona L. (2005) Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosens. Bioelectron*. 20: 2517–2554
- [44] Li X, Yu P, Yang L, Wang F, Mao L. (2012) An Electrochemical Method for Investigation of Conformational Flexibility of Active Sites of *Trametes versicolor* Laccase Based on Sensitive Determination of Copper Ion with Cysteine-Modified Electrodes. *Anal. Chem.*, 84: 9416–9421
- [45] Fernández-Fernández M, Sanromán MA, Moldes D. (2012) Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv*. 31: 1808-1825
- [46] Baldrian P. (2004) Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63(5):560-3.

- [47] Hu X, Wang C, Wang L, Zhang R, Chen H. (2014) Influence of temperature, pH and metal ions on guaiacol oxidation of purified laccase from *Leptographium qinlingensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30(4):1285-90.
- [48] Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M. (1999) Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*. 3(1):1-26.
- [49] Griet Eeckhout S. (2006). Mercure: une solution qui nous empoisonne. Laboratoire Europeo de Radiación del Sincrotrón en Grenoble, Francia. Disponible en <http://www.scienceinschool.org/2007/issue7/mercury/spanish>
- [50] Ibarra-Escutia P, Juárez Gómez J, Calas-Blanchard C, Marty JL, Ramírez-Silva MT. (2010) Amperometric biosensor based on a high resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions. *Talanta*. 81: 1636–1642.
- [51] Murzin D, Salmi T. (2005) 1. Setting the scene en *Catalytic Kinetics*. EUA, Elsevier. p 7-8
- [52] Purich DL. (2010) *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*. EUA, Elsevier. p 1.
- [53] Talens-Perales D, Marín-Navarro J, Polaina J. (2016) *Enzymes: Functions and Characteristics* – Caballero B, Finglas PM, Toldrá F. *Encyclopedia of food and health* EUA, Elsevier. p 535-537.
- [54] Bartlett PN, Toh CS, Calvo EJ, Flexer V. (2008) 8. Modelling Biosensor Responses - Philip Bartlett. *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*.
- [55] Sumner JB, Somers GF. (1953) *Chemistry and methods of enzymes*. 3° ed. EUA: Academic Press p 13-14.
- [56] Johnson KA, Goody RS. (2011) The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry*. 50(39): 8264–8269.

- [57] Touliaas TL, Kitsosa CP. (2016) Fitting the Michaelis–Menten model. *J Comput. Appl. Math.* 296: 303-319.
- [58] Dixon M, Webb EC, Thorne CJR, Tipton KF. Chapter IV. Enzyme Kinetics. *Enzymes*. 3^oed. EUA: Academic Press. p. 55-57.
- [59] Lineweaver H, Burk D.(1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56(3): 658–666.
- [60] Voet D, Voet JG, Pratt CW. Capítulo 12. Cinética, inhibición y regulación de las enzimas. *Fundamentos de bioquímica*. 2^o ed. España: Editorial Panamericana. p. 367.
- [61] Li Y, Li W, Zhang G, Lü X, Hwang H, Aker WG, Guan H, Wang P. (2016) Purification and characterization of polysaccharides degradases produced by *Alteromonas* sp. A321. *IJBIMAC* 86: 96-104.
- [62] Arroyo M. (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. 39 (2):23-39.
- [63] Davis F, Higson PJ. (2012) 5- Practical applications and protocols for enzyme biosensors. *Biosensors for Medical Applications*. EUA: Woodhead Publishing. p. 135-60.
- [64] Moehlenbrock MJ, Minter SD. (2017) 1- Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization. Minter SD. *Enzyme Stabilization and Immobilization Methods and Protocols* 2^o ed. EUA: Humana Press. p 1-7.
- [65] Cheung DT, Nimni ME. (1982) Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde I: Reaction with model compounds. *Connect. Tissue Res.* 10: 187-199.
- [66] Eggins BR. (2002) *Chemical sensors and biosensors*. UK: West Sussex- Wiley.

- [67] Borgmann S, Schulte A, Neugebauer S, Schuhmann W. (2011) 1- Amperometric Biosensors. Alkire RC, Kolb DM, Lipkowski J. *Advances in Electrochemical Science and Engineering*. UK: Wiley-VCH. p. 1-83.
- [68] Fouletier J, Fabry P. (2010) 5- Amperometric Sensors. *Chemical and Biological Microsensors*. UK: ISTE-Wiley. p. 138-160.
- [69] Sadeghi SJ. Amperometric Biosensors. Roberts GCK. *Encyclopedia of biophysics*. UK: EBSA-Springer. p. 61-67.
- [70] Inzelt G. (AÑO) 14- Pseudo-reference Electrodes. Inzelt G, Lewenstam A, Scholz F. *Handbook of reference electrodes*. UK: Springer. p. 331-332.
- [71] Rodríguez-Sevilla E, Ramírez-Silva MT, Romero-Romo M, Ibarra-Escutia P, Palomar-Pardavé M. (2014) Electrochemical Quantification of the Antioxidant Capacity of Medicinal Plants Using Biosensors. *Sensors*. 14: 14423-14439.
- [72] Marko-Varga G, Emnéus J, Gorton L, Ruzgas T. (1995) Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *TrAC*. 14(7): 319-328.
- [73] Bagal-Kestwal D, Karvea MS, Kakade B, Pillai VK. (2008) Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity. *Biosens. Bioelectron*. 24: 657–664.
- [74] Cao RG, Zhu B, Li J, Dongsheng Xu D. (2009) Oligonucleotides-based biosensors with high sensitivity and selectivity for mercury using electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochem. commun*. 11: 1815–1818.
- [75] Zhang Z, Yinb J, Wua Z, Yua R. (2013) Electrocatalytic assay of mercury(II) ions using a bifunctional oligonucleotide signal probe. *Anal. Chim. Acta*. 762: 47– 53.

[76] Chen DM, Gao ZF, Jia J, Li NB, Luo HQ. (2015) A sensitive and selective electrochemical biosensor for detection of mercury(II) ions based on nicking endonuclease-assisted signal amplification. *Sens. Act. B* 210: 290-296.

[77] Zhang Z, Fua X, Lia K, Liua R, Penga D, Hea L, Wangb M, Zhangb H, Zhoua L. (2016) One-step fabrication of electrochemical biosensor based on DNA-modified three-dimensional reduced graphene oxide and chitosan nanocomposite for highly sensitive detection of Hg(II). *Sens. Act. B* 225: 453–462.

[78] Elsebai B, Ghica ME, Abbas MN, Brett CMA. (2017) Catalase Based Hydrogen Peroxide Biosensor for Mercury Determination by Inhibition Measurements. *J. Hazard. Mater.* 340: 344-350.

[79] Cheng N, Xu Y, Huang K, Chen Y, Yang Z, Luo Y, Xu W. (2017) One-step competitive lateral flow biosensor running on an independent quantification system for smart phones based in-situ detection of trace Hg(II) in tap water. *Food Chem.* 214: 169–175.

ANEXOS

ANEXO 1

Evaluación de la membrana

Con el fin de determinar la concentración de glutaraldehído y la técnica empleada para inmovilizar la enzima, se realizaron pruebas que evalúan la intensidad de corriente y la linealidad para los procesos de inmovilización.

Técnica A. Inmovilización en mezcla.

1. Preparación de solución: Mezclar 50 μL Glutaraldehído (5%), 40 μL Enzima 10 mg/mL, 10 μL Buffer de Acetatos (0.1 M, pH = 4.5).
2. Depositar 5 μL de solución Enzima-Glutaraldehído sobre el electrodo de trabajo.
3. Colocar el sensor dentro de la estufa por 20 h a 40°C.
4. Pasado este tiempo, retirar el electrodo y dejar enfriar previo a su uso.

Técnica B. Inmovilización por capas.

1. Depositar 5 μL de una solución de enzima 4 mg/mL en el electrodo de trabajo.
2. Dejar secar el sensor en la estufa (40°C) por 15 min.
3. Retirar de la estufa y colocar 5 μL Glutaraldehído (2.5 y 5%) sobre el electrodo de trabajo.
4. Colocar el electrodo en la estufa por 20 h a 40°C.
5. Pasado este tiempo, retirar el electrodo y dejar enfriar previo a su uso.

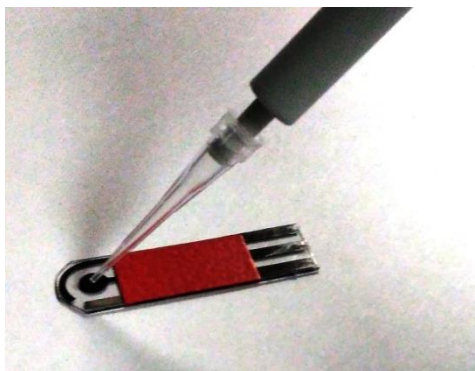


Figura A1.1 Deposición de la enzima en el electrodo de trabajo.



Figura A1.2 Formación de la membrana en la superficie del electrodo. Se observa de coloración blanquizca debido a la temperatura en que se encontraba, la cual se pierde al perder temperatura.

Para cada técnica de inmovilización se probaron diferentes concentraciones de sustrato que van de 0 a 31 μM , realizando cada experimento por triplicado. La intensidad de corriente para cada punto depende primeramente de la concentración del sustrato y de manera secundaria de la capacidad del sustrato de alcanzar el sitio activo de la enzima. En la Figura A1.3 se muestran los datos experimentales obtenidos, donde se observa un aumento de intensidad de

para la técnica de inmovilización en mezcla, comparada con la técnica de inmovilización por capas.

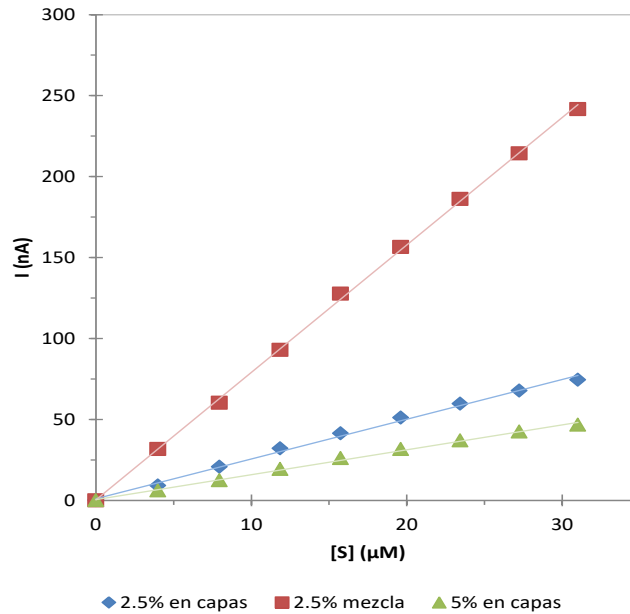


Figura A1.3 Evaluación de la modificación del electrodo empleando dos técnicas de inmovilización: por capas y en mezcla de enzima-glutaraldehído.

Por otro lado también se puede concluir que 2.5% de glutaraldehído en la mezcla provee al sensor de una mayor intensidad de corriente comparada con aquel que contiene 5% de glutaraldehído en su composición. Debido a estos resultados se toma la técnica de inmovilización en mezcla para próximas modificaciones de los electrodos.

ANEXO 2

Potenciostato-Galvanostato y Amperímetro

Potenciostato-Galvanostato

Las conexiones del potenciostato-galvanostato deben configurarse de diferente manera dependiendo del uso.

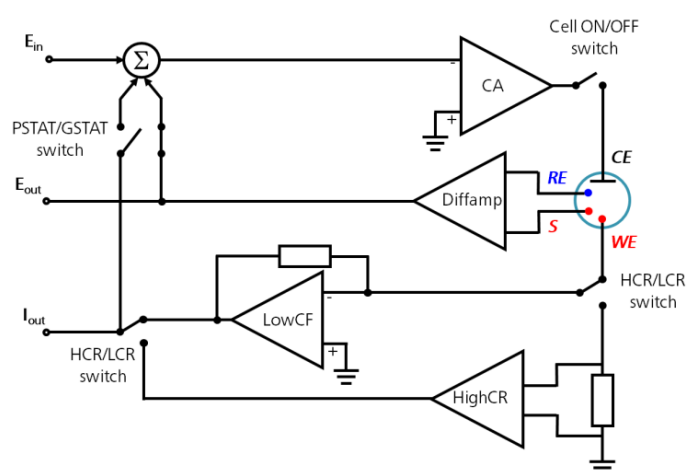


Figura A2.1 Diagrama de un potenciostato-galvanostato [1]

Existen dos modos básicos de la celda electroquímica:

- Modo potenciostático: El equipo controla con precisión el potencial del contra electrodo (CE) contra el electrodo de trabajo (WE) de modo que la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (WE) y el electrodo de referencia sea preciso al valor especificado.
- Modo galvanostático: El flujo de corriente entre el electrodo de trabajo y el contra electrodo es controlado. La diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y

el electrodo de trabajo, así como la corriente entre el contra electrodo y el electrodo de trabajo es monitoreada de manera continua.

- Modo PGSTAT: El potencial o la corriente especificados se controla precisamente en cualquier momento de la medición utilizando un mecanismo de realimentación negativa.

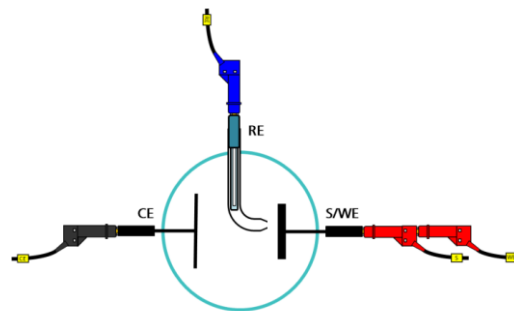


Figura A2.2 Diseño de una celda de tres electrodos[1].

Los electrodos empleados en este tipo de celda (Figura A2.2) presentan funciones específicas:

- Electrodo de trabajo. Lleva a cabo la reacción de interés o de estudio. El material de construcción, su tamaño y forma dependen de la aplicación.
- Electrodo de referencia. Es un electrodo que tiene un potencial de electrodo estable y bien conocido, el cual se usa de referencia dentro de la celda para controlar y medir los potenciales de la misma. También la corriente que pasa a través del electrodo de referencia se mantiene cerca de cero gracias al uso del contra electrodo.
- Contra electrodo. Se emplea para cerrar el circuito de la celda electroquímica. Se hace de un material inerte y generalmente no participa en la reacción electroquímica.

Amperímetro

Es un aparato de medida utilizado para medir la intensidad o corriente eléctrica. La unidad con la que realiza las medidas de corriente eléctrica es el amperio.

El amperio, es decir, coulombs/segundo, expresa la velocidad con la que sucede algo (reacción electroquímica).

La diferencial de la ley de Faraday muestra la velocidad a la que los electrones se mueven a través de la interfaz solución-electrodo; la cual esta relacionada con la velocidad de la reacción. Así pues cuando medimos la corriente faradaica medimos al mismo tiempo la velocidad de la reacción electroquímica [2].



Figura A2.3 Detector amperométrico BAS LC 4C

Los amperímetros poseen una resistencia shunt, la cual es una resistencia en paralelo. Con la presencia de diversas resistencias shunt, se puede construir un amperímetro con varios rangos o intervalos de medición. Los amperímetros tienen una resistencia interna muy pequeña (< 1 Ohm), ya que de esta manera su presencia no disminuye la corriente medida de circuito eléctrico. De igual manera contienen un conversor analógico-digital para medir la caída de tensión en un resistor, empleando un microprocesador que arroja los datos de forma numérica digital.

REFERENCIAS

[1] Metrohm. (2011) Basic overview of the working principle of a potentiostat/galvanostat (PGSTAT) – Electrochemical cell setup. Disponible en: <https://www.metrohm.com/es-mx/aplicaciones/%7BB2FBF69D-3EB0-4735-8F14-F8B5E65794A2%7D>

[2] Kissinger PT. (2002) Electrochemistry for the Non-Electrochemist. *Curr. Sep.* 20(2): 51-53.