

# Informe final publicable de proyecto

## Desarrollo de biocatalizadores inmovilizados en biopolímeros lignocelulósicos: una nueva herramienta para reducir la contaminación causada por compuestos estrogénicos.

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2019\_1\_156567

Fecha de cierre de proyecto: 01/10/2022

**OVSEJEVI GANDARA, KAREN** (Responsable Técnico - Científico)  
**MENÉNDEZ RODRÍGUEZ, María Del Pilar** (Co-Responsable Técnico-Científico)  
**CABRERA CAETANO, Emanuel** (Investigador)  
**VÁZQUEZ POLLIO, Valeria** (Investigador)  
**BOTTO, Emiliana** (Investigador)  
**GARCÍA ALONSO, Javier Rodrigo** (Investigador)  
**GIOIA FABRE, Larissa** (Investigador)  
**GIORGI DILACIO, Victoria** (Investigador)  
**MOYNA BORTHAGARAY, Guillermo** (Investigador)  
**REINA, Luis** (Investigador)  
**BERTONE GONZALEZ, isabel alejandra** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL ESTE \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO DE TACUAREMBÓ \\  
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

## Resumen del proyecto

Los contaminantes farmacéuticos (CF) representan uno de los mayores problemas de polución a nivel mundial. Entre los CF más peligrosos están las sustancias hormonalmente activas cuya generación está en franco ascenso debido, principalmente, al uso de anticonceptivos formulados en base a hormonas. En nuestro país ya se han detectado estos compuestos en la cuenca del Río Santa Lucía y en el Río Uruguay.

Este proyecto se focalizó en desarrollar una nueva metodología de descontaminación enmarcada en los principios de la "Química Verde", buscando inmovilizar enzimas (lacasas) en nuevos biomateriales obtenidos a partir de recursos renovables.

Las enzimas son catalizadores eficientes y amigables con el medio ambiente, extensamente utilizados en procesos biotecnológicos. Las lacasas son enzimas capaces de biotransformar un amplio espectro de compuestos. Todas las lacasas utilizadas fueron aisladas de cepas de hongos provenientes de plantaciones locales de Eucaliptus y fueron capaces de degradar estrógenos, reduciendo la estrogenicidad en la solución tratada.

Por otra parte, se obtuvieron biopolímeros por disolución de corteza de Eucaliptus dunnii con el líquido iónico (LI) cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio. Al utilizar LI se evitó el uso de productos químicos tóxicos, ya que ellos son sales estables, no inflamables y reciclables. Por precipitación de los biopolímeros en medio acuoso, en presencia ó ausencia de lacasa, se generaron hidrogeles. Todos los hidrogeles con enzima atrapada resultaron activos, reteniendo el 90% de la proteína aplicada pero expresando sólo el 10% de la actividad. Las lacasas inmovilizadas fueron capaces de reducir la concentración de estrógenos presentes en soluciones acuosas. Asimismo, la enzima inmovilizada presentó mayor estabilidad térmica que la enzima en solución.

Los hidrogeles inactivos (sin lacasa) resultan una potencial matriz a ser químicamente modificada para generar soportes para fijar enzimas mediante otras estrategias de inmovilización.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Orgánica / Química verde**

**Palabras clave: Lacasa / Compuestos estrogénicos / Inmovilización en biopolímeros /**

### **Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

Los medicamentos son considerados contaminantes ambientales "emergentes", ya que hasta hace poco tiempo no existían técnicas analíticas para su detección y por no contar con una regulación específica sobre su descarte (1).

Los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales son considerados como fuentes principales de la contaminación por fármacos, pues al metabolizarse un medicamento un porcentaje del mismo se elimina por la orina o por las heces (como metabolito o en su forma activa). Diferentes estudios demuestran que en estos efluentes se detecta la presencia de productos farmacéuticos y metabolitos, los cuales reingresan al medio ambiente, pero bajo la forma de contaminantes (2-6). Esta contaminación puede darse en el suelo, aguas superficiales, aguas subterráneas, sedimentos y biota.

La Comisión Europea seleccionó entre los contaminantes farmacéuticos más peligrosos a los estrógenos 17beta-estradiol (E2) y al 17alfa-etinilestradiol (EE2) (7). El efecto de las sustancias hormonalmente activas sobre el medio ambiente y los seres humanos es muy complejo. En los seres humanos pueden ocasionar reducción de la fertilidad, cáncer de mama, cáncer de próstata (8) y en animales acuáticos pueden dar lugar a la feminización de los machos y el hermafroditismo. Esta feminización se ha relacionado con la presencia de sustancias tales como el estrógeno natural E2 y el estrógeno sintético EE2. El uso de estrógenos sintéticos en lugar de estrógenos naturales en los anticonceptivos hormonales, potencia estos efectos al degradarse más lentamente que la hormona natural, permaneciendo más tiempo en el agua (9-11).

Según datos suministrados por las Naciones Unidas, en al menos uno de cada cuatro países se utilizan anticonceptivos hormonales y se proyecta que cerca de 800 millones de mujeres utilizarán algún método de anticoncepción en el año 2030, entre los tres más demandados están aquellos que emplean hormonas (12). En Uruguay los principales métodos anticonceptivos empleados durante el año 2015 fueron los anticonceptivos orales, preservativos y DIU (13). Este alto consumo de hormonas contribuirá a generar una mayor contaminación de reservas acuíferas.

A nivel mundial existe un gran vacío legal en relación al nivel de componentes farmacéuticos activos que puedan estar presentes en ecosistemas sin riesgo para los mismos. En Uruguay el marco jurídico en materia ambiental está dado por:

- la Constitución Nacional, artículo 47 (regulado por la ley 17.283, 2000, "Ley general de protección al medioambiente").
- la Ley 16.466, 1994, relacionada con la "evaluación del impacto ambiental" (reglamentada por el Decreto 349/2005).
- el Decreto 253/79 y sus modificativos regulan la calidad de agua, sin contemplar la cuantificación de hormonas. Sin embargo, se aplican ciertas normativas para suplir esta falta de regulación: Decreto 307/09 ("Riesgos relacionados con agentes

químicos”), Convenio de Basilea (para el manejo ambientalmente adecuado de los residuos peligrosos), Convenio de Estocolmo (sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, 2004) y Convenio de Rotterdam (aplicable a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto del comercio internacional, 2004).

En nuestro país la Intendencia Municipal de Montevideo es un referente nacional en relación a los tratamientos de efluentes y actualmente, debido a que no existe una Normativa específica, no realiza ni exige ningún tipo de tratamiento para reducir la presencia de hormonas en efluentes industriales o aguas de saneamiento (14-15). Sin embargo, el problema existe y prueba de ello es la presencia de disruptores endocrinos en el Río Uruguay (16) y en la cuenca del Río Santa Lucía (17).

Las enzimas son catalizadores eficientes y amigables con el medio ambiente extensamente utilizados en procesos biotecnológicos. Entre las enzimas con mayor campo de aplicaciones se destacan las lacasas(18), dado que su baja especificidad les permite actuar sobre un amplio rango de sustratos, pudiendo incluso oxidar compuestos complejos empleando mediadores en la transferencia electrónica (19-24). En especial, las lacasas de origen fúngico han demostrado poder degradar disruptores endocrinos, entre ellos, estrógenos naturales (estrona; 17beta-estradiol; estriol) y estrógeno sintético (17alfa-etinilestradiol) (25-26). Si bien, su aplicación a nivel industrial está limitada por su inestabilidad en forma soluble y su difícil recuperación para usos posteriores (27). La inmovilización enzimática es la estrategia más utilizada para superar estas desventajas y por ello, han sido inmovilizadas por muy variados métodos y sobre diferentes matrices (27-36). Una de las técnicas más sencillas de inmovilización es por entrapamiento del biocatalizador en una red polimérica tipo hidrogel (37-40). Si bien diversos hidrogeles con capacidad catalítica (hidrogeles activos) se han obtenido a partir de enzimas incluidas en polisacáridos (41-42), el uso de materiales lignocelulósicos como fuente de biopolímeros tiene gran potencial para desarrollar procesos sustentables. A partir de ellos es posible obtener celulosa (el principal biopolímero y recurso renovable en el planeta (43-44), lignina (segundo biopolímero en abundancia (45)) y hemicelulosas (las que junto a la lignina forman la matriz que rodea las microfibrillas de celulosa (46-47)). Emplear materiales lignocelulósicos como fuente de biopolímeros para inmovilizar biocatalizadores tiene varias ventajas: su bajo precio, su amplia distribución, son un recurso renovable y biodegradable y poseen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas (capaces de interactuar con la enzima).

Existen diferentes metodologías para extraer biopolímeros de residuos forestales (48-50). El uso de Líquidos iónicos (LI) es la más ambientalmente amigable, al no emplear productos químicos tóxicos, ni producir emisiones potencialmente peligrosas (51-53). Los LI son sales orgánicas o mezclas eutécticas de una sal orgánica e inorgánica, son estables, no inflamables y reciclables (54). Se conocen más de 1500 LI, siendo incontables los sistemas que pueden obtenerse al mezclar dos o más de ellos (55). Esto último permite diseñar el LI que mejor se ajuste a la reacción o extracción a desarrollar. En la actualidad existen varios procesos a escala comercial que utilizan LI (56-57) e incluso alguno ha sido patentado, como la obtención de celulosa (58).

El equipo de trabajo que participará en este proyecto posee amplia experiencia en las distintas áreas, implicadas en el mismo. Es importante señalar que tres de los integrantes han finalizado recientemente su tesis de posgrado en temas directamente relacionados (producción de lacasas, estudio de materiales lignocelulósicos, utilización de LI y búsqueda de nuevos biocatalizadores) (59-61).

En el presente proyecto se plantea confinar lacasas en hidrogeles de biopolímeros extraídos con LI de materiales lignocelulósicos (residuos forestales), generando un biocatalizador biodegradable a partir de recursos renovables para el tratamiento de aguas conteniendo contaminantes estrogénicos.

## **Metodología/Diseño del estudio**

1) Optimización de la producción, purificación parcial y estudios de estabilidad de la lacasa de *dichostereumn sordulentum* 1488

1a- Optimización de la producción

Para la optimización de los procesos se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) empleando el software Desing Expert 10. El uso de estos modelos permite reducir considerablemente el número de experimentos a realizar y con ello el gasto de reactivos

y tiempo de trabajo. Además la MSR permite desarrollar modelos matemáticos para evaluar la significancia estadística de los factores que están siendo estudiados y la interacción entre ellos.

Se seleccionaron 6 factores que afectan el cultivo de este hongo: glicerol, glucosa, peptona, urea, inóculo, corteza de *Eucaliptus dunnii*. Como la enzima es extracelular, para cuantificar el efecto de un factor ó la interacción entre factores, se midió actividad lacasa en el sobrenadante del cultivo.

La primera etapa del trabajo se focalizó en reducir el número de factores a analizar mediante un diseño experimental CATEGORICO MULTINIVEL para seleccionar las fuentes de Nitrógeno y de Carbono con mayor efecto en la expresión de la

lacasa.

En una segunda etapa se evaluó el efecto en el crecimiento del hongo de las interacciones entre las fuentes de C y N (anteriormente seleccionadas) y la corteza, mediante un diseño factorial COMPLETO CON 2 NIVELES Y 4 PUNTOS CENTRALES. Finalmente para optimizar las condiciones de producción de la lacasa se realizó un MODELO CENTRAL COMPUESTO CON 2 NIVELES Y 5 PUNTOS CENTRALES.

Medida de actividad lacasa:

En solución se ensayó espectrofotométricamente usando 2,6-dimetoxifenol (DMF) 2 mM como sustrato en buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.5 (buffer de actividad, BA), monitoreando la formación de su producto de oxidación 3,3,5,5'-tetrametoxi-p-difenoquinona a 477 nm (absortividad= 14.600 1/M.cm) (62).

Inmovilizada: al total del hidrogel se le adicionan bajo agitación, 30 mL de DMF 2mM, se mide producto formado en el sobrenadante.

UE= cantidad de enzima necesaria para obtener un micromol de producto por minuto en las condiciones de trabajo.

Medida de proteínas: Método de ácido bicinoninico (63).

#### 1b-Purificación y caracterización de lacasa de *D.sordulentum* (DS)

Se partió del extracto crudo obtenido en las condiciones optimizadas del cultivo, monitoreándose la pureza alcanzada mediante electroforesis SDS-PAGE.

i- Etapa 1- en forma escalonada, primero se realizó una precipitación con acetona al 10% (para remover polisacáridos), luego el sobrenadante se llevó al 40% y finalmente al 60%.

ii- Etapa 2- el precipitado cetónico al 60%, redisoluelto en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 6.0 se intercambió en batch con DEAE-Sepharosa®, a Tamb durante 1 hora, eluyéndose en columna con el mismo buffer suplementado con NaCl 0.2M.

iii- Caracterización de la lacasa

Se resuspendió precipitado cetónico (9.5 mg/1mL, 0,54 UE/mg)

-Estabilidad con el pH, alícuotas de la enzima se incubaron 24hs a Tamb en un rango de pH 3.0-9.0, midiéndose la actividad residual.

-Actividad en presencia del Líquido iónico (LI) [BMIM]Cl, se cuantificó la actividad en presencia de una concentración final de LI de 0-10%. Este estudio también se realizó para las lacasas de *Pycnoporus sanguineus* 5050 (PS) y *Trametes villosa* 1449 (TV).

-Estabilidad con la temperatura en presencia y ausencia de [BMIM]Cl, se incuban las 3 lacasas 19 hs en LI 10% y BA, a 17, 40, 50, 60 y 70°C. Se cuantificó la actividad residual.

-Actividad en presencia de [BMIM]Ac, se utilizó una concentración final de LI de 0-10%.

-Actividad en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO), se mide actividad al precipitado resuspendido en DMSO.

-Estabilidad con la temperatura en presencia y ausencia de [BMIM]Ac, se incubó la lacasa en iguales condiciones que el estudio para [BMIM]Cl .

- Liofilización de la enzima. Se realizaron 2 estudios: a) a alícuotas de precipitado cetónico se le adicionaron en relación 10:1 en peso (aditivo: enzima), PEG 600, PEG 6000, DMF, cloruro de sodio y cloruro de sodio + DMF, se disolvieron en 5.0 ml de BA y se liofilizaron. B) alícuotas de sobrenadante de cultivo de DS se le adicionaron diferentes agentes en concentración final: 100mg/L para polietilenglicol (PEG) de diferentes pesos moleculares 600, 6000 y 8000, 0.2 M de cloruro de sodio (NaCl), 1 y 10mM de Triton X-100, 1 y 10mM de laurilsulfato de sodio (LSS). También se ensayó prolina (en varias concentraciones hasta 1,5mg/mL, dejando interactuar 30 min.). Posteriormente todas las muestras se liofilizaron.

#### 2) Extracción de biopolímeros empleando líquidos iónicos (LI), caracterización de los productos obtenidos

i-Molienda: La corteza de *Eucalyptus dunnii* se molió en dos etapas, en un molino Retsch SM 200 utilizando un tamiz de 4 mm y en un molino MARCONI MA 680 utilizando un tamiz de 0.5mm.

ii-Contenido de humedad: se secó a 105°C corteza hasta peso constante.

iii-Disolución de corteza en LI: en un ensayo tipo, 96 g de [BMIM]Cl, 18 g de DMSO y 6 g de corteza molida se mezclaron y calentaron a 120°C bajo agitación durante 48 hs\*. La mezcla se somete a 105°C por 10 minutos y luego se centrifuga. Los sólidos residuales se lavaron 3 veces con DMSO, en cada lavado se dejó 10 minutos en estufa a 105°C y se centrifugó. Los sólidos residuales se lavaron 5 veces con agua destilada y se centrifugó. El sólido se dejó en estufa a 105°C hasta peso constante.

\*Se analizó el efecto del tiempo en la disolución en un rango de 24-72 hs

iv-Obtención de carbohidratos y lignina a partir de la corteza disuelta en líquido iónico.

Los sobrenadantes provenientes del tratamiento de la corteza con LI y de los lavados con DMSO de la corteza tratada se mezclaron y se les agregó una solución acetona:agua (1:1). Se agitó durante 30 minutos y luego se centrifugó. Los sólidos se combinaron y se lavaron con una solución de acetona agua (1:1), se centrifugó y el precipitado resultante se lavó con agua destilada y se centrifugó. Finalmente el sólido lavado se retomó con agua y se liofilizó, obteniéndose el precipitado rico en carbohidratos.

La solución acetona:agua se rotaevaporó hasta la mitad del volumen. El precipitado obtenido se centrifugó y lavó con agua destilada, se secó a 105°C hasta peso constante para obtener el precipitado rico en lignina.

v-Determinación de la composición química:

El contenido de lignina insoluble y carbohidratos se determinó utilizando el método del National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42618 (64) con modificaciones (65) y el contenido de lignina soluble se determinó utilizando el método de Ehrman (66).

3) Degradación de estrógenos en solución por lacasas de diferente origen.

Se incubaron alícuotas de la lacasa en estudio con etinil estradiol (EE2) y estradiol (E2) en una concentración final de EE2=0.01 mg/mL y E2=0.02 mg/mL durante 24 hs a Tamb bajo agitación, se detuvo la reacción por agregado de NaOH. Se realizaron controles sólo con el estrógeno y solo con enzima. Los productos se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Análisis de los productos de reacción.

TLC- se extrajeron los productos con Acetato de etilo (AcOEt) y se rotaevaporaron. Las fases móviles fueron hexano: 8:2 y 9:1. Revelador anisaldehído y UV 254 nm.

HPLC. se trabajó con un Flujo 0.8 mL/min, Columna C18, Pre-columna C18, se eluyó por gradiente, empleando las soluciones A: 0.1% ácido fosfórico y B: Acetonitrilo + 0.1% ácido fosfórico. Las muestras se concentraron mediante extracción en fase sólida (SPE) en C18, obteniéndose 2 eluídos, uno en metanol (MeOH) y otro en acetato de etilo (AcOEt), ambos fueron analizados para determinar el avance de la degradación del estrógeno.

4) Formación y caracterización de los hidrogeles

Obtención de hidrogeles inactivos.

Inicialmente se trabajó con celulosa microcristalina comercial, para optimizar el proceso sin consumir los biopolímeros obtenidos. Alícuotas de 1g de [BMIM]Cl calentado a 120°C, en presencia y ausencia de DMSO, se le adicionaron distintas concentraciones del polisacárido. La mezcla fue enfriada hasta 40°C. Rápidamente se cargó la mezcla en una jeringa de 10 mL y se goteó sobre buffer pH 6.0 50 mM, utilizando una bomba peristáltica horizontal, acoplada a una estufa. Se obtuvieron "bolitas" de hidrogeles inactivas (s/enzima). La misma metodología se aplicó para la obtención de hidrogeles a partir del precipitado rico en carbohidratos obtenido en el ítem 2-iv y para los biopolímeros de Eucalyptus globulus y Switchgrass (SWG) proporcionados por el Q.F. Fernando Bonfiglio (67,68).

Obtención y caracterización de hidrogeles activos.

Se utilizó enzima liofilizada (con y sin aditivos) de TV y de DS. Los biopolímeros (en una toma en peso correspondiente a una concentración final de celulosa del 5%) se trataron con [BMIM]Cl y [BMIM]Ac a 100°C, en presencia de DMSO. Se dejó enfriar el sistema hasta 40°C previo a la adición de la enzima. Rápidamente se cargó la mezcla en una jeringa de 10 mL y se goteó sobre buffer pH 6.0 50 mM, formándose bolitas de hidrogel con enzima atrapada suspendidas en un sobrenadante. Los hidrogeles se lavaron con buffer para eliminar restos de líquido iónico. Se analizó el proceso de inmovilización mediante MSR, estudiando las variables temperatura (20–40°C), cantidad de biopolímero (125–175mg), enzima agregada (10–30UEtotales) y DMSO (0.6–1.2mL), utilizando los biopolímeros de Eucalyptus proporcionados por el Q.F. Fernando Bonfiglio, [BMIM]Ac y lacasa de DS.

También se incubaron a Tamb durante 20 hs, hidrogeles inactivos con lacasa de DS (16 UE/g de bolitas), controlándose la actividad adsorbida.

Otros estudios complementarios: a) entrapar a 50°C, b) mezclar todos los componentes directamente en la jeringa, c) reducir la cantidad de LI (80:20, 70:30, 50:50, LI/agua), d) utilizar enzima liofilizada pretratada con aditivos (ver ítem 1b-iii), e) presencia de prolina durante la formación del hidrogel.

Asimismo, se cuantificaron proteínas en la muestra aplicada, en el sobrenadante y lavados de inmovilización (previa remoción del LI que interfiere en la técnica y concentración al vacío).

El análisis de liberación de enzima del hidrogel se realizó monitoreando la formación de producto en el sobrenadante del ensayo de actividad, previa remoción de las esferas de hidrogel.

Caracterización de los hidrogeles.

Se reutilizaron los hidrogeles, para convertir DMF.

Se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  para enzima TV atrapada y DMF como sustrato.

Estabilidad con la temperatura- Se incubaron 24 hs alícuotas de hidrogeles en BA, a  $T_{amb}$ , 40, 50 y 60°C, cuantificándose la actividad residual.

SEM: se contrató el servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de Facultad de Ciencias-UdelaR para visualizar la morfología del material lignocelulósico de partida y de las esferas de hidrogel con y sin enzima.

5) Degradación de estrógenos con lacasa inmovilizada.

Se trabajó en las mismas condiciones que el ensayo en solución. Se utilizaron hidrogeles de lacasas de DS y TV atrapadas en biopolímeros extraídos por "steam explosion" de madera de *Eucalyptus globulus* y SWG, respectivamente. Los controles fueron realizados con hidrogeles sin enzima. Al finalizar la reacción se lavan los hidrogeles con AcOEt, se rotavaporan los lavados y se controlan también por HPLC.

6) Análisis de estrogenicidad por ensayo YES (69)

El mismo se realizó en el CURE Maldonado. La concentración nominal de EE2 en los controles fue 10 mg/L en un volumen total de 5 mL. Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en 1 mL de etanol absoluto obteniendo una concentración de 50 mg/L, se realizaron diluciones seriadas hasta una concentración nominal de  $1 \times 10^{-9}$  ug/L. Se tomaron 10 uL y se expusieron las levaduras al ensayo. En paralelo se realizó una curva patrón con solución estándar de Estradiol (E2).

## Resultados, análisis y discusión

1) Optimización de la producción, purificación parcial y estudios de estabilidad de la lacasa de *Dichostereum sordulentum* (DS)

1a- Optimización de la producción

Diseño experimental categórico multinivel. Con este primer modelo pudimos observar que la mayor actividad se obtiene con: PEPTONA (para ambas fuentes de carbono, glucosa ó glicerol) y con GLUCOSA. La CORTEZA: no afectó significativamente la

actividad en el rango de concentración ensayada (2-4 g/matraz) (Figura 1-ANEXO).

Diseño factorial completo con 2 niveles y puntos centrales.

Con este modelo se concluyó que la CORTEZA, es el factor con mayor peso en la respuesta alcanzada (UE/L), teniendo un fuerte efecto negativo. El INOCULO, también presentó un efecto negativo en la respuesta, el mismo podría explicarse por la competencia por los sustratos al momento del desarrollo del hongo. La GLUCOSA, no tuvo un efecto significativo, esto indicaría que la corteza aporta suficiente carbono. La PEPTONA presentó un efecto positivo en la respuesta. La interacción entre los factores CORTEZA-INOCULO-PEPTONA permitió obtener diferentes condiciones para alcanzar la misma respuesta, esto podría ser relevante para futuro escalado del proceso de producción de la lacasa.

El MODELO presentó curvatura (es decir para algún factor no hay una relación lineal con la actividad), por ello para optimizar el proceso se realizó otro diseño experimental, Central Compuesto (Figuras 2 y 3-ANEXO).

Modelo central compuesto con 2 niveles y 5 puntos centrales. En el medio basal (MCB), en presencia de glucosa 8.5 g/L, las condiciones óptimas de producción fueron: INOCULO 100 mg/matraz, CORTEZA 2-2.5 g/matraz, PEPTONA 11-12 g/L (Figura 4-ANEXO).

## 1b-Purificación a partir del sobrenadante de cultivo y caracterización de lacasa

### i- Precipitación cetónica.

La precipitación se desarrolló en forma escalonada, primero al 10% (para remover polisacáridos), en esta etapa no precipitó la enzima, recuperándose las UEniciales en el sobrenadante. Se continuó incrementando la concentración de acetona hasta alcanzar el 40%, la enzima no precipitó y toda la actividad se recogió en el sobrenadante. Cuando se elevó al 60% se logró precipitar la lacasa, obteniéndose toda la actividad en el precipitado y la enzima purificada 1.6 veces. Se debe destacar, la estabilidad de la enzima en el solvente, esto permite no sólo concentrarla, sino que también posibilita almacenarla a 4°C en forma precipitada.

### ii- Intercambio iónico

El pH fue seleccionado en base a la experiencia del equipo de trabajo sobre lacasas fúngicas. En esta etapa se logró purificar 44 veces a la enzima. El patrón electroforético resultante mostró claramente la obtención de una enzima pura en el pico de elución (Figura 5-ANEXO).

### iii- Caracterización de la lacasa

La caracterización se centró en analizar las condiciones necesarias para la futura obtención de hidrogeles activos.

Estabilidad con el pH, el precipitado cetónico resuspendido (PR) mantuvo su actividad y estabilidad en todo el rango de pH ensayado,

-Actividad en presencia de cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, [BMIM]Cl, este LI fue seleccionado porque en él se disuelven completamente los biopolímeros con los cuales se prepararon los hidrogeles. Para las 3 lacasas se observó disminución de la actividad con el aumento del % de LI, siendo la más afectada la de *P. Sanguineus*. Por este motivo no fue utilizada para la síntesis de hidrogeles activos. Se observó que la lacasa de *D. sordulentum* es más activa, sin embargo, todas pierden rápidamente actividad luego de 5% LI, conservando aún actividad a 10% LI (Figura 6-Anexo).

-Estabilidad con la temperatura en LI 10% y buffer, la lacasa DS presentó mayor estabilidad en buffer hasta 40°C, a 50°C se igualan LI y buffer, y luego la estabilidad aumenta en el LI (Figura 7-Anexo). Las otras lacasas presentaron un comportamiento semejante, sólo que luego de igualarse la actividad recuperada en 50°C, no se observa diferencia entre LI y buffer (Figuras 8-9-Anexo).

-Actividad en presencia de acetato de 1-butil-3-metilimidazolio, [BMIM]Ac, por bibliografía (70) este LI afecta menos a las enzimas, la actividad aumentó para las soluciones al 1 y 5%, luego se mantiene hasta el 10% y al 30% disminuye significativamente (Figura10-Anexo).

- Estabilidad con la temperatura, la enzima fue más estable en [BMIM]Ac al 10% que en [BMIM]Cl y buffer. La actividad recuperada para estos 3 casos se iguala a 60°C y se pierde a 70°C (Figura11-Anexo).

- Liofilización de la enzima. Para la obtención de hidrogeles activos empleando LI, la enzima debe estar libre de agua, por ello es necesario conocer su estabilidad frente a los procesos que remueven dicho solvente (en nuestro caso la liofilización). Asimismo, dado que las interacciones entre la enzima y el LI pueden afectar su solubilidad en el mismo y reducir la actividad inmovilizada, se analizó la adición de diferentes agentes previo al proceso de secado al vacío. El precipitado obtenido por precipitación cetónica al 60%, resuspendido en buffer de actividad y liofilizado en presencia de diferentes aditivos, recuperó, en todos los casos, menos del 10% de su actividad inicial. En base a estos resultados y pensando que el extracto enzimático crudo pudiera preservar a la enzima activa luego de la liofilización, a alícuotas del mismo se adicionaron PEG 600- 6000-, 8000, Tritón, LSS, NaCl. La actividad recuperada estuvo en el entorno del 70% de la inicial, salvo para el NaCl y 1mM de LSS, que fue

del orden del 50%. Es decir que los aditivos si bien no estabilizaron, su presencia no fue negativa y permitió disponer de la enzima anhidra y con diferentes alternativas de suplementos que mejoren la solubilización en el LI y así, la obtención de hidrogeles activos.

## 2) Extracción de biopolímeros empleando líquidos iónicos (LI)

En las condiciones de trabajo, el análisis del tiempo de exposición al LI [BMIM]Cl, reveló que el porcentaje de disolución a 24 hs es del 37%, a 48hs se logra más del 60% y luego de ese tiempo no se incrementa la disolución. Se obtuvieron dos precipitados, uno rico en carbohidratos y otro rico en lignina correspondientes, respectivamente, a un 26.4% y 6.5% de la masa seca inicial de corteza utilizada.

La composición química del precipitado rico en carbohidratos y del residuo de corteza que quedó sin disolver luego del tratamiento con LI puede observarse en la Tabla 1-ANEXO.

## 3) Degradación de estrógenos en solución por lacasas de diferente origen.

Análisis de los productos de reacción.

TLC- No se detectaron posibles productos, tal vez por estar muy diluidos, a futuro se considera realizar una concentración de los mismos mediante una extracción en fase sólida (SPE).

HPLC- Se observó una disminución del EE2 ( $t_r=24.5$  min) y los posibles productos fueron visibles en el eluido con AcOEt, no en MeOH, eluyendo entre los 22 min y 50 min de corrida. (Figura12-15-Anexo). En el caso del E2 ( $t_r=25.40$  min) su señal desaparece y aparece un pico pequeño a  $t_r= 23.37$  min que sería un posible producto (Figura 16-ANEXO). Los cromatogramas no variaron de una a otra lacasa. Se confirmó que es necesario concentrar para lograr observar los posibles productos de degradación.

## 4) Formación y caracterización de los hidrogeles

Hidrogeles inactivos: se observó que para tener hidrogeles que no se desintegren es necesaria una concentración del 5% de celulosa. Se desarrollaron hidrogeles a partir del precipitado de carbohidratos obtenido por disolución de corteza *Eucalyptus dunni*. También se dispuso de otros biopolímeros obtenidos por "steam explosion", a partir de madera *Eucalyptus globulus* y Switchgrass (SWG), gentilmente cedidos por el Dr. Fernando Bonfiglio (desarrollados durante su tesis de Doctorado). El [BMIM]Cl fue efectivo para solubilizar todos los biopolímeros, el [BMIM]Ac solo solubilizó a los materiales obtenidos por "steam explosion". En todos los casos el DMSO fue necesario para lograr una mejor solubilización de los biopolímeros y facilitar la formación de los hidrogeles por goteo.

Hidrogeles activos. Se utilizaron las lacasas de *T. villosa* y *D. sordulentum*, por ser las más activas. La optimización del proceso requirió una gran cantidad de biopolímero, por ello se emplearon los biopolímeros de *Eucalyptus* obtenidos por "steam explosion". Se observó que:

- la interacción enzima-temperatura es la de mayor importancia, si aumenta, aumentan las UEtotales en el hidrogel,
- el DMSO reduce la actividad inmovilizada,
- elevar la temperatura a 50°C no modificó el rendimiento de inmovilización,
- reducir la cantidad de LI (para afectar menos la estabilidad de la enzima) no permitió formar los hidrogeles,
- preparar la mezcla reactiva directamente en la jeringa de goteo, tuvo un efecto positivo, lográndose triplicar el rendimiento de inmovilización.

Se observó actividad en todos los hidrogeles obtenidos, el más activo se obtuvo con lacasa de DS, [BMIM]Ac y SWG, alcanzando una eficiencia de unión del 12%. Por este motivo y por ser líquido a Tamb, resultando más fácil de manipular, se continuó entrapando con éste LI.

Resultados preliminares de la determinación de parámetros cinéticos indican que el entrapamiento modificó la interacción enzima-sustrato, algo esperado, ya que se modifica el espacio que rodea la enzima.

En todos los casos las URecuperadas en el sobrenadante y lavados, más las inmovilizadas no igualaron a las UEaplicadas. Al cuantificar la proteína presente en sobrenadante y lavados del hidrogel, se concluyó que el 90% de las proteínas aplicadas estaban inmovilizadas. La diferencia entre el rendimiento de inmovilización en base a proteínas y UE, podría deberse a la inestabilidad de la enzima durante la formación del hidrogel. Por este motivo se buscó estabilizarla previo a su inmovilización (agregando aditivos antes de liofilizarla). Se logró mejorar la disolución del liofilizado en la mezcla de LI y DMSO, pero no se incrementó el rendimiento de inmovilización en base a UE inmovilizadas. La incorporación de prolina (reportada con efecto protector durante el entrapamiento (71)), a la mezcla de Enzima, biopolímero, DMSO y LI, no tuvo efecto. La idea es continuar trabajando para incrementar la actividad ligada al hidrogel, incorporando otros agentes durante la formación del mismo, por



ej. proteínas como la Seroalbúmina bovina, que puedan interactuar con el LI, sirviendo como un escudo para la enzima. Si bien los hidrogeles presentaron menos de un 10% de liberación de enzima, se debe superar la pérdida de actividad durante su reuso, por ello nos proponemos revertir este efecto realizando entrecruzamientos post-inmovilización, por ej. con dextranos, PEG, etc. (72).

La estabilidad térmica del hidrogel en base a DS fue superior a la de la enzima en solución, aún con 40 veces menos enzima en el ensayo, la enzima inmovilizada mantuvo un 10% de actividad residual luego de 24 hs a 50°C.

El análisis por SEM de los hidrogeles mostró un cambio notorio en la morfología del material con y sin enzima atrapada. En presencia del biocatalizador el material se ve más compacto y a mayor aumento se aprecia en las paredes de los poros, engrosamientos correspondientes a la proteína (Figuras 17 y 18-ANEXO).

Se realizaron también estudios utilizando las bolitas sin enzima como soporte para la adsorción de las lacasas, pero se obtuvieron rendimientos muy bajos: 2-3 %.

#### 4) Degradación de estrógenos con lacasa inmovilizada.

Se observó un único producto de reacción ( $t_r=22.5$  min) (Figura 19-ANEXO) por lo que, o bien la catálisis en fase sólida ocurre por otro mecanismo ó los demás productos y/o el propio EE2 se adsorben al hidrogel. Si el EE2 se adsorbe, baja su concentración en solución y los productos formados quedarían por debajo del límite de detección. Al analizar los lavados de los hidrogeles aparece estrógeno en el lavado del hidrogel activo, aunque se esperaría igual resultado para el lavado del hidrogel inactivo, en éste no apareció. Tal vez esto se deba a que la bolita con enzima atrapada retenga ciertos componentes del hidrogel que interfieren en la detección del EE2. Esto podría asociarse a la estructura más "compacta" que se observa en el SEM para el hidrogel activo (Figura 20-ANEXO).

A futuro se realizará una curva de calibración para los estrógenos, de forma de poder cuantificar la cantidad de estrógeno biotransformado y adsorbido.

#### 5) Análisis de estrogenicidad

La puesta a punto del ensayo insumió la mayor parte tiempo de colaboración con el CURE.

Tanto el tratamiento en solución con lacasa de TV como de DS mostraron efectividad en la reducción de la estrogenicidad (Tabla 2-ANEXO). Los resultados con lacasa inmovilizada deben re-confirmarse y al presente se están realizando estos estudios.

### Conclusiones y recomendaciones

Este proyecto se focalizó en desarrollar una nueva metodología de descontaminación, la cual se encuentra totalmente enmarcada en los principios de la "Química Verde" ya que implicó sintetizar biocatalizadores insolubles en nuevos biomateriales obtenidos a partir de recursos renovables, con el beneficio adicional de que al perder actividad por el uso continuo, éstos serán totalmente biodegradables. Adicionalmente, las enzimas con las que se trabajó provienen de cepas de basidiomicetes autóctonas, aisladas de plantaciones locales de Eucaliptus. En particular fue posible optimizar un protocolo para la producción y purificación de la lacasa de *Dichostereum sordulentum*, a partir del cual se logró purificar 70 veces la lacasa. Todas las lacasas utilizadas fueron capaces de degradar estrógenos y redujeron la estrogenicidad en la solución tratada.

Por otra parte, fue posible obtener biopolímeros a partir de la disolución de corteza molida de *Eucaliptus dunnii* con el líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio. Estos biopolímeros, junto con los obtenidos por el Dr. Bonfiglio, a partir de madera de *Eucaliptus globulus* y switchgrass, permitieron obtener hidrogeles con y sin enzima atrapada, activos e inactivos, respectivamente.

Los hidrogeles inactivos, si bien no adsorbieron enzima en su superficie, son una potencial matriz a ser químicamente activada para generar soportes para fijar enzimas por otras estrategias de inmovilización. Esto contribuirá a reducir costos del proceso de inmovilización, ya que la matriz donde fijar la enzima es uno de los factores que más encarece el proceso.

Todos los hidrogeles con enzima atrapada resultaron activos, sin embargo, existió una gran diferencia entre el rendimiento de inmovilización en base a proteínas (90%) y UE (en el entorno del 10%). Ello podría deberse a la inestabilidad de la enzima en el líquido iónico y en el dimetilsulfóxido (necesario para solubilizar los biopolímeros). De los líquidos iónicos utilizados el que menos afectó la lacasa fue el acetato de 1-butil-3-metilimidazolio. En próximos ensayos emplearemos otros LI, por ej. etil sulfato de 1-etil-3-metilimidazolio y el fosfato de colina dihidrogenado.

Se analizaron diversos aditivos para proteger a la enzima y evitar que pierda actividad durante la liofilización y durante la

formación del hidrogel. Sin embargo, el agregado de: tensoactivo no iónico (Tritón X-100), tensoactivo aniónico (lauril sulfato de sodio), sales (cloruro de sodio), sustrato de la enzima para proteger su sitio activo (dimetoxifenol), polietilenglicol (PEG) de diversos pesos moleculares y prolina, no logró aumentar la actividad enzimática expresada en el hidrogel. La idea es continuar trabajando en incrementar la actividad ligada al hidrogel, incorporando otros agentes durante la formación del mismo, por ej. proteínas como la Seroalbúmina bovina, que puedan interactuar con el LI, sirviendo como barrera protectora para la enzima. Además, si bien los hidrogeles presentaron menos de un 10% de liberación de enzima, se debe superar la pérdida de actividad durante su reuso, por ello nos proponemos revertir este efecto realizando entrecruzamientos post-inmovilización, por ej. con dextranos, PEG, etc.

Por otra parte, los hidrogeles activos presentaron mayor estabilidad térmica que la enzima en solución y por HPLC se probó que reducen la concentración de estrógenos presentes en soluciones acuosas, nos resta comprobar que la solución tratada resultante tenga menor estrogenicidad, para lo cual actualmente se están realizando estudios en el CURE. El análisis por Microscopía electrónica de barrido (SEM) de los hidrogeles confirmó la presencia de enzima atrapada en el hidrogel activo y que éste es más compacto que el hidrogel sin enzima.

Como conclusión final, se inició una nueva línea de trabajo con resultados muy prometedores, con derivaciones que ya están siendo planificadas para ser realizadas a corto plazo. Además, durante el desarrollo del proyecto se consolidó la integración de varios grupos de trabajo a lo largo del país (Montevideo, Paysandú, Tacuarembó y Maldonado) y se contribuyó a la formación de recursos humanos a través de una Maestría. Parte de los resultados obtenidos se han difundido en congresos y en cursos (de grado y posgrado).

## Referencias bibliográficas

- 1.Petrie, B. et al. *Water research*. 2015, 72, 3-27
- 2.Cardoso, O. et al. *W. Chemosphere*. 2014, 115, 20–30
- 3.Gogoi, A. et al. *Groundwater for Sustainable Development* .2018, 6, 169–180
- 4.Xiong, J-Qi. et al. *Trends in Biotechnology*. 2018, 36(1), 30-44
- 5.Bexfield, L. M. et al. *Environmental Science & Technology*. 2019, 53, 2950&#8722;2960
- 6.Communication from the Commission to the European Parliament , The Council and the European Economic and Social Committee. *European Union Strategic Approach to Pharmaceuticals in the Environment*. Brussels, COM 2019, 128 final
- 7.Johnson, A.C. et al. *Environmental Science Technology*.2013, 47(21), 12297-12304
- 8.Adeel, M. et al. *Environment International*. 2016, 99, 107-119
- 9.Jobling, S. et al. *Environmental Health Perspectives*.2006, 114(1), 32-39
- 10.Kidd, K. et al. *Proceedings of the National Academy of sciences*. 2007, 104(21), 8897–8901
- 11.Larsson DGJ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2014, 369:20130571. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0571>
- 12.UN trends Contraceptive Use. Report, 2015
13. Encuesta Nacional de comportamientos reproductivos, ENCoR, 2016 [http://www.unfpa.org.uy/userfiles/publications/167\\_file2.pdf](http://www.unfpa.org.uy/userfiles/publications/167_file2.pdf)
- 14.INFORME MONITOREO DE EFLUENTES INDUSTRIALES, 2015 [http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/informeanualuei2015\\_0.pdf](http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/informeanualuei2015_0.pdf)
- 15.Sistema de Saneamiento, 2017. IMM. PLANTA DE PRE-TRATAMIENTO, ESTACIÓN DE BOMBEO PUNTA CARRETAS Y EMISARIO SUBACUÁTICO <http://www.montevideo.gub.uy/servicios-y-sociedad/saneamiento/sistema-de-saneamiento>
- 16.Tesis Miguez, D. 2013. <https://dspace.lib.cranfield.ac.uk/handle/1826/8201>
- 17.Griffero, L. et al. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 2018, 13(1), 15-22
- 18.Kunamneni, A. et al. *Recent Patents on Biotechnology*. 2008, 2(1), 10-24
- 19.Khlifi, R. et al. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, 175, 802-808
- 20.Hu, M.R. et al. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009, 36, 45-51
- 21.Torres-Duarte, C. et al. *Chemosphere*. 2009, 77, 687-692
- 22.Camarero, S. et al. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, 40, 1264-1271
- 23.Rodríguez Couto S., et al. *Chemosphere* .2005, 58, 417-422
- 24.Bourbonnais R; Paige M.G. *FEBS Letters*. 1990, 267, 99-102
- 25.Macellaro, G. et al. *Biomed Research International*. 2014, Article ID 614038 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/614038>
- 26.Auriol, M. et al. *Water Research*. 2007, 41(15), 3281–3288
- 27.Sheldon, R. A. *Advances Synthesis and Catalysis*. 2007, 349, 1289–1307
- 28.Skoronski, E. et al. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 99, 121-127
- 29.Asgher, M. et al. *Chemical Engineering Research and Design*. 2017, 119, 1-11
- 30.Bagewadi, Z. et al. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, In Press, Corrected Proof, Disponible online 14 Feb. 2017
- 31.Abd El Aty, Abeer. et al. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017, 9, 74-81
- 32.Sun, H. et al. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016, 47(1), 20-28
- 33.Zheng, F. et al. *J. International Biodeterioration & Biodegradation*. 2016, 110, 69-78
- 34.De Souza, T. et al. *Process Biochemistry*. 2015, 50(3), 417-423
- 35.Gioia, L. et al. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 2015, 62(4), 502-13
- 36.Gioia, L. et al. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2018, 4, 2125
- 37.Liu Y; Chen J Y. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2016, 31(6), 553-567
- 38.Poulsen, P. *Current Applications of Immobilized Enzymes for Manufacturing Purposes*, in *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1985, Vol. 1 (Russel, G., ed.) Intercept, Newcastle
- 39.Chibata, I.; Tosa, T. *Trends in Biotechnology*. 1983, 1, 9-11

40. Trevan, M. D. *Immobilized Enzymes: An Introduction and Their Application in Biotechnology*. 1980, Wiley, Chichester United Kingdom
41. Jegannathan, K. et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009, 58, 78–83
42. Cheirsilp, B. et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009, 59, 206–211
43. Dadi, A. et al. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007, 137, 407–421
44. Klemm, D. et al. *Polymer News*. 1999, 24, 377–379
45. Boerjam, W. et al. *Annual Review of Plant Biology*. 2003, 54, 519–546
46. Koch, G. Raw material pulp. In: Sixta H (ed) *Handbook of pulp*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2006. KGaA, Weinheim
47. Hamelinck, C. et al. *Biomass & Bioenergy*. 2005, 28, 384–401
48. Cazaurang, M. et al. *Cellulose Chemistry and Technology*. 1999, 24, 629–638
49. Morán, J. et al. *Cellulose*. 2008, 15(1), 149–159
50. Jahan, M. et al. *Cellulose*. 2011, 18(2), 451–459
51. Fort, D. et al. *Green Chemistry*. 2007, 9, 63–69
52. Lucas, M. et al. *Applied Material and Interfaces*. 2010, 2, 2198–2205
53. Yuan, T. et al. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2010, 58, 11302–11310
54. Rogers, R.; Seddon, K. *Science*. 2003, 302, 792–793
55. Freemantle M. RSC Publishing, 2009 ISBN: 978-1-84755-161-0
56. Abai, M. et al. *Dalton Transactions*. 2015, 44, 8617–8624
57. McCoy, M. *News of The Week*. 2016, 94 (39), 16
58. United States US 2003/0157351 A1
59. Tesis Gioia, L. <http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/7ee1fbb5bd2511a8d3ff947e9ee5f008.pdf>
60. Tesis Botto, E. <http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/e7e03b0dd24119d24a4fcc5c2e73b9ed.JPG>
61. Tesis Reina, L. Estudio de la composición química de distintos materiales lignocelulósicos: caracterización de las ligninas y compuestos de alto valor agregado.
62. Ahn, M.Y., et al. *Enzyme and Microbial Technology* 41 (2007) 141–148
63. <http://www.pb-l.com.ar/wp-content/uploads/2016/07/RA03-qPROTEIN.pdf>
64. Sluiter, A. et al. NREL/TP-510-42618 analytical procedure Lab. Anal. Proced. (2012)17. <https://doi.org/NREL/TP-510-42618>.
65. Reina, L. et al *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 107 (2014) 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.03.013>.
66. Ehrman, T. *Lab. Anal. Proced.* (1996) 8.
67. Bonfiglio, F. et al. *Biomass Bioenergy* 121, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.013>.
68. Bonfiglio, F. et al. *Industrial Crops & Products* 170, 113800
69. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8174/1/uy24-17726.pdf>
70. Kim, M.H., et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 75 (2012) 68–72
71. Singh, R., et al. *Biotech* (2020) 10:155. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2140-7>
72. Imam, H. T., et al. Marr, P.C., Marr, A.C. *Green Chem.*, 2021. 23, 4980 DOI: 10.1039/d1gc01852crsc.li/greenchem

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)