



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

**TESIS DE DOCTORA EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE LOS MATERIALES**

Síntesis y caracterización de partículas magnéticas
para su aplicación en biotecnología.

Paula Nicolás

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

1 de Febrero de 2017

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Ciencia y Tecnología de los Materiales, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2012 y el 1 de febrero de 2017 bajo la dirección de la Dra. María Luján Ferreira y codirección de la Dra. Verónica L. Lassalle.

Paula Nicolás



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el 23/3/2017 , mereciendo la calificación de
Sobresaliente 10(Diez))

A Maite

A los valientes estudiantes de las ciencias duras de América latina, que a través de su complejidad vislumbran la paz.

AGRADECIMIENTOS

A la UNS, la ANPCyT y el CONICET por el soporte financiero para el desarrollo de la presente tesis.

A la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) por proveer el equipamiento y el espacio físico para la realización de este trabajo.

A todo el personal de apoyo y técnicos del instituto PLAPIQUI, especialmente del grupo de Catálisis por su invaluable ayuda en la utilización de equipos necesarios para el trabajo experimental de la tesis.

Al personal administrativo de PLAPIQUI, en especial a Nora Pascual.

A María Julia Yáñez por aportar su pericia en las técnicas de microscopía electrónica.

A la Dra. Susana Morcelle por realizar el SDS-PAGE.

A mis directoras, las Dras. María Luján Ferreira y Verónica Lassalle por su confianza, paciencia y conocimiento.

A mis compañeros y compañeras de PLAPIQUI, por su cariño y amistad.

RESUMEN

La presente tesis estudia dos líneas de investigación paralelas y complementarias: por un lado, la síntesis de partículas de magnetita mediante el método de co-precipitación en presencia de surfactantes; por otro lado el diseño de biocatalizadores a base de la lipasa B de *Candida Antarctica* (CALB) y soportes magnéticos. La CALB ha sido estudiada en profundidad por el grupo de biocatálisis del instituto PLAPIQUI a lo largo de varios años. La performance de los biocatalizadores obtenidos fue testada en la reacción de esterificación de ácido oleico con etanol sin solvente.

El capítulo I introduce los conceptos básicos sobre catálisis en general y, con un nivel mayor de detalle, los relacionados con la catálisis enzimática resaltando su importancia en relación a múltiples aspectos biotecnológicos, ambientales y económicos.

Se resumen los distintos métodos de inmovilización estudiados en la literatura a lo largo de la historia de esta disciplina, señalando las ventajas y desventajas de cada uno. También se hace una revisión de la variedad de materiales utilizados como soportes sólidos.

Se puntualiza en soportes magnéticos, en particular a base de nanopartículas del óxido de hierro Fe_3O_4 , magnetita (MAG). Se explicitan las características de la MAG, seleccionada para este trabajo. Las estrategias de síntesis de este óxido de hierro son brevemente reseñadas, profundizando en el método de co-precipitación. Finalmente se enumeran los objetivos puntuales de las tesis.

En el capítulo II se detalla el procedimiento experimental para la inmovilización de CALB. Se establecen las condiciones de reacción en las que se medirá la actividad catalítica (reacción test) y un protocolo de muestreo adecuado para la determinación de conversión. Por último, se describen las técnicas de caracterización aplicadas a los catalizadores y materiales precursores junto con el tratamiento necesario de las muestras para cada una.

El capítulo III incluye el estudio de la síntesis de los *soportes* nanoparticulados a base de magnetita. Se analizan la influencia del tipo y

concentración de estabilizante empleado en el medio de coprecipitación de MAG sobre las propiedades fisicoquímicas de las partículas formadas. Los modificantes explorados fueron ácido oleico, dodecilsulfato de sodio, polietilenglicol de alto peso molecular (35000) y hexametiltetramina. Además, se estudia la funcionalización de las partículas magnéticas con grupos amino (NH_2) empleando quitosano (QUIT) o lisina. Las muestras fueron caracterizadas por SEM-EDX, TEM, DRIFTS y DLS. Se establecen las formas en que cada sustancia orgánica participa en el mecanismo de cristalización y mediante éste se logra explicar las diferencias observadas en el tamaño, forma y funcionalidad superficial de las partículas.

En el capítulo IV se estudia la inmovilización covalente de CALB sobre partículas magnéticas modificadas con ácido oleico, quitosano (QUIT) y glutaraldehído (GLUT). Las interacciones QUIT-GLUT, GLUT-CALB y CALB-CALB son estudiadas en profundidad. Se propone una relación entre las propiedades del soporte y el biocatalizador con la actividad catalítica. En base a esta relación, se sugiere un mecanismo de inmovilización que explica el comportamiento del sistema y se determinan cuáles son las variables críticas a ajustar para mejorar el protocolo de inmovilización.

En el capítulo V constituye un trabajo de optimización del catalizador preparado en el capítulo IV. Para ello, se investiga la inmovilización de CALB sobre el mismo soporte estudiado en el capítulo IV, previa modificación de la superficie con cantidades variables de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTS) y de más GLUT. La influencia de la cantidad nominal de CALB ofrecida también fue evaluada. Un programa computacional se empleó para diseñar los experimentos y analizar estadísticamente los resultados. Se obtuvieron modelos matemáticos que permitieron identificar las variables significativas para cada respuesta evaluada: conversión, carga enzimática y actividad específica. Se seleccionaron los mejores catalizadores para comprobar su estabilidad operacional y retención de actividad en almacenamiento. Los mecanismos de inmovilización sobre las distintas superficies que explican estas propiedades son propuestos. Los diferentes catalizadores y materiales precursores fueron caracterizados ampliamente por varias técnicas.

En el capítulo VI se exploran distintos métodos de cuantificación de proteínas en vista de los errores encontrados en los más comunes (Bradford, Lowry) y que se implementan en forma rutinaria para el cálculo de la carga enzimática en los biocatalizadores preparados. CALB fue determinada en el caldo comercial, los sobrenadantes de inmovilización y aguas de lavado de varias muestras mediante 4 protocolos distintos, combinando el clásico ensayo de Bradford con la determinación de azufre por emisión atómica. Se analizó la influencia del patrón de concentración elegido para el método colorimétrico y se identificaron las interferencias presentes en ambas técnicas. Fue posible establecer un protocolo de cuantificación de esta lipasa que, a diferencia de otros, arrojó valores de carga enzimática concordantes con la actividad de los catalizadores. La demostración de los errores sistemáticos cometidos a través del ensayo de Bradford sugiere que este método sea reconsiderado – e incluso descartado- para cuantificar cualquier proteína, ya sea en un medio de inmovilización o no.

En el capítulo VII se investiga la inmovilización de CALB un nuevo soporte: magnetita funcionalizada con el aminoácido lisina (LIS). Este material posee propiedades diferentes a MAG-QUIT en cuanto a tamaño de partícula y estabilidad en suspensión acuosa. El acoplamiento de la lipasa se realizó mediante dos técnicas: A- adsorción simple sobre MAG-LIS seguida de entrecruzamiento con GLUT de concentración variable, y B-activación de MAG-LIS con GLUT de una concentración específica (determinada según los resultados del método A) y posterior inmovilización covalente. Se logró diseñar un protocolo que permite obtener un biocatalizador activo, fácilmente separable del medio de reacción, reutilizable, resistente a los reusos y total preservación de actividad durante largos períodos de almacenamiento.

En capítulo VIII se enumeran las conclusiones globales de todo la investigación realizada y se establecen los lineamientos considerados pertinentes para el trabajo a futuro.

ABSTRACT

The present thesis follows two parallel and complementary lines of research: on the one hand, the synthesis of magnetite particles by the co-precipitation method in the presence of surfactants; and on the other, the use of different materials prepared as new supports for the immobilization of *Candida Antarctica* lipase B (CALB), an enzyme in depth studied by the biocatalysis group of the PLAPIQUI institute over several years. The performance of the obtained biocatalysts was tested in the solvent-free esterification reaction of oleic acid with ethanol.

Chapter I introduces general concepts of catalysis and, with a greater level of detail, those related to enzymatic catalysis. The importance was highlighted in relation to multiple aspects such as biotechnology, environment and economy. Different methods of immobilization studied in the literature throughout the history of this discipline are summarized, pointing out the advantages and disadvantages of each one. There is also an extensive review of the variety of materials used as solid supports.

Magnetic supports are well described, particularly those based on magnetite nanoparticles. The characteristics of the magnetite as the one chosen for this work are explained. The synthesis strategies of nanoparticulated iron oxide are briefly reviewed, deepening in the co-precipitation method. Finally the specific objectives of the theses are listed.

Chapter II details the experimental procedure for CALB immobilization. The reaction conditions in which the catalytic activity (test reaction) and a suitable sampling protocol for conversion determination are measured are set forth. Finally, the characterization techniques applied to the catalysts and precursor materials are described together with the necessary treatment of the samples for each one.

Chapter III includes the study of the synthesis of nanoparticulated supports based on magnetite. The influence of the type and concentration of stabilizer used for MAG coprecipitation medium on the physicochemical properties of the formed particles is analyzed. The modifiers screened were oleic

acid, sodium dodecylsulfate, high molecular weight polyethylene glycol (35,000) and hexamethylenetetramine. In addition, the functionalization of the magnetic particles with amino groups (NH_2) using chitosan (QUIT) or lysine was studied. Samples were characterized by SEM-EDX, TEM, DRIFTS and DLS. The role of each organic substance in the mechanism of crystallization are established. This analysis allows to explain the differences observed in the size, shape and surface functionality of the particles.

Chapter IV studies the covalent immobilization of CALB on magnetic particles modified with oleic acid, chitosan (QUIT) and glutaraldehyde (GLUT). The QUIT-GLUT, GLUT-CALB and CALB-CALB interactions are studied in depth. A relation between the properties of the support and the biocatalyst with the catalytic activity is proposed. Based on this relationship, an immobilization mechanism is suggested that explains the behavior of the system and determines which are the critical variables to be adjusted to improve the immobilization protocol.

Chapter V is an optimization work for catalyst prepared in Chapter IV. For this purpose, CALB was immobilized on the same support studied in Chapter IV, after modification of the surface with varying amounts of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) and more GLUT. The influence of the nominal amount of CALB offered was also evaluated. A computer program was used to design the experiments and statistically analyze the results. Mathematical models were obtained to identify the significant variables for each evaluated response: conversion, enzymatic loading and specific activity. The best catalysts were selected to check their operational stability and activity retention after storage. The mechanisms of immobilization on the different surfaces that explain these properties are proposed. The prepared catalysts and precursor materials were widely characterized by various techniques.

In Chapter VI, different methods of protein quantification are explored considering the errors found in the most common ones (Bradford, Lowry) , routinely implemented for the calculation of the enzymatic loading in biocatalysts. CALB was determined in the commercial broth, the immobilization supernatants and washing waters of several samples by 4 different protocols, combining the

classic Bradford test with the determination of sulfur by atomic emission. The influence of the concentration standard chosen for the colorimetric method were studied and the interferences present in both techniques were identified. It was possible to establish a protocol for quantification of this lipase which, unlike others, yielded values of enzymatic loading consistent with the activity of the catalysts. The demonstration of the systematic errors made through the Bradford test suggests that this method be considered - and even ruled out - to quantify any protein, whether in immobilization medium or not.

Chapter VII investigates the immobilization of CALB on a new support: magnetite functionalized with the amino acid lysine (LIS). This material has different properties from MAG-QUIT in terms of particle size and stability in aqueous suspension. Lipase coupling was performed by two techniques: A- simple adsorption on MAG-LIS followed by cross-linking with GLUT of variable concentration, and B- activation of MAG-LIS with GLUT of a specific concentration (determined according to the results of method A) and subsequent covalent immobilization. It was possible to design a protocol that allows to obtain an active biocatalyst, easily removable from the reaction medium, reusable, resistant to reuse and with total preservation of activity during long periods of storage.

Chapter VIII lists the overall conclusions of the research carried out and establishes the guidelines considered relevant for future work.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	aminoácido
A _{CALB}	actividad específica por mg de lipasa inmovilizada
A _{CAT}	actividad específica por mg de catalizador
AR	actividad retenida
AO	ácido oleico
APTS	3-aminopropiltriétoxissilano
BSA	albúmina de suero bovino
CALB	lipasa B de <i>candida antarctica</i>
CBB	azul brillante de Coomassie
CE	carga enzimática
DC	dispersión coloidal
Dh	diámetro hidrodinámico
DLS	dispersión de luz dinámica
DRIFTS	espectroscopía infrarroja de reflectancia difusa con transformada de Fourier
EA-ICP	emisión atómica-plasma de acoplamiento inducido
EDX	energía de rayos X dispersados
GLUT	glutaraldehído
HMTA	hexametiléntetraamina
IR	infrarrojo
LIS	lisina
MAG	magnetita
mg	miligramo
mmol	milimol
NPMs	nanopartículas magnéticas
PDI	índice de polidispersión
PEG	poli-etilenglicol

PPproteína precipitable
QUITquitosano
RBreactivo de Bradford
SDSdodecilsulfato de sodio
SEMmicroscopía electrónica de barrido
SOPsoporte MAG-AO-QUIT-GLUT
TEMmicroscopía electrónica de transmisión
UE.....unidades de enzima
UL.....unidades de lipasa
UV-Visultravioleta visible
Xconversión
ζpotpotencial zeta
μmol micromol

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.1.** Niveles de estructura molecular en una proteína
- Esquema 1.2.** Representación del mecanismo de reacción de las lipasas
- Esquema 1.3.** Resumen de métodos de inmovilización enzimática
- Esquema 1.4.** Estructura molecular del glutaraldehído
- Esquema 1.5.** Química de la superficie de MAG en agua
- Esquema 1.6.** Mecanismos probables de crecimiento de núcleos de MAG
- Esquema 2.1.** Toma de muestra de la síntesis de oleato de etilo con catalizador magnético
- Esquema 2.2.** Representación de la reflexión de radiación por superficies rugosas.
- Esquema 3.1.** Estructuras de AO, SDS, HMTA y PEG
- Esquema 3.2.** A-Estructura molecular de la lisina y valores de pKa de cada grupo ionizable. B-Quitano
- Esquema 3.3.** Estructura molecular de un aminoácido genérico
- Esquema 3.4.** Mecanismo de oxidación de formaldehído sobre óxido de hierro y representación de la adsorción del anión formiato sobre la superficie de MAG.
- Esquema 3.5.** Interacciones posibles entre AO y Fe superficial en MAG
- Esquema 3.6.** Desagregación de MAG-AO por sonicación en acetona
- Esquema 3.7.** Mecanismos de interacción MAG-AO con QUIT
- Esquema 3.8.** Estructura de LIS adsorbida sobre MAG
- Esquema 4.1.** Principales reacciones entre QUIT y GLUT
- Esquema 4.2.** Estructuras originadas por la interacción GLUT-Enzima
- Esquema 5.1.** Interacciones entre CALB y SOP_A
- Esquema 5.2.** Química de la superficie de los materiales SOP_{AG}
- Esquema 6.1.** Estructura del CBB a pH 2-7 (forma azul, carga neta -1)

Esquema 7.1. Caminos de inmovilización de CALB sobre MAG(SDS)-LIS

Esquema 7.2. Efecto del GLUT sobre CALB adsorbida en MAG(SDS)-LIS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Variación de la velocidad de una reacción biocatalizada en función de la concentración de sustrato.

Figura 1.2. Número de publicaciones anuales en revistas científicas sobre inmovilización enzimática.

Figura 1.3. Curva de histéresis magnética.

Figura 1.4. Respuesta de nanopartículas de magnetita dispersas en agua ante un campo magnético

Figura 1.5. Disposición de cationes Fe^{2+} y Fe^{3+} y aniones óxido en la estructura de MAG.

Figura 1.6. Variación de la concentración de cristales a lo largo del tiempo de precipitación

Figura 2.1. Típica fuente de plasma de acoplamiento inducido

Figura 2.2. Nebulizador para la inyección de muestra en la fuente de plasma.

Figura 2.3. Representación de un microscopio electrónico de barrido (SEM)

Figura 2.4. Representación de un microscopio electrónico de transmisión (TEM).

Figura 2.5. Representación del comportamiento de la luz al interaccionar con partículas pequeñas o grandes en suspensión

Figura 2.6. Ilustración del fenómeno en el que el D_h es mayor que el tamaño del núcleo de la partícula

Figura 2.7. Distribuciones de DH de una misma muestra expresadas en número, volumen o intensidad

Figura 2.8. Representación de la doble capa eléctrica alrededor de una partícula cargada negativamente

Figura 2.9. a)Celda de medición de diámetro hidrodinámico. b)Celda para la medida de potencial Z

Figura 3.1 Equipamiento utilizado para la coprecipitación de magnetita

Figura 3.2. Aspecto del medio de coprecipitación de MAG-AO a medida que se agrega la base.

- Figura 3.3.** SEM-EDX de las muestras P. Escala = 10 μm .
- Figura 3.4.** SEM-EDX de muestras H. Escala = 10 μm .
- Figura 3.5.** SEM-EDX de muestras PH. Escala = 10 μm .
- Figura 3.6.** SEM de MAG-AO. Escala = 200 nm.
- Figura 3.7.** TEM de MAG-AO
- Figura 3.8.** TEM de muestras H. Escala = 20 nm.
- Figura 3.9.** Proyecciones en el plano de un octaedro.
- Figura 3.10.** TEM de muestras P. Escala = 20 nm
- Figura 3.11.** TEM de muestras PH. Escala = 20 nm
- Figura 3.12.** TEM de la muestra P2I. Escala = 20 nm
- Figura 3.13.** TEM de la muestra MAG(SDS). Escala = 20 nm
- Figura 3.14.** Fotografía de dispersiones de muestras seleccionadas en solventes de distinta polaridad.
- Figura 3.15.** Espectro IR de transmisión de P2
- Figura 3.16.** Espectro IR de transmisión de H2
- Figura 3.17.** Espectro IR de transmisión de PH2
- Figura 3.18.** Espectro DRIFTS de MAG-AO
- Figura 3.19.** Espectros de MAG(SDS) lavada con agua o con heptano y etanol.
- Figura 3.20.** Espectro IR de MAG(SDS)-LIS
- Figura 3.21.** Espectro IR de MAG-AO-QUIT
- Figura 3.22.** Espectro de compuesto intermediario en la coprecipitación de MAG con HMTA.
- Figura 4.1.** Espectros infrarrojos del soporte, CALB inmovilizada y CALB libre.
- Figura 4.2.** Representación de los enlaces que dan origen a bandas características de proteínas en el IR.
- Figura 4.3.** Micrografías TEM a) SOP. b) SOP-CALB. Las barras en el extremo inferior izquierdo representan 10 nm.

Figura 4.4. Conversión en esterificación de AO con Novozyme435 y SOP-CALB.

Figura 4.5. Conversión retenida por 33 mg de SOP-CALB/g de AO

Figura 4.6. Conversiones medidas en ciclos catalíticos y tests de leaching para 30 mg del catalizador SOP-CALB

Figura 4.7. Retención de la actividad de 30 mg de SOP-CALB luego de 2 meses de almacenamiento a 4 °C.

Figura 4.8. Aspecto de la suspensión acuosa de MAG-AO-QUIT antes y después del entrecruzamiento con GLUT.

Figura 4.9. Estructuras de los compuestos de GLUT en agua.

Figura 4.10. Espectros UV de GLUT al 2,5 % a temperatura ambiente y a 45 °C.

Figura 4.11. Espectros UV-V de sobrenadantes y lavados de la reacción MAG-AO-QUIT con GLUT

Figura 4.12. Distribución de lisinas (K) expuestas en CALB. La tríada catalítica se señala en rojo

Figura 4.13. Aditivos del caldo comercial de CALB

Figura 5.1. Estructura de la molécula de APTS

Figura 5.2. Espectros IR de SOP agitado en etanol puro

Figura 5.3. Espectros IR de muestras SOP_A

Figura 5.4. Espectro IR de APTS impregnado en KBr.

Figura 5.5. Espectros IR de SOP_{AG} sin GLUT.

Figura 5.6a Zona de los espectros IR de muestras SOP_{AG} con GLUT correspondientes a la región de absorción de grupos OH y NH

Figura 5.6b. Zona de los espectros IR de muestras SOP_{AG} con GLUT correspondientes a la región de absorción de enlaces C-N, C=N y Si-O

Figura 5.7. Espectros IR de CAT 1 a 10.

Figura 5.8. Micrografía SEM y espectro EDX de SOP_{AG1}

Figura 5.9. Micrografía SEM y espectro EDX de SOP_{AG4}

Figura 5.10. Micrografía SEM y espectro EDX de SOP_{AG7}

Figura 5.11. Micrografía SEM y espectro EDX de SOP_{AG9}

Figura 5.12. Micrografía SEM y espectro EDX de CAT 1

Figura 5.13. Micrografía SEM y espectro EDX de CAT 4

Figura 5.14. Micrografía SEM y espectro EDX de CAT 7

Figura 5.15. Micrografía SEM y espectro EDX de CAT 9

Figura 5.16. Micrografías TEM de muestras seleccionadas SOP_{AG} y CAT. Las barras en las esquinas inferiores izquierdas equivalen a 20 nm.

Figura 5.17. Diámetros hidrodinámicos de agregados de muestras CAT.

Figura 5.18. Diagrama de Pareto estandarizado para X%

Figura 5.19. Superficie de respuesta X% vs. CE% y mg de GLUT nominal.

Figura 5.20. Conversión experimental y calculada vs. carga enzimática.

Figura 5.21. Diagrama de Pareto estandarizado para CE%

Figura 5.22. Superficie de respuesta de CE% vs. CALB y GLUT nominales.

Figura 5.23. Diagrama de Pareto para AE_{CAT}

Figura 5.24. Superficie de respuesta AE_{CAT}

Figura 5.25. Diagrama de Pareto para AE_{CALB}

Figura 5.26. Superficie de respuesta para AE_{CALB}.

Figura 5.27. Superficie de respuesta para Deseabilidad con CALB constante igual a 6 mg nominal.

Figura 5.28. X% con masas variables de CAT 7 a 24 y 45 °C.

Figura 5.29. X% con 60 mg de CAT7 a T ambiente.

Figura 5.30. X% inicial de CATs seleccionados y luego de 2 meses de almacenamiento.

Figura 5.31. A)Ácido aspártico, B)Histidina, C)Serina

Figura 5.32. Representación de CALB inmovilizada sobre SOP_{AG7} y 12

Figura 5.33. Dependencia de AR% con CE%

Figura 5.34. CE% en función de mg de CALB ofrecida para las 3 cantidades de GLUT nominal.

Figura 6.1.a-RB 5X en soluciones de diferente pH. **b**-Espectros UV-V de las soluciones en 6.1a

Figura 6.2. Curvas de calibrado del método de Bradford en el rango estándar.

Figura 6.3. Curvas de calibrado del método de Bradford en el rango micro.

Figura 6.4. Curvas de calibrado del método de Bradford con BSA o CALB como patrón de concentración.

Figura 6.5. SDS-PAGE del caldo comercial de CALB. 1- Marcadores de peso molecular. 2 y 3-Caldo comercial de CALB.

Figura 6.6. Espectro UV-V de A) la muestra control con RB 5X, B) sobrenadantes de inmovilización a tiempo = 0 (3, 6, 9 mg de CALB/50 mL) diluidos a un cuarto con BR 5X.

Figura 6.7. Espectro XRF del soporte sólido SOP_{AG7}.

Figura 6.8. Variación de la conversión de los catalizadores vs. su CE calculada por el método de Bradford y por los métodos III-IV

Figura 6.9. Reacción entre APTS y GLUT en agua y el posterior agregado de RB 5X.

Figura 6.10. Producto de reacción APTS-GLUT en etanol y el posterior agregado de RB 5X.

Figura 6.11. Espectros UV-V de diluciones del sobrenadante de inmovilización de CAT 7 con CBB, sin agitación (negro) y agitado (rojo).

Figura 7.1. Espectro IR de MAG(SDS)-LIS-CALB

Figura 7.2. Espectros IR de MAG(SDS)-LIS-CALB-GLUTX, X=0,05-0,6%

Figura 7.3. Espectros IR de MAG(SDS)-LIS, con GLUT como agente activador del soporte y CALB inmovilizada covalentemente.

Figura 7.4. Micrografías TEM de muestras seleccionadas a una magnificación de 270000 X. Las barras de escala en las esquinas representan 20 nm.

Figura 7.5. Micrografías TEM de distintas zonas del catalizador B. La barra en la esquina inferior izquierda representa 20 nm.

Figura 7.6. Conversión (azul) y leaching (rojo) de catalizadores A0,05-0,6. El A2,5 resultó totalmente inactivo ya en el primer uso.

Figura 7.7. Conversión y leaching de 30 mg de catalizador B.

Figura 7.8. Conversión de 30 mg de catalizador/g AO a 45 °C luego de ser almacenados por períodos prolongados.

Figura 7.9. Cantidades de AO convertido por 30 mg de cada catalizador en todos los ciclos. A2,5 resultó totalmente inactivo.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.1.** Factor E de diferentes sectores productivos
- Tabla 1.2.** Ventajas y desventajas de las enzimas como catalizadores
- Tabla 1.3.** Materiales aplicados como soporte sólido en inmovilización de enzimas
- Tabla 2.1.** Técnicas de caracterización empleadas
- Tabla 3.1.** Condiciones experimentales para obtener 500 mg de MAG.
- Tabla 3.2.** Dh y ζ_{pot} de las magnetitas coprecipitadas en presencia de estabilizantes.
- Tabla 4.1** Dh y ζ_{pot} del catalizador y el soporte
- Tabla 4.2.** Diámetros hidrodinámicos de CALB en solución.
- Tabla 5.1.** Variables independientes y respuestas
- Tabla 5.2.** Condiciones de borde impuestas al programa
- Tabla 5.3.** Diseños propuestos por el programa.
- Tabla 5.4.** Diseño experimental aleatorizado
- Tabla 5.5.** Condiciones experimentales de preparación de todos los catalizadores
- Tabla 5.6.** Porcentajes en peso de MAG y APTS en muestras CAT
- Tabla 5.7.** Respuestas del diseño experimental
- Tabla 5.8.** Errores estándar basados en el error total con 3 g.l. para X%
- Tabla 5.9.** Análisis de Varianza para conversión. $R^2 = 76,5727 \%$
- Tabla 5.10.** Errores estándar basados en el error total con 3 g.l. para CE%
- Tabla 5.11.** Análisis de Varianza para carga enzimática. $R^2 = 96,4532 \%$
- Tabla 5.12.** Errores estándar basados en el error total con 3 g.l.
- Tabla 5.13.** Análisis de Varianza para AE_{CAT} . $R^2 = 75,921 \%$
- Tabla 5.14.** Regresión múltiple para $AECAT$ vs. CE% y GLUT
- Tabla 5.15.** ANOVA para AE_{CAT} vs. CE% y GLUT. $R^2 = 87,7331 \%$.

Tabla 5.16. Errores estándar basados en el error total con 3 g.l.

Tabla 5.17. Análisis de Varianza para AE_{CALB} . $R^2 = 89,4988 \%$

Tabla 5.18. Coeficientes y valores P del modelo AE_{CALB} (Ec. 4.4)

Tabla 5.19. ANOVA de AE_{CALB} . $R^2 = 87,2801 \%$

Tabla 5.20. Deseabilidad prevista por los modelos y observada experimentalmente.

Tabla 5.21. Actividad retenida a los 2 meses de almacenamiento (AR%) con 30 mg de CAT/g AO y CE% de muestras seleccionadas.

Tabla 6.1. Curvas de calibrado con BSA como patrón.

Tabla 6.2. Curva de calibrado con CALB como patrón.

Tabla 6.3. Concentraciones de proteína en caldo comercial de CALB

Tabla 6.4. Proteína detectada por el método de Bradford en diluciones del caldo comercial

Tabla 6.5. Cargas enzimáticas determinadas por los 4 métodos.

Tabla 7.1. Diámetros hidrodinámicos en agua y potencial ζ de catalizadores A, B y materiales precursores.

Tabla 7.2. Costos de los reactivos para fabricar 1 g de catalizador B y precio de Novozyme® 435.

ÍNDICE

Capítulo I: Introducción.....	1
1.1. Introducción.....	3
1.2. Catálisis enzimática.....	6
1.2.1. Enzimas.....	6
1.2.2. Lipasas.....	10
1.2.3. Concepto de actividad enzimática.....	13
1.3. Inmovilización de enzimas.....	15
1.3.1. Atrapamiento.....	16
1.3.2. Encapsulamiento.....	16
1.3.3. Interacción química entre enzimas.....	18
1.3.4. Interacción química con un soporte sólido.....	18
1.3.4.1. Protocolos de inmovilización enzimática sobre soportes sólidos.....	19
1.3.4.2. Materiales de soporte para inmovilización enzimática	21
1.4. Nanotecnología magnética.....	25
1.5. Magnetita.....	28
1.5.1. Propiedades de la magnetita.....	28
1.5.2. Métodos de síntesis de magnetita.....	29
1.5.2.1. Descomposición térmica de acetilacetanoato de Fe	29
1.5.2.2. Microemulsiones	30
1.5.2.3. Métodos hidrotérmicos	30
1.5.2.4. Métodos electroquímicos	30
1.5.2.5. Coprecipitación.....	30
1.6. Estudios previos acerca de inmovilización enzimática y NPMs.	34

1.7. Hipótesis y objetivos	36
1.8. Organización de la Tesis.....	37
1.9. Referencias del Capítulo I.....	37

Capítulo II: Experimental51

2.1. Reactivos.....	53
2.2. Métodos experimentales.....	53
2.2.1. Inmovilización de CALB.....	53
2.2.2. Reacción test y muestreo.....	54
2.2.3. Test de leaching.....	45
2.3. Técnicas de caracterización.....	56
2.3.1. Espectroscopía de reflectancia difusa en el infrarrojo con Transformada de Fourier (DRIFTS)	57
2.3.2. Espectroscopía de Emisión Atómica con atomizador de plasma acoplado inductivamente (AE-ICP).....	58
2.3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	60
2.3.4. Microscopía electrónica de transmisión.....	61
2.3.5. Dispersión de luz dinámica.....	62
2.3.6. Microelectroforesis Láser Doppler.....	66
2.3.7. Espectroscopía de absorción molecular Ultravioleta-Visible (UV-V).....	68
2.3. Referencias del Capítulo II.....	68

Capítulo 3: Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas.....71

3.1. Introducción.....	73
3.2. Experimental.....	79
3.2.1. Coprecipitación de MAG	79

3.2.1.1. Con hexametilentetraamina (HMTA) o poli-etilén glicol (PEG) como estabilizante.....	79
3.2.1.2. Con HMTA y PEG como co-estabilizantes.....	79
3.2.1.3. Síntesis con PEG mediante co-precipitación inversa.....	80
3.2.1.4. Con ácido oleico como estabilizante.....	80
3.2.1.5. Con dodecilsulfato de sodio (SDS) como estabilizante.....	80
3.2.2. Funcionalización con grupos NH ₂	83
3.2.2.1. Nanoprecipitación de quitosano	83
3.2.2.2. Adsorción de lisina.....	83
3.3. Resultados	84
3.3.1. SEM-EDX.....	84
3.3.2. TEM.....	88
3.3.3. DLS y electroforesis.....	93
3.3.4. DRIFTS.....	95
3.4. Discusión.....	100
3.4.1. Efecto de PEG como estabilizante.....	100
3.4.1.1. Tamaño y forma.....	100
3.4.1.2. Estabilidad en suspensión.....	101
3.4.2. Efecto de HMTA como estabilizante.....	102
3.4.2.1. Tamaño y forma de las partículas.....	102
3.4.2.2. Estabilidad en suspensión	106
3.4.3. Efecto de AO.....	108
3.4.4. Efecto de SDS.....	109
3.4.5. Aminación con quitosano.....	110
3.4.6. Aminación con lisina.....	112

3.5. Conclusiones.....	113
3.6. Referencias del capítulo III.....	115

Capítulo IV: Estudio de la inmovilización covalente de CALB sobre sobre partículas magnéticas y testeo de su actividad catalítica123

4.1. Introducción.....	125
4.2. Experimental.....	127
4.2.1. Activación del soporte MAG-AO-QUIT.....	127
4.2.2. Inmovilización de CALB sobre MAG-AO-QUIT-GLUT (SOP).....	128
4.2.3. Reacción test y prueba de leaching.....	128
4.3. Resultados.....	128
4.3.1. Caracterización.....	128
4.3.1.1. DRIFTS.....	128
4.3.1.2. Tamaño y potencial zeta.....	131
4.3.1.3. Microscopía electrónica.....	132
4.3.2. Actividad catalítica.....	132
4.3.2.1. Efecto de la variación de masa del catalizador en los niveles de conversión.....	132
4.3.2.2. Efecto del reuso del catalizador en los niveles de conversión.....	133
4.3.2.3. Efecto del tiempo de almacenamiento en los niveles de conversión.....	135
4.3.2.4. Carga enzimática.....	136
4.4. Discusión.....	136
4.4.1 Interacción GLUT-QUIT.....	136
4.4.2 Interacción GLUT-CALB.....	142

4.4.3 Interacción CALB-CALB.....	147
4.5. Conclusiones del Capítulo IV.....	150
4.6. Referencias del Capítulo IV.....	151

Capítulo 5: Evaluación de la influencia de 3-APTS y GLUT sobre la actividad de CALB inmovilizada covalentemente157

5.1. Introducción.....	159
5.2. Experimental.....	161
5.2.1. Selección del diseño de cribado.....	161
5.2.2. Metodologías de modificación del SOP.....	164
5.2.2.1. Incorporación de 3-APTS.....	164
5.2.2.2. Activación con GLUT.....	164
5.2.2.3. Inmovilización de CALB.....	164
5.2.2.4. Reacción test	165
5.2.2.5. Determinación de carga enzimática, hierro y silicio.....	166
5.3. Resultados.....	166
5.3.1. Caracterización de biocatalizadores y soportes.....	166
5.3.1.1. DRIFTS.....	166
5.3.1.2. Microscopía electrónica.....	170
5.3.1.3. DLS.....	175
5.3.1.4. Composición de los CAT mediante EA-ICP.....	175
5.3.2. Actividad catalítica	176
5.3.2.1. Variabilidad de respuestas con cantidades nominales de modificantes y enzima	176
5.3.2.1.1. Conversión.....	176
5.3.2.1.2. Carga enzimática.....	180
5.3.2.1.3. Actividad específica por unidad de masa de catalizador.....	182
5.3.2.1.4. Actividad específica por unidad de masa de CALB inmovilizada.....	185

5.3.2.1.5. Optimización de todas las respuestas.....	188
5.3.2.2. Estabilidad térmica y operacional.....	190
5.3.2.3. Retención de actividad en almacenamiento.....	191
5.4. Discusión.....	191
5.4.1. Influencia de APTS como único aditivo.....	192
5.4.2. Efecto de la combinación APTS/GLUT.....	194
5.4.3. Efecto de GLUT.....	197
5.4.4. Efecto del parámetro CALB ofrecida	200
5.5. Conclusiones del capítulo V.....	203
5.6. Referencias del capítulo V.....	206

Capítulo 6: Determinación de la carga enzimática de biocatalizadores de CALB-magnetita211

6.1. Introducción.....	213
6.2. Experimental.....	219
6.2.1. Curvas de calibrado con BSA como patrón.....	219
6.2.2. Curva de calibrado con CALB como patrón.....	221
6.2.3. Determinación de S por EA-ICP.....	221
6.2.4. Muestras control.....	221
6.2.5. Análisis de las muestras.....	222
6.3. Resultados.....	222
6.3.1. Curvas de calibrado.....	222
6.3.2. Análisis del caldo comercial.....	224
6.3.3. Análisis de las muestras control.....	226
6.4. Discusión.	228
6.4.1. Influencia de la naturaleza del patrón usado para cuantificar proteína.....	228

6.4.2 Influencia de las interferencias.....	231
6.4.2.1. Interferencias en el método de Bradford.....	232
6.4.2.2. Interferencias en el método de determinación de S por EA-ICP.....	234
6.5. Conclusiones del capítulo VI.....	235
6.6. Referencias del capítulo VI.....	237

Capítulo 7: Optimización del protocolo de inmovilización de CALB sobre MAG-lisina243

7.1. Introducción.....	245
7.2. Experimental.....	246
7.2.1. Adsorción de CALB sobre MAG(SDS)-LIS y entrecruzamiento con GLUT.....	246
7.2.2. Activación con GLUT del soporte aminado e inmovilización covalente..	247
7.3. Resultados.....	249
7.3.1. Caracterización.....	249
7.3.1.1. DRIFTS.....	249
7.3.1.2. Electroforesis y DLS.....	251
7.3.1.3. Microscopía electrónica.....	252
7.3.2. Actividad catalítica.....	255
7.3.2.1. CALB entrecruzada post-adsorción.....	255
7.3.2.2. CALB inmovilizada covalentemente: catalizador B.....	256
7.3.2.3. Estabilidad en almacenamiento.....	257
7.4. Discusión.....	258
7.4.1. Influencia de la concentración de GLUT	258
7.4.2. Influencia del protocolo de inmovilización.....	261

7.4.3. Competitividad del catalizador B frente a Novozyme® 435.....	263
7.5. Conclusiones.....	264
7.6. Referencias del capítulo VII.....	265
8. Capítulo VIII: Conclusiones y trabajo a futuro.....	267

CAPÍTULO I

Introducción

1.1. Introducción

Proveer de bienes y servicios de un modo sustentable requiere de la administración eficiente de la materia y la energía. Los catalizadores son una de las varias herramientas que el químico tiene a su disposición para enfrentar las necesidades de la sustentabilidad. El uso de catalizadores, materiales que aumentan la velocidad de las reacciones químicas, ya se ha afianzado en las industrias de la gran mayoría de los productos que consumimos, incluyendo alimentos, vestimenta, fármacos, combustibles y plásticos. Además, los catalizadores poseen una casi intrínseca capacidad de abordar directamente la problemática de la sustentabilidad dado que disminuyen costos energéticos, aumentan la selectividad de las reacciones, vuelven más eficiente el consumo de los recursos y abren puertas al uso de materias primas alternativas [1]. Alcanzar una sociedad sustentable es entonces un desafío multifacético que requiere contribuciones de empresas, gobiernos y la comunidad en general así como del sector científico.

En 1998, Paul Anastas y John Warner publicaron “Química verde: teoría y práctica”, que fue un llamado a los químicos a diseñar (y rediseñar) procesos que reduzcan o eliminen completamente desechos peligrosos [2]. Los Doce Principios de la Química Verde son una guía para asistir a los químicos en la creación de reacciones “ambientalmente benignas” y procesos que reduzcan o eviten la formación de residuos:

LOS DOCE PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE

1. Es mejor prevenir el desperdicio que limpiarlo luego de que se origine.
2. Los métodos de síntesis deben ser diseñados para maximizar la incorporación de todos los materiales usados en el proceso al producto final.
3. Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deben ser diseñados para usar y generar sustancias que sean mínima o nualmente tóxicas para la salud humana y el ambiente.
4. Los productos químicos deben diseñarse preservando la eficacia de su función a la vez que se minimice su toxicidad.

5. El uso de sustancias auxiliares (como solventes y agentes de separación) deberían ser innecesarios siempre que sea posible o inocuos en el caso que se empleen.
6. Los requerimientos energéticos deben enfrentarse por sus efectos tanto ambientales como económicos y deben ser minimizados.
7. Un material en bruto o materia prima debería ser renovable en vez de agotable siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. La derivatización innecesaria (bloqueo de un grupo, protección/desprotección, modificación temporal de un proceso físico o químico) debe ser evitada siempre que sea posible.
9. Se emplearán catalizadores (lo más selectivos posible) en lugar de los reactivos estequiométricos.
10. Los productos químicos deben diseñarse de tal forma que al final de su función no persistan en el ambiente y se descompongan en derivados inocuos.
11. Se deben desarrollar métodos analíticos que faciliten el monitoreo y control en tiempo real e *in situ*, antes de que se formen sustancias peligrosas.
12. Minimizar el potencial de accidentes químicos. Se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios.

La presente tesis ha tenido en cuenta el espíritu de estos principios en su diseño y desarrollo. En particular, se orienta a avanzar sobre lo establecido en el principio 9.

Una forma práctica de cuantificar la eficiencia de un proceso químico es establecer una relación entre la masa de desperdicio generado (todo lo obtenido excepto el producto deseado: solventes, productos secundarios, sales, etc.) por unidad de masa del producto de interés obtenido. A esta relación se la denomina *factor E*:

$$E = \frac{\text{masa total de residuos (kg)}}{\text{masa de producto obtenido (kg)}}$$

En 2007 se publicó una estimación comparativa del factor E en diferentes sectores productivos (Tabla 1.1, [3]).

Tabla 1.1. Factor E de diferentes sectores productivos

Sector industrial	Tonelaje ^{a)}	Factor E
Petroquímica	$10^6 - 10^8$	<0,1
Químicos en bulk	$10^4 - 10^6$	<1 - 5
Química fina	$10^2 - 10^4$	5 - >50
Farmacéutica	$10 - 10^3$	25 - >100

a) Volumen de producción anual de un producto en un solo lugar (valor más bajo) o a nivel mundial (valor más alto)

El factor E se incrementa drásticamente al bajar de procesos en bulk hacia químicos finos, en buena parte debido a que la producción de estos últimos involucra síntesis en varios pasos, pero también al empleo de reactivos estequiométricos en vez de catalizadores.

La catálisis se ocupa de los cambios en la ruta hacia la transformación de los reactivos en productos. Se trata de la cinética de reacción, es decir, de cuán rápido puede ocurrir esa transformación. La velocidad de una reacción está estrechamente relacionada con la energía necesaria para que se disocien los enlaces de los reactivos y se formen los de los productos. A esta “barrera energética” se la denomina *energía de activación* (E_a). Cuanto mayor sea E_a , menor será la velocidad de reacción.

Un catalizador puede definirse como una sustancia capaz de alterar el mecanismo de una reacción química disminuyendo la E_a , por lo que el proceso avanzará más rápidamente. Además, los catalizadores tienen la capacidad de regenerarse en el medio de reacción, por lo que nunca se consumen [4], idealmente. La realidad es más compleja, pero la definición general se ha mantenido.

Tradicionalmente, se distinguen dos tipos principales de catalizadores: los homogéneos y los heterogéneos. Esta distinción se basa en si el catalizador está presente en la misma fase en la que se encuentran los reactivos (homogéneos), o se encuentra formando parte de una segunda fase (heterogéneos). Actualmente, a

esta clasificación se han sumado los biocatalizadores o *enzimas*. Las enzimas son los catalizadores que regulan procesos en las células de los seres vivos y se han adaptado naturalmente para actuar en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la *biocatálisis* se refiere al uso de enzimas como catalizadores de procesos artificiales (in vitro), por lo que un gran desafío es transformar estos catalizadores fisiológicos en catalizadores capaces de funcionar bajo las adversas condiciones de reacción de un proceso industrial.

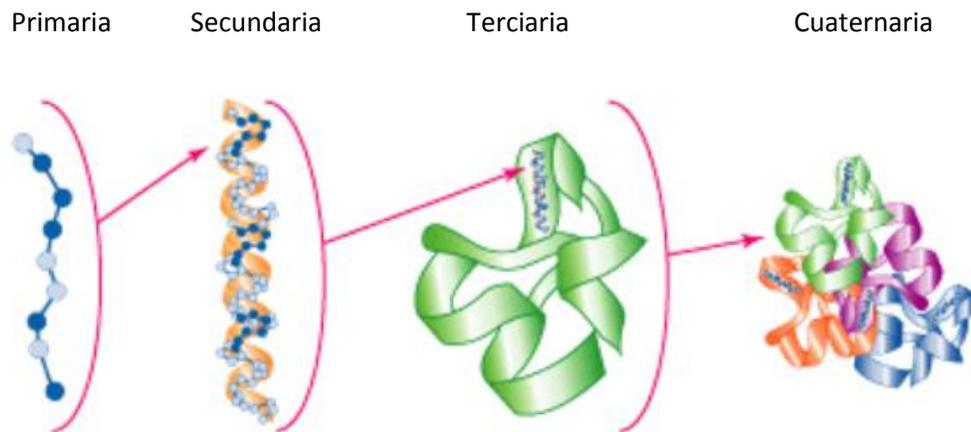
Si bien las enzimas podrían catalogarse como una subclase de catalizadores homogéneos, se han ganado un lugar propio en el ámbito de la catálisis gracias ciertas características que las distinguen de los catalizadores tradicionales (homogéneos/heterogéneos): manifiestan gran especificidad química, lo cual es una cuestión importante en productos farmacéuticos y químicos finos; son activas en condiciones moderadas, por lo que la inestabilidad del producto o sustrato en condiciones drásticas deja de ser un problema, y son catalizadores compatibles con restricciones ambientales estrictas (que hoy en día es –o debería ser- una situación general). Además, las enzimas contribuyen con la etiqueta de “producto natural”, lo cual es una ventaja comercial en el caso de las aplicaciones alimentarias y cosméticas, entre otras [5].

1.2. Catálisis enzimática

1.2.1. Enzimas

Las enzimas son estructuras moleculares proteicas altamente evolucionadas, adaptadas para realizar una tarea con eficacia y precisión. Existen cuatro niveles de estructuración de las proteínas y por ende, de las enzimas. El primer nivel o estructura primaria, consiste en la unión de aminoácidos ordenados de acuerdo a la codificación genética del organismo del cual provienen. La unión entre aminoácidos llamada enlace peptídico, da origen a la estructura secundaria que está determinada por los ángulos de rotación del enlace entre átomos constituyentes de los aminoácidos y que fijan cadenas en forma de tirabuzón (α -hélice) o de láminas (β -plegadas). La conformación de estos dos niveles es bastante estable y su rompimiento requiere cambios profundos del

microentorno de la enzima. El siguiente nivel de estructuración (estructura terciaria) tiene en cuenta la cercanía entre α -hélices y láminas β -plegadas en donde se potencian las interacciones iónicas, las hidrofóbicas y especialmente los enlaces disulfuro entre cadenas. Finalmente la estructura cuaternaria, que no ocurre en todas las enzimas, hace referencia a la unión de varias cadenas de estructura terciaria, formando dímeros, trímeros, etc. Estos últimos dos niveles de estructuración son más sensibles al microentorno de la enzima y pequeños cambios en el pH, la temperatura y la presencia de iones inorgánicos pueden desestabilizarla cambiando totalmente su actividad catalítica [6]. El Esquema 1.1 ilustra los diferentes niveles de estructuración de una proteína genérica.



Esquema 1.1. Niveles de estructura molecular en una proteína. Disponible en [7].

Las enzimas surgen como una alternativa atractiva a los catalizadores tradicionales, ya que presentan numerosas características compatibles con la química verde:

-Proviene de fuentes virtualmente inagotables como plantas, animales, bacterias u hongos.

-Demandan mínimos requerimientos energéticos, ya que pueden actuar en condiciones de reacción moderadas como temperaturas cercanas a la ambiente.

-En muchas de las reacciones para las cuales fueron diseñadas, son quimio, regio y estereoselectivas.

La condición de catalizador de las enzimas reside en su estructura proteica. El sitio activo –una especie de nicho molecular en el que tiene lugar la catálisis- representa una porción muy pequeña de la enzima (sólo unos pocos residuos de aminoácidos), mientras que el resto de la molécula actúa como un andamio y proporciona estabilidad estructural. Muchas enzimas son proteínas conjugadas con otras moléculas que pueden o no intervenir en el proceso catalítico.

La catálisis enzimática involucra el uso de enzimas como catalizadores biológicos disociados de la célula de la que derivan. El principal desafío en este proceso es la construcción de catalizadores enzimáticos robustos capaces de funcionar bajo condiciones que generalmente se alejan de las fisiológicas. El objetivo es preservar las propiedades sobresalientes de las enzimas como catalizadores (especificidad, reactividad bajo condiciones suaves) superando al mismo tiempo sus limitaciones (principalmente su pobre estabilidad configuracional). Las ventajas y limitaciones asociadas a las enzimas como catalizadores son consecuencia de su compleja estructura molecular. La labilidad de estas macromoléculas hace de la estabilización un prerrequisito para su aplicación efectiva [8]. En la Tabla 1.2 se detallan las propiedades de las enzimas desde el punto de vista catalítico.

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de las enzimas como catalizadores

Ventajas	Desventajas
Proviene de fuentes renovables	Difícil manipulación
Activas bajo condiciones suaves	Posible desactivación
Selectividad	Contaminación de productos

Una reacción biocatalizada requiere que los residuos aminoácidos que constituyen el sitio activo se orienten en direcciones específicas y bien definidas.

Este fenómeno se conoce actualmente como “acoplamiento inducido”, ya que la cercanía del sustrato provoca la orientación de los residuos.

El mecanismo general para este tipo de reacciones se puede representar mediante la siguiente reacción:



Donde E representa la enzima, S el sustrato, ES* el complejo enzima-sustrato (estado de transición), P los productos y k_1 , k_2 y k_3 las constantes de formación/disociación de las especies químicas. Los enlaces temporales entre la enzima y el sustrato que forman el estado de transición facilitan el rompimiento de los enlaces del sustrato, de esta forma la energía de activación necesaria para la obtención de producto será menor y la reacción procederá más rápidamente.

La cinética de las reacciones con un único sustrato y catalizadas por *enzimas solubilizadas* puede ser descripta por el modelo de Michaelis-Menten. Este modelo relaciona la velocidad de reacción con la concentración de sustrato mediante la ecuación 1.1:

Ecuación 1.1. Ley de velocidad de una reacción biocatalizada

$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{K_M + [S]}$$

donde V_{\max} es la velocidad máxima de reacción, $[S]$ es la concentración de sustrato y K_M es la constante de Michaelis-Menten. Esta constante corresponde a la concentración de S con la cual se alcanza la mitad del valor de V_{\max} (ver Figura 1.1).

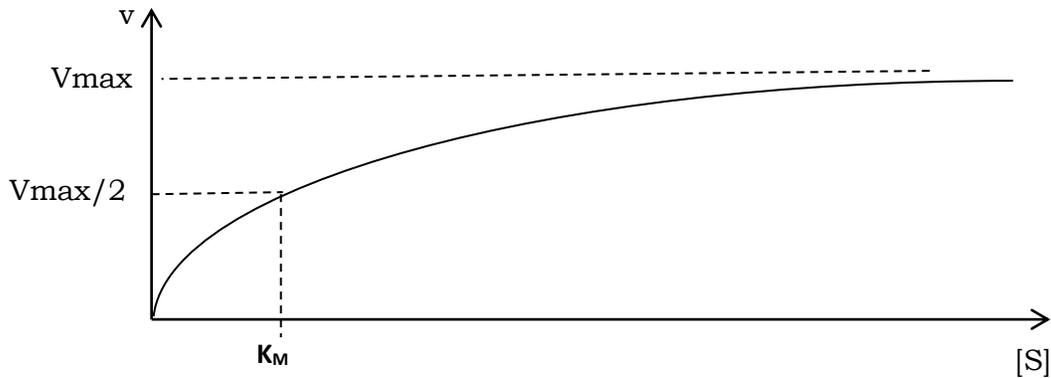


Figura 1.1. Variación de la velocidad de una reacción biocatalizada monofásica en función de la concentración de sustrato.

El significado práctico de esta cantidad es una medida inversa de la afinidad que la enzima tiene con el sustrato: valores bajos de K_M indican que la V_{max} se alcanzará con concentraciones S menores que aquellas reacciones con K_M más elevados [5].

1.2.2. Lipasas

Un grupo particularmente interesante de enzimas son las lipasas (triacilglicerol acil-hidrolasas EC 3.1.1.3) debido a su versatilidad como biocatalizadores. Si bien su función natural es la hidrólisis de triglicéridos, también son capaces de sintetizar químicos de alto valor agregado, mediante esterificaciones, transesterificaciones e interesterificaciones en medios no acuosos [9] e incluso aminólisis [10]. La principal característica estructural de las lipasas es la existencia de una cadena de aminoácidos que cubre el sitio activo, llamada *lid* o tapa: un bucle anfílico estabilizado por interacciones electrostáticas en su cara externa y una región hidrofóbica extensa en su cara interna. Esta última está formada por una cadena de longitud variable para cada lipasa; posee estados de orden/desorden dependiendo de las condiciones de cristalización de la molécula, y se postula que su movimiento da acceso al sitio

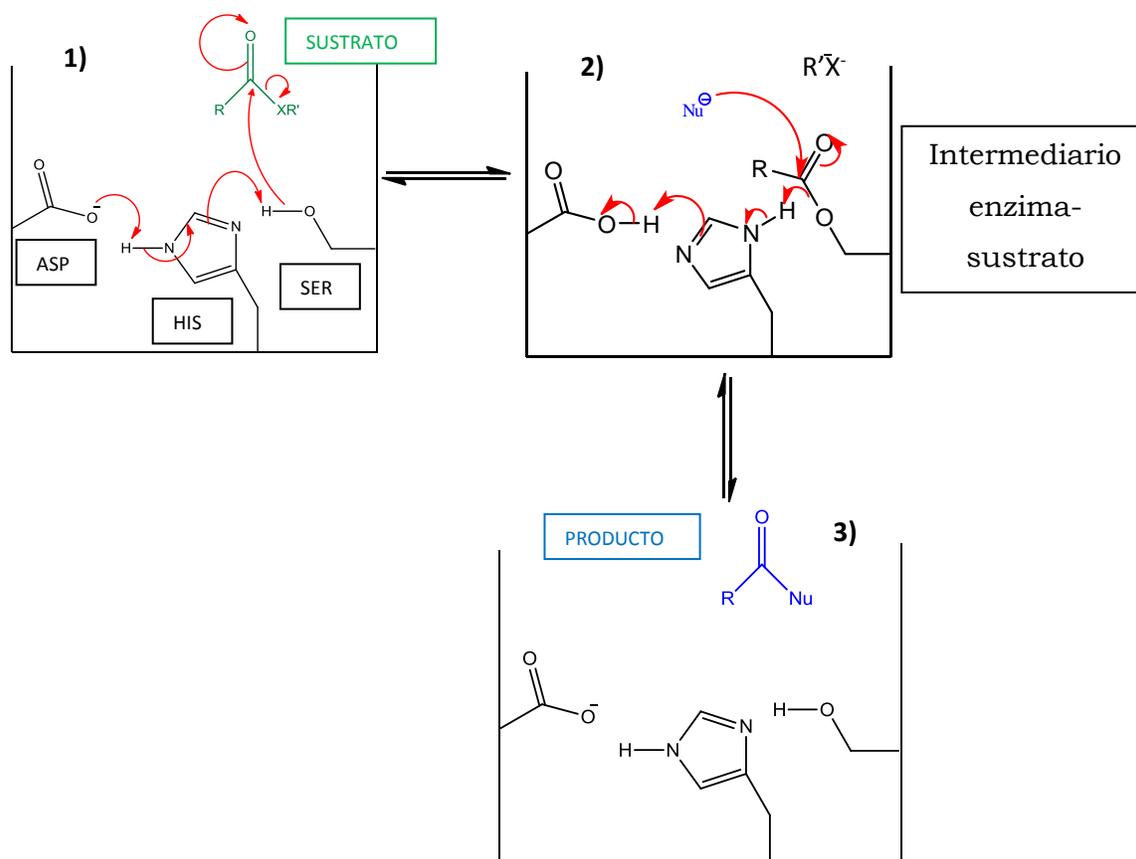
activo en un fenómeno denominado *activación interfacial* [11]. El sitio activo es una región interna de la molécula donde confluyen las cadenas laterales de tres aminoácidos: serina (SER), histidina (HIS) y ácido aspártico (ASP).

A pesar de la variedad de reacciones y sistemas en los que se emplean las lipasas, el mecanismo de reacción conserva lineamientos generalizados. Los mismos se ilustran en el Esquema 1.2 y se detallan a continuación [12]:

1) La formación del complejo de transición en las lipasas implica reordenamientos de la tríada catalítica para potenciar la nucleofilicidad del residuo oxhidrilo de la SER. El ASP genera un puente de hidrógeno con la histidina. El nitrógeno de la HIS, puede por lo tanto desprotonar al residuo serina, potenciando la nucleofilicidad del oxhidrilo. De esta forma, éste podrá iniciar el proceso catalítico sobre el sustrato mediante ataque nucleofílico al carbono carbonílico del sustrato ($R-CO-XR'$), formando un intermediario tetraédrico.

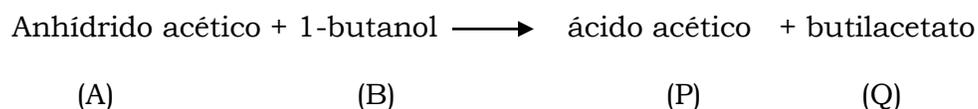
2) Dado que el intermedio tetraédrico es un hemiacetal inestable, se hidroliza rápidamente liberando $R'X-H$ (que puede ser un alcohol, éster o amina dependiendo de la naturaleza del sustrato) y formando el intermediario acil-enzima. Para completar la reacción, un segundo sustrato puede atacar nucleofílicamente al complejo acil-enzima.

3) Este ataque nucleofílico permite la formación de un segundo intermedio tetraédrico inestable, que se hidroliza para liberar el producto final, y regenerar el sitio activo de la enzima. Dependiendo del sustrato nucleófilo atacante también se puede obtener un triacilglicerol, un éster, un ácido carboxílico o una amida.



Esquema 1.2. Representación del mecanismo de reacción de las lipasas.

El modelo cinético más aceptado para muchas reacciones catalizadas por lipasas es el denominado Ping-Pong Bi-Bi [13–15]. A diferencia de Michaelis-Menten, este enfoque considera dos sustratos convirtiéndose en dos productos, y que la lipasa existe en dos configuraciones catalíticas alternativas, cada una transformando un sustrato en un producto. Las ecuaciones de velocidad para estos mecanismos ping-pong son bastante complejas de derivar y usualmente se requieren varias suposiciones para obtener expresiones cinéticas consistentes [16]. Por ejemplo, para la reacción con solvente:



una ley de velocidad propuesta es [17]:

$$V = \frac{[A] [B] k_1 k_2 k_3 k_4 (k_5 + k_6) k_{-7} k_{-8} E_T}{[A] (k_5 + k_6) (k_1 k_2 (k_{-3} + k_4) k_{-7} + [B] k_3 (k_{-1} k_4 k_7 + k_2 k_4 k_7 + k_1 k_2 k_{-7} + k_1 k_4 k_{-7})) k_{-8} + (k_{-1} + k_2) k_{-7} + ((k_{-3} + k_4) k_5 k_6 k_{-8} [P] + [B] k_3 (k_5 k_6 k_{-8} [P] + k_4 (k_{-5} k_{-8} + k_6 k_{-8} + k_{-5} k_8 [P] + k_6 k_8 [P] + k_5 k_{-8} [P])))}$$

Donde los factores k son parámetros cinéticos de los pasos elementales que conforman el mecanismo de la reacción global.

1.2.3. Concepto de actividad enzimática

La actividad enzimática está estrechamente relacionada con el cambio de energía necesario para transformar al sustrato en producto. Esta definición termodinámica, aunque rigurosa, no tiene significancia práctica. Los cambios de energía libre de una reacción que involucra una entidad tan inestable como el complejo ES* no resultan en absoluto fáciles de medir [18]. Experimentalmente, pueden determinarse cantidades de sustrato remanente o bien producto formado. Estos procedimientos presentarán mayor o menor dificultad en función de cada medio de reacción. Si el tiempo de reacción al cual se toma la muestra es lo suficientemente corto como para entrar en la zona lineal sustrato vs. tiempo, podrá calcularse la *velocidad inicial de reacción* (v_0). Este parámetro es sumamente útil para caracterizar el potencial catalítico de la enzima, pero sólo en condiciones unívocamente especificadas: tipo de sustrato y su concentración, temperatura, pH (si correspondiera), solvente e incluso modo y velocidad de agitación. Si a v_0 se la expresa por unidad de masa de enzima, se obtiene la *actividad específica*, que queda definida en micromoles de sustrato consumido (o producto liberado) por minuto y por miligramo de enzima (Ecuación 1.1),

Ecuación 1.2. Actividad específica de una enzima

$$\text{Actividad específica} = \frac{\mu\text{mol de } S}{\text{min} * \text{mg de } E}$$

Donde S es el sustrato consumido y E la enzima.

Otra forma de informar la actividad son las unidades de enzima (UE), que en general se define como la cantidad de preparado comercial (o catalizador) necesaria para liberar un mol (o un submúltiplo del mol) de determinado producto de reacción catalizada, por unidad de tiempo, en condiciones experimentales definidas (temperatura, solvente, concentración de reactivos, etc.). En el caso de las lipasas, UE es a veces reemplazado por UL (unidades de lipasa). Para determinar UL, un ejemplo típico es la hidrólisis de p-nitrofenil-palmitato 50 mM en hexano a 37 °C, en la que se libera p-nitrofenol. A los 5 minutos este producto es extraído por una fase acuosa alcalina y cuantificado por espectroscopia UV-Vis [19]. A pesar de ser un valor dependiente de numerosas variables, las UE suele ser la única información disponible acerca de la composición de los preparados comerciales. Por ejemplo, el caldo de CALB empleado en este trabajo contiene, según el fabricante, un mínimo de 5000 UL por gramo de líquido [20]. Es decir, que la velocidad inicial de liberación de p-nitrofenol con 1 g de caldo es 5000 micromoles por minuto, en las condiciones estipuladas para esa reacción test.

Por último, se define el concepto de conversión (X). Es la relación entre la cantidad de sustrato consumido y la inicial de acuerdo a una reacción test definida. El final de la reacción es un tiempo determinado, no necesariamente en el equilibrio. Si esta magnitud se expresa en porcentaje, se llama conversión por ciento (X %, Ecuación 1.3)

Ecuación 1.3. Definición de conversión por ciento.

$$X \% = \frac{N_0 - N}{N_0} \times 100$$

Donde N_0 son los moles iniciales de sustrato y N los moles encontrados al tiempo de muestreo.

1.3. Inmovilización de enzimas

Si las enzimas no se solubilizaran en el medio de reacción de interés pero aun mantuvieran su configuración activa, podrían aplicarse de la misma forma que los catalizadores heterogéneos sin contaminar el medio de reacción y se podrían manipular con la facilidad de un sólido, posibilitando además su reuso en ciclos sucesivos. Para intentar alcanzar estas condiciones ideales, se lleva a cabo la inmovilización. Éste es un proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por diversas técnicas posibles. El término “enzima inmovilizada” se refiere a enzimas físicamente confinadas o localizadas en una región definida del espacio con retención de la actividad catalítica, y que puede ser usada repetida y continuamente [21].

El interés en estudiar la inmovilización de enzimas ha crecido de manera exponencial a nivel mundial, al punto de duplicarse el número de artículos anuales a lo largo de los últimos diez años: en el año 2006 se publicaron unos 2000 trabajos en la temática “inmovilización enzimática”, mientras que en 2016 este número ascendió a 4000. Este aumento se ilustra en la Figura 1.2.

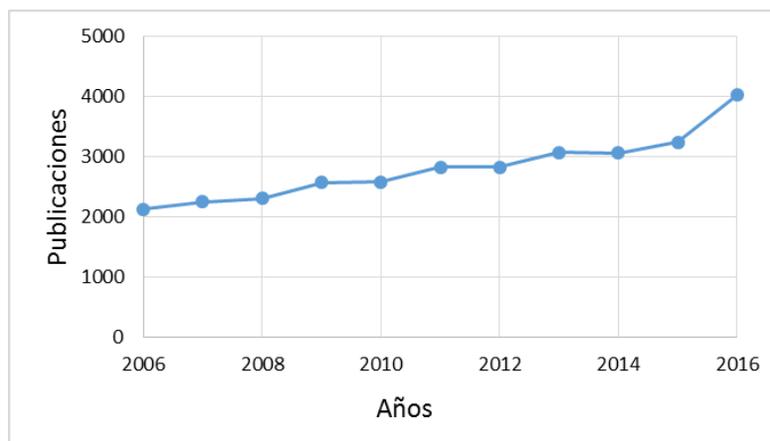


Figura 1.2. Número de publicaciones anuales en revistas científicas sobre inmovilización enzimática. (Fuente: ScienceDirect).

Básicamente existen dos metodologías para inmovilizar enzimas; estas son el confinamiento espacial y la interacción química.

- 1) Confinamiento espacial mediante:
 - a) Atrapamiento
 - b) Encapsulamiento
- 2) Interacciones químicas:
 - a) Entre las mismas enzimas
 - b) Con un material sólido, llamado soporte o *carrier*.

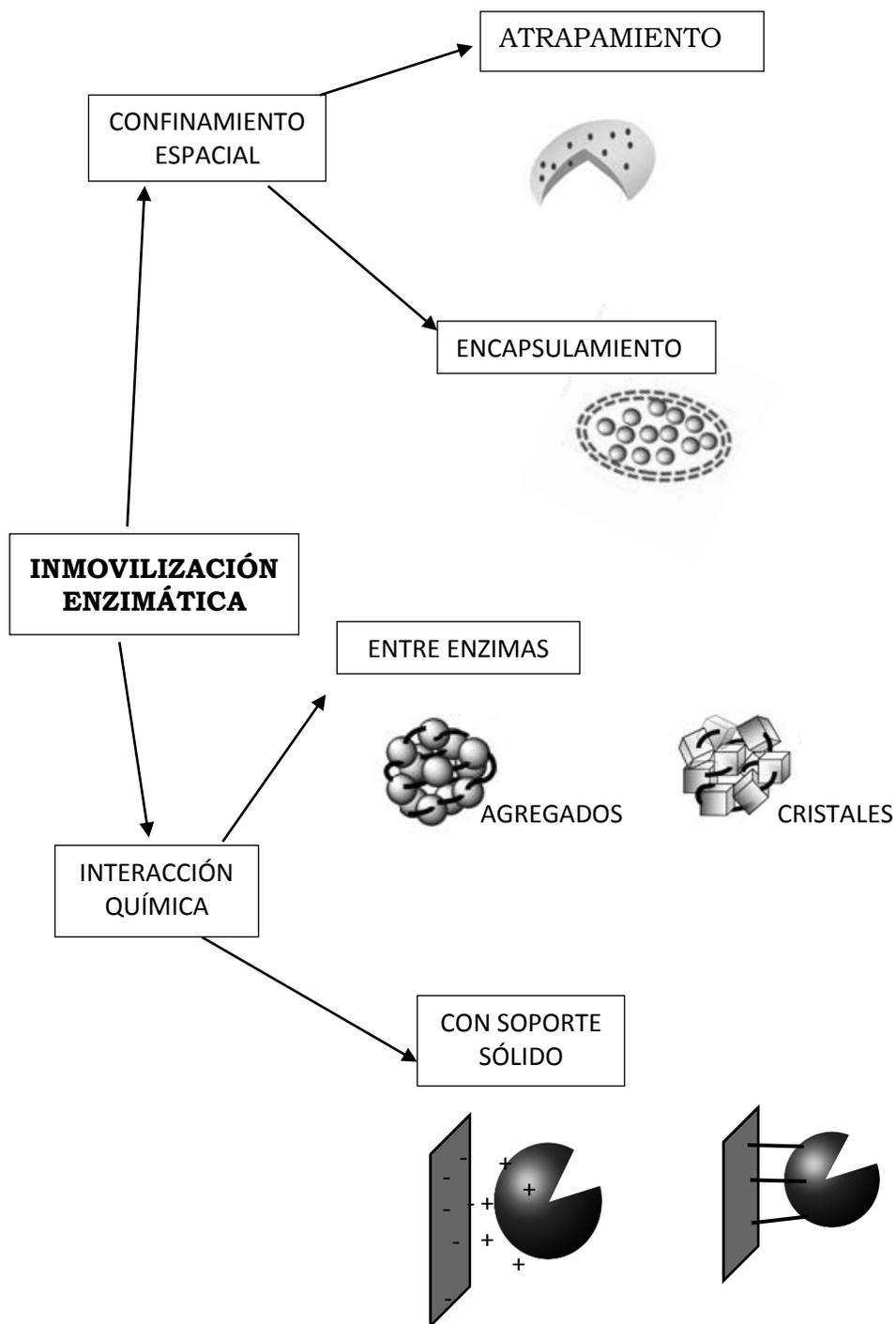
La simplicidad en la clasificación de estas técnicas es sólo aparente, ya que se ha desarrollado una inmensa variedad de combinaciones sobre la base de estos procedimientos tradicionales [22]. En el Esquema 1.3 se representan estas cuatro variantes.

1.3.1. Atrapamiento.

Mediante esta metodología de inmovilización las enzimas se retienen en cavidades internas de una matriz polimérica, de manera que permanecen atrapadas en una red. Varios polímeros orgánicos como alginato, poliacrilamida o poliuretano han sido utilizados para estos fines así como sistemas sol-gel. Esta técnica se usa comúnmente para inmovilización de células enteras. Sin embargo, en su aplicación para enzimas libres es inevitable la desorción [16,23–25].

1.3.2. Encapsulamiento

En el caso del encapsulamiento, grupos de enzimas son encerradas por una membrana polimérica, permitiendo el paso de sustratos y productos. Las enzimas pueden o no estar asociadas a la estructura de la membrana. La misma tiene la capacidad de actuar, con frecuencia, como un tamiz molecular en reacciones despolimerizantes [16,26–28].



Esquema 1.3. Resumen de métodos de inmovilización enzimática.

1.3.3. Interacción química entre enzimas

A partir de esta metodología, las enzimas son cristalizadas o precipitadas desde un medio líquido para obtener cristales [29,30] o agregados [31,32], respectivamente. Los mismos se unen luego unos con otros mediante la acción de un agente químico, como el glutaraldehído, que actúa como entrecruzante. A estos preparados se los denomina cristales enzimáticos entrecruzados (CLECs, por su sigla en inglés) o agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs). El costo de los CLECs es extremadamente alto debido a la necesidad de contar con una solución ultrapura a partir de la cual se cristaliza la enzima [16].

Los CLEAs, en cambio, son mucho más viables económicamente ya que los agregados pueden prepararse mediante técnicas convencionales de precipitación no desnaturalizantes, tal como la sobresaturación con sulfato de amonio [33,34]. Una limitación asociada a esta metodología de inmovilización, es la dificultad que presenta su manipulación, ya que se las CLEAs se dispersan en el medio de reacción al punto de parecer disueltas. Por lo tanto requieren de uno o más procedimientos para separarlas, lavarlas y reutilizarlas (centrifugación/filtración) [35].

1.3.4. Interacción química con un soporte sólido

Una molécula puede anclarse a la superficie de un material sólido a través de una adsorción física (atracciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas, enlaces puentes de hidrógeno) o bien mediante la formación de enlaces químicos covalentes. En particular, las proteínas enzimáticas tienen residuos de aminoácidos con grupos químicamente reactivos, capaces de promover tanto interacciones de tipo iónicas y / o hidrofílicas, así como dominios que inducen interacciones hidrofóbicas. Estos residuos de aminoácidos y los dominios hidrofóbicos pueden participar en la inmovilización de enzimas mediante las interacciones mencionadas más arriba. Se utilizan diversos tipos de soportes insolubles (*carriers*) en su estado original o luego de una modificación apropiada [36].

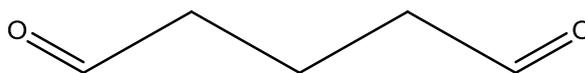
Esta técnica de inmovilización incluye la posibilidad de diseñar racionalmente la estructura y la química del soporte, con el objeto de obtener un material resistente a las condiciones de reacción donde se planea utilizar y también promover una interacción efectiva y estable con la enzima a inmovilizar. Estas son características indispensables para que cualquier biocatalizador resulte comercialmente competitivo. Por lo tanto, la estrategia de inmovilización elegida para este trabajo de tesis fue la interacción química con un soporte sólido.

Las propiedades catalíticas de una enzima inmovilizada mediante este procedimiento están determinadas tanto por el material que constituya el soporte, como de la estrategia utilizada para su acoplamiento.

1.3.4.1. Protocolos de inmovilización enzimática sobre soportes sólidos

Para asegurar el acoplamiento efectivo de una proteína al soporte sólido, es preciso contar con la presencia de grupos funcionales reactivos frente a aquellos disponibles en la biomolécula. La funcionalización de soportes con grupos amino ($-NH_2$) es una metodología ampliamente difundida en inmovilización enzimática gracias a su versatilidad química. Los NH_2 permiten adaptar el protocolo de inmovilización. Si se encuentra en forma catiónica ($-NH_3^+$), pueden convertir a la superficie en un intercambiador iónico, promoviendo la inmovilización por adsorción. La inmovilización por enlace covalente es lograda mediante el uso de agentes *entrecruzantes*. Éstos son compuestos orgánicos bifuncionales capaces de reaccionar tanto con el soporte aminado como con la enzima. El procedimiento por el que se agrega el entrecruzante al soporte funcionalizado se le suele llamar *activación* [37–39].

Entre los entrecruzantes más empleados, podemos destacar al glutaraldehído o 1,5 pentanodial (GLUT), cuya estructura química se muestra en el Esquema 1.4.



Esquema 1.4. Estructura molecular del GLUT

El mismo puede emplearse en diferentes etapas del proceso de inmovilización:

-directamente sobre el soporte aminado, para luego inmovilizar la enzima.

-después de haber adsorbido la enzima en los grupos amino, generando un entrecruzamiento intenso *entre* enzimas y también con el soporte [40].

La gran reactividad del GLUT puede volverse perjudicial para la retención de la actividad catalítica de las enzimas. Un entrecruzamiento intenso deriva a veces en una alteración irreversible de la estructura molecular, llevando a la desnaturalización y desactivación. Este efecto desfavorable de GLUT se ha comprobado en diferentes tipos de enzimas, incluyendo las lipasas [41].

Por ejemplo, la lipasa B de *Penicillium camembertii* fue inmovilizada sobre varios soportes siguiendo diferentes protocolos:

-Adsorción simple sobre sólidos hidrofóbicos (octil-agarosa, resina epoxi-funcionalizada o polihidroxibutirato)

-Adsorción iónica sobre agarosa funcionalizada con grupos $-NH_2$ (MANAE-agarosa)

-Adsorción iónica sobre MANAE-agarosa seguida de entrecruzamiento con GLUT

-Enlace covalente sobre MANAE-agarosa activada con GLUT.

Empleando el primer método no se logró inmovilizar la lipasa. A través del segundo método (interacción iónica solamente) la lipasa fue exitosamente inmovilizada y resultó activa en la hidrólisis de propionato de vinilo. Cuando el mismo derivado inmovilizado (MANAE-agarosa-lipasa) fue entrecruzado con GLUT al 1 %, la actividad decayó un 44 %. Finalmente, el método de enlace covalente sobre MANAE-agarosa-GLUT permitió la inmovilización de la enzima, aunque perdiendo la totalidad de su actividad [42].

Por otro lado, la lipasa de *Candida rugosa* fue inmovilizada en óxido de hierro recubierto de polímeros ricos en grupos $-NH_2$ y amonios cuaternarios, activado con GLUT al 7 %. El catalizador resultante fue activo en la hidrólisis de

aceite de oliva, siendo reutilizable al menos hasta diez ciclos perdiendo solamente el 30 % de la actividad inicial [43]. Los autores propusieron que tanto la lixiviación de enzima como su desnaturalización en cada uso fueron responsables de la desactivación parcial.

El efecto del GLUT se pone claramente en evidencia también al variar la concentración utilizada para entrecruzar agregados de enzima en la preparación de CLEAs. Un trabajo representativo de este fenómeno es el de Majumder y col. quienes utilizaron GLUT 10-60 mM para entrecruzar agregados de la lipasa de *Bulcolderia cepacia*. Los agregados insolubles sin GLUT hidrolizaron mayor masa de aceite de oliva en 10 horas que las CLEAs con GLUT. A tiempos de reacción más prolongados, éstas últimas fueron más productivas que todas las otras formulaciones cuando la concentración de entrecruzante fue 10 mM. Los autores atribuyen estos resultados a la soberrigidización de las moléculas enzimáticas por encima de esa concentración de GLUT [44].

De estos trabajos surge la importancia de estudiar tanto el efecto del protocolo de inmovilización con GLUT como el de su concentración.

1.3.4.2. Materiales de soporte para inmovilización enzimática

El material seleccionado como soporte debe cumplir con ciertas condiciones ideales para que su aplicación práctica resulte eficiente [45]:

- Debe ser químicamente inerte frente a los solventes, sustratos y productos de la reacción a catalizar
- Debe presentar resistencia mecánica a la agitación y estabilidad térmica
- Debe exhibir compatibilidad química con la enzima y/o agentes funcionalizantes
- Debe ser fácilmente separados del medio de reacción y reciclable
- Debe ser de bajo costo de fabricación y mínimo impacto ambiental en su síntesis y disposición final
- Debe presentar alta relación área/masa y propiedades antimicrobianas

Naturalmente, es difícil que un mismo material reúna todas estas características, por lo que la elección de un soporte se verá condicionada a los requerimientos de la reacción que desee catalizar.

A lo largo de más de medio siglo de investigaciones se han estudiado materiales de diversa naturaleza como soporte para inmovilización enzimática. Sin exagerar, se podría pensar en una infinidad de *carriers* al considerar la combinación de dos o más sólidos diferentes para obtener soportes compuestos. La Tabla 1.3 detalla algunos de los más difundidos.

El trabajo de Cao es una exhaustiva recopilación de información acerca de inmovilización enzimática sobre soportes sólidos [22]. Otras publicaciones recientes resumen soportes, estrategias de inmovilización y aplicaciones para distintas enzimas [45–49].

Tabla 1.3. Materiales aplicados como soporte sólido en inmovilización de enzimas

Material de soporte	Enzima inmovilizada	Reacción de aplicación	Referencia
Sílice	CALB	Esterificación	[50]
Zeolitas	Proteasa alcalina de <i>Solanum melongena</i>	Hidrólisis de caseína	[51]
Carbono activado y nanotubos de C	Tirosinasa	Oxidación de L-3,4 dihidroxifenilalanina	
	Glucosa oxidasa	Oxidación de D-glucosa	[52]
	CALB	Hidrólisis de p-NO ₂ Ph-palmitato	
TiO ₂	CALB	*	[53]
Al ₂ O ₃	Cloroperoxidasa	Oxidación de dibenzotiofeno	[54]
ZrO ₂	α -amilasa	Hidrólisis de almidón	[55]

Dióxido de estaño	Lipasa de <i>Rhizopus delemar</i>	Esterificación	[56]
Magnetita/ polidopamina	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	Hidrólisis de tributirina	[57]
Alginato	Xilanasa de levan	Hidrólisis de xilanos de madera de haya	[58]
Quitosano	Inulinasa de levadura	Hidrólisis de inulina	[59]
Colágeno	Catalasa	Descomposición de H ₂ O ₂	[60]
Gelatina	α -amilasa	Hidrólisis de almidón	[61]
Poliestireno	Deshidrogenasa	Conversión de formaldehído a metanol	[62]
Variantes De Poliacrilato	CALB	Esterificación	[63]
	<i>Rizomucor mehieii</i> <i>Thermomyces lanuginosa</i>	Hidrólisis de tristearina	
Poliamida	Lipasa de <i>Bacillus coagulans</i>	Hidrólisis de p-NO ₂ Ph-palmitato	[38]
Fibra de coco verde	Lacasa	Degradación de colorantes textiles	[64]
Fibra de tallos de maíz	Amilasa	*	[65]
	Lipasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Membrana Interna De Cáscara De Huevo	Oxalato oxidasa	Degradación de ácido úrico	[66]
	Glucosa oxidasa	Oxidación de glucosa	
	Peroxidasa de rábano picante	Descomposición de H ₂ O ₂	

*sólo se estudió la interacción soporte-enzima

Entre la gran variedad de materiales con probada utilidad como soportes, las sustancias con propiedades magnéticas resultan especialmente atractivas gracias a la posibilidad de manipularse mediante la aplicación de un campo magnético. Si la composición de un catalizador incluye un material magnético, su separación del medio de reacción (para su lavado y reuso en ciclos catalíticos sucesivos) se facilita mediante la decantación magnética, sin necesidad de filtrar o centrifugar. Ésta fue una de las motivaciones para emplear materiales magnéticos en la presente Tesis.

Numerosas publicaciones reportan la inmovilización de enzimas en soportes sólidos magnéticos activados con diversos agentes entrecruzantes. Por ejemplo, las lipasas de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) y *Candida rugosa* (CRL) se inmovilizaron sobre partículas magnéticas modificadas con proporciones variables de (3-mercaptopropil)-trimetoxisilano y 1-(3-trimetoxisilil-propil)-urea. Estos entrecruzantes contienen, respectivamente, grupos -SH y -NH₂ capaces de reaccionar con residuos aminoacídicos de las proteínas. Los biocatalizadores con TLL resultaron más activos que los de CRL en la hidrólisis de p-NO₂-Ph-palmitato. En la transesterificación de aceite de soja con etanol, TLL inmovilizada retuvo entre el 70 y el 90 % de su actividad inicial hasta el octavo ciclo. Los autores destacaron que en cada decantación magnética entre ciclos, una fracción de las partículas permaneció en suspensión. Con esta pérdida de masa del catalizador justificaron, en parte, el descenso de la conversión [67].

La tripsina fue inmovilizada sobre partículas magnéticas funcionalizadas con ácido tánico, un compuesto polifenólico. Según los autores, el acoplamiento de la enzima se logró por la formación de un enlace covalente ácido-tripsina a pH 9,4. La actividad de la tripsina inmovilizada se testeó en la hidrólisis de caseína. En 10 minutos de reacción a 37 °C, la caseína había sido degradada prácticamente por completo [68].

En muchos casos las partículas magnéticas requieren algún tipo de recubrimiento para que sean aptas en la inmovilización enzimática: nanopartículas de oro, compuestos organometálicos, polímeros con grupos epóxido, sílice aminada, cálix-n-arenos, por mencionar algunos [69-73].

En todos los casos revisados, las partículas rondan los 10-20 nm. La importancia del tamaño nanométrico de las partículas empleadas como soporte radica en dos efectos principales: el aumento del área superficial disponible para acoplar las enzimas, y la alteración de las propiedades magnéticas del material. Estas propiedades son detalladas a continuación.

1.4. Nanotecnología magnética

Los materiales con propiedades magnéticas pueden tener diferentes respuestas frente a la aplicación de un campo magnético externo. Si el campo magnético externo es suficientemente amplio, los spines de cada domino pueden rotar y quedar paralelos a la dirección del campo aplicado hasta que los dipolos se alineen. La región del *plateau* en la curva de la Figura 1.3, correspondiente a la curvas de magnetización, es la magnetización a saturación (M_s). M_s es una medida de la magnetización (M) por gramo de material. Cuando el campo magnético aplicado disminuye, también lo hace la magnetización del material. Si la curva de desmagnetización, durante la remoción del campo magnético, no sigue la curva de magnetización inicial, se dice que el material manifiesta histéresis, tal como se observa en la Fig. 1.3. La remanencia (M_r) es la magnetización remanente cuando el campo aplicado es cero ($H = 0$). El campo magnético aplicado en la dirección negativa, requerido para retornar la magnetización a cero es la fuerza coercitiva o coercitividad (H_c).

Los materiales *superparamagnéticos* presentan coercitividad y remanencia nulas ($H_c = M_r = 0$). Esto significa que al retirar el campo, la temperatura ambiente es suficiente para desorganizar los spines magnéticos instantáneamente, lo cual se cumple *cuando la dimensión de las partículas es nanométrica*. En caso contrario, los spines permanecerían paralelos y su magnetización desaparecería a una intensidad de campo determinada.

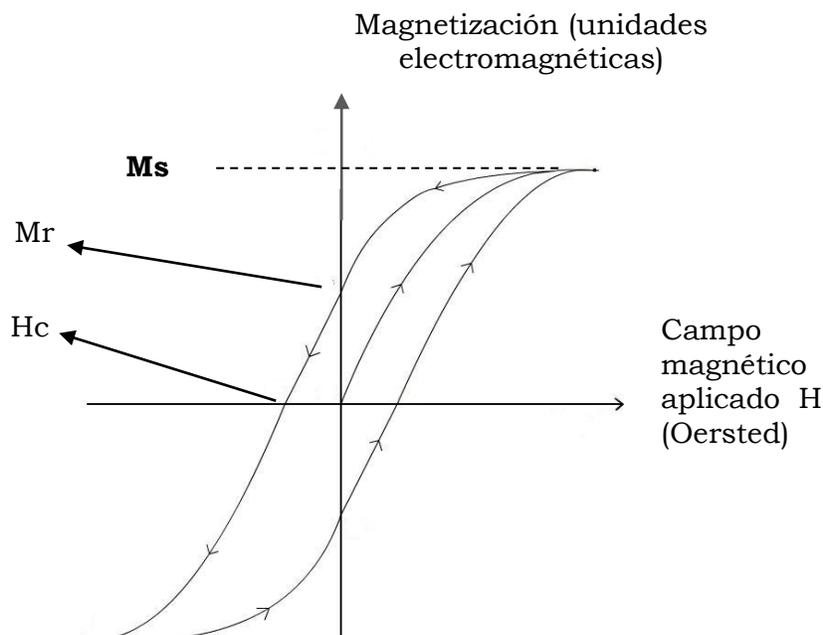


Figura 1.3. Curva de histéresis magnética

Gracias a las propiedades peculiares de las nanopartículas magnéticas (NPMs), se han estudiado y utilizado desde hace varias décadas en diversos campos de aplicación y han sido profundamente reportadas [74–77]. Entre las áreas de mayor incidencia, podemos distinguir a la medicina, la remediación ambiental y la biotecnología. En el área médica, las NPMs sirven como agente de contraste en la resonancia magnética nuclear [78,79] y como portadores de fármacos para su liberación controlada dentro del organismo [80,81]. Con respecto a la remediación ambiental, las NPMs pueden adsorber contaminantes de aguas y suelos (metales pesados [82,83], sustancias orgánicas [84,85]). En cuanto a la biotecnología, son útiles como soportes para inmovilizar biomoléculas (enzimas, otras proteínas, ácidos nucleicos) e incluso células enteras [86,87].

Existen varios materiales magnéticos que pueden emplearse para preparar nanopartículas [88]:

-Metales de transición puros: Fe, Co, Ni.

-Metales y compuestos de tierras raras: sulfuro y óxido de europio (EuS, EuO), Gd (gadolinio), Dy (disprosio), Tb (terbio).

-Óxidos metálicos: hematita (α -Fe₂O₃), maghemita (γ -Fe₂O₃), magnetita (Fe₃O₄), wustita (FeO), ferritas de diversos metales (BaFe₂O₄, MgFe₂O₄, CoFe₂O₄)

-Aleaciones: Fe-Co, Fe-Ni, Fe-Pt, Co-Pt

De todas estas sustancias, para el trabajo de esta tesis se seleccionó la magnetita (MAG) ya exhibe numerosas características que cubren los requerimientos de un material de soporte adecuado:

- Puede obtenerse a partir de materias primas de bajo costo y disponibles localmente
- Es resistente química y mecánicamente al medio de reacción de interés
- Posee reactividad superficial
- Tiene una alta relación área/masa (aproximadamente 100 m²/g) cuando las partículas son nanométricas (< 50 nm, [89,90])
- Presenta una elevada magnetización de saturación
- Es un material biocompatible y no tóxico
- Es fácilmente recuperable para su reuso mediante decantación magnética, tal como se aprecia en la Figura 1.4.

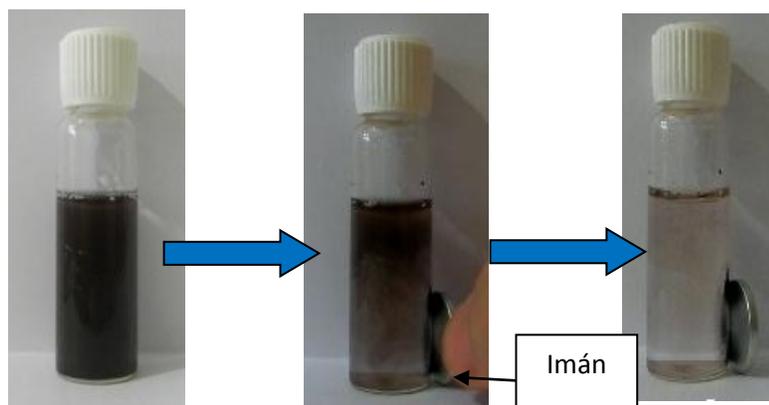


Figura 1.4. Respuesta de nanopartículas de magnetita dispersas en agua ante un campo magnético

1.5. Magnetita

1.5.1. Propiedades de la magnetita

Entre todos los óxidos de hierro, la MAG posee las propiedades más interesantes por la presencia de cationes en dos estados de oxidación: Fe^{2+} y Fe^{3+} , en una estructura de espinela inversa. Su celda unitaria se compone de 32 átomos de oxígeno dispuestos en una celda cúbica centrada en las caras. En esta estructura cristalina los iones $\text{Fe}(\text{II})$ y la mitad de los iones $\text{Fe}(\text{III})$ ocupan los sitios octaédricos mientras que la otra mitad se dispone en los tetraédricos. La arista de la celda unidad mide 0,839 nm [91]. En forma esquemática, se representa la disposición de los iones en la magnetita en la Figura 1.5.

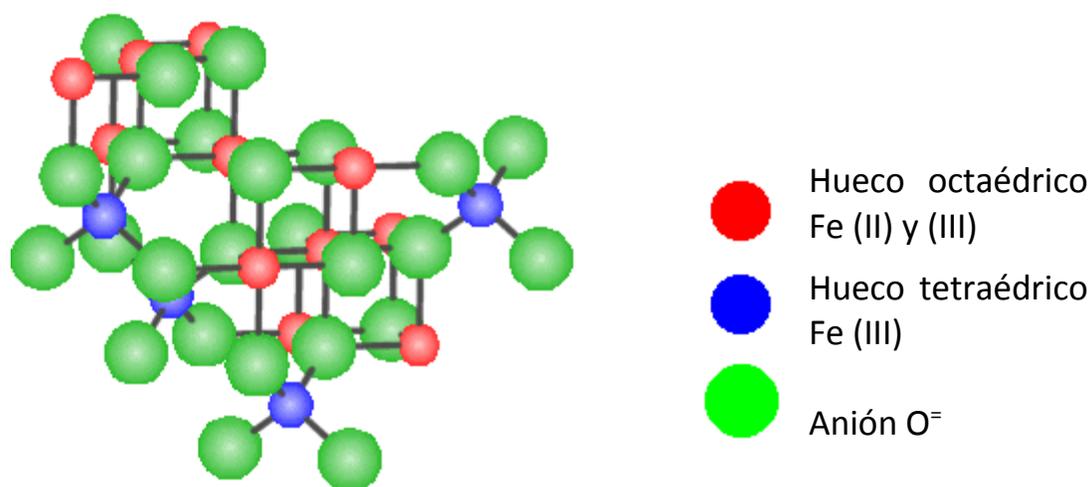
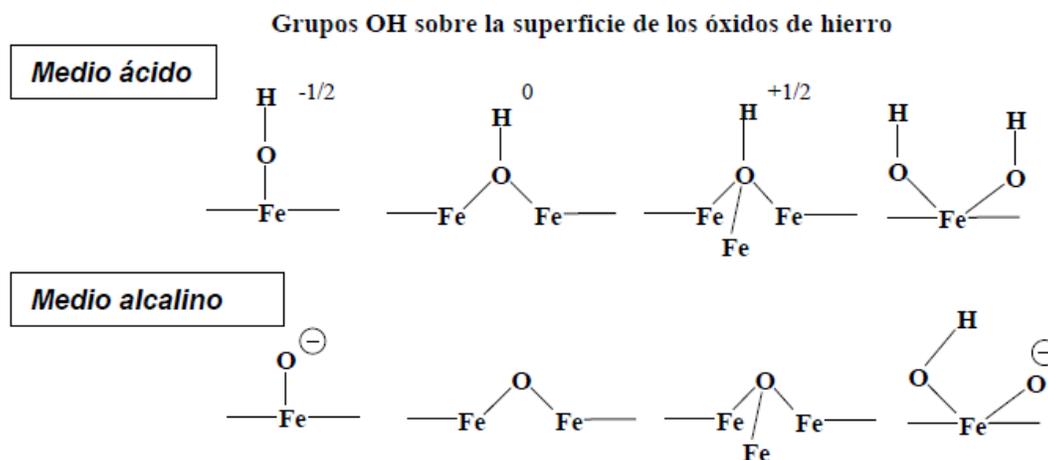


Figura 1.5. Disposición de cationes Fe^{2+} y Fe^{3+} y aniones óxido en la estructura de MAG. Disponible en

<http://condensedconcepts.blogspot.com.ar/2010/01/examples-of-inhomogeneous-mixed-valence.html>

La superficie de MAG contiene grupos $-OH$ que pueden protonarse o desprotonarse según el pH del medio en que se encuentren [92]. Estos grupos funcionales sirven de puntos de anclaje para la incorporación de otras especies químicas que aumentan la posibilidad de interacción con la biomolécula a inmovilizar. El Esquema 1.5 ilustra la química superficial de MAG.



1.5.2.2. Microemulsiones

La MAG se forma en microgotas de agua (o algún glicol) dentro de micelas dispersas en uno o más solventes orgánicos de alto punto de ebullición a 1 atm y temperaturas superiores a 100 °C. Suelen llamarse micelas inversas por tener las cabezas hidrofílicas hacia adentro y exponer colas hidrófobas hacia afuera. El agente precursor es una sal disuelta de Fe(III) -como FeCl_3 - que se agrega a la microemulsión formada por una base (por ej. KOH acuoso) y la mezcla de solventes, tales como n-octanol y ciclohexano [94]. Aunque se obtienen nanopartículas, las mismas tienden a sinterizarse dentro de la microfase acuosa resultando en agregados de más de 500 nm [95]. Esta ruta sintética implica manipular grandes volúmenes de reactivos inflamables generando además residuos peligrosos en términos de su toxicidad.

1.5.2.3. Método hidrotermal

A partir de esta técnica también se emplea una sal férrica acuosa junto con un compuesto alcalino, que forman óxido férrico sólido. Esta suspensión se calienta a altas temperaturas (del orden de los 200 °C) incrementando la presión de vapor de la fase líquida. El calor se mantiene por unas 4 horas, tiempo durante el que se forma la MAG. Al igual que la descomposición de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, es necesario un autoclave capaz de resistir las drásticas condiciones experimentales. Surfactantes pueden estar presentes [96,97].

1.5.2.4. Métodos electroquímicos

Electrodos de hierro metálico se sumergen en una solución de una sal de hierro, orgánica o inorgánica. Al pasar corriente a través de esta mezcla se produce la oxidación del Fe anódico y la reducción del Fe de la sal. Las partículas de MAG se depositan en el cátodo. La reacción puede realizarse a temperatura ambiente [98,99].

1.5.2.5. Coprecipitación

Es el método más difundido debido a su simplicidad y bajo costo. La coprecipitación de MAG se produce a partir de una solución acuosa de dos sales de Fe^{+3} y Fe^{+2} (pH inicial $\approx 1,5$ debido a la acidez de las soluciones acuosas de ión

férrico), generalmente en relación molar 2/1 que es alcalinizada por adición de una base (NaOH u otra), en general se opera a 70-80°C [100]; aunque también se registran antecedentes respecto del uso de temperatura ambiente [101]. La síntesis se lleva a cabo bajo un flujo de N₂ para remover el oxígeno y así evitar la oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³ y la obtención de otros óxidos de Fe (Fe₂O₃) [102].

Este proceso ha sido reconocido por su importancia industrial debido a su capacidad para ser escalado, su reproducibilidad, y sus condiciones de reacción amigables con el medioambiente [103].

El mecanismo de formación de los cristales de magnetita mediante coprecipitación involucra dos etapas: nucleación y crecimiento. El proceso de nucleación consiste en la aparición de una fase sólida a partir de los átomos en solución y termina en el estado inicial de la formación de las partículas. Para lograr partículas de tamaños nanométricos es necesario aumentar el número de núcleos y reducir el crecimiento de los existentes [104]. En la Figura 1.6 se ilustra el fenómeno de cristalización.

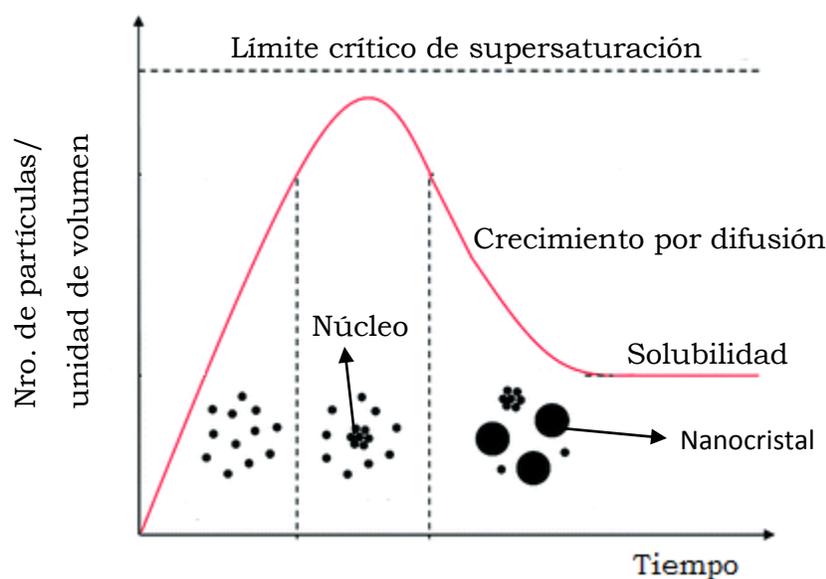
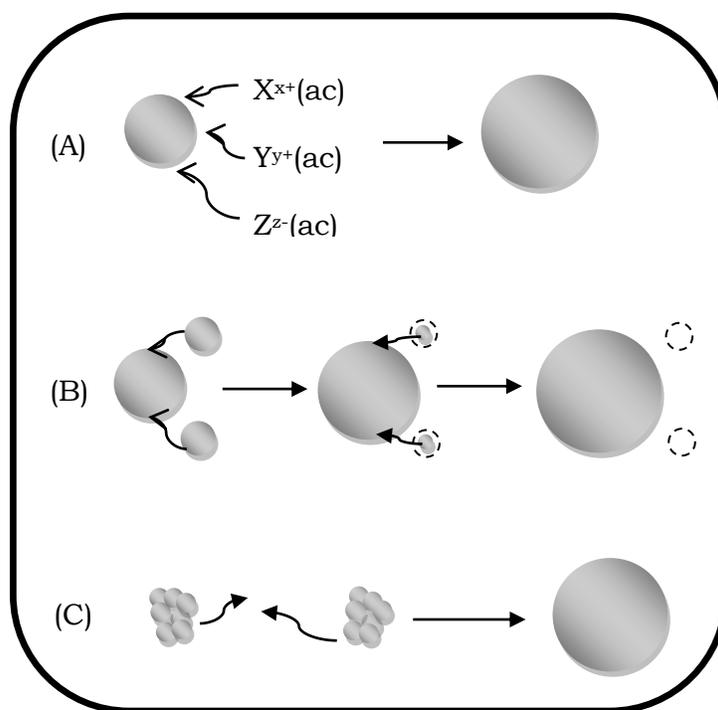


Figura 1.6. Variación de la concentración de cristales a lo largo del tiempo de precipitación. Adaptado de [105] (contenido de acceso abierto).

En cuanto al crecimiento de los cristales, en la literatura abierta se postulan tres mecanismos probables:

- (A) Crecimiento de los núcleos que consumen precursores de la solución
- (B) El proceso Ostwald, que tiene lugar cuando partículas grandes crecen a expensas de disolver las más pequeñas;
- (B) Fusión de varias partículas por unión orientada (coalescencia).

Estos mecanismos se representan en el Esquema 1.6.



Esquema 1.6. Mecanismos probables de crecimiento de núcleos de MAG

Uno de los estudios más recientes sobre nucleación y crecimiento de MAG por coprecipitación se realizó monitoreando el medio de reacción en tiempo real con criomicroscopía electrónica de transmisión de alta resolución. Este artículo afirma que en el primer minuto de reacción se observaron estructuras tipo gel esparciéndose unos pocos cientos de nm, junto con pequeños agregados de partículas de 2 nm. Estas partículas primarias no presentaron cristalinidad. A los

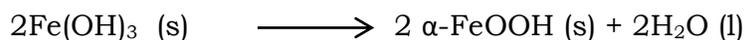
6 minutos, los agregados se volvieron más densos formando cuasi-esferas de 5 a 15 nm, ya cristalinas. A tiempos mayores estas partículas crecieron en número y tamaño a expensas de las primarias. A su vez, también encontraron evidencia de coalescencia al observar partículas fusionándose entre sí [106].

El mecanismo probable de la reacción química de formación de MAG mediante co-precipitación consta de varias etapas [107]:

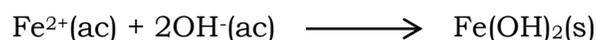
- (1) El hidróxido férrico es el primer sólido en precipitar, ya que su producto de solubilidad (K_{ps}) es más chico que el del ferroso. El pH del medio de reacción se mantiene en 1,5 porque la base es consumida inmediatamente a medida que se agrega [103]:



- (2) $\text{Fe}(\text{OH})_3$ se convierte en goethita (oxihidróxido):



- (3) Alcanzando un pH de 5, precipita el hidróxido ferroso



- (4) Finalmente la goethita y el hidróxido ferroso se combinan para formar magnetita cuando el pH es entre 9-10:



Las principales limitaciones del método de coprecipitación de MAG se relacionan con un ineficiente control del tamaño final de las nanopartículas y la tendencia a la agregación. Esta tendencia se puede asociar a la gran energía superficial de la magnetita nanométrica [108].

Las estrategias para evitar/minimizar la agregación se relacionan con el agregado de aditivos (surfactantes, estabilizantes), que actúan a través de dos mecanismos principales: estabilización estérica y estabilización por incorporación de ligandos.

La estabilización estérica se logra mediante la adición de moléculas voluminosas (como polímeros hidrosolubles) a la solución de sales precursoras, restringiendo el desplazamiento de las NPMs recién formadas a través del medio de reacción, minimizando la agregación [109]. El polietilenglicol (PEG) de elevado peso molecular es uno de los más estudiados [110,111].

La adsorción de ligandos de distinta naturaleza sobre la superficie de los núcleos en crecimiento tiene una doble función: detener el crecimiento de las NPMs en una etapa temprana de su formación, logrando tamaños finales reducidos; y también pueden aportar grupos funcionales específicos que dotan a la MAG de carácter hidrofóbico o hidrofílico [112,113]. De esta manera, se puede controlar la dispersión de las NPMs en solventes de distinta polaridad. Por ejemplo, la repulsión electrostática entre partículas cargadas las vuelve estables en agua. El tamaño y forma de las NPMs se puede controlar al variar la concentración del aditivo, siempre que se mantenga constante la concentración de precursores [114].

Si se eligen modificantes con determinados grupos funcionales, se promueve la incorporación de otras moléculas, como proteínas o entrecruzantes, entre muchas otras [115].

1.6. Estudios previos acerca de inmovilización enzimática y NPMs.

La lipasa B de *Candida antártica* (CALB) ha sido estudiada en profundidad por el grupo de catálisis enzimática de PLAPIQUI. A partir del desarrollo de la tesis doctoral de la Dra. María Laura Foresti [116], se logró un importante caudal de conocimientos sobre la inmovilización de lipasas de CALB, *Candida rugosa* y *Pseudomonas fluorescens* en polipropileno y quitosano, como modelos de material hidrofóbico e hidrofílico respectivamente. Se aplicó como reacción test experimental la síntesis de oleato de etilo sin solvente. La misma se estudió también teóricamente por métodos de mecánica molecular, analizando las interacciones lipasa-sustrato; el mecanismo de reacción y las interacciones producto/sustrato y sitio activo/agua, en particular de CALB y la lipasa de *Candida rugosa*.

La Dra. María del Pilar Guauque Torres desarrolló su tesis doctoral en PLAPIQUI aplicando una nueva técnica de inmovilización no estudiada hasta ese momento en el grupo [35]. Las lipasas estudiadas fueron CALB, y las de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) y *Rhizomucor miehei* (RML). En particular, los derivados de CALB preparados como enzimas agregadas entrecruzadas (Cross Linked Enzyme Aggregates o CLEAs) se evaluaron usando también como reacción test la síntesis de etiloleato por esterificación sin solvente. Se registró el fenómeno de hiperactivación para la mayoría de estos derivados de CALB preparados. Es decir, la enzima en forma de CLEAs resultó más activa que su forma libre para la síntesis de etiloleato.

Además, la Dra. Guauque Torres evaluó la determinación de proteína en los preparados líquidos comerciales de lipasas disponibles en el laboratorio mediante la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La presencia de estabilizantes, aditivos, ácidos nucleicos, macromoléculas y otras proteínas imposibilita la precipitación selectiva de la proteína proveniente de lipasa; por lo tanto el resultado de la precipitación hace referencia a la masa de *proteína precipitable* (PP). Se asume que cantidades crecientes de PP implican cantidades crecientes de lipasa.

En la tesina de grado “Síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita-quitosano” realizada por esta tesista se comprobó que, bajo condiciones de coprecipitación controladas, se obtenía un óxido de hierro de color negro que respondía a la aplicación de un campo magnético y que además tenía un difractograma de rayos X igual al de la magnetita pura, disponible en numerosas bases de datos abiertas. En cuanto a las propiedades magnéticas, la magnetometría de muestra vibrante (VSM) demostró que las partículas obtenidas por coprecipitación eran superparamagnéticas, debido al tamaño reducido de los cristales formados (alrededor de los 10 nm). Por lo tanto, se concluyó que el compuesto sintetizado *bajo esas condiciones* era mayormente *magnetita* [102].

Entonces, lo que se busca en este trabajo es, combinar los conocimientos adquiridos por el grupo en síntesis de nanopartículas magnéticas con la inmovilización de lipasas y aplicarlos en la preparación de un biocatalizador de alta actividad y estabilidad, utilizando herramientas de nano y biotecnología.

1.7. Hipótesis y objetivos

Hipótesis: es posible formular biocatalizadores eficientes a base de un soporte magnético y CALB.

Objetivos:

- Optimizar las condiciones de síntesis de nanopartículas de magnetita en presencia de estabilizantes que permitan controlar su tamaño y la agregación (concentración y naturaleza química) a partir del método de co-precipitación.
- Explorar distintos materiales de recubrimiento para funcionalizar las partículas con grupos amino, promoviendo la interacción posterior con la lipasa a inmovilizar (quitosano, lisina).
- Evaluar variables determinadas en la preparación del biocatalizador a base de CALB inmovilizada en los soportes magnéticos funcionalizados nano y macroparticulados: concentraciones de enzima y de entrecruzante o aditivo (en caso de ser utilizado).
- Explorar distintas vías de inmovilización alterando el protocolo experimental para lograr biocatalizadores activos y estables en la reacción de interés: entrecruzamiento pre- y post-inmovilización.
- Estudiar los parámetros que aseguran viabilidad e implementación práctica de los biocatalizadores (estabilidad en el tiempo de almacenamiento, costo, estabilidad operacional).
- Encontrar una metodología analítica adecuada y confiable para cuantificar la lipasa inmovilizada, combinando la técnica tradicional de espectroscopía UV-Vis con emisión atómica-ICP.
- Caracterizar los materiales obtenidos por microscopía electrónica de barrido y por transmisión (SEM/TEM), espectroscopía de rayos X dispersados (EDX), espectroscopía infrarroja por reflectancia difusa (DRIFTS) y otras según sea necesario.

1.8. Organización de la Tesis

La presente Tesis consta de ocho capítulos. En este primer capítulo se introducen conceptos básicos sobre catálisis enzimática y síntesis de nanopartículas de magnetita. Asimismo, se presentaron los objetivos propuestos para el trabajo.

En el capítulo II se detallan los métodos experimentales para la inmovilización de la enzima estudiada y la determinación de su actividad catalítica. También se describen las técnicas de caracterización aplicadas y los tratamientos de las muestras en cada una.

El capítulo III estudia la síntesis de nanopartículas de MAG por coprecipitación en presencia de diferentes estabilizantes y su posterior funcionalización.

El capítulo IV consiste en el estudio de la inmovilización covalente de CALB a través de GLUT sobre el NPMs modificadas con quitosano.

En el capítulo V se realiza un análisis sistemático de la influencia de la cantidad de entrecruzante (GLUT y/u otro) y lipasa ofrecida sobre la actividad y estabilidad de CALB inmovilizada en NPMs modificadas con quitosano.

El capítulo VI está dedicado a la aplicación de diferentes técnicas analíticas para la cuantificación de proteínas, con el propósito de calcular la cantidad de enzima inmovilizada.

El capítulo VII estudia la influencia tanto del protocolo de inmovilización (GLUT antes o después de inmovilizar la enzima) como de la concentración del entrecruzante, con el objeto de optimizar la actividad y estabilidad del biocatalizador.

En el capítulo VIII se exponen las conclusiones globales de todo el trabajo de tesis y se indican lineamientos generales para investigaciones futuras.

1.9. Referencias del Capítulo I

- [1] T.P. Umile, *Catalysis for sustainability : goals, challenges, and impacts*, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2015.
- [2] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green chemistry : theory and practice*, Oxford University Press, 1998.
- [3] R.A. Sheldon, I.W.C.E. Arends, U. Hanefeld, *Green Chemistry and Catalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2007.
- [4] G. Rothenberg, *Catalysis Concepts and Green Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008.
- [5] A. Illanes, *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*, Springer, 2008.
- [6] E. Primo Yúfera, *Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria*, Reverté, Barcelona, 1995.
- [7] No Title, (n.d.). <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-crosslinking-protein-modification.html#/legacy=www.piercenet.com>.
- [8] A. Illanes, L. Wilson, C. Vera, Facts and Figures in Enzyme Biocatalysis, in: *Probl. Solving Enzym. Biocatal.*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, 2013: pp. 1–10.
- [9] P.-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L.G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, E.M. Papamichael, Advances in lipase-catalyzed esterification reactions, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1846–1859.
- [10] A.M. Mouad, D. Taupin, L. Lehr, F. Yvergnaux, A.L.M. Porto, Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 126 (2016) 64–68.
- [11] U. Derewenda, A.M. Brzozowski, D.M. Lawson, Z.S. Derewenda, *Catalysis*

- at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase., *Biochemistry*. 31 (1992) 1532–41.
- [12] P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M.E. Leser, R. Miller, Lipases at interfaces: A review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 147 (2009) 237–250.
- [13] M.V. Flores, P.J. Halling, Full model for reversible kinetics of lipase-catalyzed sugar-ester synthesis in 2-methyl 2-butanol, *Biotechnol. Bioeng.* 78 (2002) 795–801.
- [14] G. V Chowdary, S.G. Prapulla, Kinetic study on lipase-catalyzed esterification in organic solvents, *Indian J. Chem.* 44 (2005) 2322–2327.
- [15] D. Bezbradica, M. Stojanovi, D. Veličkovi, A. Dimitrijevi, M. Carevi, M. Mihailovi, N. Milosavi, Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester, *Biochem. Eng. J.* 71 (2013) 89–96.
- [16] A. Illanes, L. Wilson, C. Vera, *Problem Solving in Enzyme Biocatalysis.*, Wiley, Chichester, 2014.
- [17] M. Cvjetko Bubalo, A. Jurinjak Tušek, M. Vinkovič, K. Radošević, V. Gaurina Sršek, I. Radojčić Redovniković, Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 122 (2015) 188–198.
- [18] A. Illanes, Introduction, in: A. Illanes (Ed.), *Enzym. Biocatal.*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2008: pp. 1–56.
- [19] E.W.J. Mosmuller, J.D.H. Van Heemst, C.J. Van Delden, M.C.R. Franssen, J.F.J. Engbersen, A New Spectrophotometric Method for the Detection of Lipase Activity Using 2,4-Dinitrophenyl Butyrate as a Substrate, *Biocatal. Biotransformation*. 5 (1992) 279–287.
- [20] Lipase from *Candida* sp. recombinant, expressed in *Aspergillus niger* | Sigma-Aldrich, (n.d.).
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/13170?lang=es®ion=AR> (accessed December 15, 2016).

- [21] N.R. Mohamad, N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, R.A. Wahab, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes., *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29 (2015) 205–220.
- [22] L. Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2006.
- [23] J. Wang, D. Bowie, X. Zhang, C. Filipe, R. Pelton, J.D. Brennan, Morphology and Entrapped Enzyme Performance in Inkjet-Printed Sol-Gel Coatings on Paper, *Chem. Mater.* 26 (2014) 1941–1947.
- [24] D. Kim, H. Yoo, J.Y. Park, S. Hong, “Bio-switch Chip” Based on Nanostructured Conducting Polymer and Entrapped Enzyme, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 21933–21938.
- [25] L. Yang, X. Li, X. Li, Z. Su, C. Zhang, M. Xu, H. Zhang, Improved stability and enhanced efficiency to degrade chlorimuron-ethyl by the entrapment of esterase SulE in cross-linked poly (γ -glutamic acid)/gelatin hydrogel, *J. Hazard. Mater.* 287 (2015) 287–295.
- [26] H. El Rassy, A. Perrard, A.C. Pierre, Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: Bi-Bi Ping-Pong kinetics, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 30 (2004) 137–150.
- [27] A. Trusek-Holownia, A. Noworyta, Efficient utilisation of hydrogel preparations with encapsulated enzymes – a case study on catalase and hydrogen peroxide degradation, *Biotechnol. Reports.* 6 (2015) 13–19.
- [28] M.J. Abdekhodaie, J. Cheng, X.Y. Wu, Effect of formulation factors on the bioactivity of glucose oxidase encapsulated chitosan–alginate microspheres: In vitro investigation and mathematical model prediction, *Chem. Eng. Sci.* 125 (2015) 4–12.
- [29] J.D. Vaghjiani, T.S. Lee, G.J. Lye, M.K. Turner, Production and Characterisation of Cross-Linked Enzyme Crystals (Clecs®) for Application as Process Scale Biocatalysts, *Biocatal. Biotransformation.* 18 (2000) 151–

175.

- [30] T.S. Lee, M.K. Turner, G.J. Lye, Mechanical Stability of Immobilized Biocatalysts (CLECs) in Dilute Agitated Suspensions, *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 43–50.
- [31] S. Talekar, V. Ghodake, T. Ghotage, P. Rathod, P. Deshmukh, S. Nadar, M. Mulla, M. Ladole, Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase, *Bioresour. Technol.* 123 (2012) 542–547.
- [32] M.N. Gupta, S. Raghava, Enzyme Stabilization via Cross-Linked Enzyme Aggregates, in: *Methods Mol. Biol.*, 2011: pp. 133–145.
- [33] M.P. Guauque Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*, *Biochem. Eng. J.* 72 (2013) 18–23.
- [34] M.P. Guauque Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity, *Biochem. Eng. J.* 90 (2014) 36–43.
- [35] M.P. Guauque Torres, Preparación y caracterización fisicoquímica de lipasas autosoportadas a partir de agregados de enzimas (CLEAs) con actividad catalítica en reacciones de esterificación, hidrólisis y acidólisis, UNS, 2013.
- [36] W. Aehle, *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2007.
- [37] P. Monsan, Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization, *J. Mol. Catal.* 3 (1978) 371–384.
- [38] S. Pahujani, S.S. Kanwar, G. Chauhan, R. Gupta, Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 2566–2570.
- [39] J.A. Silva, G.P. Macedo, D.S. Rodrigues, R.L.C. Giordano, L.R.B. Gonçalves, Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on

- chitosan-based hydrogels using different support activation strategies, *Biochem. Eng. J.* 60 (2012) 16–24. doi:10.1016/j.bej.2011.09.011.
- [40] L. Betancor, F. López-Gallego, N. Alonso-Morales, G. Dellamora, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, Glutaraldehyde in Protein Immobilization, in: J.M. Walker, J.M. Guisan (Eds.), *Immobil. Enzym. Cells*, 2nd ed., Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006: pp. 57–64.
- [41] D.H. Lee, C.H. Park, J.M. Yeo, S.W. Kim, Lipase Immobilization on Silica Gel Using a Cross-linking Method, *J. Ind. Eng. Chem.* 12 (2006) 777–782.
- [42] A. a Mendes, L. Freitas, A.K.F. de Carvalho, P.C. de Oliveira, H.F. de Castro, Immobilization of a Commercial Lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by Different Strategies., *Enzyme Res.* 2011 (2011) 1–8.
- [43] M. Ziegler-Borowska, T. Siódmiak, D. Chełminiak, A. Cyganiuk, M.P. Marszałł, Magnetic nanoparticles with surfaces modified with chitosan–poly[N-benzyl-2-(methacryloxy)-N,N-dimethylethanaminium bromide] for lipase immobilization, *Appl. Surf. Sci.* 288 (2014) 641–648.
- [44] A.B. Majumder, K. Mondal, T.P. Singh, M.N. Gupta, Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts, *Biocatal. Biotransform.* 26 (2008) 235–242.
- [45] V.L. Sirisha, A. Jain, A. Jain, Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes, *Adv. Food Nutr. Res.* 79 (2016) 179–211.
- [46] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 435–456.
- [47] J. Mehta, N. Bhardwaj, S.K. Bhardwaj, K.-H. Kim, A. Deep, Recent advances in enzyme immobilization techniques: Metal-organic frameworks as novel substrates, *Coord. Chem. Rev.* 322 (2016) 30–40.
- [48] C. Altinkaynak, S. Tavlasoglu, N. İydemir, I. Ocsoy, A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability, *Enzyme Microb. Technol.* 93

- (2016) 105–112.
- [49] K. Meller, M. Szumski, B. Buszewski, Microfluidic reactors with immobilized enzymes—Characterization, dividing, perspectives, *Sensors Actuators B Chem.* 244 (2017) 84–106.
- [50] Y. Jiang, P. Zheng, L. Zhou, W. Kong, J. Gao, J. Wang, J. Gu, X. Zhang, X. Wang, Immobilization of lipase in hierarchically ordered macroporous/mesoporous silica with improved catalytic performance, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 130 (2016) 96–103.
- [51] A. Kumari, B. Kaur, R. Srivastava, R.S. Sangwan, Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties, *Biochem. Biophys. Reports.* 2 (2015) 108–114.
- [52] K. Min, J. Kim, K. Park, Y.J. Yoo, Enzyme immobilization on carbon nanomaterials: Loading density investigation and zeta potential analysis, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 83 (2012) 87–93.
- [53] M.L. Foresti, G. Valle, R. Bonetto, M.L. Ferreira, L.E. Briand, FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 1624–1635.
- [54] K. Juarez-Moreno, J.N. Díaz de León, T.A. Zepeda, R. Vazquez-Duhalt, S. Fuentes, Oxidative transformation of dibenzothiophene by chloroperoxidase enzyme immobilized on (1D)- γ -Al₂O₃ nanorods, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 115 (2015) 90–95.
- [55] R. Reshmi, G. Sanjay, S. Sugunan, Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis, 2007.
- [56] M. Guncheva, M. Dimitrov, D. Zhiryakova, Nanosized tin dioxide — Unexplored carrier for lipase immobilization, 2011.
- [57] Y. Ren, J.G. Rivera, L. He, H. Kulkarni, D.-K. Lee, P.B. Messersmith, Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating., *BMC Biotechnol.* 11 (2011) 63.

- [58] P. Jampala, M. Preethi, S. Ramanujam, B.S. Harish, K.B. Uppuluri, V. Anbazhagan, Immobilization of levan-xylanase nanohybrid on an alginate bead improves xylanase stability at wide pH and temperature, *Int. J. Biol. Macromol.* 95 (2017) 843–849.
- [59] R.S. Singh, R.P. Singh, J.F. Kennedy, Immobilization of yeast inulinase on chitosan beads for the hydrolysis of inulin in a batch system, *Int. J. Biol. Macromol.* 95 (2017) 87–93.
- [60] N. Song, S. Chen, X. Huang, X. Liao, B. Shi, Immobilization of catalase by using Zr(IV)-modified collagen fiber as the supporting matrix, *Process Biochem.* 46 (2011) 2187–2193.
- [61] N. Jaiswal, O. Prakash, M. Talat, S.H. Hasan, R.K. Pandey, α -Amylase immobilization on gelatin: Optimization of process variables, *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 10 (2012) 161–167.
- [62] H. An, B. Jin, S. Dai, Fabricating polystyrene fiber-dehydrogenase assemble as a functional biocatalyst, *Enzyme Microb. Technol.* 68 (2015) 15–22.
- [63] A. Basso, M. Hessler, S. Serban, Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins, *Tetrahedron.* 72 (2016) 7323–7328.
- [64] R.O. Cristóvão, S.C. Silvério, A.P.M. Tavares, A.I.S. Brígida, J.M. Loureiro, R.A.R. Boaventura, E.A. Macedo, M.A.Z. Coelho, Green coconut fiber: a novel carrier for the immobilization of commercial laccase by covalent attachment for textile dyes decolourization., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2012) 2827–38.
- [65] J.S. Lv, X.Y. Liu, J.X. Xu, Y.F. Deng, Z. Wu, Y.M. Wang, M.Y. Fan, H. Xu, Preparation and properties of adsorption material from corn stalks core when used for enzyme immobilization and the subsequent activities of the adsorbed enzymes, *Ind. Crops Prod.* 50 (2013) 787–796.
- [66] C.S. Pundir, M. Bhambi, N.S. Chauhan, Chemical activation of egg shell membrane for covalent immobilization of enzymes and its evaluation as inert support in urinary oxalate determination, *Talanta.* 77 (2009) 1688–

1693.

- [67] Z. Salehi, H.H. Ghahfarokhi, A.A. Kodadadi, R. Rahimnia, Thiol and urea functionalized magnetic nanoparticles with highly enhanced loading capacity and thermal stability for lipase in transesterification, *J. Ind. Eng. Chem.* 35 (2016) 224–230.
- [68] K. Atacan, B. Çakıroğlu, M. Özacar, Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion, *Int. J. Biol. Macromol.* 97 (2017) 148–155.
- [69] Y. Cao, L. Wen, F. Svec, T. Tan, Y. Lv, Magnetic AuNP@Fe₃O₄ nanoparticles as reusable carriers for reversible enzyme immobilization, *Chem. Eng. J.* 286 (2016) 272–281.
- [70] R.A. Fernandes, A.L. Daniel-da-Silva, A.P.M. Tavares, A.M.R.B. Xavier, EDTA-Cu (II) chelating magnetic nanoparticles as a support for laccase immobilization, *Chem. Eng. Sci.* 158 (2017) 599–605.
- [71] T. Iype, J. Thomas, S. Mohan, K.K. Johnson, L.E. George, L.A. Ambattu, A. Bhati, K. Ailsworth, B. Menon, S.M. Rayabandla, R.A. Jesudasan, S. Santhosh, C.N. Ramchand, A novel method for immobilization of proteins via entrapment of magnetic nanoparticles through epoxy cross-linking, *Anal. Biochem.* 519 (2017) 42–50.
- [72] K. Abdollahi, F. Yazdani, R. Panahi, Covalent immobilization of tyrosinase onto cyanuric chloride crosslinked amine-functionalized superparamagnetic nanoparticles: Synthesis and characterization of the recyclable nanobiocatalyst, *Int. J. Biol. Macromol.* 94 (2017) 396–405.
- [73] E. Ozyilmaz, M. Bayrakci, M. Yilmaz, Improvement of catalytic activity of *Candida rugosa* lipase in the presence of calix[4]arene bearing iminodicarboxylic/phosphonic acid complexes modified iron oxide nanoparticles, *Bioorg. Chem.* 65 (2016) 1–8.
- [74] K. Hola, Z. Markova, G. Zoppellaro, J. Tucek, R. Zboril, Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances, *Biotechnol. Adv.*

- 33 (2015) 1162–1176.
- [75] J. Xu, J. Sun, Y. Wang, J. Sheng, F. Wang, M. Sun, Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization, *Molecules*. 19 (2014) 11465–11486.
- [76] R.D. Ambashta, M. Sillanpää, Water purification using magnetic assistance: A review, *J. Hazard. Mater.* 180 (2010) 38–49.
- [77] O. V Makarchuk, T.A. Dontsova, I.M. Astrelin, Magnetic Nanocomposites as Efficient Sorption Materials for Removing Dyes from Aqueous Solutions., *Nanoscale Res. Lett.* 11 (2016) 161.
- [78] F. Yazdani, B. Fattahi, N. Azizi, Synthesis of functionalized magnetite nanoparticles to use as liver targeting MRI contrast agent, *J. Magn. Magn. Mater.* 406 (2016) 207–211.
- [79] P. Xu, Z. Shen, B. Zhang, J. Wang, R. Wu, Synthesis and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as calcium-responsive MRI contrast agents, *Appl. Surf. Sci.* 389 (2016) 560–566.
- [80] C. Shi, C. Thum, Q. Zhang, W. Tu, B. Pelaz, W.J. Parak, Y. Zhang, M. Schneider, Inhibition of the cancer-associated TASK 3 channels by magnetically induced thermal release of Tetrandrine from a polymeric drug carrier, *J. Control. Release*. 237 (2016) 50–60.
- [81] L. Wu, L. Chen, F. Liu, X. Qi, Y. Ge, S. Shen, Remotely controlled drug release based on iron oxide nanoparticles for specific therapy of cancer, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. (2017).
- [82] I. Mohmood, C.B. Lopes, I. Lopes, D.S. Tavares, A.M.V.M. Soares, A.C. Duarte, T. Trindade, I. Ahmad, E. Pereira, Remediation of mercury contaminated saltwater with functionalized silica coated magnetite nanoparticles, *Sci. Total Environ.* 557 (2016) 712–721.
- [83] R. Verma, A. Asthana, A.K. Singh, S. Prasad, M.A.B.H. Susan, Novel glycine-functionalized magnetic nanoparticles entrapped calcium alginate beads for effective removal of lead, *Microchem. J.* 130 (2017) 168–178.

- [84] Y. Gong, L. Wang, J. Liu, J. Tang, D. Zhao, Removal of aqueous perfluorooctanoic acid (PFOA) using starch-stabilized magnetite nanoparticles, *Sci. Total Environ.* 562 (2016) 191–200.
- [85] P. Wang, X. Wang, S. Yu, Y. Zou, J. Wang, Z. Chen, N.S. Alharbi, A. Alsaedi, T. Hayat, Y. Chen, X. Wang, Silica coated Fe₃O₄ magnetic nanospheres for high removal of organic pollutants from wastewater, *Chem. Eng. J.* 306 (2016) 280–288.
- [86] M.R. Mehrasbi, J. Mohammadi, M. Peyda, M. Mohammadi, Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil, *Renew. Energy.* 101 (2017) 593–602.
- [87] J. Wang, L.-H. Jiang, Y. Zhou, B.-C. Ye, Enhanced biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Acinetobacter* species strain LMB-5 coated with magnetic nanoparticles, *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 116 (2017) 184–190.
- [88] S.P. Gubin, *Magnetic Nanoparticles*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2009.
- [89] S.L. Iconaru, R. Guégan, C.L. Popa, M. Motelica-Heino, C.S. Ciobanu, D. Predoi, Magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles as adsorbents for As and Cu removal, *Appl. Clay Sci.* 134 (2016) 128–135.
- [90] Y. Bagbi, A. Sarswat, D. Mohan, A. Pandey, P.R. Solanki, Lead (Pb²⁺) adsorption by monodispersed magnetite nanoparticles: Surface analysis and effects of solution chemistry, *J. Environ. Chem. Eng.* 4 (2016) 4237–4247.
- [91] R.M. Cornell, U. Schwertmann, *The Iron Oxides*, Second, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2003.
- [92] F.A. Tourinho, A.F.C. Campos, R. Aquino, M.C.F.L. Lara, G.J. da Silva, J. Depeyrot, Surface charge density determination in electric double layered magnetic fluids, *Brazilian J. Phys.* 32 (2002) 501–508.
- [93] G. Yang, B. Zhang, J. Wang, S. Xie, X. Li, Preparation of polylysine-modified

- superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.* 374 (2015) 205–208. doi:10.1016/j.jmmm.2014.08.040.
- [94] Y. Li, R. Jiang, T. Liu, H. Lv, X. Zhang, Single-microemulsion-based solvothermal synthesis of magnetite microflowers, *Ceram. Int.* 40 (2014) 4791–4795.
- [95] Q. Yang, F. Lan, Q. Yi, Y. Wu, Z. Gu, A colloidal assembly approach to synthesize magnetic porous composite nanoclusters for efficient protein adsorption, *Nanoscale.* 7 (2015) 17617–17622.
- [96] S. Byrappa, C.S. Vicas, N. Dhanaraj, K. Namratha, S.D. Keerthana, R. Dey, K. Byrappa, Hydrothermal growth of fine magnetite and ferrite crystals, *J. Cryst. Growth.* 452 (2016) 111–116.
- [97] O.A. Attallah, E. Girgis, M.M.S.A. Abdel-Mottaleb, Synthesis of non-aggregated nicotinic acid coated magnetite nanorods via hydrothermal technique, *J. Magn. Magn. Mater.* 399 (2016) 58–63.
- [98] D. Gopi, M. Thameem Ansari, L. Kavitha, Electrochemical synthesis and characterization of cubic magnetite nanoparticle in aqueous ferrous perchlorate medium, *Arab. J. Chem.* 9 (2016) S829–S834.
- [99] A. Rodríguez-López, J.J. Cruz-Rivera, C.G. Elías-Alfaro, I. Betancourt, H. Ruiz-Silva, R. Antaño-López, Fine tuning of magnetite nanoparticle size distribution using dissymmetric potential pulses in the presence of biocompatible surfactants and the electrochemical characterization of the nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C.* 46 (2015) 538–547.
- [100] S. Kumar, A.K. Jana, I. Dhamija, Y. Singla, M. Maiti, Preparation, characterization and targeted delivery of serratiopeptidase immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 413–426. doi:10.1016/j.ejpb.2013.06.019.
- [101] M.C. Mascolo, Y. Pei, T.A. Ring, Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases, *Materials (Basel).* 6 (2013) 5549–5567.
- [102] P. Nicolás, M. Saleta, H. Troiani, R. Zysler, V. Lassalle, M.L. Ferreira,

- Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues, *Acta Biomater.* 9 (2013) 4754–4762.
- [103] T. Ahn, J.H. Kim, H.-M. Yang, J.W. Lee, J.-D. Kim, Formation Pathways of Magnetite Nanoparticles by Coprecipitation Method, *J. Phys. Chem. C.* 116 (2012) 6069–6076.
- [104] P.E.G. Casillas, C. a R. Gonzalez, C. a M. Pérez, Infrared Spectroscopy of Functionalized Magnetic Nanoparticles, *Infrared Spectrosc. - Mater. Sci. Engineering Technol.* (2009) 405–420.
http://cdn.intechopen.com/pdfs/36186/InTech-Infrared_spectroscopy_of_functionalized_magnetic_nanoparticles.pdf.
- [105] J. Chang, E.R. Waclawik, Colloidal semiconductor nanocrystals: controlled synthesis and surface chemistry in organic media, *RSC Adv.* 4 (2014) 23505.
- [106] J. Baumgartner, A. Dey, P.H.H. Bomans, C. Le Coadou, P. Fratzl, N.A.J.M. Sommerdijk, D. Faivre, Nucleation and growth of magnetite from solution, *Nat. Mater.* 12 (2013) 310–314.
- [107] H. Singh, S. Bhagwat, S. Jouen, B. Lefez, B. Athawale, Anjali A. Hannover, S. Ogale, Elucidation of the role of hexamine and other precursors in the formation of magnetite nanorods and their stoichiometry, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 3246–3253.
- [108] W. Wu, Q. He, C. Jiang, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies., *Nanoscale Res. Lett.* 3 (2008) 397–415.
- [109] M. Sun, A. Zhu, Q. Zhang, Q. Liu, A facile strategy to synthesize monodisperse superparamagnetic OA-modified Fe₃O₄ nanoparticles with PEG assistant, *J. Magn. Mater.* 369 (2014) 49–54.
- [110] A.B. Savić, D. Čokeša, S. Lazarević, B. Jokić, D. Janačković, R. Petrović, L.S. Živković, Tailoring of magnetite powder properties for enhanced phosphate removal: Effect of PEG addition in the synthesis process, *Powder Technol.* 301 (2016) 511–519.
- [111] F.A. Harraz, Polyethylene glycol-assisted hydrothermal growth of magnetite

- nanowires: Synthesis and magnetic properties, *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures*. 40 (2008) 3131–3136.
- [112] N. MOHAMMAD, EDRISSI, Reza, BAHRAM, Synthesis of Pure Magnetite Nanoparticles Using Microwave Hydrothermal and Sonication, *Asian J. Chem.* 20 (2008) 3857–3865.
- [113] K.M.K. Selim, J.H. Lee, S.J. Kim, Z.C. Xing, I.K. Kang, Y. Chang, H.Q. Guo, Surface modification of magnetites using maltotrionic acid and folic acid for molecular imaging, *Macromol. Res.* 14 (2006) 646–653.
- [114] A.G. Roca, M.P. Morales, C.J. Serna, Synthesis of Monodispersed Magnetite Particles From Different Organometallic Precursors, *IEEE Trans. Magn.* 42 (2006) 3025–3029.
- [115] L. Mohammed, H.G. Gomaa, D. Ragab, J. Zhu, Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review, *Particuology*. 30 (2017) 1–14.
- [116] M.L. Foresti, Estudio de la actividad catalítica de lipasas inmovilizadas en reacciones de esterificación, UNS, 2005.

CAPÍTULO II

Experimental

En este capítulo se describen los lineamientos generales de las metodologías experimentales empleados en todo el trabajo de tesis. Oportunamente se ahondará en cada procedimiento en particular a lo largo de los próximos capítulos.

2.1. Reactivos

Sulfato ferroso heptahidratado, cloruro férrico hexahidratado, hidróxido de sodio y biftalato de potasio (Anedra, Argentina), hidróxido de amonio (Merck, Argentina) dodecilsulfato de sodio, ácido oleico (94% acidez Anedra, Alemania), etanol absoluto, éter etílico y heptano Dorwill, acetona y ácido acético (Cicarelli Argentina), lisina clorhidrato (BDH Biochemicals, Inglaterra), quitosano (Chitoclear, Islandia), Liposyme CALB-L batch LCN02103 y Novozyme 435 donados por Novo Nordisk (Brasil), fenolftaleína (Anedra, China), 3-aminopropiltriethoxisilano (APTS, Avocado Research Chemicals Reino Unido), glutaraldehído al 25% (Fluka), albúmina de suero bovino al 30% (Wiener Argentina), reactivo de Bradford (Bio-Rad, Estados Unidos), cloruro de sodio (Anedra, Dinamarca), poli-etilenglicol 35000 (Fluka, Suiza), hexametiléntetraamina (Biopack), ácido clorhídrico (JT Baker, México).

2.2. Métodos experimentales

2.2.1. Inmovilización de la enzima.

La inmovilización se llevó a cabo poniendo en contacto 100 mg de un determinado soporte (MAG con modificantes) con 17 mL de una solución de CALB 0,6 mg/mL (10,3 mg PP/mL) en agua destilada (pH=5,7) durante 7 horas con agitación magnética intensa (1000 rpm). Finalmente el catalizador con CALB inmovilizada se aisló por decantación magnética, se realizaron 3 lavados con agua destilada y se secó a 37 °C hasta el día siguiente. Se almacenó en heladera a 4 °C hasta su uso.

2.2.2. Reacción test y muestreo.

Se agitaron magnéticamente 1 g de AO, 200 μL H_2O , 150 μL de etanol absoluto y masas variables de catalizador durante 3 horas a una temperatura determinada en un vial de vidrio de 10 mL de capacidad, con una tapa a rosca perforada envuelta en teflón.

Para tomar muestras representativas de esta mezcla multifásica, la misma fue homogeneizada al final de la reacción agregando 1,5 mL de etanol absoluto, agitando magnéticamente a 1000 rpm por 5 segundos y en menos de un minuto el vial se pesó, el catalizador se decantó con un imán de Nd y se extrajo una alícuota mediante una jeringa provista de una aguja de punción lumbar. En un erlenmeyer sellado con teflón y pesado previamente, se inyectó la muestra inmediatamente para determinar su masa. En el Esquema 2.1 se representa este procedimiento.

Todo el proceso de muestreo fue diseñado para evitar la evaporación del etanol, lo cual alteraría la proporción de ese reactivo respecto de los demás.

Las alícuotas fueron disueltas en 10 mL de etanol/etiléter (1/1) y tituladas con KOH etanólico en presencia de fenolftaleína, determinando la cantidad de ácido graso remanente.

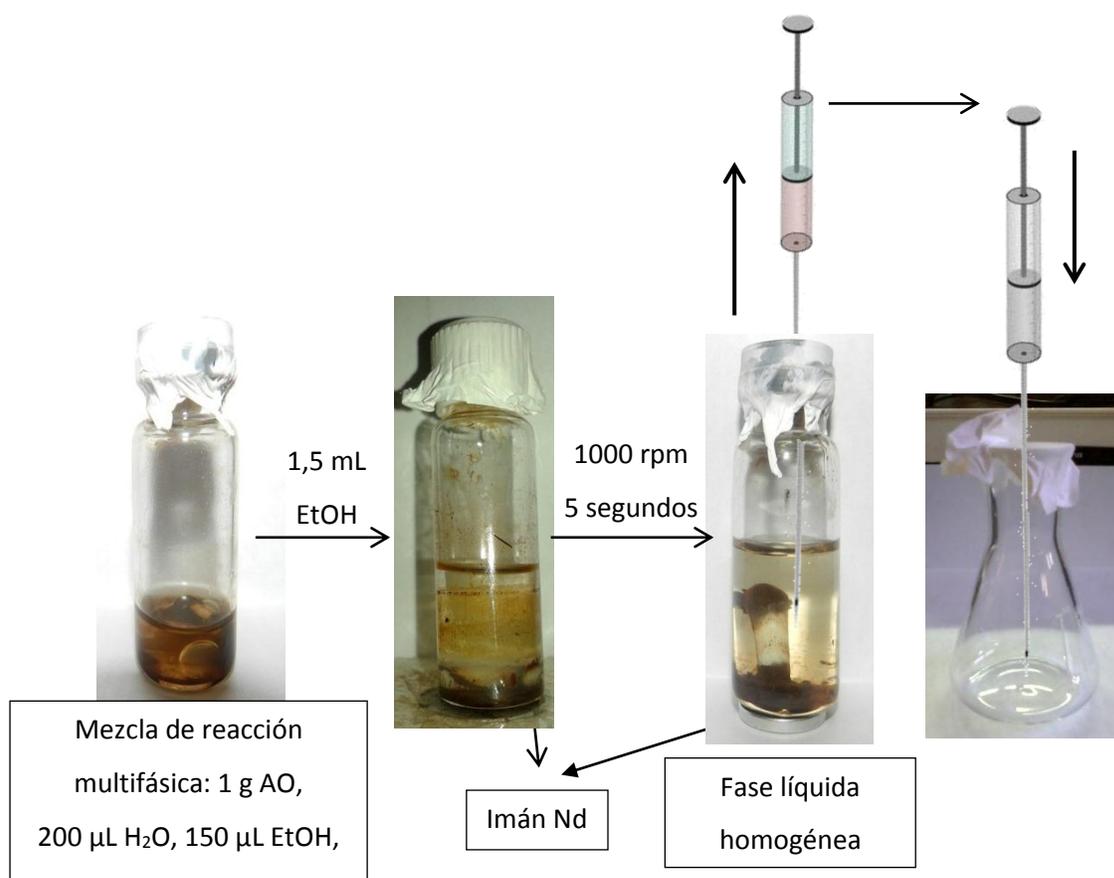
Se tomaron dos muestras de cada medio de reacción y los valores de conversión se promediaron con menos de 1% de diferencia.

En los casos donde el catalizador utilizado fue Novozyme® 435, la toma de muestra se realizó según el protocolo optimizado por Foresti y Ferreira [1]. Brevemente, al finalizar la reacción el vial se agitó manualmente de manera enérgica por 1 minuto y luego, con agitación magnética a 1000 rpm, se extrajeron dos muestras mediante una jeringa y las mismas se depositaron en erlenmeyers sellados.

2.2.3. Test de leaching

Se agregaron 500 μL de la mezcla de reacción de esterificación homogeneizada (separada del catalizador) a una mezcla de reacción fresca (1 g de

AO, 200 μL H_2O , 150 μL de etanol absoluto) y se agitó magnéticamente durante 3 horas a la misma temperatura que se había realizado la reacción con catalizador magnético. En este caso, la toma de muestra se realizó según el protocolo reportado en [1]. Para el cálculo de conversión se tuvo en cuenta el AO fresco y el aportado por la alícuota de 500 μL .



Esquema 2.1. Toma de muestra de la síntesis de oleato de etilo con catalizador magnético.

2.3. Técnicas de caracterización.

Se aplicaron diferentes técnicas de caracterización con dos fines principales: i-determinar propiedades de interés de los materiales preparados, fundamentalmente los soportes y sus derivados/precursores; ii-las lipasas y los biocatalizadores obtenidos.

En la Tabla 2.1 se resumen dichas técnicas con la información provista por cada una.

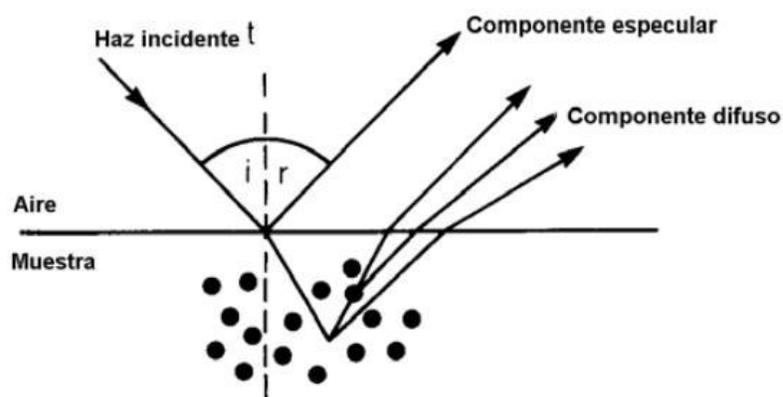
Tabla 2.1. Técnicas de caracterización empleadas

Técnica	Características a observar	Equipamiento
DRIFTS	Presencia de grupos funcionales	Nicolet Smart Collector
DLS	Diámetro hidrodinámico Polidispersión	Malvern Zetasizer Nano
Electroforesis Laser Doppler	Potencial ζ	Malvern Zetasizer Nano
TEM	Tamaño y morfología de partícula	JEOL 100 CX I
SEM-EDX	Morfología superficial- Análisis elemental cualitativo	LEO EVO 40-XVP
Absorción atómica de llama	Contenido de hierro	Perkin Elmer AAnalyst 700
Emisión atómica-ICP	Contenido de azufre, silicio	Shimadzu Secuencial 1000 modelo III
Análisis elemental de productos de calcinación	Contenido de C-N-H	Perkin Elmer Series II CHNS/O Analyser 2400
Espectroscopía UV-Vis	Estimación de carga enzimática. Especiación de GLUT	PG Instruments T60 Spectrophotometer

Seguidamente, se describen los principios teóricos en los que se basan cada una de ellas, detallando el tratamiento o preparación que las muestras requirieron en cada caso.

2.3.1. Espectroscopía de reflectancia difusa en el infrarrojo con Transformada de Fourier (DRIFTS)

La espectroscopía infrarroja es una técnica que permite identificar los grupos funcionales que componen una muestra a partir de vibraciones características en el espectro infrarrojo, y con ello dar una indicación de su naturaleza química. Un espectro infrarrojo identifica los movimientos vibracionales característicos de un enlace dentro de una molécula. Dichos movimientos vibracionales pueden ser de tensión (cambio de la longitud del enlace pero no del ángulo), o de torsión (cambio del ángulo del enlace pero no de la longitud). La energía que se requiere para que las moléculas pasen de un estado vibracional fundamental al primer estado excitado de vibración es de 1-10 Kcal/mol. Esta es la energía de la radiación electromagnética en la región infrarroja (número de onda=4000-400 cm^{-1}). Si un haz de luz en el rango de la radiación infrarroja incide sobre la molécula, la luz puede ser absorbida cambiando el momento dipolar del enlace, y generando un estado vibracional excitado que podrá ser registrado con el equipo de infrarrojo (IR). El espectrómetro en cuestión posee un haz de referencia que permite cuantificar la cantidad de energía transmitida (transmitancia) a la muestra en una longitud de onda determinada. La medición de energía transmitida no es posible en algunas muestras como polvo, papel y gomas. En estos casos las técnicas de reflexión, como la reflectancia difusa, representan una alternativa viable. La reflexión difusa tiene lugar cuando un haz de radiación, en el rango del IR, choca con una muestra rugosa que posee diferentes planos sobre los cuales el haz puede reflejarse en multitud de ángulos diferentes al incidente. Este efecto se observa en el Esquema 2.2. Estos haces reflejados son filtrados y colectados por un detector que genera el espectro de la muestra. El espectro obtenido usando la reflectancia difusa es similar al obtenido por transmitancia, pero el procesamiento de la muestra es mucho más sencillo ya que sólo es necesario diluirla al 1% con KBr y analizar el polvo homogenizado, sin necesidad de preparar pastillas [2].



Esquema 2.2. Representación de la reflexión de radiación por superficies rugosas. Disponible en:

http://karin.fq.uh.cu/~cnv1/qf/docencia/pregrado/espectroscopia/Tomo_1_PDF/IR1.pdf

Al ser la magnetita un material opaco e insoluble, la técnica DRIFTS es más adecuada que la tradicional de transmisión. Para el análisis de los soportes magnéticos y los biocatalizadores, se mezclaron manualmente en un mortero de 2 a 5 mg de muestra con 100 mg de KBr seco y luego se transfirió al portamuestra. El blanco se registró con KBr puro. El equipo se mantuvo purgado con nitrógeno.

2.3.2. Espectroscopía de Emisión Atómica con atomizador de plasma acoplado inductivamente (AE-ICP)

Una de las formas de atomizar una muestra y al mismo tiempo promover transiciones electrónicas es el empleo de una fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP), el cual consiste en una antorcha de argón ionizado rodeada de una bobina de inducción de radiofrecuencia ilustrada en la Figura 2.1. La muestra se introduce dentro de la antorcha mediante un flujo de argón (Figura 2.2). Los electrones experimentan transiciones electrónicas como consecuencia de la alta temperatura, pero este estado excitado dura muy poco tiempo (fracciones de segundo). La relajación de los átomos de la muestra en este plasma emite una radiación de líneas características de cada elemento cuya intensidad es proporcional a la concentración [3].

Al analizarse muestras en estado líquido (sobrenadantes de inmovilización y aguas de lavado), no se requirió ninguna preparación ni tratamiento de las muestras.

En los casos donde las muestras fueron sólidas (soportes y biocatalizadores), una masa conocida -7 a 15 mg- se dispersó y sonicó en 10,0 mL de HCl al 15% y se calentó a 45 °C hasta la total desintegración de la magnetita. Cuando residuos de material polimérico permanecieron en suspensión, la muestra fue filtrada previo a su análisis.

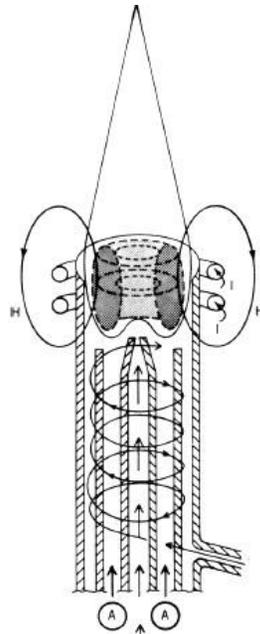


Figura 2.1. Típica fuente de plasmas de acoplamiento inducido. Reproducido de [4] con permiso de la editorial.

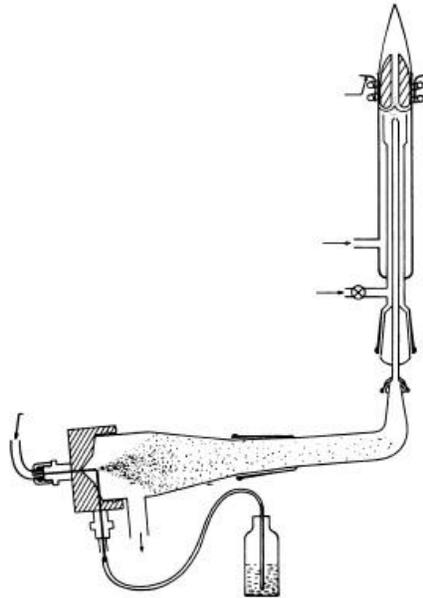


Figura 2.2. Nebulizador para la inyección de muestra en la fuente de plasma.
Reproducido con permiso de [4].

2.3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. Para ello, se hace uso de un haz de electrones que enfoca sobre la muestra con ayuda de electroimanes, lo que permite obtener imágenes con un nivel de resolución cuatro órdenes de magnitud superior a la de un microscopio óptico (0.2 \AA frente a 2000 \AA).

La técnica consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre la muestra a analizar. Los electrones que impactan interactúan de diferentes maneras con la muestra, y se dispersan dando origen a múltiples señales con mayor o menor energía. Particularmente, la imagen de microscopía electrónica se construye con la señal de electrones secundarios (electrones de baja energía $<50\text{eV}$) que son detectados en el equipo y transformados en una imagen tridimensional [2]. La Figura 2.3 esquematiza la disposición de los componentes del equipo.

Las muestras se aplicaron como polvo metalizadas con oro mediante un revestidor de bombardeo iónico (marca SPI).

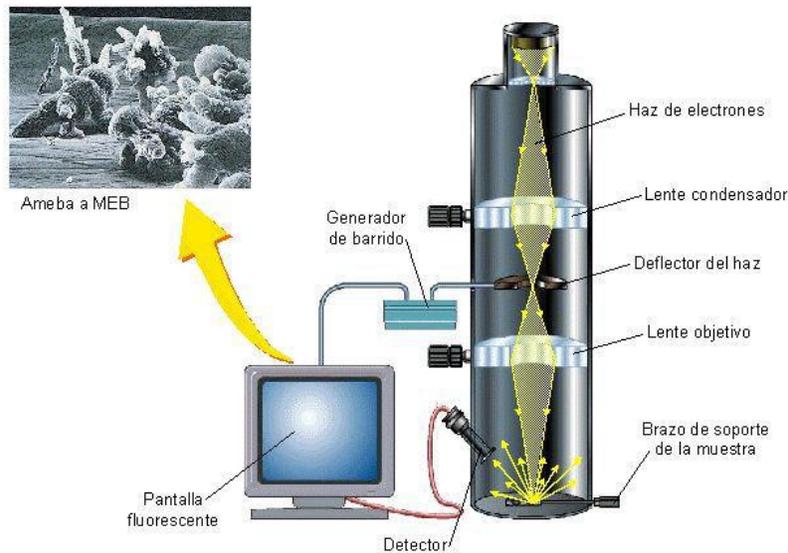


Figura 2.3. Representación de un microscopio electrónico de barrido (SEM)

Disponible en: <https://mahara.org/view/view.php?id=50413>.

2.3.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La técnica TEM permite la visualización de muestras a gran aumento. La imagen representa la transmisión de un haz de electrones a través de una muestra. Las variaciones de amplitud y fase en el haz transmitido proporcionan contraste de imagen que es una función del grosor de la muestra (la cantidad de material por la que debe pasar el haz de electrones) y el material de la muestra (los átomos más pesados dispersan más electrones y por lo tanto tienen un camino libre medio de electrones más pequeño que los átomos más ligeros)[5].

La Figura 2.4 esquematiza la disposición de los componentes del equipo.

Las muestras sólidas en polvo se dispersaron en etanol (5-10 mg/mL) y se sometieron a tratamiento con ultrasonido durante por aproximadamente una hora. Unas gotas de esta suspensión se depositaron sobre una rejilla de cobre de 200 mesh y se secaron a temperatura ambiente.

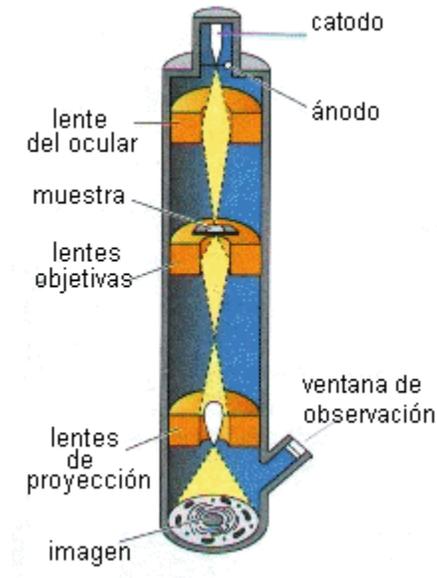


Figura 2.4. Representación de un microscopio electrónico de transmisión (TEM).

Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microscopia/microscopia1.htm>

2.3.5. Dispersión de luz dinámica (DLS)

El principio que permite emplear DLS para medir diámetro hidrodinámico de partículas se basa en que las partículas pequeñas y las moléculas que están en movimiento térmico aleatorio constante, llamado movimiento browniano, difunden a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño: partículas más pequeñas difunden más rápido que las partículas más grandes. La velocidad del movimiento browniano también es determinada por la temperatura, por lo tanto la precisión en el control de temperatura es esencial para una exacta medición tamaño. La velocidad de difusión es determinada a partir del patrón producido por la iluminación de las partículas con un láser. La intensidad de dispersión en un ángulo específico fluctúa con el tiempo, y esto se detecta utilizando un detector de fotodiodos de avalancha (APD). Los cambios de intensidad se analizan generando una función de correlación (ver Figura 2.5). Los datos provenientes de esta curva son transformados en medidas de diámetro hidrodinámico y

distribución de tamaños, a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación. 2.1).

Ecuación 2.1. Relación de Stokes-Einstein $D_h = \frac{k_B T}{3 \pi \eta D}$

D_h es el diámetro hidrodinámico, k_B constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y D es el coeficiente de difusión traslacional.

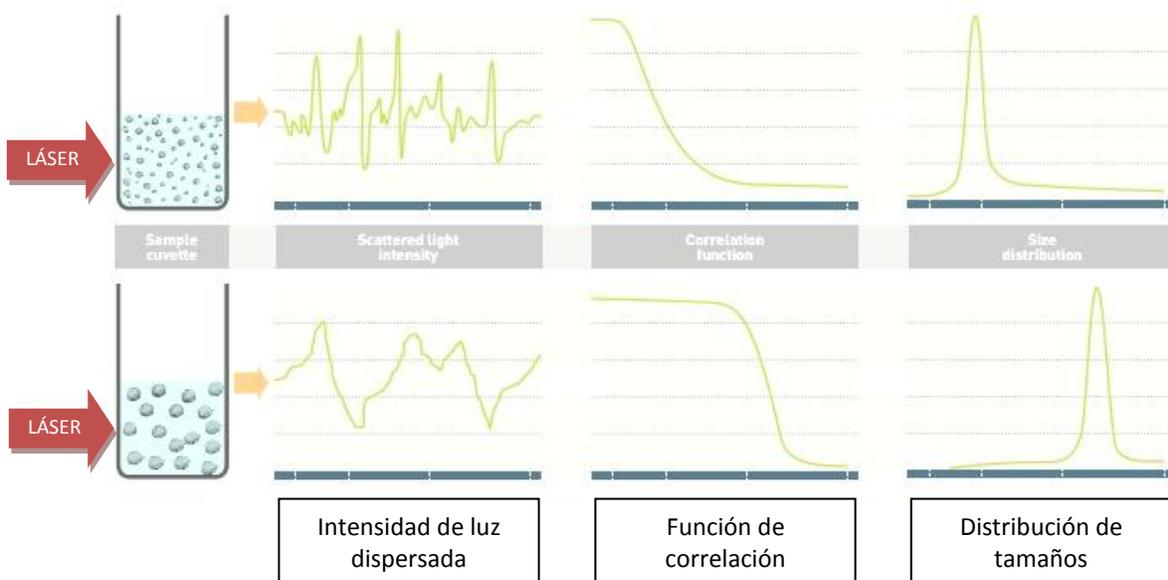


Figura 2.5. Representación del comportamiento de la luz al interactuar con partículas pequeñas o grandes en suspensión. Adaptado de [7].

El coeficiente de difusión traslacional dependerá tanto del “núcleo” de la partícula como de la estructura de la superficie y la presencia de iones en el medio líquido. Por esta razón, los tamaños registrados por DLS pueden ser mucho mayores que los observados en microscopía [6]. La Figura 2.6 ilustra este efecto.

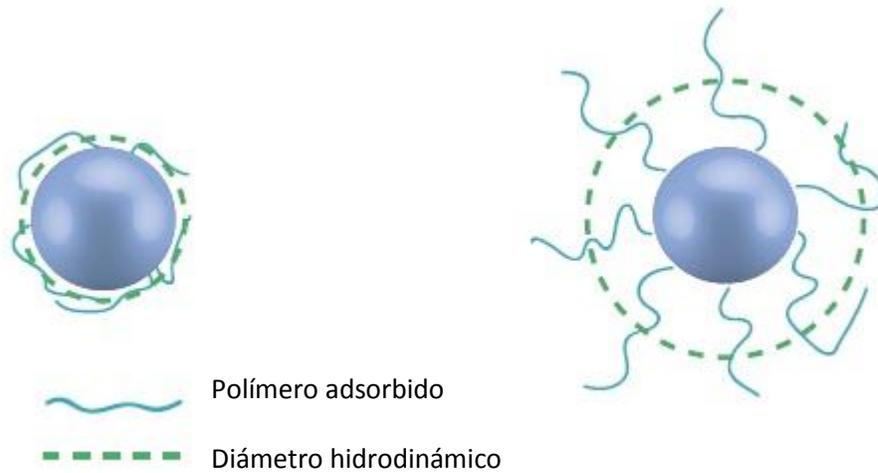


Figura 2.6. Ilustración del fenómeno en el que el Dh es mayor que el tamaño del núcleo de la partícula.

La distribución de Dh puede ser informada por el software del equipo de tres formas distintas: intensidad, volumen o número. Estos mecanismos de ponderación dependen del principio de medición que se utilice.

-Intensidad: Las técnicas de dispersión dinámica de la luz darán una distribución ponderada de la intensidad, donde la contribución de cada partícula en la distribución se relaciona con la intensidad de la luz dispersada por esa partícula. Por ejemplo, usando la aproximación de Rayleigh, la contribución relativa para partículas muy pequeñas será proporcional al tamaño. La aproximación de Rayleigh relaciona la intensidad I de la luz dispersada por una partícula en un haz de luz de longitud de onda λ con la intensidad incidente, I_0 ; cuando el tamaño de la partícula es significativamente menor a λ .

-Número: Una técnica de recuento como el análisis de imágenes dará una distribución ponderada en número en la que cada partícula recibe igual ponderación independientemente de su tamaño. Esto es más útil cuando es importante conocer el número absoluto de partículas - en la detección de partículas extrañas por ejemplo - o donde se requiere alta resolución (partícula por partícula).

-Volumen: Las técnicas de dispersión *estática* de la luz, tales como la difracción láser, darán una distribución ponderada en volumen. Aquí la contribución de cada partícula en la distribución se relaciona con el volumen de esa partícula (equivalente a masa si la densidad es uniforme). Es decir, la contribución relativa será proporcional al tamaño. Esto es a menudo extremadamente útil desde una perspectiva comercial ya que la distribución representa la composición de la muestra en términos de su volumen / masa y, por tanto, su potencial valor económico [6].

Cuando se comparan los datos del tamaño de partícula para la misma muestra medida por diferentes técnicas, los tipos de distribución que se miden e informan pueden producir resultados muy diferentes. Esto se ilustra claramente tomando como referencia una muestra compuesta por igual número de partículas con diámetros de 5 y 50 nm. La distribución ponderada en número da igual ponderación a ambos tipos de partículas, haciendo hincapié en la presencia de partículas más finas de 5 nm. La distribución ponderada en términos de intensidad muestra una señal un millón de veces más elevada para las partículas más grandes que 50 nm. La distribución ponderada en volumen es intermedia entre los dos, como se observa en la Figura 2.7.

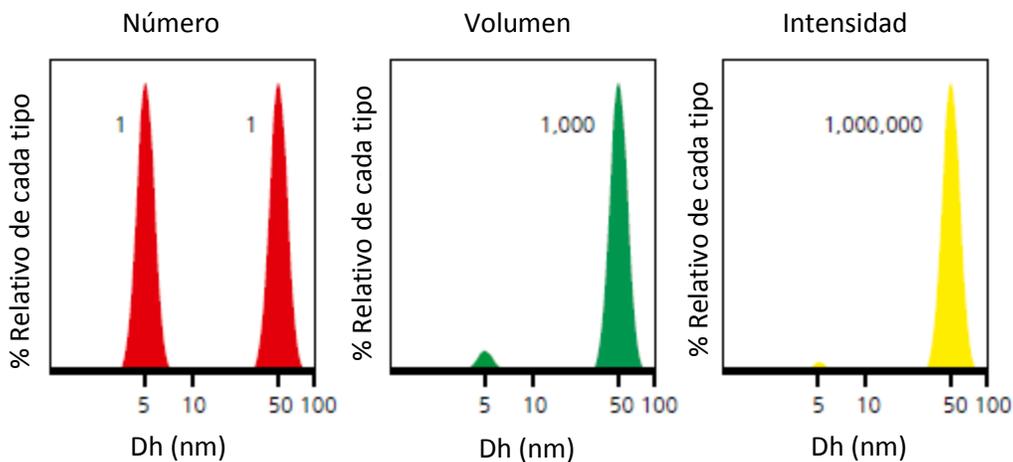


Figura 2.7. Distribuciones de Dh de una misma muestra expresadas en número, volumen o intensidad.

Para las mediciones de D_h , 1 mg de muestra sólida se dispersó en 10 mL de agua destilada bajo tratamiento con ultrasonido. 1 mL de la suspensión se colocó en una celda descartable de poliestireno de 12 mm de camino óptico. La misma se muestra en la Figura 2.9a. Se realizó una serie de entre 12 y 100 corridas. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

2.3.6. Microelectroforesis Láser Doppler

El potencial zeta (ζ pot), también conocido como potencial electrocinético, es una medida de la carga eléctrica "efectiva" sobre la superficie de las partículas y permite inferir la estabilidad de carga de las partículas coloidales. Cuando una partícula tiene una carga superficial neta, la carga es "apantallada" por una concentración aumentada de iones de carga opuesta cerca de la superficie de las partículas. Estos iones que rodean a la partícula constituyen la *capa de Stern*. Esta capa de iones con carga opuesta se mueve con la partícula, y junto con la capa de carga superficial y los iones cargados de forma opuesta se denominan *doble capa eléctrica* (ver Figura 2.8). El ζ pot es una medida de la diferencia de potencial entre la capa difusa y el fluido en el que se dispersa una partícula. Las partículas con un ζ pot positivo se unen a las superficies cargadas negativamente, y viceversa.

La medición se realiza aplicando un campo eléctrico a través de la dispersión. Las partículas migrarán hacia el electrodo de carga opuesta. El cambio de frecuencia o fase de un haz láser incidente, causado por el movimiento de las partículas, se mide como la movilidad electroforética, y ésta es convertida matemáticamente a ζ pot mediante la ecuación de Smoluchowski o Hückel. Éstas son los dos casos límite de la relación entre movilidad electroforética y ζ pot. El primero es aplicable a partículas grandes con bicapas eléctricas delgadas, mientras que el segundo es válido si las partículas son muy pequeñas y por lo tanto su bicapa eléctrica es más gruesa [7].

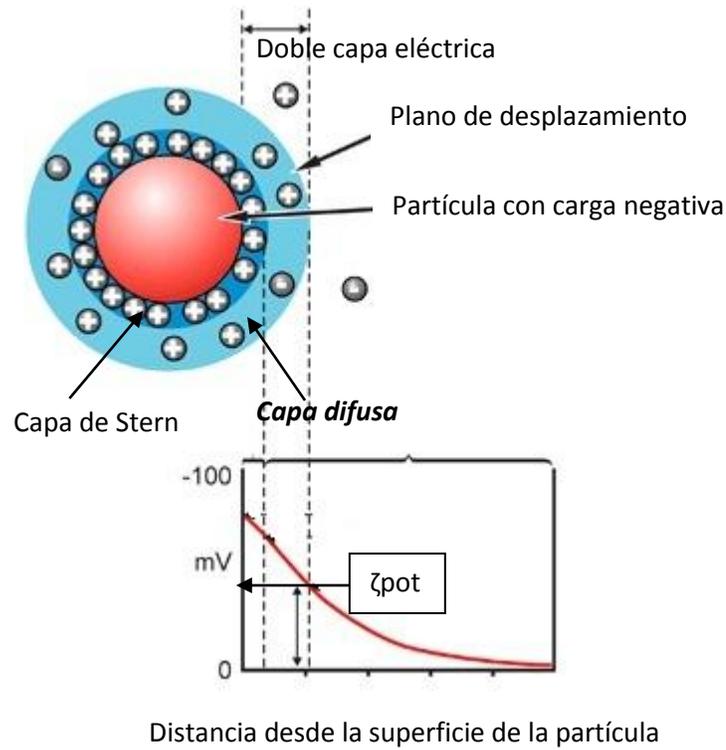


Figura 2.8. Representación de la doble capa eléctrica alrededor de una partícula cargada negativamente (adaptado de [8]).

La misma dispersión preparada para DLS se transfirió a la celda para electroforesis (Figura 2.9b.) mediante una jeringa sin aguja evitando el ingreso de burbujas de aire.

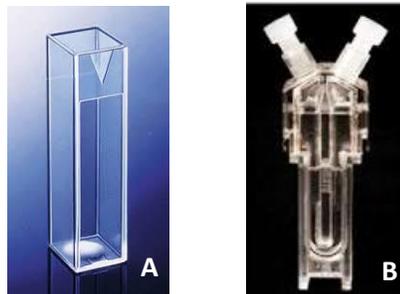


Figura 2.9. a)Celda de medición de diámetro hidrodinámico. b)Celda para la medida de potencial Z (disponible en malvern.com)

2.3.7. Espectroscopía de absorción molecular Ultravioleta-Visible (UV-V)

La radiación UV-V es capaz producir transiciones en los niveles energéticos de los electrones en las moléculas. En el caso de la espectroscopía UV-V molecular, la absorción de la radiación electromagnética en el rango UV-V por parte de las moléculas de una muestra puede utilizarse para la identificación de compuestos así como para el análisis cuantitativo de muestras mediante la aplicación de la Ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon b C$) y la comparación con patrones de concentración conocida, donde A es la absorbancia, b es el camino óptico expresado en cm, C es la concentración molar de la muestra y ϵ es la absorptividad molar en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ [5].

Las muestras analizadas por esta técnica requirieron diferentes tratamientos y blancos de reactivos, por lo que se detallarán oportunamente a lo largo de los próximos capítulos. La celda utilizada fue una de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

2.4. Referencias del capítulo II

- [1] M.L. Foresti, M.L. Ferreira, Frequent analytical/experimental problems in lipase-mediated synthesis in solvent-free systems and how to avoid them., *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1408–25. doi:10.1007/s00216-005-3087-6.
- [2] D.A. Skoog, T.A. Niemann, F.J. Holler, *Principios de Análisis Instrumental*, 5ta ed., McGraw-Hill, 2001.
- [3] D.A. Skoog, J.J. Leary, *Análisis Instrumental*, 4ta ed., McGraw-Hill, 1994.
- [4] V.A. Fassel, Quantitative Elemental Analyses by Plasma Emission Spectroscopy, *Science* (80-.). 202 (1978).
- [5] Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante, (n.d.). http://www.ua.es/es/investigacion/sti/servicios/analisis_instrumental/mi

croscopia/tem.html.

- [6] I. Malvern, A Basic Guide to Particle Characterization. INFORM WHITE PAPER, (2012).
[http://golik.co.il/Data/ABasicGuidtoParticleCharacterization\(2\)_1962085150.pdf](http://golik.co.il/Data/ABasicGuidtoParticleCharacterization(2)_1962085150.pdf).
- [7] A. V. Delgado, F. González-Caballero, R.J. Hunter, L.K. Koopal, J. Lyklema, Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena, *J. Colloid Interface Sci.* 309 (2007) 194–224. doi:10.1016/j.jcis.2006.12.075.
- [8] nanoComposix · Characterization Techniques, (n.d.).
<http://nanocomposix.com/pages/characterization-techniques> (accessed November 30, 2016).

Capítulo III

Síntesis y caracterización de
nanopartículas de magnetita
funcionalizadas

En este capítulo se analiza la influencia de la naturaleza y concentración del estabilizante sobre las propiedades fisicoquímicas de las partículas magnéticas sintetizadas por coprecipitación. El propósito de este estudio fue lograr un control sobre el tamaño, polidispersión y carga superficial de los materiales a utilizar como soporte de la lipasa en el diseño de biocatalizadores.

Para estos fines, se emplearon poli-etilenglicol (PEG) de alto peso molecular (35000 Da), hexametiltetraamina (HMTA), ácido oleico (AO) y dodecilsulfato de sodio (SDS). En todos casos el compuesto modificante estuvo presente en el medio de reacción antes del agregado de base.

Posteriormente se exploran dos rutas de funcionalización de las nanopartículas preparadas, para proveer de grupos amino ($-NH_2$) a la superficie de las partículas, con el objeto de intensificar la afinidad química del soporte magnético con la enzima a inmovilizar. Las estrategias adoptadas fueron la nanoprecipitación de quitosano (QUIT) y adsorción de lisina (LIS).

Las diferentes formulaciones fueron caracterizadas por TEM, SEM-EDX, DRIFTS, electroforesis y DLS.

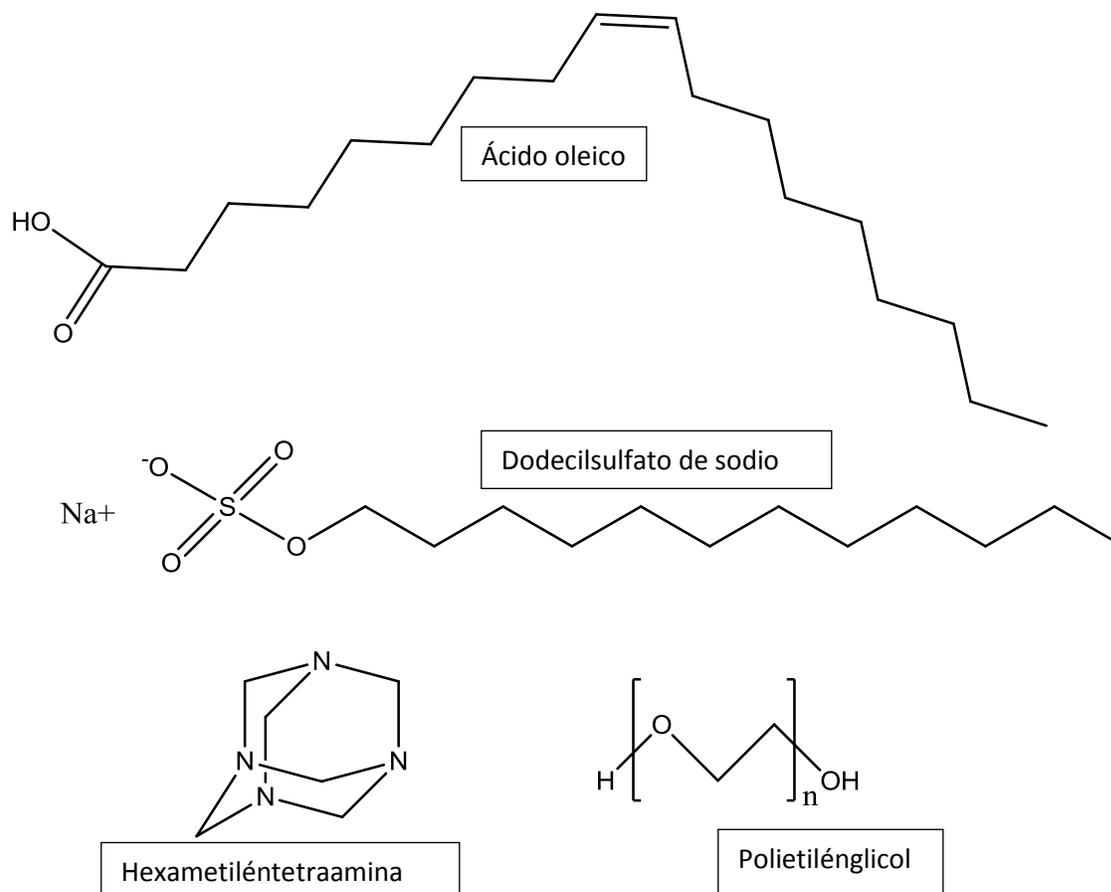
3.1. Introducción

El interés en la síntesis de nanopartículas de magnetita (MAG) con estructuras bien definidas surge de las propiedades fisicoquímicas notablemente distintas entre partículas con distintos tamaños y formas. Estructuras como esferas [1], octaedros [2], bastones [3], cubos [4], cáscaras huecas [5], placas [6], entre otras [7] se han sintetizado con diversa precisión en el control del proceso, utilizando distintos métodos de síntesis. Este control es en parte alcanzado mediante la introducción de estabilizantes en el medio de reacción, los cuales pueden afectar significativamente la solubilidad y propiedades anisotrópicas del material inorgánico, llevando al ordenamiento de los átomos hacia configuraciones variadas desde la escala nano a micro.

Como se mencionó en el capítulo I, la coprecipitación de MAG es frecuentemente realizada en presencia de estabilizantes de muy variada naturaleza. Estas sustancias pueden cumplir diferentes roles, como funcionalizar

la superficie de las partículas, minimizar la agregación y controlar la forma y tamaño de los cristales. Algunas sustancias conducen a la cristalización selectiva en geometrías específicas según su concentración [8].

Se seleccionaron estabilizantes orgánicos de diferente naturaleza, cuya estructura molecular se muestra en el esquema 3.1.



Esquema 3.1. Estructuras de AO, SDS, HMTA y PEG.

En la literatura abierta, el AO es comúnmente empleado como surfactante para minimizar la agregación de las partículas magnéticas, aun cuando es agregado al medio de reacción después de la base. Es decir, una vez que la MAG ya se ha cristalizado [9–11]. En cambio, en este trabajo, el AO está presente, inicialmente, en contacto con la solución de Fe⁺²/Fe⁺³ previo al momento de la

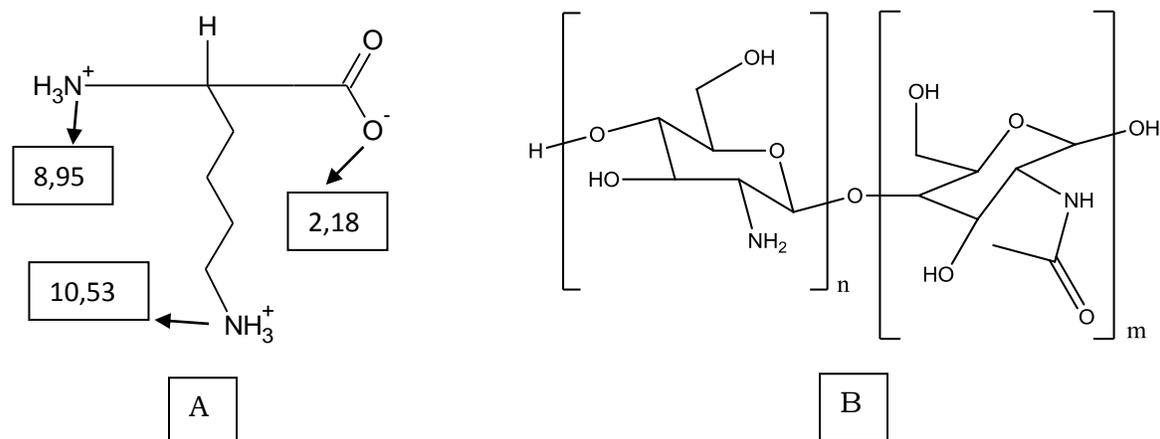
adición de la base. Esto permite evaluar si ejerce algún efecto en el proceso de crecimiento de los cristales.

El SDS es capaz de estabilizar suspensiones de nanopartículas de diversos materiales como oro, sílice, magnetita u óxido de cobre, entre otros [12-15]. Además, el control de la forma de las partículas puede ejercerse a través de la concentración de SDS [8].

La HMTA es ampliamente utilizada como molécula directora del crecimiento de cristales de distintas sustancias, tales como óxido de cinc (bastones) [16], hidróxido férrico (nanoplacas) [17], óxido de uranio, aluminio y circonio (esferas) [18], akaganeita, goethita y hematita de varias geometrías [19], y ferrita de cobre [4]. En cuanto a MAG, el método utilizado para obtener partículas de forma controlada por la HMTA es generalmente el hidrotermal [20-22].

Como estabilizante polimérico, se seleccionó el PEG de alto peso molecular. Los PEGs comprenden una familia de polímeros hidrófilos ampliamente utilizados en productos médicos, farmacéuticos, cosméticos, industriales y alimenticios. [23]. Como estabilizante de partículas magnéticas, existen reportes del uso de PEGs como aditivo del medio de reacción [24], así como único solvente, en reemplazo del agua [25]. En la literatura abierta, no hay un consenso sobre el mecanismo por el cual este polímero estabiliza las nanopartículas de MAG. De todas maneras, en este capítulo lo que se busca determinar es si hay variaciones en las propiedades finales del material obtenido según las condiciones experimentales aplicadas.

Con respecto a la funcionalización con grupos amino, se seleccionó el quitosano (QUIT) y la lisina (LIS) como materiales proveedores de estos grupos funcionales. La estructura molecular de estos aditivos se muestra en el Esquema 3.2.

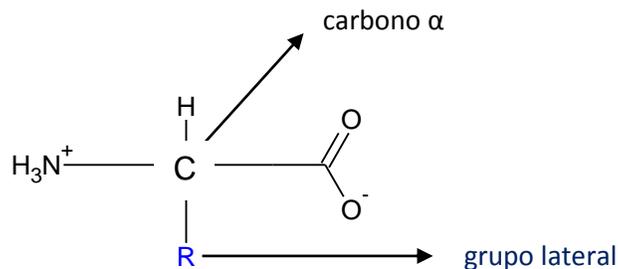


Esquema 3.2. A-Estructura molecular de la lisina y valores de pKa de cada grupo ionizable. B-Quitosano

El biopolímero QUIT ya se había explorado con anterioridad como soporte sólido en forma de escamas para inmovilización enzimática por adsorción simple [26]. En esta tesis, en cambio, se plantea aplicar la técnica de nanoprecipitación adaptada para obtener nanopartículas de MAG recubiertas (total o parcialmente) de grupos amino de QUIT. La nanoprecipitación consiste en la adición lenta de una solución de polímero a un medio en el que este compuesto no es soluble, produciéndose una precipitación controlada [27].

Considerando que los átomos de hierro expuestos del óxido son capaces de coordinarse con bases de Lewis, los aminoácidos (AA) surgen como una opción atractiva gracias a su bifuncionalidad química que cumple con las características requeridas: el grupo funcional compatible con la MAG (carboxilatos) y los aminos, que dotan de reactividad frente a proteínas que se quieran inmovilizar o bien otras moléculas que actúen de espaciadores o entrecruzantes.

Los AA tienen la estructura general que se muestra en el Esquema 3.3 [28].



Esquema 3.3. Estructura molecular de un aminoácido genérico

El grupo lateral -R puede presentar una naturaleza variable, esto es, neutro o cargado, ácido o básico, polar o apolar. El carácter de R puede alterar significativamente la hidrofiliidad de la molécula, y por lo tanto del material sobre el que se adsorba.

La LIS fue elegida por contar con una cadena lateral aminada, que aumenta el número de grupos funcionales reactivos. Además, es en general el AA que provee los grupos NH₂ en la estructura de las proteínas. Estos grupos -NH₂ son útiles para el posterior entrecruzamiento con grupos aldehído a través de diferentes tipos de reacciones, como formación de bases de Schiff (enlaces C=N) entre otras, que se detallarán en profundidad en el capítulo IV.

La modificación de MAG con AA ha sido reportada mayormente por coprecipitación para diversas aplicaciones, pero son escasos los trabajos publicados para inmovilización de enzimas. Algunos estudios incluyen el AA en la solución de sales precursoras [29–33], mientras que otros lo incorporan una vez formado el óxido, luego del agregado de base [34–40]. Observando las microfografías TEM de estas publicaciones, es notoria la aglomeración obtenida mediante el primer procedimiento.

Ahmadi y col. estudiaron la aglomeración de nanopartículas de MAG-cisteína. Emplearon dos protocolos: agregar el AA únicamente antes de la base, o bien en los dos momentos, antes y después de la coprecipitación. El efecto

dispersante que tuvo la segunda capa de cisteína fue evidente por TEM y por PCS (photon correlation spectroscopy). El diámetro hidrodinámico de los cúmulos se redujo de 164 a 41 nm cuando la segunda capa de AA fue incorporada [41].

El propósito de este capítulo es sintetizar partículas de MAG de forma y tamaño controlado por el método de coprecipitación en presencia de estabilizantes, para evaluar si las propiedades fisicoquímicas de las partículas que componen el soporte (como tamaño, forma y carga superficial) tienen un impacto en la capacidad de carga de la enzima y en la performance de los biocatalizadores preparados.

Las clásicas técnicas de caracterización para cristales magnéticos (difracción de rayos X (XRD), magnetometría de muestra vibrante (VSM) y espectroscopia Mössbauer) no fueron consideradas para este trabajo ya que no aportarían nueva información útil acerca de los materiales preparados en el marco de interés de la presente Tesis.

Por ejemplo, XRD permite reconocer la estructura cristalina de los sólidos. En el caso de la coprecipitación de MAG, un subproducto posible es la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), formada por oxidación parcial de los iones ferrosos. Su patrón de difracción de rayos X es igual al de MAG, por lo que no pueden diferenciarse por esa técnica.

La espectroscopia Mossbauer, puede ser útil para estimar la estequiometría de los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} , dando una idea de la pureza de la MAG preparada [42]. De todas maneras, sabiendo que bajo condiciones ya estudiadas el producto principal en la coprecipitación es MAG [43], el porcentaje de pureza no sería un dato necesariamente útil en la aplicación como soporte de inmovilización de enzimas.

La VSM permite trazar la curva de magnetización y determinar así la magnetización de saturación (M_s), remanencia y coercitividad. El requerimiento del superparamagnetismo y alta M_s en las NPMs es muy importante para las aplicaciones biomédicas. Estas propiedades permiten localizar las NPMs en el área deseada del organismo y elevar su temperatura bajo un campo magnético, lo

cual dispara la liberación de un fármaco [44]. Para la aplicación de inmovilizar enzimas, el magnetismo intrínseco de la MAG es la propiedad de interés para la decantación magnética, que puede comprobarse simplemente con imanes de alta potencia comerciales. Además, la técnica VSM se había empleado en un trabajo previo en el que se comprobó que las partículas preparadas por coprecipitación en las condiciones seleccionadas resultan superparamagnéticas [43].

3.2. Experimental

3.2.1. Coprecipitación de MAG

3.2.1.1. Con hexametiléntetraamina (HMTA) o poli-etilénglicol (PEG) como estabilizante

Para obtener 500 mg de MAG, 0,6007 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1,1681 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 33 mL de agua destilada. Se agregaron 0,25; 0,5 o 1 g de HMTA o PEG y se calentó a 70 °C purgando el reactor con nitrógeno. Una vez alcanzada esta temperatura, se agregaron 8,7 mL de NaOH 5 M con velocidad controlada (2 gotas \approx 0,1 mL por segundo). La mezcla fue agitada magnéticamente a 700-800 rpm por media hora más desde la finalización del agregado de base. El sólido se decantó con ayuda un imán de Nd, retirando el sobrenadante y lavando con agua destilada hasta neutralidad. A estos productos se los llamará **Hi y Pi** donde “i” denotará la proporción de estabilizante utilizado respecto de MAG (05, 1, 2).

3.2.1.2. Con HMTA y PEG como co-estabilizantes

Para obtener 500 mg de MAG, 0,6007 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1,1681 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 33 mL de agua destilada. Se agregaron masas iguales de HMTA y PEG para que juntas sumen 250, 500 o 1000 mg. La solución se calentó a 70°C purgando el reactor con nitrógeno. Una vez alcanzada esta temperatura, se agregaron 8,7 mL de NaOH 5 M a 0,1 mL por segundo. La mezcla fue agitada magnéticamente a 700-800 rpm por media hora más desde la finalización del agregado de base. El sólido se decantó con ayuda un imán de Nd,

retirando el sobrenadante y lavando con agua destilada hasta neutralidad. A estos productos se los llamará **PHi** donde “i” denotará la proporción de estabilizantes utilizada respecto de MAG (05, 1, 2).

3.2.1.3. Síntesis con PEG mediante co-precipitación inversa

En esta preparación, las cantidades de sales de hierro y estabilizante son las mismas que P2, pero es esta solución la que es agregada con velocidad controlada al hidróxido de sodio a 70°C. A esta formulación se la llamará **P2I**.

3.2.1.4. Con ácido oleico como estabilizante.

Se agregó un exceso de NaOH 5 M (8 mL) a una emulsión formada por 2 mL de AO y 33 mL de una solución acuosa de cloruro férrico hexahidratado (4,3 mmoles) y sulfato ferroso heptahidratado (2,15 mmoles). El agregado se realizó con velocidad controlada (aproximadamente 0,1 mL por segundo) bajo atmósfera de nitrógeno a 70 °C con agitación magnética. La mezcla fue agitada magnéticamente a 700-800 rpm por media hora más desde la finalización del agregado de base. El sólido se decantó mediante un imán de Nd. Para purificar el producto obtenido, se retiró el sobrenadante y se lavó con una mezcla de agua-etanol absoluto 1/1 para eliminar el AO no adsorbido, y las impurezas (cloruros, sulfatos e hidróxido de sodio). A este producto se lo llamará **MAG-AO**. Esta única relación de masas MAG/AO fue seleccionada en base a experiencias previas las cuales demostraron que en esas condiciones se obtienen partículas totalmente recubiertas del estabilizante y son fácilmente aisladas por decantación magnética [43].

3.2.1.5. Con dodecilsulfato de sodio (SDS) como estabilizante.

2,3362 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,2005 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,1616 g de SDS se disolvieron en 72 mL de agua destilada. La solución se calentó hasta 70 °C y se agregaron 10 mL de NH_4OH 5M con velocidad controlada (3 mL por minuto) bajo atmósfera de nitrógeno con agitación magnética. La mezcla fue agitada magnéticamente a 700-800 rpm por media hora más desde la finalización del

agregado de base. El sólido se decantó con ayuda un imán de Nd, retirando el sobrenadante y lavando con agua destilada hasta neutralidad. Esta única relación de masas MAG/SDS fue seleccionada en base al trabajo de Azcona y col., el cual demostró que en esas condiciones se obtiene una mezcla de nanopartículas esféricas y bastones alargados [8].

Como se detallará más adelante, fue necesario desorber el SDS para facilitar la incorporación de grupos amino. Para eliminar el surfactante, el producto seco (500 mg) se sonicó en heptano (5 mL) durante una hora. Se retiró el solvente y se lavó el residuo del mismo con etanol absoluto. A este producto se lo nombrará como **MAG(SDS)**. Esta nomenclatura con paréntesis implica que la formulación no necesariamente contiene SDS, sino que la magnetita fue coprecipitada en su presencia.

La Figura 3.1 muestra la disposición del equipamiento utilizado en la coprecipitación. En la figura 3.2 puede apreciarse la evolución del aspecto de la solución de sales de hierro/AO a medida que aumenta el pH por el agregado de base.

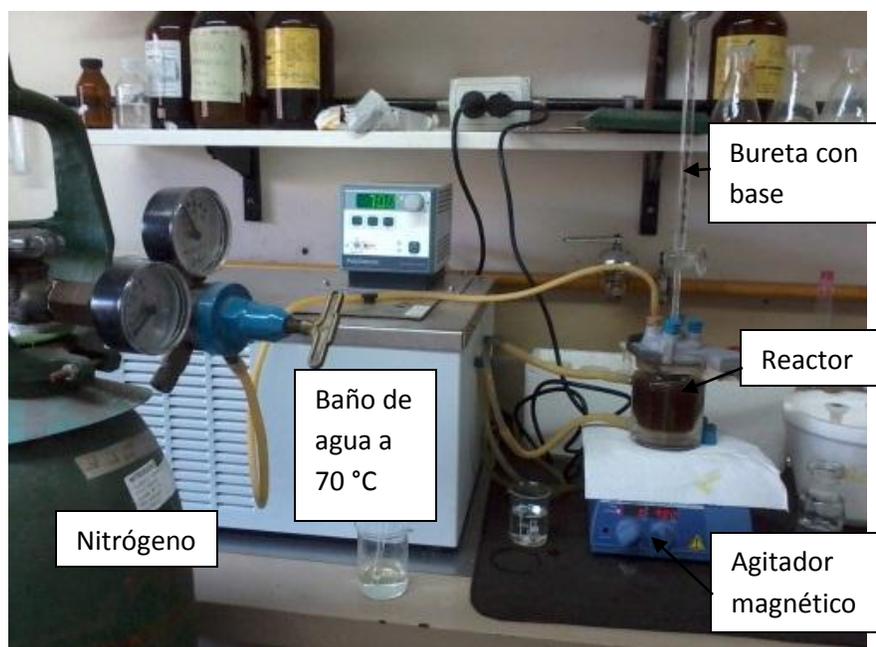


Figura 3.1 Equipamiento utilizado para la coprecipitación de magnetita



Figura 3.2. Aspecto del medio de coprecipitación de MAG-AO a medida que se agrega la base.

En la Tabla 3.1 se resumen todas las formulaciones preparadas incluyendo las variables más importantes adoptadas en el proceso de coprecipitación.

Tabla 3.1. Tipo y concentración de estabilizante empleado para obtener 500 mg de MAG bajo distintas condiciones experimentales.

Muestra	HMTA (mg)	PEG (mg)	AO (mL)	SDS (mg)	Orden de agregado de reactivos
H05	250	0	0	0	Base agregada a la solución de hierro y estabilizantes
H1	500	0	0	0	
H2	1000	0	0	0	
P05	0	250	0	0	
P1	0	500	0	0	
P2	0	1000	0	0	
PH05	175	175	0	0	
PH1	250	250	0	0	
PH2	500	500	0	0	
MAG-AO	0	0	2	0	
MAG(SDS)	0	0	0	161,6	
P2I	0	1000	0	0	Solución de hierro y PEG agregada a la base

3.2.2. Funcionalización con grupos NH₂

3.2.2.1. Nanoprecipitación de quitosano

Las partículas MAG-AO se dispersaron en acetona bajo tratamiento con ultrasonido. A esta dispersión, se agregó lentamente una solución de QUIT en ácido acético al 50%, con una concentración de polímero 10 mg/mL. La relación nominal en masa de MAG/QUIT fue de 2 a 1. La decantación con un imán de Nd permitió recuperar aproximadamente el 50% de la masa de MAG pura empleada inicialmente, ya que el resto del material permaneció en suspensión, formando una dispersión coloidal sumamente estable. A esta fase líquida (dispersión coloidal) se la llamará **DC**. Utilizando la fracción sólida decantada, se realizaron lavados con agua destilada hasta neutralidad. A las partículas sólidas recuperadas en este procedimiento se la llamará de aquí en adelante **MAG-AO-QUIT**.

3.2.2.2. Adsorción de lisina

El producto **MAG(SDS)** se dispersó en una solución acuosa de lisina (17 mg/mL manteniendo iguales las masas de óxido y aminoácido) bajo agitación magnética durante 7 horas a temperatura ambiente. Se decantó magnéticamente, el sobrenadante fue retirado y se realizaron 3 lavados con agua destilada. A esta formulación se la llamará de aquí en más **MAG(SDS)-LIS**.

De todos los materiales obtenidos por coprecipitación, sólo MAG-AO y MAG(SDS) se usaron como precursores para sintetizar soportes aminados capaces de interactuar con la enzima. Las demás muestras no fueron utilizadas para ese fin debido a diferentes razones que se describen brevemente a continuación.

Las muestras H1 y H2 resultaron hidrofóbicas, por lo que no pudieron dispersarse en solución acuosa de LIS. Por esta razón tampoco se exploró la posibilidad de ponerlas en contacto con QUIT disuelto en solución acuosa de ácido acético, ni de realizar la inmovilización directa usando GLUT.

Los productos PH resultaron altamente polidispersos en términos de la forma y tamaño de las partículas, por lo que no se consideraron adecuados para evaluar el efecto de esas características del soporte en la actividad de los biocatalizadores.

Las partículas preparadas con PEG o SDS resultaron muy similares en cuanto a su morfología. Como uno de los propósitos de esta tesis es obtener un biocatalizador activo cuya preparación a mayor escala sea económicamente viable, se seleccionó MAG(SDS) por ser el estabilizante SDS un material disponible localmente y de menor costo que PEG.

3.3. Resultados

3.3.1. SEM-EDX

En las Figuras 3.3 a 3.6 se muestran las micrografías SEM de las magnetitas coprecipitadas en presencia de distintos modificantes. En los casos donde la incorporación de la fase orgánica no pudo confirmarse por otra técnica, se analizaron también por EDX con el objeto de detectar la presencia de elementos provenientes de los estabilizantes. Además, el equipamiento utilizado es de una magnificación relativamente baja, por lo tanto la técnica SEM por sí sola no brinda información detallada sobre la morfología de las nanopartículas obtenidas.

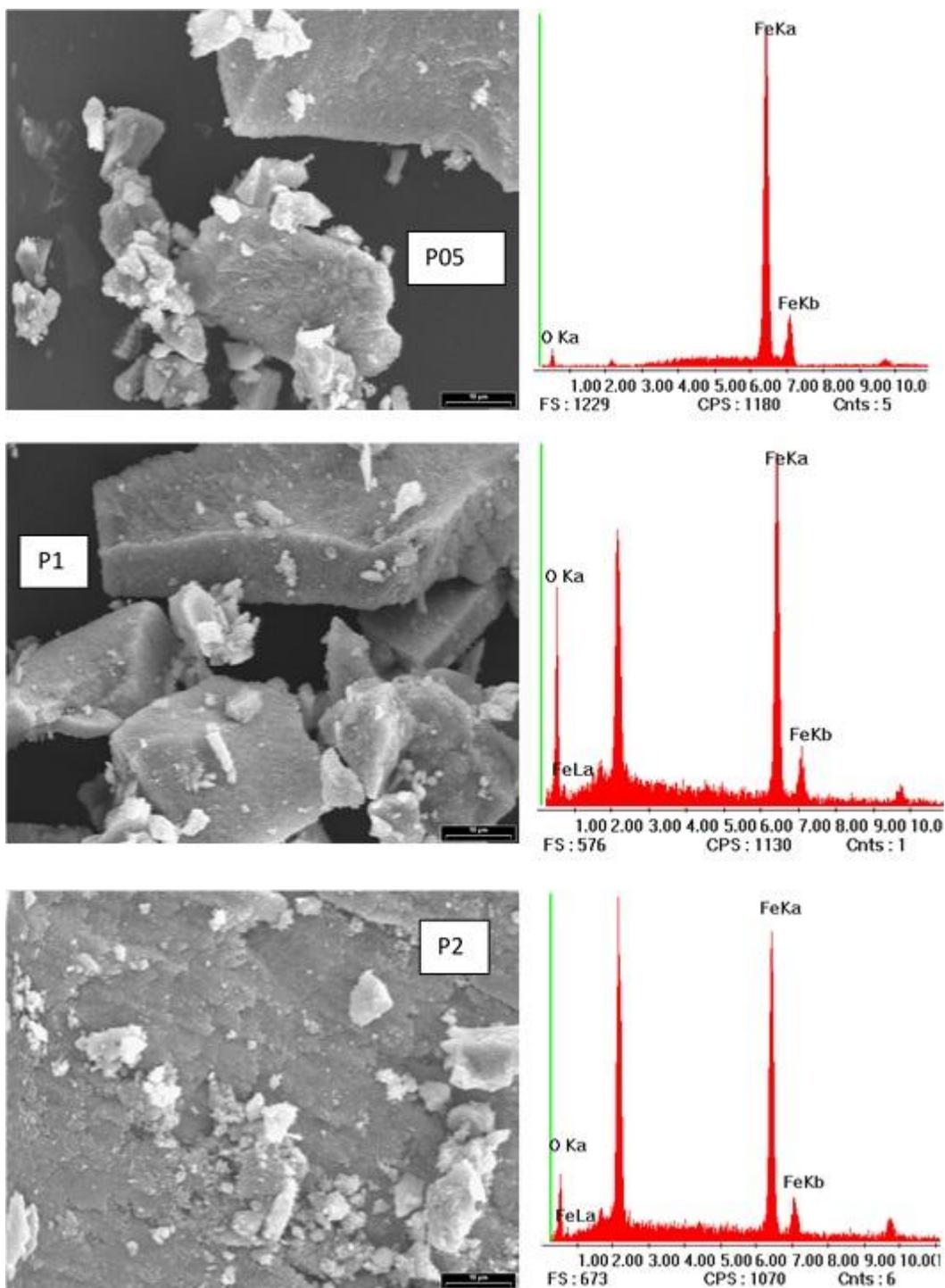


Figura 3.3. SEM-EDX de las muestras P. Escala = 10 μm .

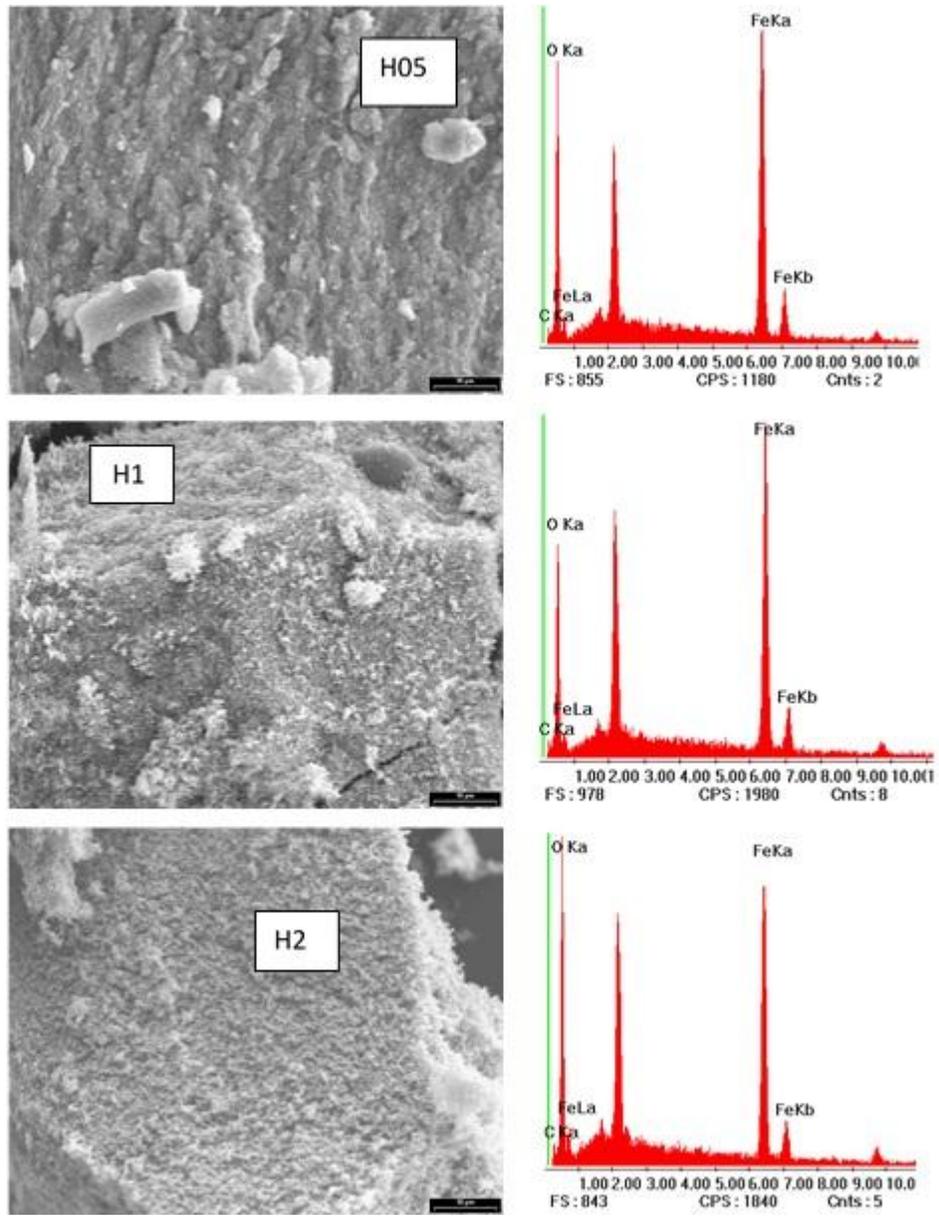


Figura 3.4. SEM-EDX de muestras H. Escala = 10 μm .

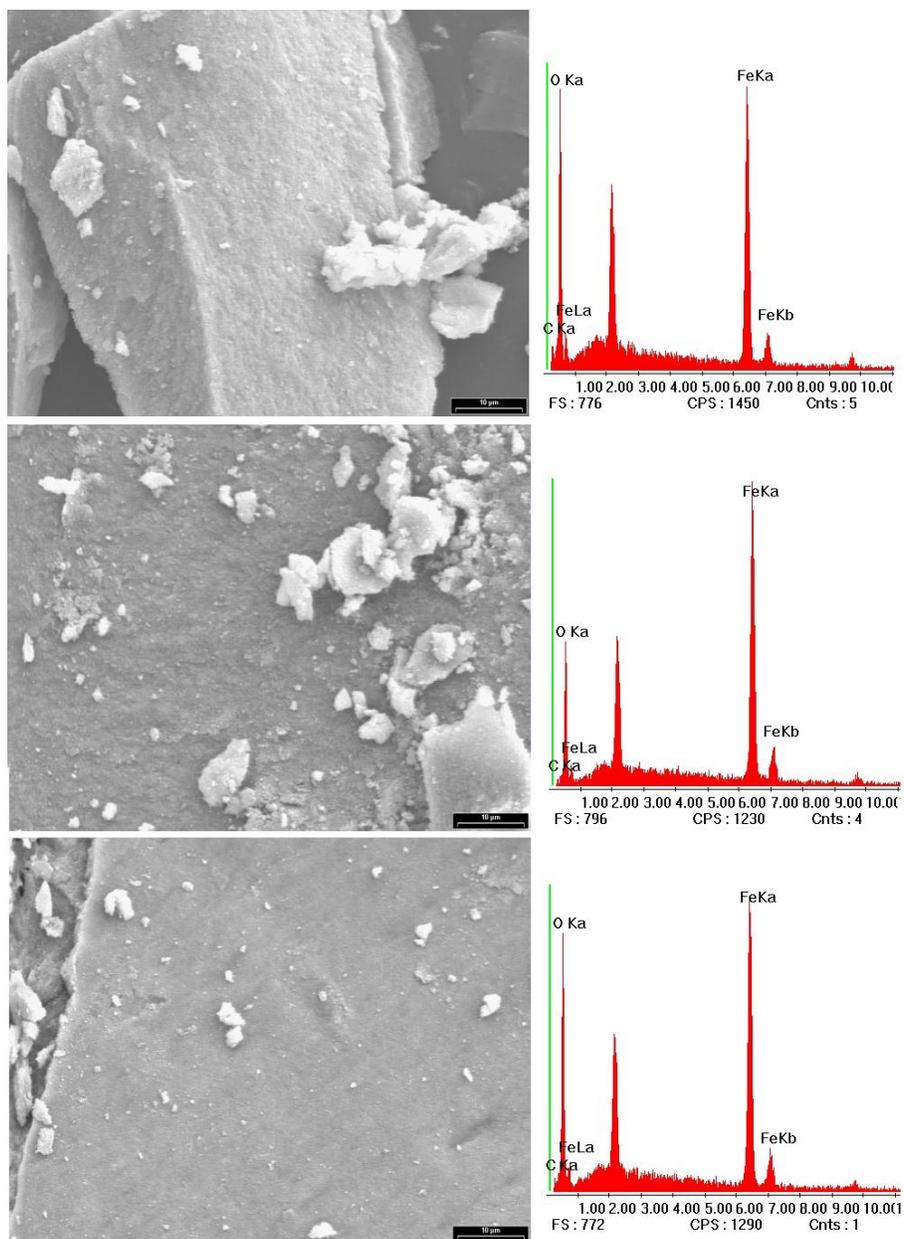


Figura 3.5. SEM-EDX de muestras PH. Escala = 10 µm.

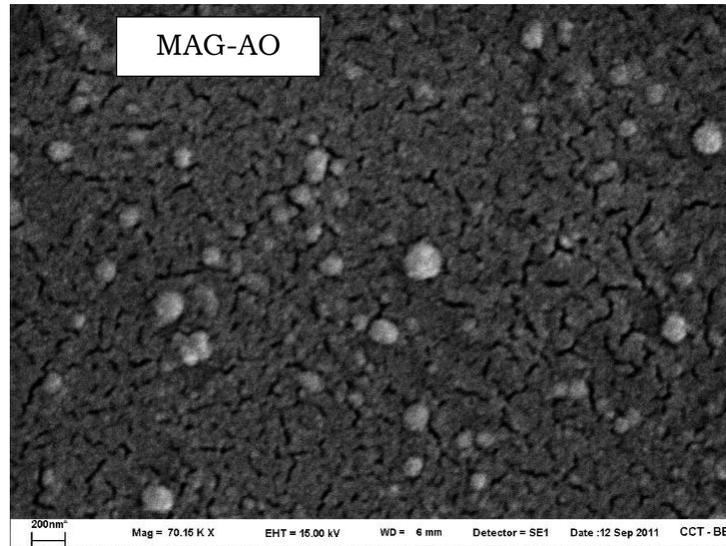


Figura 3.6. SEM de MAG-AO. Escala = 200 nm.

3.3.2. TEM

A continuación se muestran a las imágenes capturadas por TEM de las partículas de MAG coprecipitadas en presencia de los distintos modificantes. La escala indicada en el extremo inferior izquierdo de cada micrografía representa 20 nm, excepto donde se indique otro valor.

Las partículas de MAG-AO presentan forma esférica con diámetros de 10 a 20 nm. Una micrografía de una partícula aislada (Figura 3.7) permitió distinguir el núcleo magnético de la capa de estabilizante, de unos 2 nm de espesor.

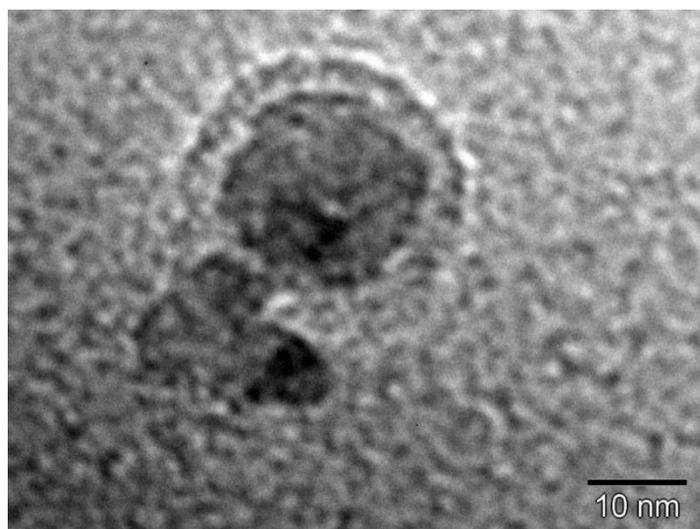


Figura 3.7. TEM de MAG-AO

La Figura 3.8 corresponde a las muestras H. Utilizando bajas concentraciones de HMTA se obtuvieron esferas polidispersas (15 a 55 nm), mientras que una mayor proporción respecto de MAG originó octaedros de hasta 200 nm de eje y 100 nm de arista. Las diferentes proyecciones de este cuerpo geométrico en el plano se observan en algunos casos como paralelogramos (ver Figura 3.9). En H1 coexisten octaedros definidos con aglomeraciones de esferas más pequeñas.

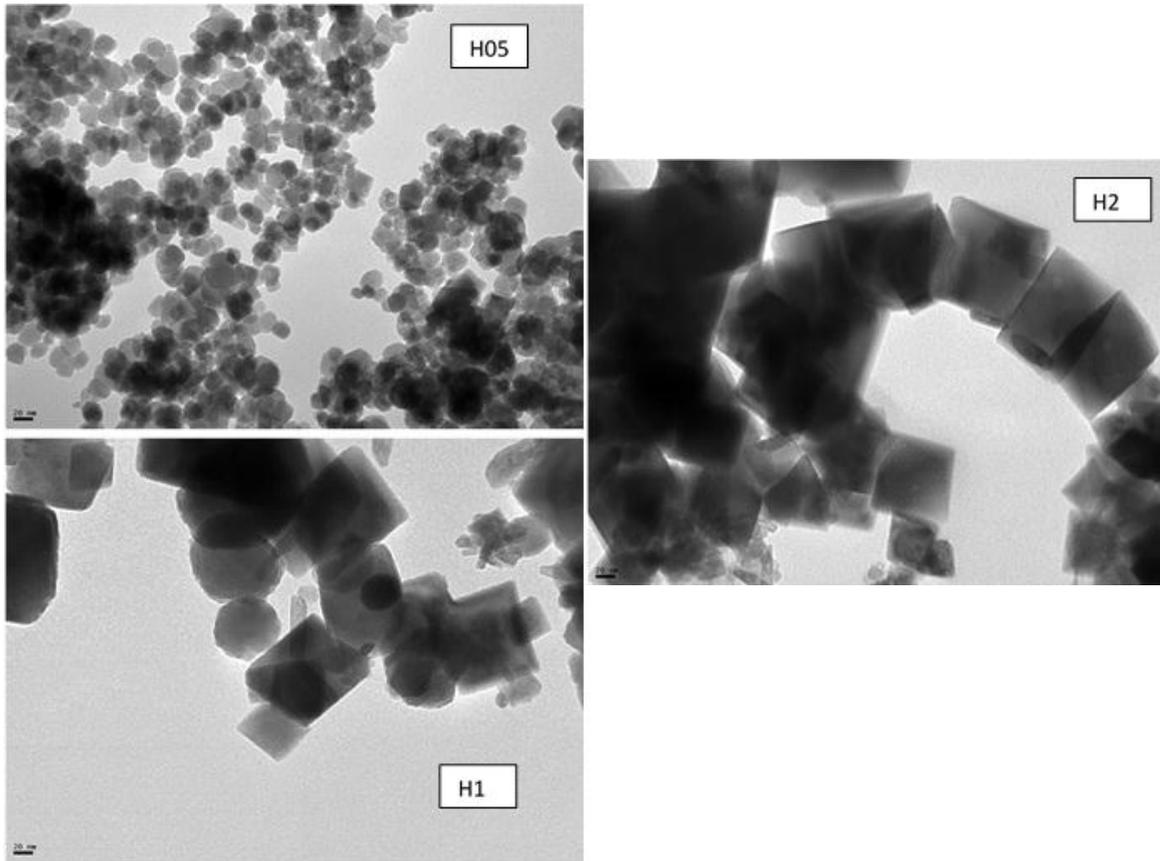


Figura 3.8. TEM de muestras H. Escala = 20 nm.

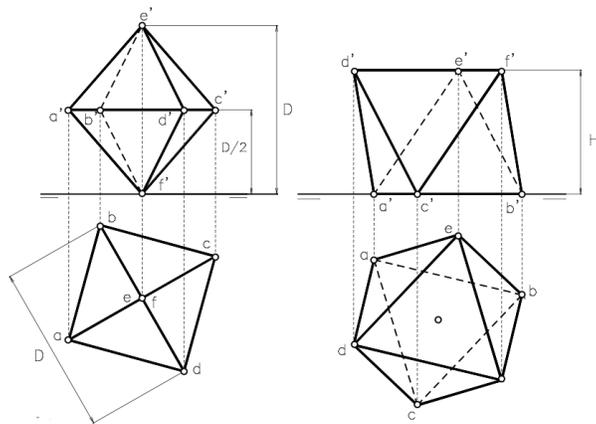


Figura 3.9. Proyecciones en el plano de un octaedro.

El empleo de PEG condujo a la formación de partículas sin forma definida, con tamaños variables de entre 5 y 30 nm, como se observa en la Figura 3.10. Las de menor tamaño se encontraron en P2.

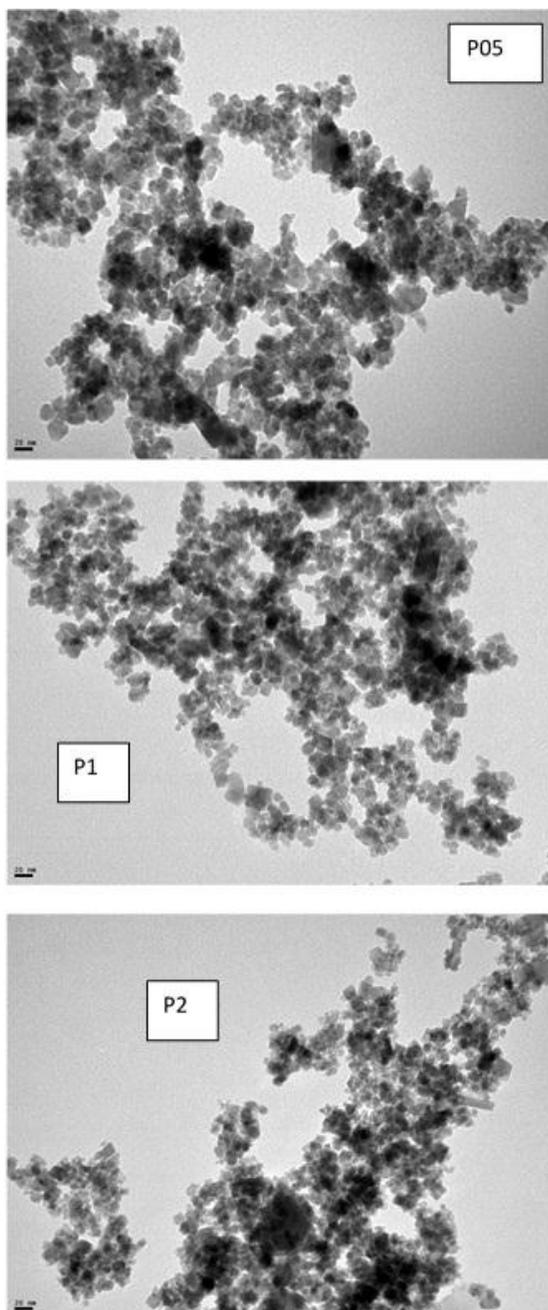


Figura 3.10. TEM de muestras P. Escala = 20 nm

La combinación de PEG y HMTA (Figura 3.11) generó partículas cuyas formas resultaron ser una combinación de octaedros y esferas de mayor tamaño (100-200 nm), además de bastones de 150 nm de largo y 10 de ancho.

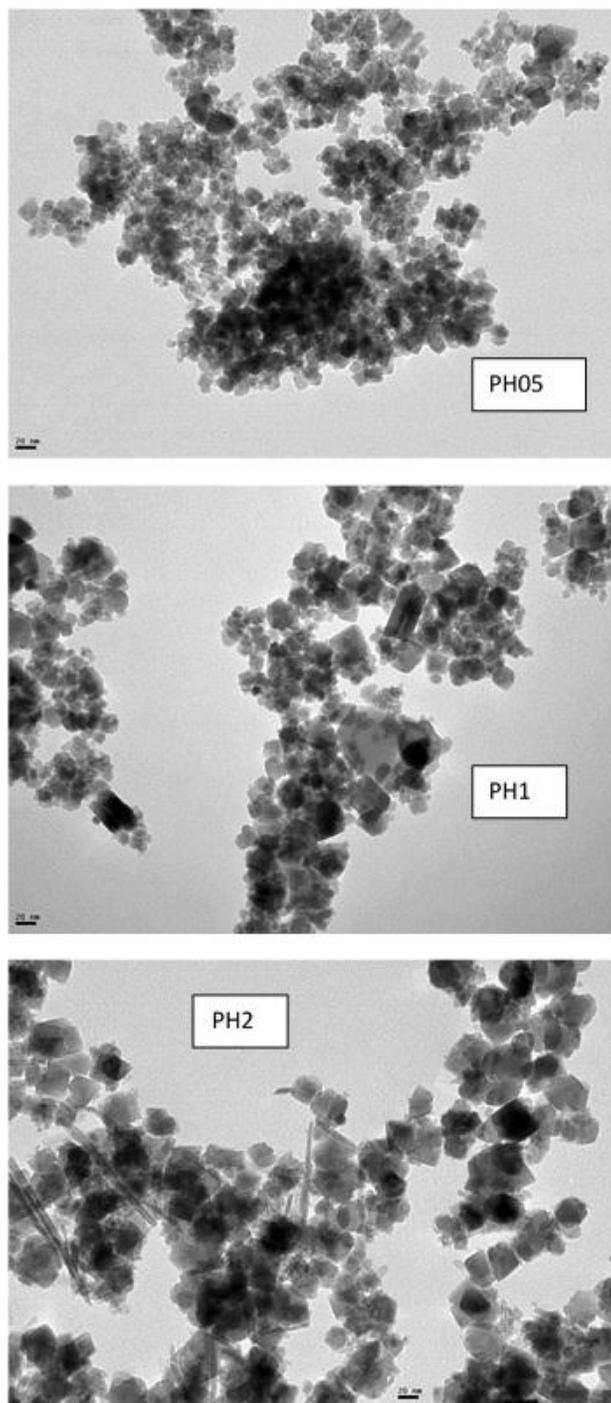


Figura 3.11. TEM de muestras PH. Escala = 20 nm

La muestra P2I (Figura 3.12) no resultó significativamente diferente a P2.

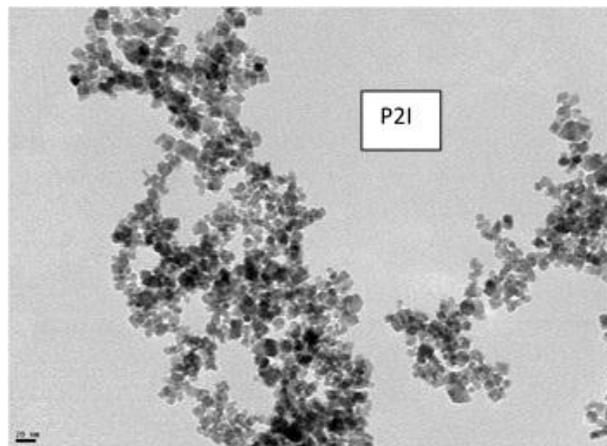


Figura 3.12. TEM de la muestra P2I. Escala = 20 n

El producto MAG(SDS) (Figura 3.13) se compone mayormente de esferas irregulares de tamaños variables entre 8 y 16 nm. También se observan bastones de 4 nm de ancho y largos variables hasta 60 nm.

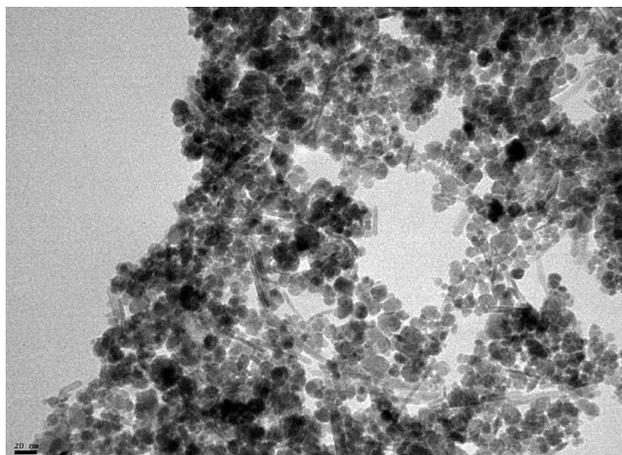


Figura 3.13. TEM de la muestra MAG(SDS). Escala = 20 nm.

3.3.3. DLS y electroforesis.

La Tabla 3.2 detalla los valores de D_h y ζ_{pot} registrados para las diferentes partículas de MAG en dispersión acuosa, así como los de las muestras H en otros solventes. Estos resultados se comentarán luego en la sección de discusión.

Tabla 3.2. Dh y ζpot de las magnetitas coprecipitadas en presencia de estabilizantes.

Muestra	Dh (nm)	IPD	Zpot (mV)
MAG	66,1 100%	0,376	-8,48
P05	190,4 100%	0,384	-2,5
P1	90,05 99,5%	0,868	-1,05
	589,5 0,5%		
P2	92,12 100%	0,398	+0,91
H05	141,9 100%	0,428	+4,0
PH0,5	906,1	0,655	+7,12
PH1	175,8 99,9%	0,446	*
	5 μm 0,1%		
PH2	441,8 100%	1,00	*
H2 heptano	615,4 100%	0,417	-
H1 heptano	727,7 100%	0,129	-
H05 heptano	827,6 100%	1,0	-
H05 acetona	158,4 100%	0,111	-
H1 acetona	803,8 100%	0,746	-
H2 acetona	650,6 100%	0,774	-
MAG(SDS) lavada con agua	478	0,290	-19,9
MAG(SDS) lavada con heptano	952	0,253	+1,02
MAG-AO en agua	689	0,263	-20,8
MAG-AO en acetona	302	0,247	-
	820 (73%)		
MAG(SDS)-LIS	133 (12%)	0,495	+17,2
	>4000 (15%)		
	714		
MAG-AO-QUIT	714	0,369	+25,7
DC	168,3	0,243	+35,6

*La media no cumplió con el estándar de calidad del equipo

3.3.4. DRIFTS

Cuando se analizaron las muestras P, H y PH por DRIFTS los espectros obtenidos no mostraron bandas atribuibles a los estabilizantes utilizados, lo cual se interpretó inicialmente como una ausencia total de una fase orgánica. Es decir, se había obtenido una MAG prácticamente pura. Sin embargo, las distintas formulaciones presentaron comportamientos muy dispares en cuanto a su hidrofiliicidad. Los resultados más representativos pueden apreciarse en la Figura 3.14.

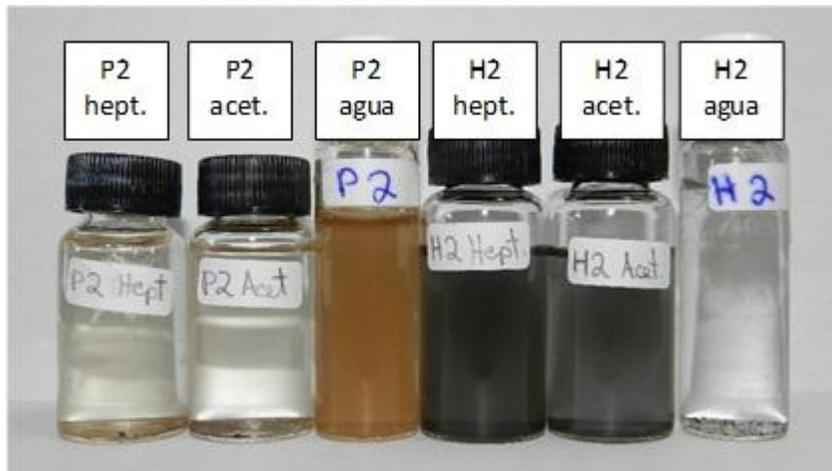


Figura 3.14. Fotografía de dispersiones de muestras seleccionadas en solventes de distinta polaridad.

Las muestras con mayor proporción de estabilizante (H2, P2 y PH2) fueron analizadas por la tradicional técnica de espectroscopia FTIR por transmisión usando pastillas de KBr. Si bien resultaron intensamente opacas, la transmitancia fue suficiente como para detectar señales de los grupos funcionales de los modificantes. Los mismos se indican en las Figuras 3.15-3.17.

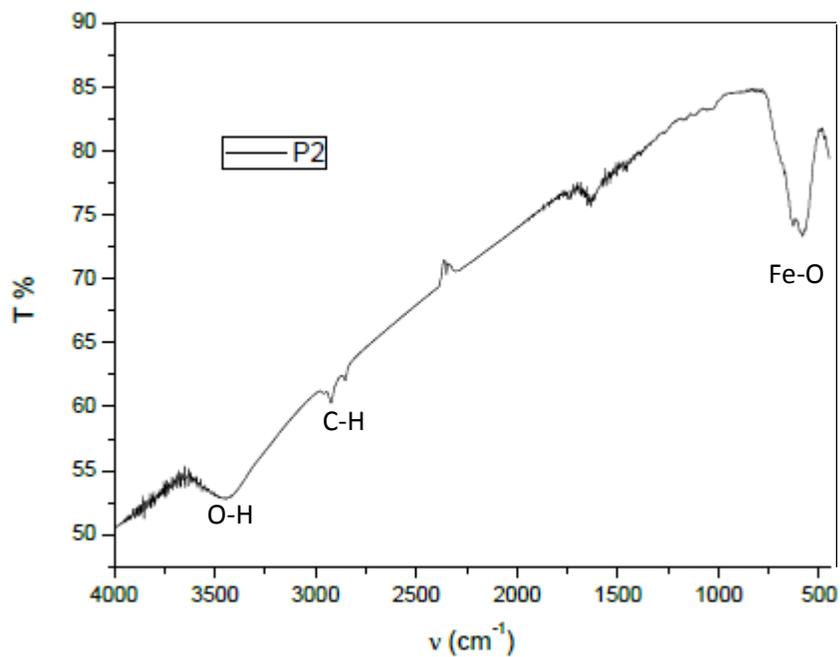


Figura 3.15. Espectro IR de transmisión de P2

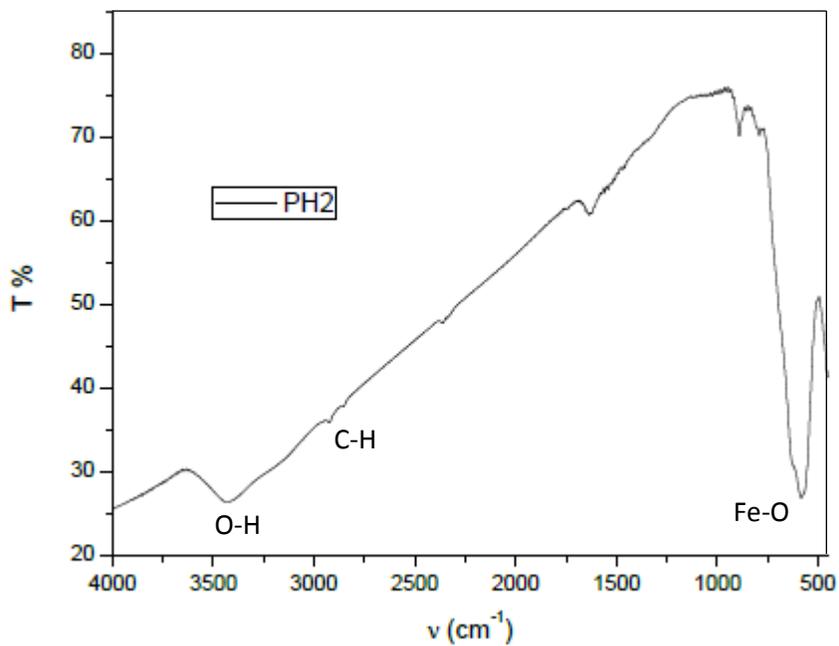


Figura 3.16. Espectro IR de transmisión de PH2

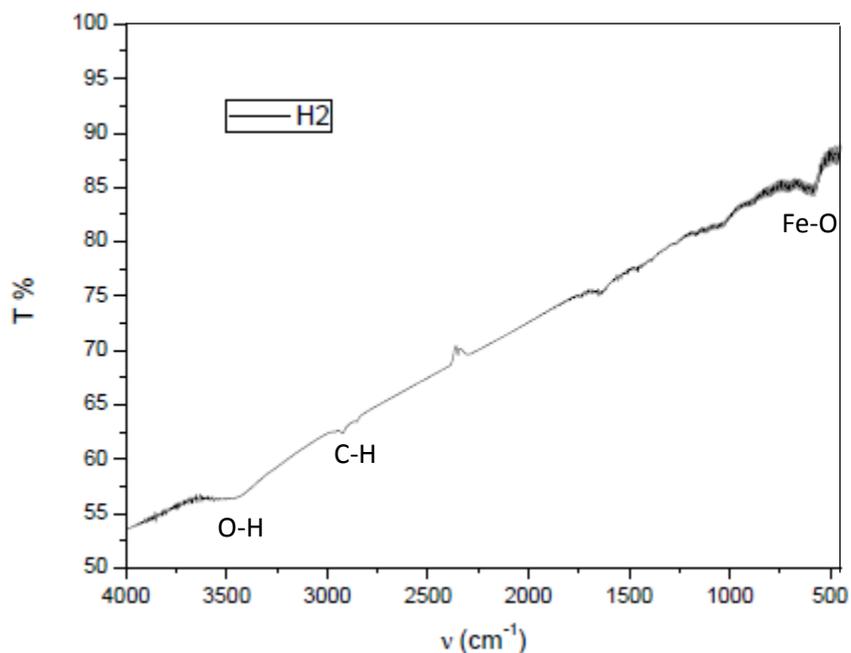


Figura 3.17. Espectro IR de transmisión de H2

Para todas las muestras se observan las señales correspondientes a grupos metileno aproximadamente a 2800-2850 cm^{-1} , aunque con muy poca intensidad. El enlace O-H proveniente tanto de los grupos terminales de PEG como de la propia MAG se detecta mediante la banda ubicada en 3400 cm^{-1} . Esta señal es mucho menos evidente en H2.

El espectro de P2 (Fig. 3.15) exhibe la banda característica de MAG a 583 cm^{-1} , y otra a 630 cm^{-1} atribuible a la presencia de maghemita [45]. La dispersión acuosa de P2 (ver Fig. 3.14) tiene un color amarronado que constituye otra evidencia del contenido de una mezcla de ambos óxidos de hierro. La oxidación parcial del Fe^{2+} en contacto con el aire es una posible causa de la formación de esta variante del óxido de hierro [46,47].

Las muestras MAG-AO y MAG(SDS) se analizaron con DRIFTS.

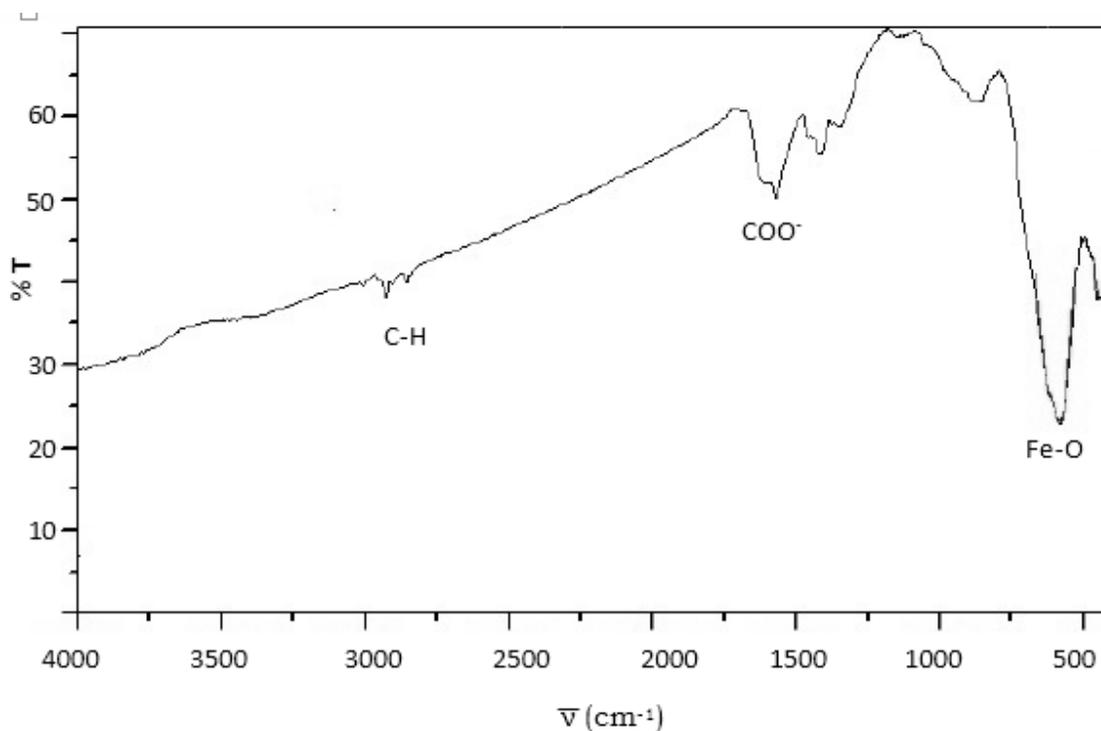


Figura 3.18. Espectro DRIFTS de MAG-AO

MAG-AO (Figura 3.18) presentó la banda de carbonilo (C=O) aproximadamente en 1710 cm^{-1} desdoblada en las dos bandas de estiramiento simétrico y asimétrico del carboxilato $-\text{COO}^-$, representativa de la capa de AO adsorbida a MAG [48]. También se observa la señal a 3400 cm^{-1} atribuible al O-H superficial de MAG. El agua adsorbida en la superficie de MAG se pone de manifiesto a partir de bandas a 3400 cm^{-1} y alrededor de 1620 cm^{-1} .

En MAG(SDS) lavada con heptano y etanol (Figura 3.19) se evidencian bandas asociadas con el estiramiento del enlace O-H aproximadamente a 3400 y 1700 cm^{-1} . Los mismos provienen de la superficie del óxido. Estas mismas señales se solapan con las correspondientes a los grupos funcionales de la lisina (C=O y N-H) en MAG(SDS)-LIS (Figura 3.20).

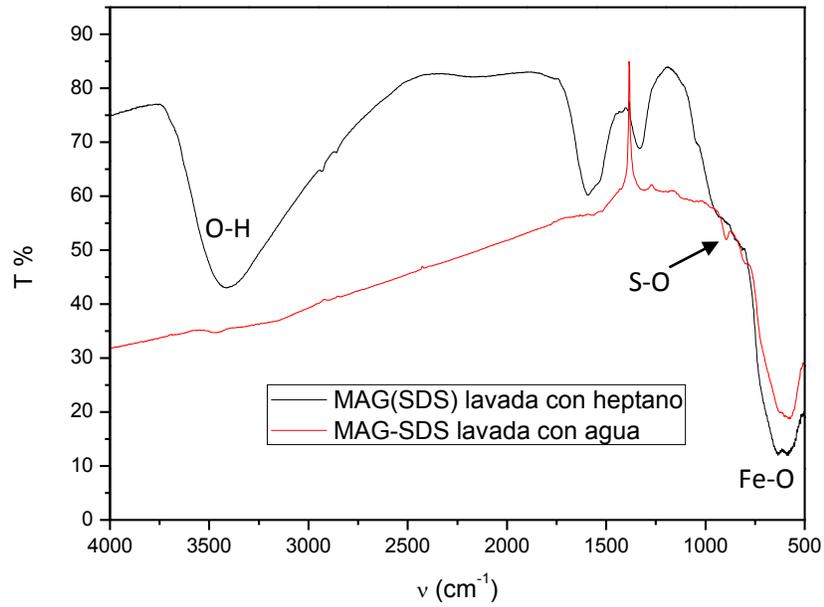


Figura 3.19. Espectros de MAG(SDS) lavada con agua o con heptano y etanol.

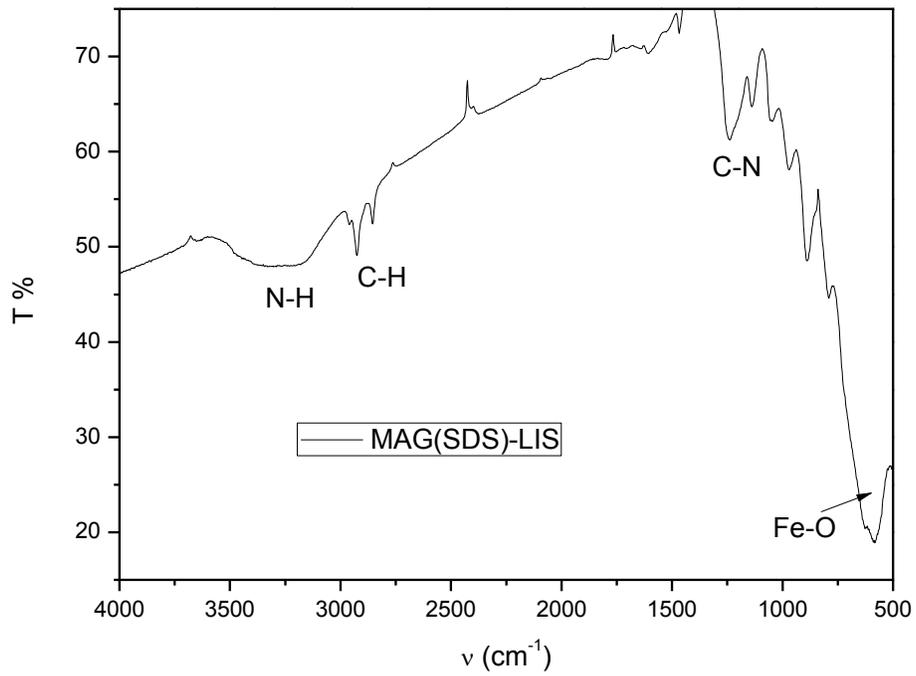


Figura 3.20. Espectro IR de MAG(SDS)-LIS

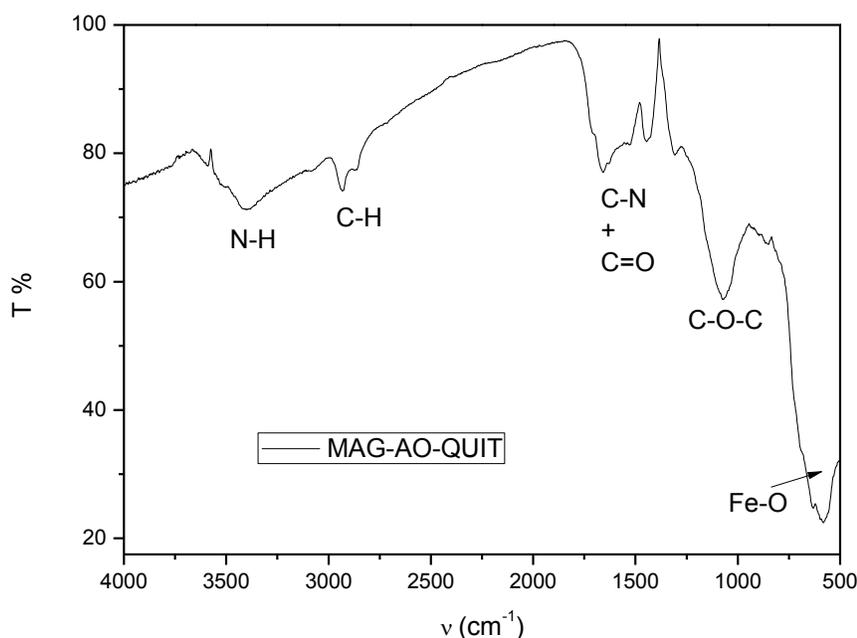


Figura 3.21. Espectro IR de MAG-AO-QUIT

En MAG-AO-QUIT, (Fig. 3.21) se observa la banda de N-H a unos 3400 cm^{-1} , C-N a 1600 solapada con la de AO (COO^-). También se aprecia a 1100 cm^{-1} la señal correspondiente a C-O del QUIT.

3.4. Discusión

3.4.1. Efecto de PEG como estabilizante

3.4.1.1. Tamaño y forma

La microscopía de transmisión permitió observar que el PEG conduce a la formación de partículas de forma irregular a esférica, con tamaños que disminuyen visiblemente a mayor concentración del modificante: mientras P05 contiene partículas que van desde los 10 a 30 nm, P2 se compone de partículas de entre 5 a 15 nm

Los Dh de P1 y P2 fueron significativamente menores que P05 (90 vs. 190 nm), indicando que la formulación con menor proporción de PEG presenta una tendencia a la agregación más marcada en medio acuoso.

Algunos autores justifican la incorporación de PEG mediante la formación de partículas constituidas por el núcleo magnético y una capa de estabilizante. Esta capa estaría físicamente adsorbida a través de los grupos OH terminales de PEG sobre la superficie del óxido [49]. Sin embargo, cuando el peso molecular del polímero es muy elevado como en este caso, la concentración de grupos oxhidrilos es muy baja, ya que sólo se encuentran en los extremos de las cadenas. Por lo tanto, la probabilidad de interacción PEG-MAG a través de este mecanismo es muy baja. El uso de PEG de peso molecular más bajo demostró ser una estrategia útil para aumentar la cobertura del núcleo magnético, aunque resulta en un tamaño de partícula mayor [49].

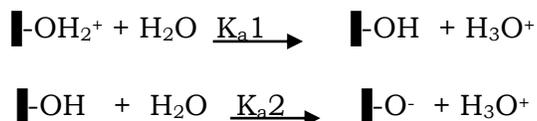
Teniendo en cuenta que el tamaño de partícula se vio afectado por la concentración de PEG pero la interacción PEG-OH/MAG fue mínima, podemos inferir que el efecto de este estabilizante es más estérico que químico cuando su peso molecular es alto. La razón es que el aumento de viscosidad de la solución provocado por el polímero restringe la migración de los iones voluminosos de hierro hidratados (iones complejos) desde el seno de la solución hasta la superficie de un núcleo en formación, limitando el crecimiento de los cristales de MAG. Esta inhibición es proporcional a la concentración y al peso molecular del PEG agregado al medio de reacción [50].

Savić y col. también prepararon MAG en presencia de PEG (400 y 20000) y no encontraron diferencias en los espectros IR con MAG pura, atribuyendo este resultado a que los lavados con agua eliminan por completo al polímero [51].

3.4.1.2. Estabilidad en suspensión

La facilidad con la que estas partículas P05-P2 se dispersan en agua se deriva de la capacidad de la MAG para recubrirse de oxhidrilos, tal como se describió en el capítulo I sección 1.5.

Según el pH del medio acuoso en que se dispersen las partículas de MAG, las mismas puede estar positivamente (o negativamente) cargadas, de acuerdo a las reacciones [52]:



En este modelo, las partículas actúan como un ácido diprótico, llevando a tres posibles sitios reactivos. A pH muy bajos, la mayoría de los sitios estarán en la forma $\blacksquare\text{-OH}_2^+$; $\blacksquare\text{-O}^-$ en medio fuertemente básicos, y $\blacksquare\text{-OH}$ (grupos intermediarios anfóteros) cerca del punto isoeléctrico del óxido. A 25 °C, este valor se encuentra entre pH = 6,1 y 6,9, dependiendo de la técnica utilizada para medirlo [53]. Cuantitativamente, cuando pH = pKa1, OH_2^+ y OH son equimolares. Si pH = pKa2, la concentración de -OH iguala a la de -O⁻.

Por lo tanto, las partículas pueden rodearse de moléculas de agua reteniéndolas físicamente por puentes de hidrógeno. Estudios teóricos han demostrado que el agua también interacciona exotérmicamente a través de su oxígeno con los átomos de hierro de la MAG [54].

3.4.2. Efecto de HMTA como estabilizante

3.4.2.1. Tamaño y forma de las partículas

La gran diferencia en el tamaño y forma de las partículas de MAG sintetizadas en presencia de HMTA sugiere una alteración del mecanismo de formación respecto de MAG pura o con PEG.

Cuando la solución de sales de hierro fue calentada a 70 °C y se le agregó la amina, se formó un precipitado naranja-rojizo. El mismo no presentaba magnetismo. El espectro DRIFTS de este intermediario (Figura 3.22) muestra una banda muy intensa característica de O-H aproximadamente a 3250 cm⁻¹. Por la apariencia del sólido, puede proponerse que se trata de hidróxido férrico, Fe(OH)₃.

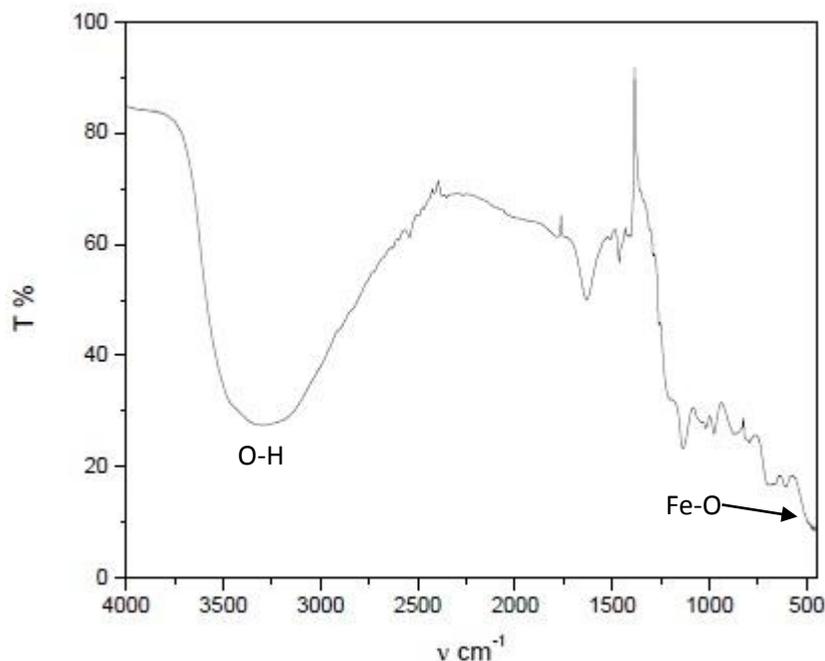
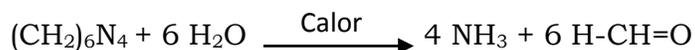


Figura 3.22. Espectro de compuesto intermedio en la coprecipitación de MAG con HMTA.

La aparición de este hidróxido se debe a la leve alcalinización del medio por la descomposición térmica de HMTA liberando amoníaco y formaldehído [18,21]:

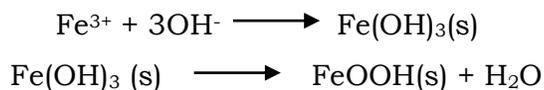


Esta reacción también puede llevarse a cabo mediante irradiación de la HMTA acuosa con microondas o ultrasonido [20].

El amoníaco reacciona con el agua, aumentando la concentración de iones OH^- :



La basicidad proporcionada por la descomposición de HMTA es suficiente para que precipite el hidróxido férrico, y luego la reacción continúa con el mecanismo ya descrito en el Capítulo I [21]:





La forma de los cristales está mayormente determinada por la velocidad relativa de crecimiento a lo largo de las direcciones xyz. Las partículas con tamaños nano a micrométricos suelen tener formas definidas porque se trata de monocristales confinados entre los planos cristalográficos de menor energía [55]. Para la MAG este plano es el (111) [56].

Numerosas publicaciones reportan la formación de poliedros de MAG por diferentes vías.

Hu y col. sintetizaron MAG octaédrica de 1 micra de arista por el método hidrotermal, tomando muestras a diferentes tiempos de reacción. A las 6 horas observaron pequeñas partículas fundidas formando placas con bordes irregulares. Luego de 14 horas muchas de estas placas ya tenían forma triangular y comenzaban a crecer en espesor. Con 23 horas las placas se observaron encimadas unas sobre otras formando estructuras escalonadas. Finalmente, a las 29 horas podían distinguirse octaedros con caras porosas y muy pocas placas libres. Terminaron la reacción a las 50 horas, donde la superficie de los octaedros se percibe totalmente plana y compacta. Los autores concluyeron que el fenómeno de crecimiento se correspondía con el proceso Ostwald [2].

Una evolución de forma muy similar a ésta (nanoesferas, placas, poliedros) se obtuvo a partir de la descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en medio orgánico con surfactantes, pero llegando a cristales de no más de 25 nm. Los autores observaron las formas por TEM e interpretaron que las partículas eran esferas, cubos, tetraedros o tetraedros truncados [57].

Chen y col. utilizaron diamina (N_2H_4) como aditivo en la descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ variando la concentración de N_2H_4 y la temperatura, (120-160 °C). Para una T fija (160 °C), el aumento de la molaridad de N_2H_4 resultó en la evolución de la forma de MAG. Obtuvieron desde sólo bastones, pasando por una mezcla de bastones y discos, hasta dodecaedros rómbicos de unos 300 nm de diámetro. Si la diamina se reemplazaba por amoníaco, sólo resultaban

nanoesferas irregulares (<20 nm). Los autores explicaron este fenómeno a través de la siguiente hipótesis: a una alta concentración de amina la energía superficial del plano (111) es la más alta entre los planos de bajo índice. Moléculas de N_2H_4 o iones amonio son selectivamente adsorbidos en ese plano y consecuentemente la velocidad de crecimiento en esa dirección se reduce. El resultado son los nanodiscos. Con una cantidad moderada de diamina, la energía del plano 110 es la más alta, llevando a la formación de los dodecaedros de caras rómbicas correspondientes a ese plano. A baja concentración de N_2H_4 la energía del plano (111) es la menor, por lo que la adsorción de moléculas e iones se da en otros planos de bajo índice llevando a la formación de bastones [58].

Por su lado, Penn propuso que la agregación orientada de nanopartículas es responsable de la formación de cristales con formas definidas [59]. Este proceso puede relacionarse con la superposición de placas observada por Hu y Chen.

Singh y col. realizaron un exhaustivo estudio de la precipitación de MAG a partir de $FeCl_3$ con $FeSO_4$ o $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ (sal de Mohr). Las condiciones de reacción fueron 150-170 °C por tres horas y alta presión (3,45 bar). Agregaron en distintos batches del medio de reacción HMTA, NaOH, NH_3 , formaldehído o combinaciones de ellos. Cuando la hexamina fue el único aditivo y la sal de Mohr fue la fuente de Fe(II), se formaron cristales con forma de bastón. Al cambiar HMTA por NaOH obtuvieron poliedros que se aprecian por TEM como paralelogramos. Los autores los identificaron (quizá erróneamente) como cubos. Concluyeron que la lenta descomposición de la hexamina a alta temperatura con la concomitante elevación del pH es un factor clave en el crecimiento anisotrópico de MAG, ya que el uso de formaldehído+NaOH o amoníaco como únicos aditivos no llevaron a la formación de poliedros [21].

En la preparación de las muestras H05, H1 y H2, el aumento de la concentración de HMTA favoreció la cristalización de octaedros probablemente gracias a un incremento de la velocidad de descomposición de la hexamina que acelera el crecimiento de las partículas en la dirección de los planos 111.

En síntesis: la HMTA no actúa sólo como estabilizante, sino también como fuente de amoníaco. Al no haber ninguna otra sustancia que se adsorba sobre MAG, que obstruya la difusión de iones hacia la superficie, u obstaculice la coalescencia, las partículas pueden agregarse con la orientación específica de MAG, hasta formar el cristal octaédrico limitado por los planos (111).

3.4.2.2. Estabilidad en suspensión

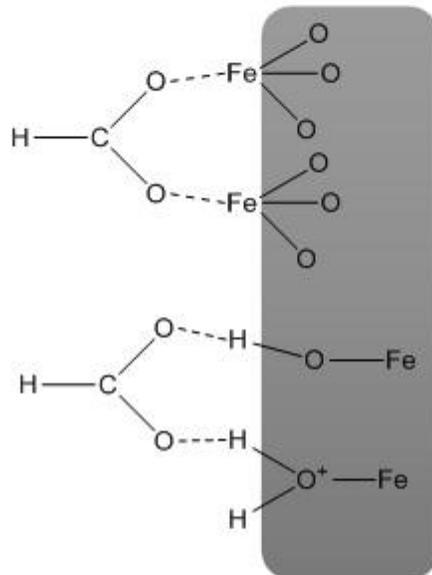
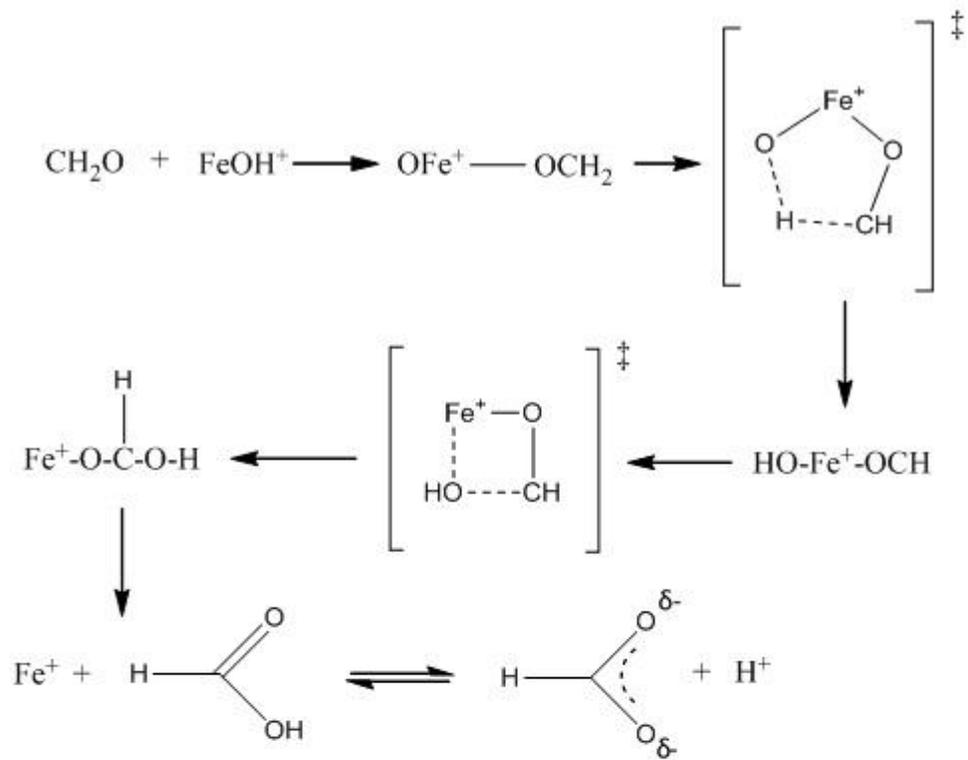
Como se mencionó en la sección 3.3.1.4, las muestras H1 y H2 resultaron hidrofóbicas.

En general, los métodos hidrotermales rinden partículas de MAG hidrofóbicas y altamente cristalinas como consecuencia del uso de surfactantes orgánicos y la alta temperatura. En cambio los procesos de coprecipitación suelen resultar en partículas hidrofílicas [60].

El formaldehído proveniente de la descomposición de HMTA puede oxidarse sobre el óxido de hierro, formando ácido fórmico [61]. Este compuesto es capaz de adsorberse sobre la superficie de la MAG a través del grupo carboxilato exponiendo el grupo -CH, lo cual dota de carácter hidrofóbico al sólido obtenido. Esto explica la gran estabilidad de la suspensión de H2 en heptano y la imposibilidad de dispersarla en agua. El mecanismo del proceso de oxidación- (según [61]) y adsorción se representa el Esquema 3.4.

Las imágenes SEM de las muestras H (Figura 3.4) muestran una disminución en la rugosidad de la superficie de MAG con el aumento de concentración de HMTA. Esto puede interpretarse como un recubrimiento más compacto con mayor cantidad de aniones por nm^2 : HCOO^- en $\text{H2} > \text{H1} > \text{H05}$.

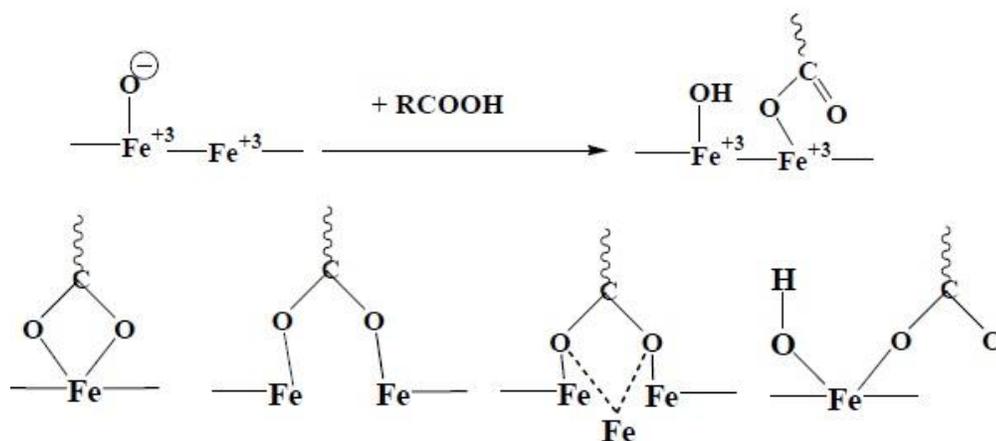
Las medidas de D_h de las muestras H realizadas en acetona (ver tabla 3.2) sugieren una importante agregación para H1 y H2. H05 en cambio pudo dispersarse con igual facilidad en agua y acetona, no así en heptano. Estos resultados están en concordancia con el modelo de adsorción de formiato expuesto anteriormente.



Esquema 3.4. Mecanismo de oxidación de formaldehído sobre óxido de hierro y representación de la adsorción del anión formiato sobre la superficie de MAG.

3.4.3. Efecto de AO

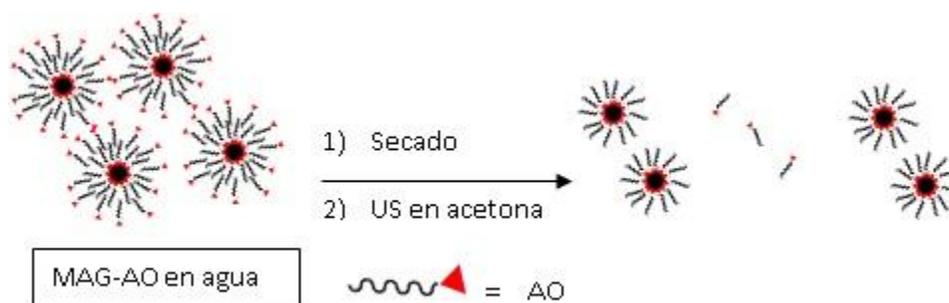
El mecanismo a través del cual se estabilizan las partículas empleando AO se conoce como estabilización estérica. El fundamento es que el volumen hidrodinámico del estabilizante en solución impide que, poco tiempo después de comenzada la nucleación, el crecimiento de los cristales continúe. Por lo tanto las partículas resultan muy pequeñas (<20 nm). La forma esférica minimiza la relación superficie/volumen, disminuyendo la energía superficial del sistema. Este tipo de mecanismo se da cuando se emplean estabilizantes voluminosos como los ácidos grasos de cadenas alquílicas largas o polímeros de peso molecular elevado. Mediante este mecanismo el AO desplazaría a las moléculas de agua alojadas en la superficie del óxido e interactuaría a través del grupo COO- formando un compuesto de coordinación con el Fe de la MAG, tal como se muestra en el Esquema 3.5.



Esquema 3.5. Interacciones posibles entre AO y Fe superficial en MAG.

El potencial Zeta (ζ_{pot}) de MAG-AO fue mucho más negativo que el del óxido puro (-20,8 contra -8,48 mV respectivamente). Este resultado se justifica por la formación de una doble capa de AO: la primera enlazada según el esquema 3.5, y la segunda retenida a través de las colas alquílicas. Por lo tanto, los aniones -COO⁻ permanecen expuestos y estabilizan las partículas en agua. En acetona y con ayuda de ultrasonido, la segunda capa se desorbe y actúa de estabilizante.

Las partículas, ahora hidrofóbicas, forman agregados de menor tamaño: 689 nm en agua y 302 nm en acetona (Esquema 3.6).



Esquema 3.6. Desagregación de MAG-AO por sonicación en acetona.

3.4.4. Efecto de SDS

El mecanismo de estabilización de MAG(SDS) es muy similar al de AO. El anión dodecilsulfato puede actuar como una base de Lewis, adsorbiéndose a través de los grupos sulfatos sobre el hierro superficial del óxido. No obstante, las partículas de MAG(SDS), con la cantidad de estabilizante empleada, resultan de dos formas distintas: lo que por TEM se perciben como esferas irregulares (que bien podrían ser proyecciones de poliedros en el plano) y bastones. Éstos últimos corresponderían, según al estudio de Ahn y col., a goethita (α -FeOOH) intermediario en el mecanismo de coprecipitación [62]. En cambio, otros trabajos se reportan evidencias de la adsorción selectiva de SDS sobre planos determinados, dirigiendo el crecimiento de los cristales en direcciones específicas. Azcona y col. prepararon MAG coprecipitada en presencia SDS obteniendo tanto bastones como partículas irregulares mucho más pequeñas. El difractograma de rayos X registrado no mostró señales atribuibles a otra especie diferente a MAG [8].

El ζ pot es considerablemente más negativo que el de MAG pura (-8,48 mV), lo cual se atribuye a la formación de una doble capa de SDS. Esto hace que forme suspensiones estables en agua.

3.4.5. Aminación con quitosano

La efectiva incorporación de QUIT a MAG-AO se verificó mediante DRIFTS (Sección 3.3.1.4).

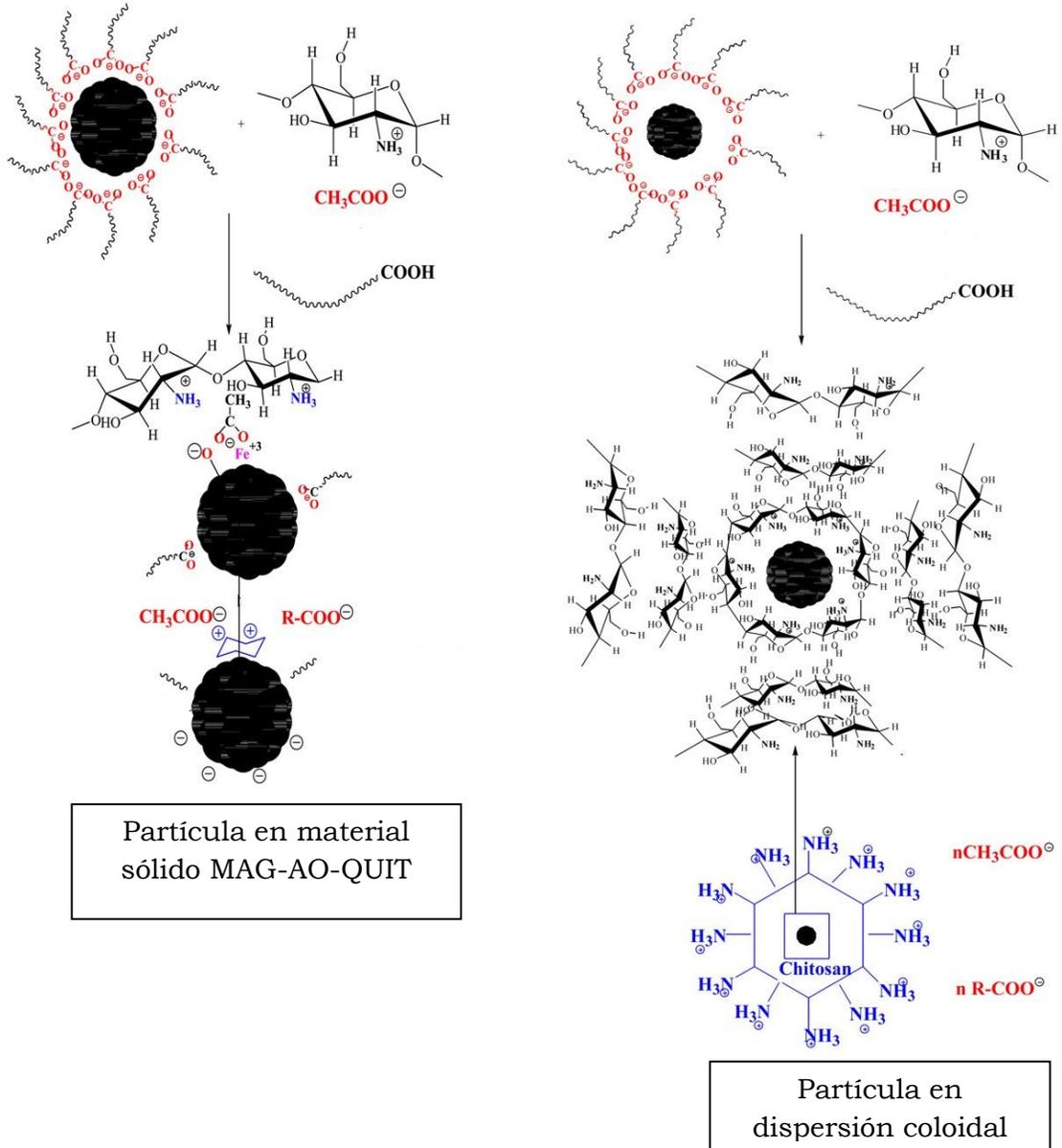
La proporción MAG/QUIT 2/1 se eligió por derivar en partículas que se pueden recuperar como sólido del medio de reacción con un rendimiento relativamente alto (50%). La incorporación de QUIT promueve la formación de suspensiones estables de partículas magnéticas que limitan su recuperación en estado sólido mediante las técnicas tradicionales (centrifugación, decantación magnética o filtración) [43]. El QUIT en solución acuosa de ácido acético se encuentra en forma catiónica, con los grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) y rodeado de aniones acetato (CH_3COO^-) como contraiones. Cuando esta solución entra en contacto con la suspensión de partículas MAG-AO en acetona, el polímero precipita por ser insoluble en ese solvente. Sin embargo, al ser polar, la fracción orgánica puede mantener al menos parte del QUIT protonado.

El ζ pot de las partículas de MAG-AO-QUIT resultó positivo (ver Tabla 3.2), lo cual denota la naturaleza catiónica del polímero. La medida de ζ pot (pH=3) del DC fue +35 mV. Tal magnitud provoca que la fuerza de repulsión electrostática supere a las fuerzas atractivas dipolo-dipolo magnético que induce a la agregación de las NPs y por lo tanto no puedan decantar.

La DC se sometió a evaporación total. El residuo sólido tomó la forma de un film frágil. El mismo fue analizado por emisión atómica-ICP para determinar el contenido de hierro, que resultó en 0,056 mg de Fe por mg de residuo sólido. Esto corresponde a un 7,6 % en peso de MAG. Por lo tanto, más del 90% del material disperso en la DC puede atribuirse a AO y QUIT.

Con respecto a MAG-AO-QUIT (recuperado como sólido), se registró un incremento tanto del tamaño como del PDI con respecto al material precursor MAG-AO. En este caso, la precipitación del polímero en acetona atrapó cúmulos de partículas de MAG-AO de gran tamaño. La determinación del contenido de hierro por emisión atómica-ICP resultó en un 73 % de MAG en el material sólido. El resto puede atribuirse a AO y QUIT.

El Esquema 3.7 ilustra los mecanismos de interacción de MAG-AO con QUIT.



Esquema 3.7. Mecanismos de interacción MAG-AO con QUIT

3.4.6. Aminación con lisina

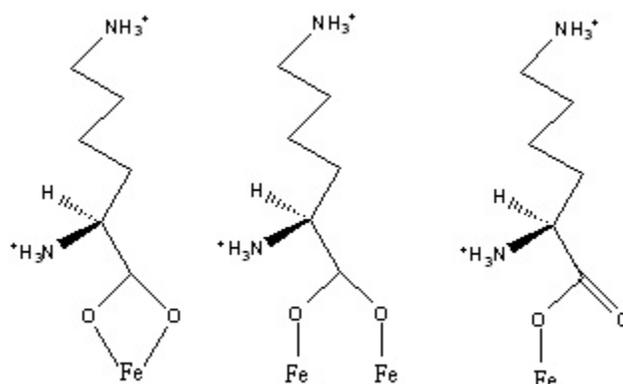
Al dispersar la MAG coprecipitada con SDS (lavada sólo con agua) en una solución de LIS, su espectro DRIFTS no presentó ninguna banda atribuible al aminoácido. Se argumentó entonces que la LIS no es capaz de desplazar al anión dodecilsulfato de la superficie del óxido. Para comprobar esta hipótesis, el sólido fue nuevamente lavado usando heptano y ultrasonido. Luego de decantar las partículas magnéticamente, el sobrenadante fue retirado y el residuo fue lavado con etanol. Se obtuvieron partículas de MAG con un ζ pot prácticamente cercano al punto de carga cero, lo cual es un indicador que la superficie contiene mayormente oxhidrilos -OH. En la figura 3.19 la banda intensa aproximadamente a 3400 cm^{-1} se atribuye a este grupo funcional. La agregación de estas partículas en agua se observó al medir el Dh, el cual fue mucho mayor a MAG con SDS.

El contacto de este nuevo producto MAG(SDS) con LIS acuosa derivó en MAG(SDS)-LIS, cuyo espectro IR permitió confirmar la presencia del de LIS.

En medios extremadamente ácidos, la especie predominante de LIS es la catiónica, con los tres grupos ionizables protonados. La repulsión electrostática con MAG (■-OH_2^+) impide la adsorción. Por otro lado, en medio decididamente alcalino, tanto MAG como LIS estarán negativamente cargadas, esto determinaría una escasa afinidad química entre y MAG y LIS [34].

En cambio, al pH del agua destilada (5,7) tanto el $\alpha\text{-NH}_2$ como el de la cadena lateral permanecen protonados de acuerdo al pKa de cada grupo ionizable de la LIS (ver esquema 3.2a). Por ende, la interacción más favorecida con la MAG será a través del grupo carboxilato. El ζ pot positivo de MAG(SDS)-LIS (tabla 3.2) se corresponde con el grupo amino protonado expuesto.

El espectro DRIFTS permitió confirmar la incorporación del aminoácido. Park y col. estudiaron la adsorción de LIS sobre MAG mediante FTIR. Identificaron bandas atribuibles a diferentes enlaces Fe-O, concluyendo que las interacciones son del tipo metal-ligando [63]. En el esquema 3.8 se representan las estructuras posibles.



Esquema 3.8. Estructura de LIS adsorbida sobre MAG

En cuanto al Dh, la adsorción de LIS no alteró significativamente el tamaño de los agregados en agua. Por TEM, en cambio se aprecia un incremento del tamaño de partícula respecto de MAG(SDS).

3.5. Conclusiones

Se sintetizaron nanopartículas de MAG por coprecipitación en presencia de estabilizantes de distinta naturaleza: PEG, HMTA, AO y SDS. Las partículas preparadas en presencia de PEG o AO resultaron esferas de 10 a 20 nm. SDS da lugar además a bastones. Todos estos materiales tiene la capacidad de dispersarse en agua. Se propone que la HMTA, en concentraciones altas, dirige el crecimiento de los cristales de MAG en la dirección preferencial de los planos (111) dando lugar a octaedros regulares. El ácido fórmico como subproducto de la descomposición de la amina se adsorbe sobre el óxido dándole carácter hidrofóbico. Por lo tanto, el control de la forma, tamaño e hidrofiliicidad de las partículas es posible a través de la elección adecuada del tipo y concentración de modificante agregado en el medio de reacción.

La funcionalización de las partículas MAG-AO con grupos amino fue posible mediante la precipitación de QUIT en acetona. Parte del producto MAG-AO-QUIT permanece como una suspensión estable en forma de dispersión

coloidal. La adsorción de LIS sobre MAG(SDS) se logró únicamente eliminando el estabilizante previamente.

Tanto las partículas modificadas con QUIT como LIS están positivamente cargadas gracias a la capacidad del grupo amino de protonarse al pH del agua destilada. Estos materiales sirven de soportes de partida para promover la inmovilización de enzimas gracia a su versatilidad química y propiedades magnéticas.

Parte de los resultados y conclusiones de este capítulo se incluyó en una publicación de una revista internacional con referato y se presentaron en reuniones científicas en formato póster:

- P. Nicolás, M. Saleta, H. Troiani, R. Zysler, V. Lassalle, M.L. Ferreira, Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: experimental and mechanistic issues, Acta Biomaterialia. 9 (2013) 4754–4762.

-Nanopartículas magnéticas: impacto de las condiciones experimentales de preparacion sobre sus propiedades finales. Paula Nicolás, Verónica Lassalle, María Luján Ferreira. Simposio Argentino de Polímeros, 15 al 18 de noviembre de 2011. Bahía Blaca, Argentina.

-Formulación de nanoparticulas de óxido de fe/polímeros: impacto de las condiciones de reacción sobre el tamaño. Paula Nicolás, Verónica Lassalle, Marcelo Avena, María Luján Ferreira. XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. 2 al 6 de mayo de 2011, Córdoba, Argentina

3.6. Referencias del capítulo III

- [1] N. Guan, C. Liu, D. Sun, J. Xu, A facile method to synthesize carboxyl-functionalized magnetic polystyrene nanospheres, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 335 (2009) 174–180.
- [2] C. Hu, Z. Gao, X. Yang, Fabrication and magnetic properties of Fe₃O₄ octahedra, *Chem. Phys. Lett.* 429 (2006) 513–517.
- [3] O.A. Attallah, E. Girgis, M.M.S.A. Abdel-Mottaleb, Synthesis of non-aggregated nicotinic acid coated magnetite nanorods via hydrothermal technique, *J. Magn. Magn. Mater.* 399 (2016) 58–63.
- [4] Z. Zhou, X. Zhu, D. Wu, Q. Chen, D. Huang, C. Sun, J. Xin, K. Ni, J. Gao, Anisotropic Shaped Iron Oxide Nanostructures: Controlled Synthesis and Proton Relaxation Shortening Effects, *Chem. Mater.* 27 (2015) 3505–3515.
- [5] M.M. Goswami, C. Dey, A. Bandyopadhyay, D. Sarkar, M. Ahir, Micelles driven magnetite (Fe₃O₄) hollow spheres and a study on AC magnetic properties for hyperthermia application, *J. Magn. Magn. Mater.* 417 (2016) 376–381.
- [6] W.-D. Zhang, H.-M. Xiao, L.-P. Zhu, S.-Y. Fu, Template-free solvothermal synthesis and magnetic properties of novel single-crystalline magnetite nanoplates, *J. Alloys Compd.* 477 (2009) 736–738.
- [7] J. Sato, M. Kobayashi, H. Kato, T. Miyazaki, M. Kakihana, Hydrothermal synthesis of magnetite particles with uncommon crystal facets, *J. Asian Ceram. Soc.* 2 (2014) 258–262.
- [8] P. Azcona, R. Zysler, V. Lassalle, Simple and novel strategies to achieve shape and size control of magnetite nanoparticles intended for biomedical applications, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 504 (2016) 320–330.
- [9] P.I.P. Soares, A.M.R. Alves, L.C.J. Pereira, J.T. Coutinho, I.M.M. Ferreira, C.M.M. Novo, J.P.M.R. Borges, Effects of surfactants on the magnetic

- properties of iron oxide colloids, *J. Colloid Interface Sci.* 419 (2014) 46–51.
- [10] E. Rafiee, A. Ataei, S. Nadri, M. Joshaghani, S. Eavani, Combination of palladium and oleic acid coated-magnetite particles: Characterization and using in Heck coupling reaction with magnetic recyclability, *Inorganica Chim. Acta.* 409 (2014) 302–309.
- [11] N.C.C. Lobato, Â. de M. Ferreira, M.B. Mansur, Evaluation of magnetic nanoparticles coated by oleic acid applied to solvent extraction processes, *Sep. Purif. Technol.* 168 (2016) 93–100.
- [12] A. Navarro-Badilla, R.B. Hurtado, M. Cortez-Valadez, A. Perez-Rodriguez, M. Flores-Acosta, A. Maldonado-Arce, SDS bubbles functionalized with Gold nanoparticles and SERS applications, *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures.* 87 (2017) 93–97.
- [13] J. Saien, M. Bahrami, Understanding the effect of different size silica nanoparticles and SDS surfactant mixtures on interfacial tension of n-hexane–water, *J. Mol. Liq.* 224 (2016) 158–164.
- [14] G.-Q. Liu, F. Wang, S.-J. Luo, D.-Y. Xu, R.-B. Guo, Enhanced methane hydrate formation with SDS-coated Fe₃O₄ nanoparticles as promoters, *J. Mol. Liq.* (2016).
- [15] H. Najibi, M. Mirzaee Shayegan, H. Heidary, Experimental investigation of methane hydrate formation in the presence of copper oxide nanoparticles and SDS, *J. Nat. Gas Sci. Eng.* 23 (2015) 315–323.
- [16] D.S. Boyle, K. Govender, P. O'Brien, Novel low temperature solution deposition of perpendicularly orientated rods of ZnO: substrate effects and evidence of the importance of counter-ions in the control of crystallite growth., *Chem. Commun. (Camb).* (2002) 80–81.
- [17] Y.F. Lin, J.L. Chen, C.Y. Xu, T.W. Chung, One-pot synthesis of paramagnetic iron(III) hydroxide nanoplates and ferrimagnetic magnetite nanoparticles for the removal of arsenic ions, *Chem. Eng. J.* 250 (2014)

409–415.

- [18] P.A. Haas, W.W. Pitt, S.M. Robinson, A.D. Ryon, Preparation of metal oxide gel spheres with hexamethylenetetramine as an ammonia donor, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 22 (1983) 461–466.
- [19] A. Sarid, K. Nomura, S. Popovid, N. Ljubegid, S. Musid, Effects of urotropin on the chemical and microstructural properties of Fe-oxide powders prepared by the hydrolysis of aqueous FeCl₃ solutions, *Powder Diffr.* 52 (1998) 214–220.
- [20] N. MOHAMMAD, EDRISSI, Reza, BAHRAM, Synthesis of Pure Magnetite Nanoparticles Using Microwave Hydrothermal and Sonication, *Asian J. Chem.* 20 (2008) 3857–3865.
- [21] H. Singh, S. Bhagwat, S. Jouen, B. Lefez, B. Athawale, Anjali A. Hannover, S. Ogale, Elucidation of the role of hexamine and other precursors in the formation of magnetite nanorods and their stoichiometry, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 3246–3253.
- [22] S. V. Bhagwat, S. Jouen, D.C. Kundaliya, H. Singh, T. Jagadale, A.A. Athawale, S. Lofland, B. Hannover, S.B. Ogale, Non-Templated Hydrothermal Growth of Anisotropic Magnetite Nanostructures Using Hexamine as the Directing Agent, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 (2009) 5823–5828.
- [23] E. Wenande, L.H. Garvey, Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review, *Clin. Exp. Allergy.* 46 (2016) 907–922.
- [24] F.A. Harraz, Polyethylene glycol-assisted hydrothermal growth of magnetite nanowires: Synthesis and magnetic properties, *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures.* 40 (2008) 3131–3136.
- [25] M. Abbas, B. Parvatheeswara Rao, S.M. Naga, M. Takahashi, C. Kim, Synthesis of high magnetization hydrophilic magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in single reaction - Surfactantless polyol process, *Ceram. Int.*

- 39 (2013) 7605–7611.
- [26] M.L. Foresti, M.L. Ferreira, Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 769–777.
- [27] V. Lassalle, M. Avena, M. Iuján Ferreira, A review of the methods of magnetic nanocomposites synthesis and their applications as drug delivery systems and immobilization supports for lipases, *Curr. Trends Polym. Sci.* 13 (2009) 37–67.
- [28] L.C.J. Wade, *Química Orgánica*, 5th ed., Pearson Prentice Hall, Madrid, 2004.
- [29] D.C. Culita, G. Marinescu, L. Patron, O. Carp, C.B. Cizmas, L. Diamandescu, Superparamagnetic nanomagnetites modified with histidine and tyrosine, *Mater. Chem. Phys.* 111 (2008) 381–385.
- [30] Z. Durmus, H. Kavas, M.S. Toprak, A. Baykal, T.G. Altınçekiç, A. Aslan, A. Bozkurt, S. Coşgun, l-lysine coated iron oxide nanoparticles: Synthesis, structural and conductivity characterization, *J. Alloys Compd.* 484 (2009) 371–376.
- [31] G. Marinescu, L. Patron, D.C. Culita, C. Neagoe, C.I. Lepadatu, I. Balint, L. Bessais, C.B. Cizmas, Synthesis of magnetite nanoparticles in the presence of aminoacids, *J. Nanoparticle Res.* 8 (2006) 1045–1051.
- [32] A. Ebrahiminezhad, Y. Ghasemi, S. Rasoul-Amini, J. Barar, S. Davaran, Preparation of novel magnetic fluorescent nanoparticles using amino acids, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 102 (2013) 534–539.
- [33] F. Zamani, S.M. Hosseini, Palladium nanoparticles supported on Fe₃O₄/amino acid nanocomposite: Highly active magnetic catalyst for solvent-free aerobic oxidation of alcohols, *Catal. Commun.* 43 (2014) 164–168.
- [34] N.C. Feitoza, T.D. Gonçalves, J.J. Mesquita, J.S. Menegucci, M.K.M.S. Santos, J.A. Chaker, R.B. Cunha, A.M.M. Medeiros, J.C. Rubim, M.H.

- Sousa, Fabrication of glycine-functionalized maghemite nanoparticles for magnetic removal of copper from wastewater, *J. Hazard. Mater.* 264 (2014) 153–160.
- [35] J.L. Viota, F.J. Arroyo, A. V. Delgado, J. Horno, Electrokinetic characterization of magnetite nanoparticles functionalized with amino acids, *J. Colloid Interface Sci.* 344 (2010) 144–149.
- [36] Y. Jin, F. Liu, C. Shan, M. Tong, Y. Hou, Efficient bacterial capture with amino acid modified magnetic nanoparticles, *Water Res.* 50 (2014) 124–134.
- [37] K.C. Barick, P.A. Hassan, Glycine passivated Fe₃O₄ nanoparticles for thermal therapy, *J. Colloid Interface Sci.* 369 (2012) 96–102.
- [38] H. Qu, H. Ma, W. Zhou, C.J. O'Connor, In situ surface functionalization of magnetic nanoparticles with hydrophilic natural amino acids, *Inorganica Chim. Acta.* 389 (2012) 60–65.
- [39] K.C. Barick, S. Singh, D. Bahadur, M.A. Lawande, D.P. Patkar, P.A. Hassan, Carboxyl decorated Fe₃O₄ nanoparticles for MRI diagnosis and localized hyperthermia, *J. Colloid Interface Sci.* 418 (2014) 120–125.
- [40] K. Viswanathan, G.D. Raj, V.S. Vadivoo, K. Kumanan, R. Prabakaran, Development of antibiotic selection kit towards veterinary applications using glycine passivated magnetic particles, *Biosens. Bioelectron.* 51 (2014) 47–54.
- [41] R. Ahmadi, E. Ranjbarnodeh, N. Gu, Synthesizing cysteine-coated magnetite nanoparticles as MRI contrast agent: Effect of pH and cysteine addition on particles size distribution, *Mater. Sci.* 30 (2012) 382–389.
- [42] C.A. Gorski, M.M. Scherer, Determination of nanoparticulate magnetite stoichiometry by Mössbauer spectroscopy, acidic dissolution, and powder X-ray diffraction: A critical review, *Am. Mineral.* 95 (2010) 1017–1026.
- [43] P. Nicolás, M. Saleta, H. Troiani, R. Zysler, V. Lassalle, M.L. Ferreira,

Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules:
Experimental and mechanistic issues, *Acta Biomater.* 9 (2013) 4754–4762.

- [44] L. Zhu, D. Wang, X. Wei, X. Zhu, J. Li, C. Tu, Y. Su, J. Wu, B. Zhu, D. Yan, Multifunctional pH-sensitive superparamagnetic iron-oxide nanocomposites for targeted drug delivery and MR imaging, *J. Control. Release.* 169 (2013) 228–238.
- [45] X.Y. Qiao, M.W. Bai, K. Tao, X.L. Gong, R. Gu, H. Watanabe, K. Sun, J.Y. Wu, X.Y. Kang, Magnetorheological Behavior of Polyethylene Glycol-Coated Fe₃O₄ Ferrofluids, *J. Soc. Rheol. Japan.* 38 (2010) 23–30.
- [46] M.C. Mascolo, Y. Pei, T.A. Ring, Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases, *Materials (Basel).* 6 (2013) 5549–5567.
- [47] J. Tang, M. Myers, K.A. Bosnick, L.E. Brus, Magnetite Fe₃O₄ Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Aqueous Oxidation Kinetics†, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 7501–7506.
- [48] K. Yang, H. Peng, Y. Wen, N. Li, Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 3093–3097.
- [49] M.. Butterworth, L. Illum, S.. Davis, Preparation of ultrafine silica- and PEG-coated magnetite particles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 179 (2001) 93–102.
- [50] M. Sun, A. Zhu, Q. Zhang, Q. Liu, A facile strategy to synthesize monodisperse superparamagnetic OA-modified Fe₃O₄ nanoparticles with PEG assistant, *J. Magn. Mater.* 369 (2014) 49–54.
- [51] A.B. Savić, D. Čokeša, S. Lazarević, B. Jokić, D. Janačković, R. Petrović, L.S. Živković, Tailoring of magnetite powder properties for enhanced phosphate removal: Effect of PEG addition in the synthesis process, *Powder Technol.* 301 (2016) 511–519.

- [52] F.A. Tourinho, A.F.C. Campos, R. Aquino, M.C.F.L. Lara, G.J. da Silva, J. Depeyrot, Surface charge density determination in electric double layered magnetic fluids, *Brazilian J. Phys.* 32 (2002) 501–508.
- [53] S.M. Vidojkovic, M.P. Rakin, Surface properties of magnetite in high temperature aqueous electrolyte solutions: A review, *Adv. Colloid Interface Sci.* (2016).
- [54] X. Li, J. Paier, Adsorption of Water on the Fe₃O₄ (111) Surface: Structures, Stabilities, and Vibrational Properties Studied by Density Functional Theory, *J. Phys. Chem. C* 120 (2016) 1056–1065.
- [55] X.-M. Liu, S.-Y. Fu, H.-M. Xiao, Fabrication of octahedral magnetite microcrystals, *Mater. Lett.* 60 (2006) 2979–2983.
- [56] T. Yang, X.-D. Wen, C.-F. Huo, Y.-W. Li, J. Wang, H. Jiao, Structure and energetics of hydrogen adsorption on Fe₃O₄(111), *J. Mol. Catal. A Chem.* 302 (2009) 129–136.
- [57] L. Zhang, R. He, H.C. Gu, Synthesis and kinetic shape and size evolution of magnetite nanoparticles, *Mater. Res. Bull.* 41 (2006) 260–267.
- [58] Z. Chen, Z. Geng, T. Tao, Z. Wang, Shape-controlled synthesis of Fe₃O₄ rhombic dodecahedrons and nanodiscs, 2014.
- [59] R.L. Penn, Kinetics of Oriented Aggregation, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 12707–12712.
- [60] G. Marcelo, E. Pérez, T. Corrales, C. Peinado, Stabilization in Water of Large Hydrophobic Uniform Magnetite Cubes by Silica Coating, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011) 25247–25256.
- [61] T. Yumura, T. Amenomori, Y. Kagawa, K. Yoshizawa, Mechanism for the Formaldehyde to Formic Acid and the Formic Acid to Carbon Dioxide Conversions Mediated by an Iron-Oxo Species, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 621–630.

- [62] T. Ahn, J.H. Kim, H.-M. Yang, J.W. Lee, J.-D. Kim, Formation Pathways of Magnetite Nanoparticles by Coprecipitation Method, *J. Phys. Chem. C*. 116 (2012) 6069–6076.
- [63] J.Y. Park, E.S. Choi, M.J. Baek, G.H. Lee, Colloidal stability of amino acid coated magnetite nanoparticles in physiological fluid, *Mater. Lett.* 63 (2009) 379–381.

CAPÍTULO IV

Estudio de la inmovilización
covalente de CALB sobre
partículas magnéticas y testeo
de su actividad catalítica

En este capítulo se evaluó la inmovilización de CALB sobre un soporte magnético compuesto por nanopartículas de MAG-AO-QUIT modificadas con glutaraldehído (GLUT). Los materiales fueron caracterizados por diferentes técnicas fisicoquímicas como DRIFTS, Electroforesis, DLS y microscopía electrónica.

Se determinaron las conversiones en ciclos catalíticos sucesivos en la reacción de síntesis de oleato de etilo sin solvente y se estimó la pérdida de enzima por lixiviación en cada uno.

A partir de la información obtenida mediante caracterización y el comportamiento catalítico, se estudiaron las formas en que interaccionan el soporte precursor con el entrecruzante, así como los posibles mecanismos de inmovilización de CALB.

4.1. Introducción

Entre la gran variedad de materiales orgánicos empleados para obtener partículas con estructura *core-shell* a partir de un núcleo inorgánico, uno de los más estudiados es el QUIT. Su versatilidad química, sumada a sus propiedades mecánicas, biocompatibilidad y relativo bajo costo permite la utilización de este polímero en diversos campos de aplicación: remediación ambiental [1], la industria alimentaria [2], la agricultura [3], producción de papel [4] y cosméticos [5], biomedicina [6], y biotecnología [7].

En particular, como soporte para inmovilización enzimática, el QUIT se utiliza en forma de polvo, copos/escamas o geles, ya sea adquiridos comercialmente o bien preparados en el mismo laboratorio donde se realizará la inmovilización [8].

Como se indicó en el capítulo I, ya se había estudiado la adsorción simple de lipasas sobre QUIT sólido, con resultados poco eficientes en términos de conversión. Recientemente Gilani y col. estudiaron la actividad de la lipasa de páncreas porcino acoplada a microesferas de QUIT mediante diferentes protocolos. Demostraron que usando la metodología de adsorción simple la eficiencia de inmovilización fue baja y también gran parte de la enzima se

desorbió fácilmente. Concluyeron que el empleo de GLUT constituye una estrategia de suma utilidad para mejorar la eficiencia de los catalizadores, independientemente de la etapa de la inmovilización en la cual se incorpore [9].

La combinación de las propiedades atractivas del QUIT como soporte, en términos de su porosidad y funcionalidad superficial, con las propiedades magnéticas de MAG, conduce a un material con elevada afinidad por numerosas biomoléculas.

Por ejemplo, la lipasa de *Candida rugosa* y la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* fueron inmovilizadas a través de GLUT sobre partículas de MAG-QUIT con alta retención de actividad y buena estabilidad operacional [10]. Algunas otras enzimas de diferente origen también demostraron ser activas y estables en este mismo soporte [11,12]. Sin embargo, también se reportaron resultados negativos asociados a pérdida de actividad de pectinasa en la síntesis de un azúcar reductor a lo largo del tiempo de almacenamiento [13] o en los mismos ciclos catalíticos [14].

La preparación de biocatalizadores de CALB se ha estudiado extensamente sobre soportes que incluyen MAG combinada con modificantes o aditivos de diversa naturaleza y origen: poli-uretano [15], gelatina [16], poliglicidilmetacrilato [17], ácido glucónico [18], organosilanos [19], entre otros.

A pesar de la abundante literatura disponible en relación a la inmovilización de esta lipasa para el diseño de biocatalizadores, no se han encontrado publicaciones donde se estudie su inmovilización en el soporte del tipo MAG-AO-QUIT-GLUT.

El objetivo principal de este capítulo fue obtener un biocatalizador activo con propiedades magnéticas capaz de removerse fácilmente del medio de reacción, generando así amplias posibilidades de reuso. Para ello se inmovilizó CALB sobre partículas de MAG-AO-QUIT como material precursor. Adicionalmente, se pretendió adquirir conocimientos sobre los mecanismos de interacción entre los compuestos presentes en cada etapa de la síntesis como una herramienta para llegar a un biocatalizador óptimo en términos de su implementación práctica.

La reacción test elegida fue la esterificación de ácido oleico con etanol sin solvente. Las razones de la elección de esta reacción en particular tienen que ver con la creciente necesidad de desarrollar procesos industriales rentables de menor impacto medioambiental, y la conveniencia de disminuir costos de producción por presencia de solvente. Los sistemas libres de solvente permiten el uso de reactores de menor volumen, altas concentraciones de sustrato y, especialmente, la disminución de los costos asociados a la purificación del producto y recuperación/reciclado del solvente.

No se realizaron estudios cinéticos, como la determinación de los parámetros del mecanismo de reacción según el modelo Michaelis-Menten, ya que las lipasas inmovilizadas, tal como se describió en el capítulo I, no siguen ese tipo de mecanismo, sino uno mucho más complejo (ping-pong bi-bi).

4.2. Experimental

4.2.1. Activación del soporte MAG-AO-QUIT

Para el inicio de las actividades se tomaron como referencia los trabajos existentes en el grupo de catálisis enzimática correspondientes a la inmovilización simple de CALB sobre QUIT [20]. Como consecuencia de esto, el objetivo primitivo fue emplear MAG-AO-QUIT como nuevo soporte. Como se mencionó en el capítulo III, las partículas de MAG-AO-QUIT se encuentran fuertemente estabilizadas mediante el mecanismo electrostático. Para evitar o minimizar la ocurrencia de este mecanismo de estabilización, y aislar partículas sólidas, se recurrió al entrecruzamiento de los grupos amino del QUIT con GLUT.

100 mg de MAG-AO-QUIT se dispersaron en 100 mL de agua destilada y se calentó a 45 °C con agitación magnética. Se agregó 1 mL de GLUT concentrado comercial (25 %). Se dejó reaccionar durante una hora, para observar la ocurrencia de cambios en la velocidad de decantación del sólido. Se realizó el agregado continuo de GLUT concentrado, de a 1 mL en intervalos de 1 hora, hasta conseguir la decantación de la mayor parte de las partículas. Esto se evidenció por el aspecto límpido del sobrenadante.

En total, se agregaron 4 mL de GLUT. Con ayuda de un imán el soporte activado decantó fácilmente. El sobrenadante fue retirado. Se realizaron 3 lavados con agua destilada y el producto final se secó a 40 °C. A este material se lo llamará de aquí en adelante **SOP**.

4.2.2. Inmovilización de CALB

Usando el soporte obtenido en 4.2.1. (SOP), se realizó la inmovilización de CALB según el procedimiento detallado en el capítulo II, sección 2.2.1. Al biocatalizador resultante se lo denominará de aquí en más **SOP-CALB**.

4.2.3. Reacción test y prueba de leaching

Fueron realizadas siguiendo los procedimientos detallados en el capítulo II, secciones 2.2.2. y 2.2.3.

4.3. Resultados

4.3.1. Caracterización

4.3.1.1. Espectroscopía DRIFTS

En las Figura 4.1 – 4.3 se muestran los espectros IR del soporte después de la activación con GLUT, del catalizador con la enzima incorporada y CALB libre impregnada en KBr.

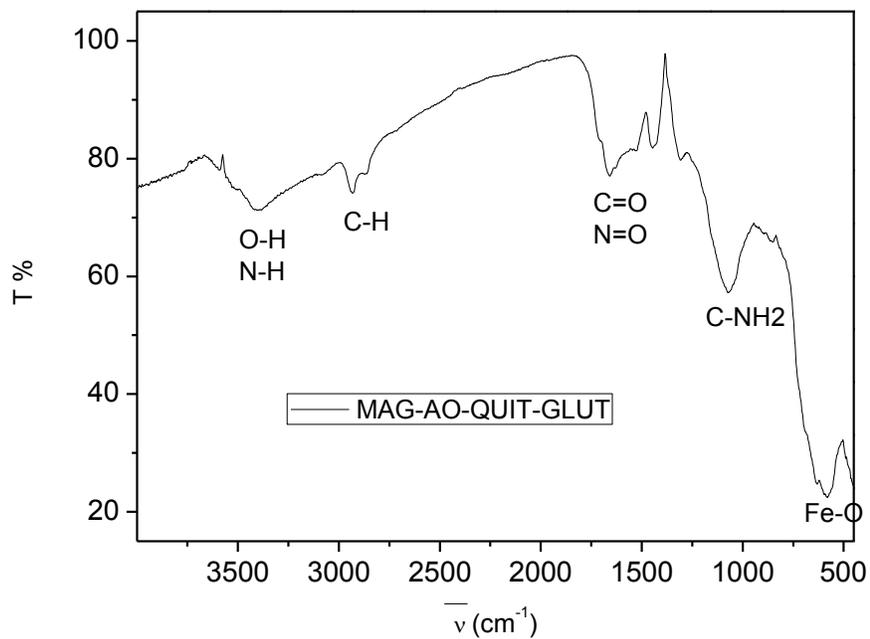


Figura 4.1. Espectros DRIFTS del soporte (SOP)

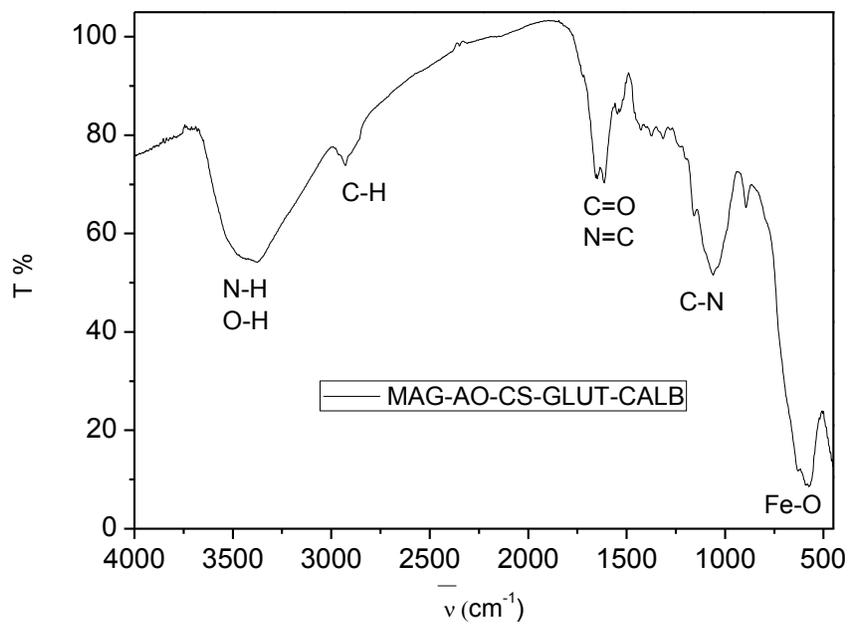


Figura 4.2. Espectro DRIFTS de SOP-CALB.

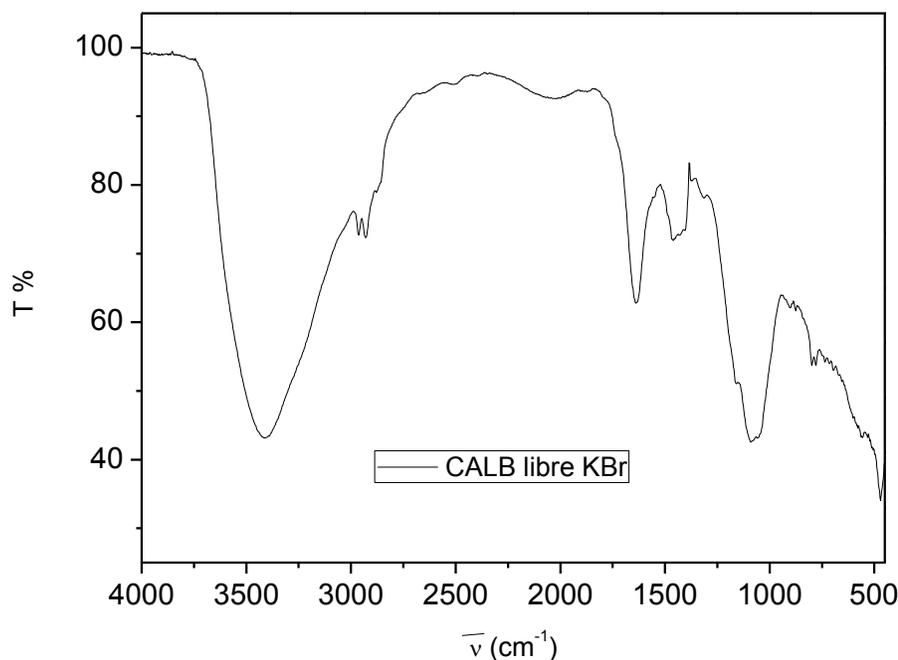


Figura 4.3. Espectros infrarrojos de soportes precursores, CALB inmovilizada y CALB libre (continuación).

La reacción de GLUT con los grupos $-\text{NH}_2$ de QUIT llevaría a la formación de grupos imina (enlace $\text{C}=\text{N}$). La señal asociada a este nuevo doble enlace se ubica normalmente a 1666 cm^{-1} . En este caso su detección se ve dificultada por el solapamiento con el doblete del grupo carboxilato proveniente del anión oleato adsorbido directamente a la superficie MAG. Se han reportado en la literatura múltiples formas de interactuar entre el GLUT y el QUIT, por lo que se analizarán en detalle en la Discusión de resultados (sección 4.4.1).

Las evidencias de incorporación de la enzima al soporte son limitadas en términos de la aparición de nuevas bandas asociadas a sus grupos funcionales, debido a que la enzima registra señales que coinciden con las correspondientes a los grupos del soporte. Por ende, sólo se han apreciado incrementos en la intensidad de bandas características como las de amida I y II (ver Figura 4.4.), o la reaparición de la señal a $3400\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$ debida al aporte de grupos amino de la propia lipasa presentes en residuos aminoácidos, como cadenas laterales de lisina.

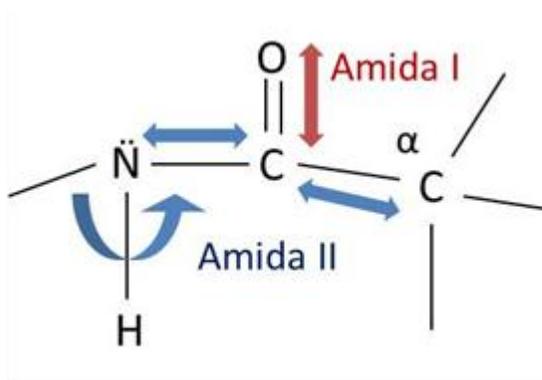


Figura 4.4. Representación de los enlaces que dan origen a bandas características de proteínas en el IR.

4.3.1.2. Tamaño y ζ pot

En la Tabla 4.1 se detallan los tamaños, expresados como valores de diámetro hidrodinámico (Dh) con las correspondientes desviaciones estándar (Sd) y ζ pot de MAG-AO-QUIT, SOP y SOP-CALB.

No se observan cambios significativos en los valores de Dh por la activación del SOP con GLUT ni por la presencia de la enzima.

El signo del ζ pot se revierte al incorporar el entrecruzante a la superficie del SOP. La inmovilización de la enzima genera una neutralización parcial de la carga superficial negativa, lo que permite confirmar su efectiva incorporación.

Tabla 4.1 Dh y ζ pot del catalizador y el soporte

Muestra	Dh (nm)	%	Sd (nm)	ζ pot (mV)	pH
MAG-AO-QUIT	714	100	91	+25,7	6,6
SOP	768 106	94 6	138 11	-23,4	5
SOP-CALB	638	100	137	-7,55	5,8
CALB 10 mg PP/mL (dilución del caldo comercial)	3965 1038	87 13	1170 240,6	-	-

4.3.1.3. Microscopía electrónica

En la Figura 4.5a se muestra las micrografías TEM del soporte con GLUT, donde se distinguen partículas de forma irregular con tamaños entre 5 y 13 nm. En la Figura 4.5b se muestra la imagen TEM de SOP-CALB. Con la inmovilización de la enzima, la morfología del material se altera y se observan agregados polidispersos de tamaños variables de hasta 1 μm (Fig. 4.3b).

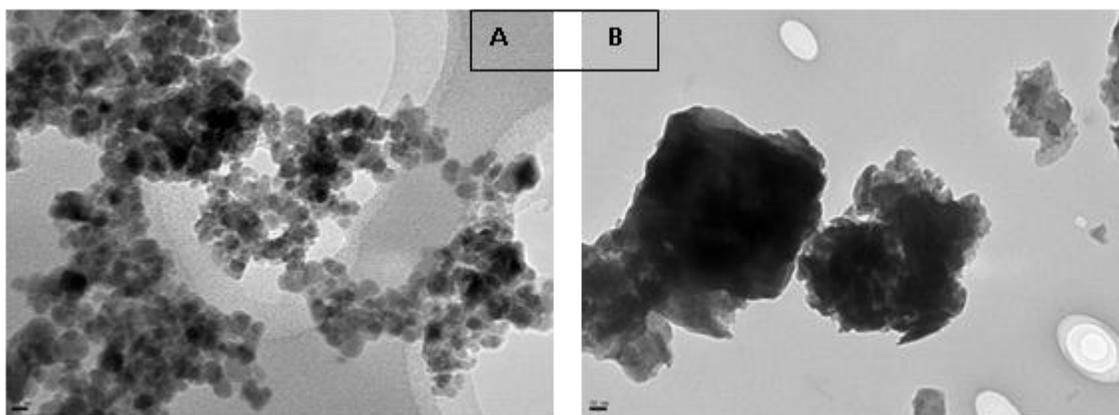


Figura 4.5. Micrografías TEM a) SOP. b) SOP-CALB. Las barras en el extremo inferior izquierdo representan 10 nm.

4.3.2. Actividad catalítica

4.3.2.1. Efecto de la variación de masa del catalizador en los niveles de conversión

En la Figura 4.6 se comparan los valores de conversión alcanzados por masas crecientes del catalizador comercial Novozym435 y el preparado a partir de MAG-AO-QUIT. En las condiciones de reacción seleccionadas, la conversión de equilibrio se alcanzó con 10 mg de Novozyme435, mientras que fueron necesarios 33 mg de SOP-CALB para obtener el mismo valor.

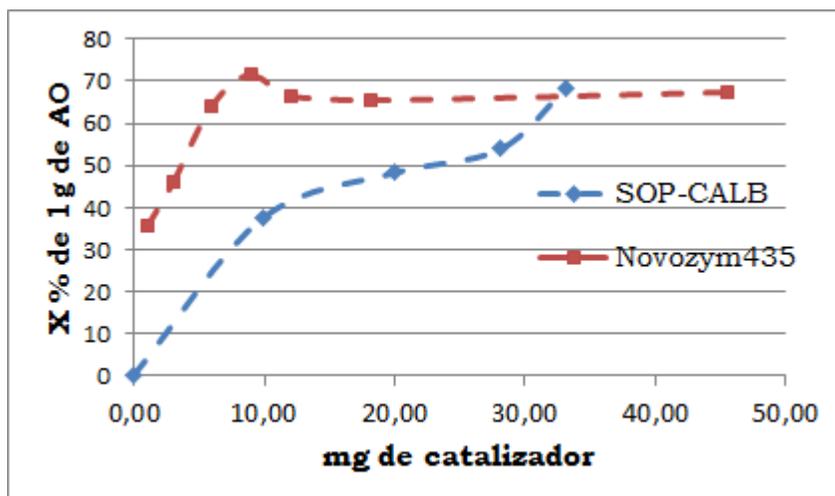


Figura 4.6. Conversión en esterificación de AO con Novozyme435 y SOP-CALB.

4.3.2.2. Efecto del reuso del catalizador en los niveles de conversión

Se exploraron las posibilidades de reuso del catalizador magnético utilizando dos metodologías de lavado diferentes entre un ciclo y otro:

i- Lavados cortos de 5 minutos

ii- Lavados largos de 2 horas.

Todos los lavados se realizaron con una mezcla heptano-etanol 1/1.

La actividad retenida % (definida según la Ecuación 4.1) para 33 mg de catalizador se muestra en la Figura 4.7. Se seleccionó esta masa dado que permitió alcanzar valores de conversión muy cercanos a la conversión de equilibrio de la reacción test en las condiciones aplicadas [21].

Ecuación 4.1. Actividad retenida % de un ciclo catalítico

$$\text{Actividad retenida ciclo } a = 100 \cdot \frac{X\% \text{ ciclo } a}{X\% \text{ ciclo } 1}$$

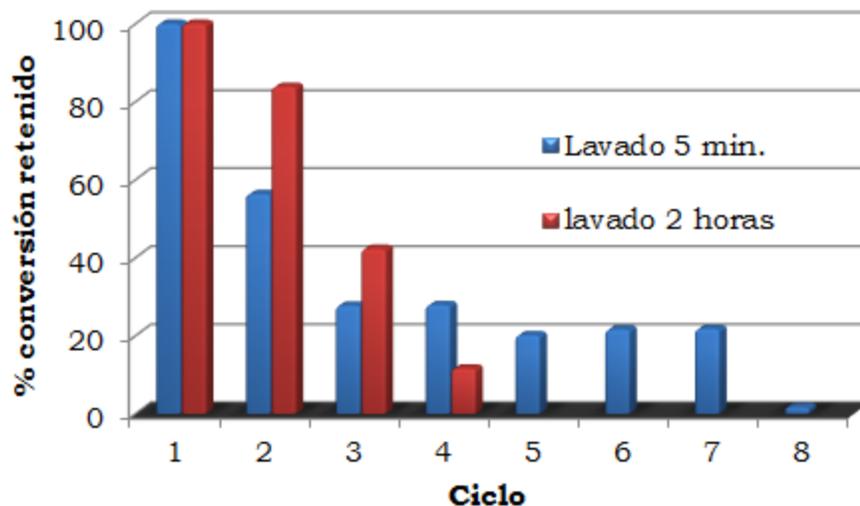


Figura 4.7. Conversión retenida por 33 mg de SOP-CALB. Sustrato:1 gramo de AO

En la Figura 4.8 se muestran los resultados para la conversión en esterificación a 24 °C con 30 mg de catalizador por gramo de ácido graso, así como la obtenida en los ensayos de leaching. Se seleccionó esta masa de catalizador como representativa de la otra proporción explorada (33mg). Dado que las cantidades son cercanas, no se esperó encontrar diferencias sustanciales. En los 2 primeros ciclos la pérdida de CALB hacia el medio de reacción justifica el descenso en la conversión del ciclo siguiente. Del tercero al quinto en cambio, a pesar de persistir el leaching, la actividad del catalizador se mantuvo en cada reacción consecutiva. Con esta masa de catalizador, la conversión registrada en el sexto ciclo es mínima.

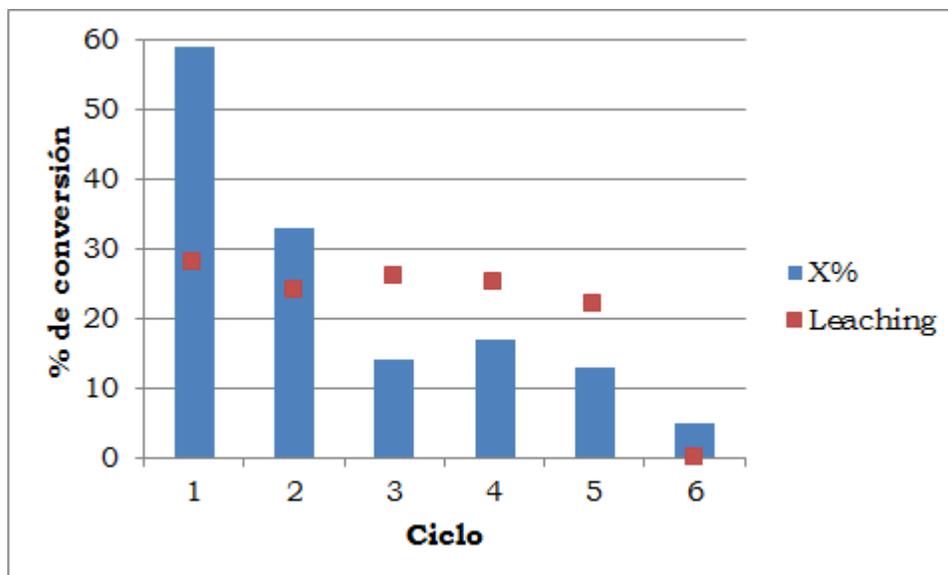


Figura 4.8. Conversiones medidas en ciclos catalíticos y tests de leaching para 30 mg del catalizador SOP-CALB

4.3.2.3. Efecto del tiempo de almacenamiento en los niveles de conversión

La actividad del catalizador fresco (30 mg) fue también medida luego de dos meses de almacenamiento a 4 °C. Los ensayos realizados revelaron un valor de conversión apenas 10 % menor a la obtenida inmediatamente luego de la inmovilización. Los resultados se representan en la Figura 4.9

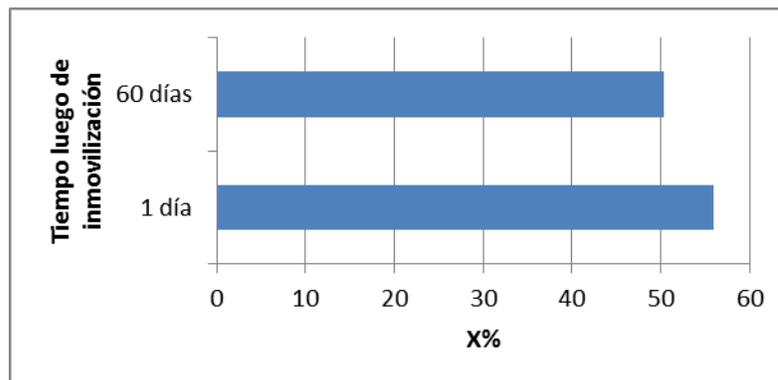


Figura 4.9. Retención de la actividad de 30 mg de SOP-CALB luego de 2 meses de almacenamiento a 4 °C.

4.3.2.4. Carga enzimática

La cantidad de enzima presente en el biocatalizador fue estimada mediante determinación de azufre en el sólido por emisión atómica-ICP. Los resultados indicaron una carga enzimática del 3,9 % de CALB, lo cual equivale a la inmovilización del 38 % de la enzima total ofrecida. Los fundamentos de la selección de este método frente a los tradicionales basados en UV-Vis (Bradford, Lowry, etc.) se expondrán exhaustivamente en el capítulo VI.

4.4. Discusión

Para justificar las características de los materiales precursores y entender el comportamiento de la lipasa inmovilizada en este sistema en particular, es preciso analizar las diferentes interacciones de los grupos funcionales reactivos que se encuentran presentes en cada etapa de la preparación.

4.4.1. Interacción GLUT-QUIT.

El QUIT en solución acuosa de ácido acético se encuentra en forma catiónica rodeado de iones acetato como contraiones. Cuando esta solución entra en contacto con la suspensión de partículas MAG-AO en acetona, el polímero precipita por ser insoluble en ese solvente. Sin embargo, al ser polar, la fracción orgánica puede mantener al menos parte del QUIT protonado. Como se mencionó en la Sección 4.1, gran parte de las partículas MAG-AO-QUIT permanecen en suspensión durante períodos prolongados de tiempo como consecuencia de la estabilización electrostática de las partículas debida a los grupos $-\text{NH}_3^+$. Una fracción de las mismas decanta por acción de un campo magnético generado por un imán de alta potencia. Este sólido al ser re dispersado en agua destilada recupera su estabilidad coloidal generando un nuevo fluido magnético estable.

La incorporación de GLUT a esta suspensión induce a la decantación relativamente rápida, tal como se observa en la Figura 4.10.

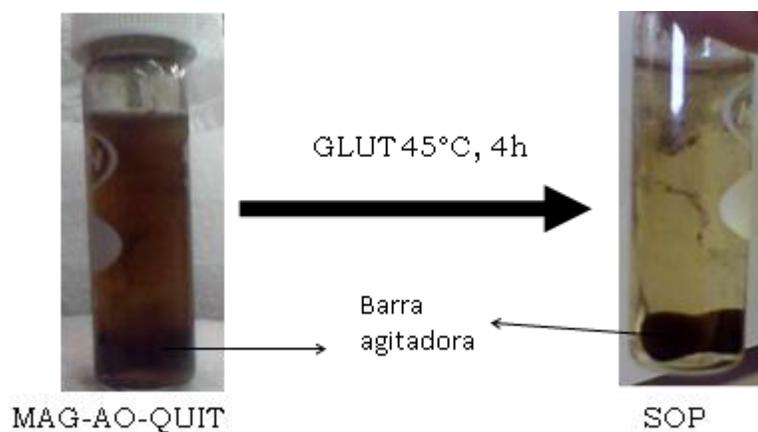


Figura 4.10. Aspecto de la suspensión acuosa de MAG-AO-QUIT antes y después del entrecruzamiento con GLUT.

El GLUT en solución acuosa puede dar lugar a diferentes especies químicas debido a su facilidad para inducir reacciones intra e intermoleculares. Las más importantes se ilustran en la Figura 4.11. La preponderancia de cada una depende fuertemente de la temperatura [22] y del pH [23], mientras que la concentración influye significativamente en la oligomerización sólo por encima de un 10% [24], valor que excede ampliamente al rango habitualmente empleado para entrecruzar compuestos aminados (inferior al 1%).

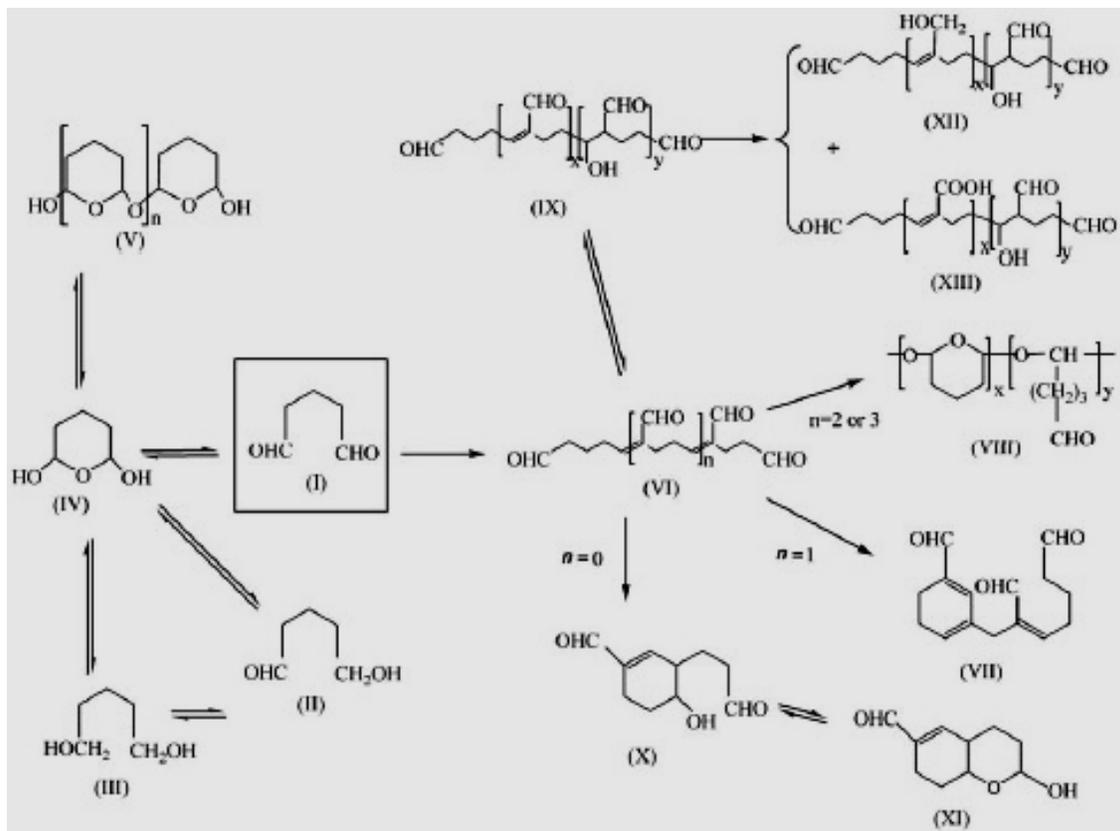


Figura 4.11. Estructuras de los compuestos de GLUT en agua. Tomado de [25] con permiso de la editorial.

Una forma sencilla de reconocer la presencia de grupos funcionales insaturados es la espectroscopía de absorción molecular en UV-Visible. Un doble enlace carbono-carbono aislado origina una banda intensa alrededor de 190 nm, mientras que un carbonilo muestra una banda menos intensa aproximadamente a 275 nm. Sin embargo, cuando estos dos dobles enlaces se encuentran conjugados, ambas bandas sufren un desplazamiento a mayores longitudes de onda debido al efecto batocrómico [26].

En la Figura 4.10 se incluye el espectro UV de una solución acuosa de GLUT al 2,5 % registrado a temperatura ambiente y a 45 °C. El mismo muestra dos bandas: una muy intensa a 233 nm (C=C conjugado con C=O) y otra a 280 nm (C=O). En las condiciones bajo las cuales se activó el soporte (45 °C) se aprecia un aumento de la intensidad de la banda correspondiente al carbonilo

aldehídico lo cual es un indicador del desplazamiento del equilibrio entre especies hacia el monómero, o polímeros de menor peso molecular aumentando la concentración de grupos aldehído (H-C=O). Si bien un cambio en la temperatura de la solución provoca una alteración de la absorptividad molar –y por ende de la absorbancia registrada-, se observa una gran diferencia en la relación de intensidades de las bandas asociadas a doble enlace C=C/C=O. Si el aumento de absorbancia fuera solamente causado por la temperatura, también se observaría ese efecto en la banda de 233 nm.

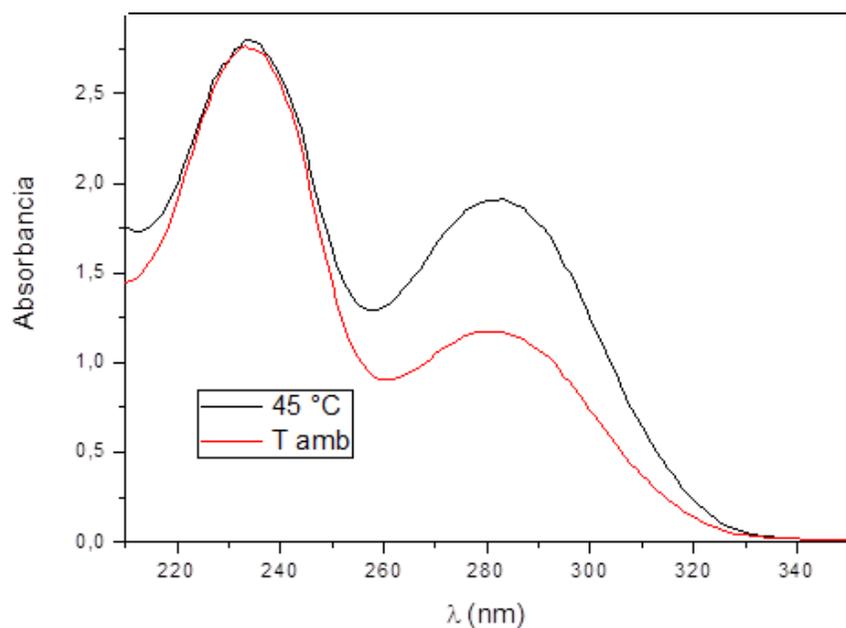
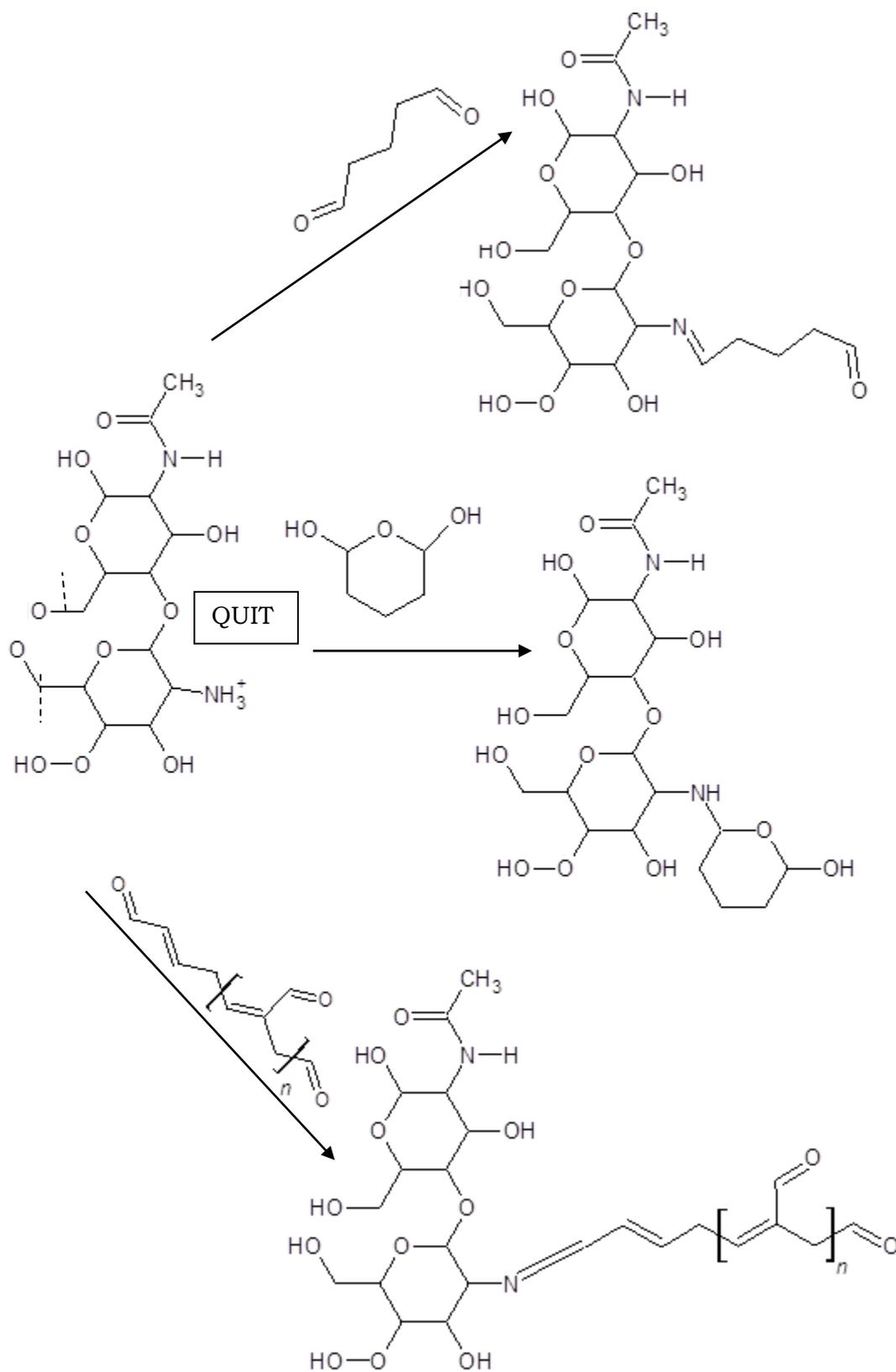


Figura 4.10. Espectros UV de GLUT al 2,5 % a temperatura ambiente y a 45 °C.

En base a los datos obtenidos a partir del análisis espectroscópico de la solución de GLUT, es posible inferir la presencia de especies que contienen grupos aldehído conjugados con enlaces dobles C=C (por ejemplo la forma X, Fig. 4.9). Otras estructuras que no absorben en el UV pero cuya presencia se ha demostrado por ^{13}C -RMN, ^1H -RMN [27] y dispersión de luz [24] (como el hemiacetal cíclico IV, Fig. 4.9) también podrían participar de la reacción con el QUIT debido a que cuentan con sitios reactivos frente a los grupos $-\text{NH}_2$. En el Esquema 4.1 se representan las diferentes reacciones posibles entre QUIT y GLUT en las condiciones experimentales aplicadas.



Esquema 4.1. Principales reacciones entre QUIT y GLUT

Las medidas de ζ pot confirman la naturaleza catiónica del QUIT precipitado sobre MAG (MAG-AO-QUIT). Evidencias de la incorporación de GLUT también se encuentran a partir de los resultados de las medidas de ζ pot del SOP, ya que la carga superficial se revierte y pasa a ser negativa. Esto es atribuible a la desprotonación de los grupos $-\text{NH}_3^+$ para actuar como nucleófilos frente a los grupos funcionales del GLUT.

Sobre la base de los datos de caracterización es posible postular que el soporte activado contiene los siguientes grupos en la superficie expuesta:

i-grupos aldehído aislados

ii-grupos aldehído conjugados con C=C

iii-grupos hemiacetal

La determinación de la cantidad de GLUT incorporada al soporte se realizó mediante espectroscopia UV-Visible. Se registraron los espectros de testigos entre 1 y 15 mg/mL para construir una curva de calibrado, tomando la absorbancia de la banda a 281 nm como referencia. El análisis del sobrenadante y los lavados de la reacción entre MAG-AO-QUIT y GLUT revelaron que la línea de base de algunos espectros había aumentado (Figura 4.11). En estos casos la cantidad remanente de entrecruzante calculada resultó mayor a la inicial. Esto se puede atribuir a dos causas: i. la presencia de partículas que permanecieron en suspensión y por lo tanto dispersan la luz (ver figura 4.8) y; ii. La alteración irreversible de la composición de la solución de GLUT por las múltiples reacciones químicas que tienen lugar. Como consecuencia de estas observaciones la cuantificación de GLUT en SOP no resultó posible usando las herramientas disponibles.

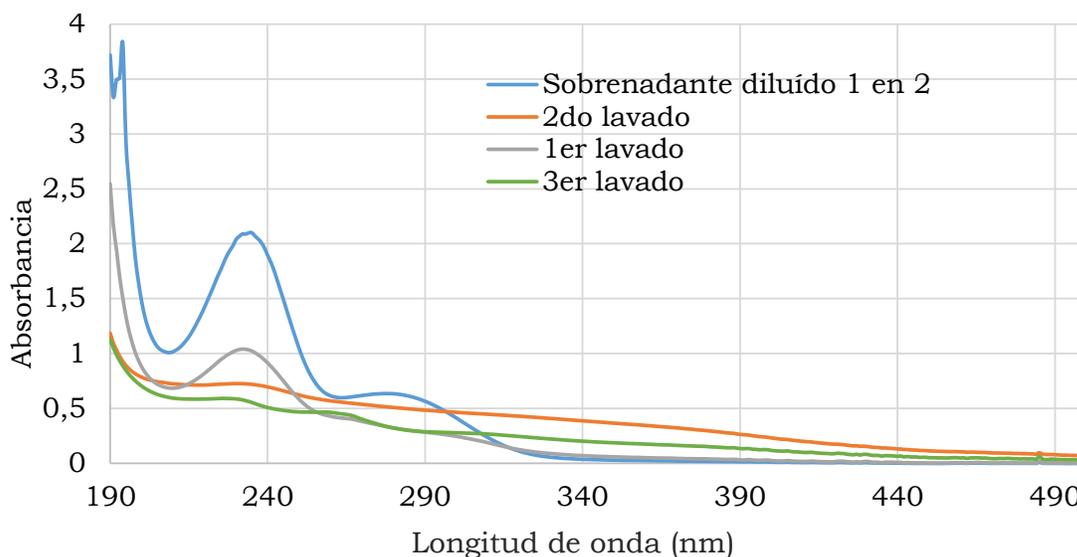


Figura 4.11. Espectros UV-V de sobrenadantes y lavados de la reacción MAG-AO-QUIT con GLUT

4.4.2. Interacción CALB-GLUT

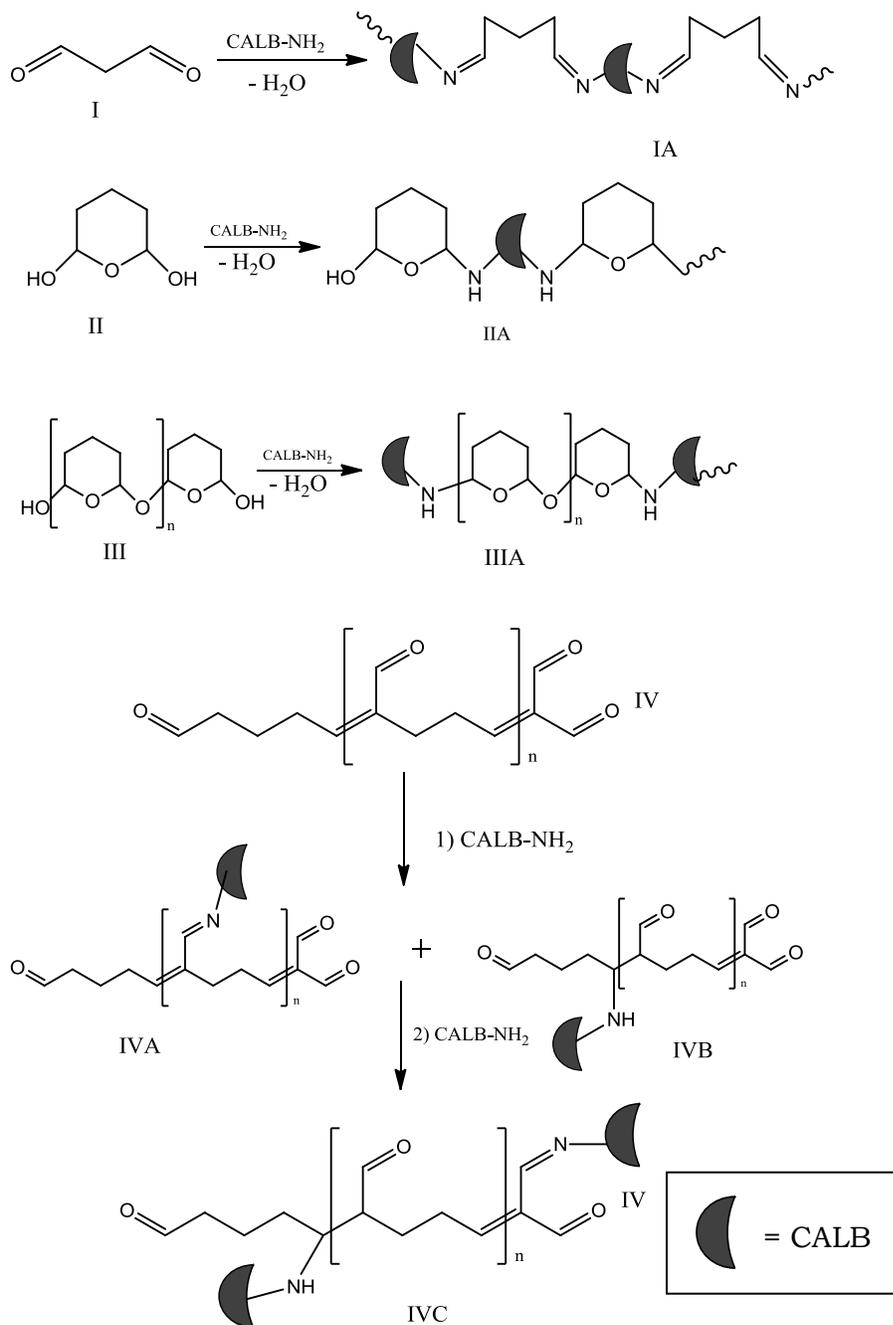
La forma en que CALB (y las proteínas en general) reacciona con soportes activados con GLUT puede racionalizarse, en un principio, de manera análoga a la interacción QUIT-GLUT, dado que los grupos activos en este caso también serían los NH_2 , provenientes de residuos aminoácidos. Si bien la reacción esperada es el ataque nucleofílico del grupo amino sobre el carbonilo, eso daría lugar a una imina químicamente inestable, por lo que la lipasa sería fácilmente removida por los lavados al finalizar la etapa de inmovilización. El empleo de agentes reductores (como el NaBH_4 , LiAlH_4 o NaBH_3CN) para transformar el doble enlace $\text{C}=\text{N}$ en una amina secundaria ha sido ampliamente reportado como una estrategia para reforzar la interacción soporte activado-lipasa. Al comparar la estabilidad operacional de los biocatalizadores obtenidos mediante esta ruta reductora con los de una inmovilización covalente sin ningún tratamiento posterior, no se encuentran evidencias de que el agente reductor sea el responsable de la retención de actividad. Por ejemplo, la lipasa de *Candida rugosa* fue inmovilizada sobre polipropileno aminado y activado con GLUT. La

actividad inicial en esterificación se mantuvo por 5 ciclos, y perdió menos del 20 % hasta la 12^{va} reacción [28].

Walt y Agayn recopilaron ya en 1994 información valiosa sobre las múltiples reacciones entre proteínas y GLUT, concluyendo que la reducción, en muchos casos, no sólo no es necesaria sino que incluso puede ser perjudicial para la retención de la conformación activa de una enzima, ya que actúa sobre los puentes disulfuro que mantienen esa conformación [29]. Un ejemplo claro del efecto desactivante del borohidruro sobre CALB-QUIT es el trabajo de Rodriguez y col. en el cual, con apenas 0,5 mg NaBH₄/mL a 25 °C, la actividad decae en un 32 % respecto al biocatalizador sin reducir [30]. El mismo efecto negativo fue observado para lacasa inmovilizada sobre fibra de coco [31]. A pesar de estas evidencias, numerosos autores reportaron hasta muchos años después que el NaBH₄ era imprescindible para el éxito de la inmovilización enzima-GLUT. Por ejemplo, Khoobi y col. prepararon partículas magnéticas recubiertas de polietilenimida (PEI) y activadas con GLUT al 1 %, sobre las que inmovilizaron lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (TLL). Luego trataron con NaBH₄ 1 mg/mL, y el catalizador fue testeado en esterificación de ácido valérico con etanol en hexano. La actividad decreció gradualmente hasta desaparecer en 10 ciclos [32]. Este protocolo fue repetido por los mismos autores en un nuevo estudio para TLL, pero usando MCM41 (un tipo de sílice mesoporosa) como soporte de partida. El catalizador MCM-PEI-TLL retuvo el 100% de la actividad inicial por seis ciclos, conservando más del 80 % en el 12^{avo} [32]. Analizando en profundidad ambos trabajos, se observa que la diferencia radica en el grado de aminación del soporte: mientras que el primero contiene 19,4 % en peso de PEI, el segundo tiene 15 %. Una mayor densidad de grupos -NH₂ permite la incorporación de más unidades de GLUT. Ante estas evidencias es claro que la relación GLUT/soporte-NH₂ constituye en factor determinante en la performance de la enzima a inmovilizar, por sobre la utilización de un agente reductor.

Los mecanismos de inmovilización posibles se representan en el Esquema 4.2. La estructura IA (del GLUT monomérico) es altamente inestable ya que el doble enlace C=N es lábil frente a la hidrólisis ácida. Por otro lado, en las formas IIA y IIIA la enzima se une al grupo hemiacetal originando aminas secundarias estables. Por último, el ataque de CALB-NH₂ sobre carbonilos conjugados con

enlaces C=C genera iminas estabilizadas por esa conjugación, resistentes a la hidrólisis (IVA) [33]. Richards y Knowels propusieron una alternativa válida que consiste en una adición del tipo Michael sobre el enlace C=C dando lugar a IVB [34]. Cuando el GLUT se hubiere enlazado al QUIT en una de sus formas poliméricas, obtenemos la estructura IVC



Esquema 4.2. Estructuras originadas por la interacción GLUT-Enzima.

Es importante notar que para que todas estas reacciones se lleven a cabo efectivamente, los grupos amino de la enzima deben encontrarse desprotonados, por lo que el pH del medio de inmovilización debe ser superior al punto isoeléctrico. En el caso de las lipasas este valor se encuentra alrededor de un pH=5 [35].

Los mecanismos de inmovilización propuestos (II – IV, Esquema. 4.2) apuntan a la unión irreversible de la enzima. Sin embargo, el catalizador SOP-CALB no presenta estabilidad en términos de la actividad retenida (Fig. 4.7). En cada ciclo se observa la pérdida de CALB (leaching), lo que origina la desactivación parcial hasta el tercer ciclo.

La retención del nivel de conversión a partir de este punto no se condice con el continuo leaching registrado en todos los reusos. Para explicar este comportamiento, además de contemplar la interacción directa con GLUT, es preciso considerar la interacción débil de moléculas de CALB entre sí, que se analizará en detalle en la próxima sección.

El fenómeno de desactivación total es más difícil de explicar, ya que si atribuimos al leaching de CALB débilmente unida como la única causa, aquellas moléculas enlazadas directamente al soporte por uniones covalentes deberían permanecer activas.

Otros motivos de desactivación comunes son:

- i- Inhibición por producto o sustrato, que en este caso consistiría en la obstrucción del sitio activo de la enzima con ácido oleico u oleato de etilo,
- ii- Cambio conformacional de la enzima (desnaturalización) que pasa irreversiblemente a la forma cerrada.
- iii- Atrición mecánica de la enzima debido al sistema de agitación

La inhibición reversible por producto o sustrato (i), en este caso, puede descartarse con seguridad ya que debería revertirse con lavados exhaustivos. Sin embargo de acuerdo a lo observado en la Fig. 4.7, se produce una desactivación más rápida después de los lavados.

La desnaturalización de la proteína inmovilizada puede racionalizarse en este caso a través de la interacción múltiple con el GLUT. Si consideramos el exceso de entrecruzante con el que se activó al soporte aminado (Sección 4.2.1.) podemos asegurar que el número de grupos funcionales disponibles (tanto aldehído como hemiacetal) para interactuar con la enzima supera ampliamente a la cantidad nominal de moléculas de CALB, en una relación 20:1 (20 mg de GLUT nominales para 1 mg de lipasa). Si grupos aldehído permanecen libres luego de la inmovilización, el entrecruzamiento GLUT-CALB puede seguir ocurriendo durante los tiempos de lavado/secado entre ciclos a través de otros grupos $-NH_2$. Esto tiene un efecto tóxico sobre la enzima [36] ya que provoca una lenta y progresiva distorsión de la estructura terciaria.

Yagonia y col. aseveraron que de los nueve residuos de lisina que CALB contiene, solo tres se encuentran expuestos y lejos del sitio activo (tríada Serina105-Aspártico187-Histidina224, Figura 4.12) por lo cual la desnaturalización por GLUT puede minimizarse. De hecho, obtuvieron CALB inmovilizada sobre sol-gel mediante APTS y GLUT (sin ningún tratamiento post-inmovilización) capaz de retener el 100% de la actividad inicial en ocho ciclos de hidrólisis de p-nitrofenilpalmitato [37]. Las cantidades nominales seleccionadas en ese trabajo aseguran la limitación del número de grupos aldehído disponibles: para un máximo de $2,2 \cdot 10^{-3}$ moles de grupos $-NH_2$ ofrecieron apenas 10^{-3} moles de GLUT. Nuevamente queda en evidencia la importancia y la influencia de la relación GLUT/soporte- NH_2 .

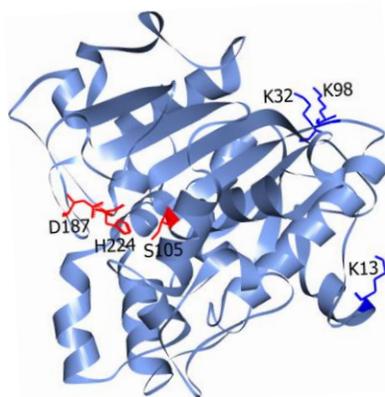


Figura 4.12. Distribución de lisinas (K) expuestas en CALB. La tríada catalítica se señala en rojo (tomado de [38] con permiso de la editorial).

En esta etapa de trabajo se emplearon 100 mg de GLUT para 50 mg de soporte aminado MAG-AO-QUIT. En base a lo expuesto, el exceso de GLUT podría justificar parcialmente la desactivación total del biocatalizador magnético.

No se descarta una contribución del efecto mecánico de la agitación seleccionada.

4.4.3. Interacción CALB-CALB

Las proteínas tienden a agregarse en solución acuosa [38]. Una de las técnicas por las que se ha estudiado este fenómeno es la dispersión de luz, tanto estática [39] como dinámica [40,41]. Una estimación del grado de aglomeración de la lipasa puede obtenerse a partir de medidas de Dh por DLS a varias concentraciones, inmediatamente después de preparadas las soluciones y luego de agitarlas media hora. La concentración que se tuvo en cuenta como referencia del caldo crudo de CALB fue 300 mg/mL, siendo este valor correspondiente a proteína precipitable (PP) [42]. Los resultados correspondientes a Dh se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Diámetros hidrodinámicos de CALB en solución.

Concentración (mg PP/mL)	Dh (nm) sin agitar	Dh (nm) agitado 30 min
0,41	1102- 57% 473,4- 43%	274,1 -100%
0,82	647,7 -100%	269,1 - 100%
1,65	2519 -82% 268,9 -18%	672,1 -81% 197,3 -19 %
3,3	1522 -100%	2130 -75% 429,5- 25%
6,7	1881- 100%	3229- 100%
10*	3965 -86,5% 1038 -13,5%	3953- 100%

*Concentración en la solución de inmovilización

El preparado comercial de CALB utilizado para esta tesis contiene numerosas especies químicas diferentes. Algunas provienen de la fuente microbiana, mientras que otras son agregadas como conservantes o estabilizantes. Entre ellas se pueden mencionar glicerol y sorbitol, que juntos constituyen aproximadamente el 50 % de los compuestos solubilizados del caldo; benzoato de sodio (0,2 %) y sorbato de potasio (0,1 %) [43] representados en la Figura 4.13. Se ha reportado la presencia de ácidos nucleicos en el caldo comercial de CALB [44]. La presencia de estas impurezas impide realizar una medida confiable de agregados que estén constituidos solamente por CALB, ya que la enzima experimentará, aún muy diluida, fuertes interacciones con prácticamente todos los aditivos mencionados.

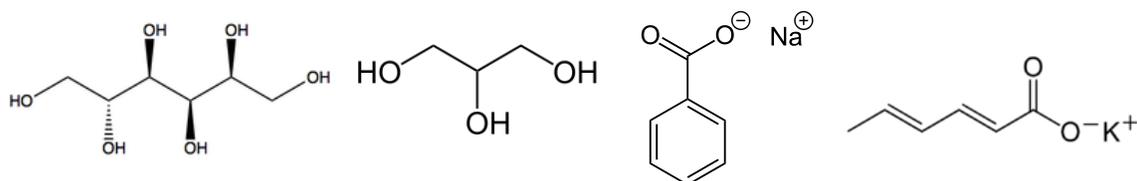


Figura 4.13. Aditivos del caldo comercial de CALB

Fang y col. midieron el Dh de CALB en una solución preparada a partir de la lipasa liofilizada ultrapura, logrando observar el tamaño de la molécula monomérica (3 x 4 x 5 nm [45]) a una concentración de 1,6 mg/mL [46]. Por lo tanto, los valores registrados en la Tabla 4.1 son indefectiblemente cúmulos de una variedad de especies químicas que se mantienen unidas por, por ejemplo, puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas. Incluso *clusters* de CALB se atraen enfrentando regiones hidrofóbicas con orientaciones específicas [47]. De todas maneras, es evidente que esos cúmulos pueden desagregarse con la agitación por debajo de 1,65 mg PP/mL. A concentraciones mayores la tendencia se revierte, volviéndose aún más marcada la agregación.

Puede inferirse entonces que en las condiciones de inmovilización, la lipasa se encuentra altamente agregada, por lo que el proceso es mucho más complejo que la sola formación de enlaces covalentes N-C.

Tomemos como modelo un agregado de casi 4 micras compuesto principalmente por sorbitol, glicerol y CALB. Grupos $-NH_2$ de enzimas de que hayan quedado expuestas reaccionan con el soporte (sobre los grupos funcionales señalados en la sección anterior) llevando consigo a todo el conjunto de moléculas que la rodeaban. Al retirar el sobrenadante y agregar agua destilada para los lavados, aquellos compuestos más hidrofílicos pueden desorberse fácilmente del agregado, pero considerando su gran tamaño y resistencia a la agitación, es posible que no todas las impurezas lleguen a eliminarse. Lo que permanece sobre la superficie del catalizador sería:

- 1) Moléculas de CALB unidas directamente por enlaces químicos
- 2) Moléculas de CALB adsorbidas unas sobre otras, intercalándose con restos de los aditivos, débilmente unidas al soporte.

Esta teoría de inmovilización mixta permite explicar, por un lado, el leaching registrado a lo largo de 7 ciclos (Fig. 4.7) que a su vez es causante de la abrupta caída en la conversión. Por otro lado, la retención de actividad en los ciclos 3 a 5, aun cuando se ha registrado desorción puede explicarse considerando que cada capa desprendida deja al descubierto nuevas moléculas que en los ciclos anteriores eran totalmente inaccesibles para el sustrato, por lo tanto el número de sitios activos expuestos se mantiene aproximadamente constante hasta el quinto ciclo.

Se reportaron comportamientos similares en otras lipasas inmovilizadas a través de GLUT. Por ejemplo, Kumar y col. inmovilizaron la lipasa de *Bacillus sp.* DVL2 entrecruzada con el dialdehído sobre alúmina. Observaron la desactivación total en 7 ciclos de esterificación de ácido oleico con etanol utilizando hexano como solvente [48].

El hecho de que el catalizador SOP-CALB se desactive en apenas 4 ciclos lavándolo exhaustivamente (Fig. 4.7) refuerza la idea anterior, dado que en cada lavado de 2 horas se desprende mayor cantidad de enzima e impurezas.

Por otro lado, este resultado se suma a la numerosa bibliografía previa que reporta el problema de la adsorción simple como un método no efectivo para inmovilizar enzimas, ya que no permite el escalado a nivel industrial y se acompaña, con frecuencia, de pérdida de actividad. Sólo enzimas comerciales

como Novozym435 han logrado superar estos problemas a través del uso de soportes macroporosos poliméricos y en el marco de desarrollo de tecnología de alto costo.

4.5. Conclusiones del capítulo IV

Se preparó un material magnético a base de nanopartículas de magnetita modificada con quitosano y glutaraldehído. Se consiguió la inmovilización de CALB en el mismo. Se observó por TEM que los núcleos magnéticos dispersos en la matriz de polímero entrecruzado tienen tamaños de alrededor de 10 nm. La incorporación de la lipasa da lugar a agregados de nanopartículas magnéticas con diámetros hidrodinámicos de hasta 700 nm en agua. El biocatalizador resultó activo y potencialmente reutilizable en la esterificación de AO con etanol sin solvente. La actividad catalítica decreció hasta desaparecer al cabo de 7 ciclos debido a la desorción (leaching) de CALB que actúa como enzima libre. Aquellas moléculas enlazadas covalentemente al soporte mediante GLUT permanecieron desactivadas debido al exceso de grupos aldehído frente a los $-NH_2$ tanto del soporte como de la lipasa.

Los resultados y conclusiones derivados de este capítulo dieron origen a una publicación en una revista internacional con referato y una presentación a reunión científica en formato póster:

-Development of a magnetic biocatalyst useful for the synthesis of ethyl oleate. Nicolás, Paula; Lassalle, Verónica; Ferreira, María Luján. *Bioprocess and Biosystems Engineering* (2014) 37 p.585

-Diseño de biocatalizadores de *Candida antarctica* B inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas. Paula Nicolás; Verónica Lassalle; María Luján Ferreira. La Plata, Argentina. 2012. Libro. ISBN 978-987-28696-0-1, p.74 V Encuentro regional de biocatálisis y biotransformaciones. Sociedad Argentina de Biocatálisis y Biotransformaciones.

4.6. Referencias del capítulo IV

- [1] S. Adewuyi, J.M. Jacob, O.O. Olaleye, T.O. Abdulraheem, J.A. Tayo, F.O. Oladoyinbo, Chitosan-bound pyridinedicarboxylate Ni(II) and Fe(III) complex biopolymer films as waste water decyanidation agents, *Carbohydr. Polym.* 151 (2016) 1235–1239. doi:10.1016/j.carbpol.2016.06.070.
- [2] U. Siripatrawan, W. Vitchayakitti, Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis, *Food Hydrocoll.* 61 (2016) 695–702. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.06.001.
- [3] P.L. Kashyap, X. Xiang, P. Heiden, Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture, *Int. J. Biol. Macromol.* 77 (2015) 36–51. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039.
- [4] E.A. Hassan, M.L. Hassan, R.E. Abou-zeid, N.A. El-Wakil, Novel nanofibrillated cellulose/chitosan nanoparticles nanocomposites films and their use for paper coating, *Ind. Crops Prod.* 93 (2016) 219–226.
- [5] I.C. Libio, R. Demori, M.F. Ferrão, M.I.Z. Lionzo, N.P. da Silveira, Films based on neutralized chitosan citrate as innovative composition for cosmetic application, *Mater. Sci. Eng. C.* 67 (2016) 115–124. doi:10.1016/j.msec.2016.05.009.
- [6] I. Petrov, O. Kalinkevich, M. Pogorielov, A. Kalinkevich, A. Stanislavov, A. Sklyar, S. Danilchenko, T. Yovcheva, Dielectric and electric properties of new chitosan-hydroxyapatite materials for biomedical application: Dielectric spectroscopy and corona treatment, *Carbohydr. Polym.* 151 (2016) 770–778. doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.110.
- [7] I. Benucci, C. Lombardelli, I. Cacciotti, K. Liburdi, F. Nanni, M. Esti, Chitosan beads from microbial and animal sources as enzyme supports for wine application, *Food Hydrocoll.* 61 (2016) 191–200.
- [8] B. Krajewska, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 126–139. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
- [9] S.L. Gilani, G.D. Najafpour, A. Moghadamnia, A.H. Kamaruddin, Stability of

- immobilized porcine pancreas lipase on mesoporous chitosan beads: A comparative study, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133 (2016) 144–153. doi:10.1016/j.molcatb.2016.08.005.
- [10] K. Pospiskova, I. Safarik, Low-cost, easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization, 2013. doi:10.1016/j.carbpol.2013.04.014.
- [11] G. Chen, J. Liu, Y. Qi, J. Yao, B. Yan, Biodiesel production using magnetic whole-cell biocatalysts by immobilization of *Pseudomonas mendocina* on Fe₃O₄-chitosan microspheres, *Biochem. Eng. J.* 113 (2016) 86–92. doi:10.1016/j.bej.2016.06.003.
- [12] M.J. Chaichi, M. Ehsani, A novel glucose sensor based on immobilization of glucose oxidase on the chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles and the luminol-H₂O₂-gold nanoparticle chemiluminescence detection system, *Sensors Actuators B Chem.* 223 (2016) 713–722. doi:10.1016/j.snb.2015.09.125.
- [13] M. Lei, D. Hu, H. Yang, Z. Lei, Preparation and characterization of hollow magnetic composite nanoparticles for immobilized pectinase, *Surf. Coatings Technol.* 271 (2015) 2–7.
- [14] L. Zang, J. Qiu, X. Wu, W. Zhang, E. Sakai, Y. Wei, Preparation of Magnetic Chitosan Nanoparticles As Support for Cellulase Immobilization, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 3448–3454.
- [15] V. Chiaradia, A. Valério, D. de Oliveira, P.H.H. Araújo, C. Sayer, Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase B and incorporation of magnetic nanoparticles on poly(urea-urethane) nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 131 (2016) 31–35. doi:10.1016/j.molcatb.2016.06.004.
- [16] M.T. Reetz, A. Zonta, V. Vijayakrishnan, K. Schimossek, Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: Magnetic separation of heterogeneous biocatalysts, *J. Mol. Catal. A Chem.* 134 (1998) 251–258. doi:10.1016/S1381-1169(98)00043-0.
- [17] T.P.N. Ngo, A. Li, K.W. Tiew, Z. Li, Efficient transformation of grease to

- biodiesel using highly active and easily recyclable magnetic nanobiocatalyst aggregates, *Bioresour. Technol.* 145 (2013) 233–239.
doi:10.1016/j.biortech.2012.12.053.
- [18] Y. Sui, Y. Cui, Y. Nie, G.M. Xia, G.X. Sun, J.T. Han, Surface modification of magnetite nanoparticles using gluconic acid and their application in immobilized lipase, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 93 (2012) 24–28.
doi:S0927-7765(11)00747-8 [pii]\r10.1016/j.colsurfb.2011.11.054.
- [19] J. Gao, W. Kong, L. Zhou, Y. He, L. Ma, Y. Wang, L. Yin, Y. Jiang, Monodisperse core-shell magnetic organosilica nanoflowers with radial wrinkle for lipase immobilization, *Chem. Eng. J.* 309 (2017) 70–79.
doi:10.1016/j.cej.2016.10.021.
- [20] M.L. Foresti, M.L. Ferreira, Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 769–777.
- [21] V. Bucalá, M.L. Foresti, G. Trubiano, M.L. Ferreira, M. Briozzo, S. Bottini, Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 914–920.
- [22] E.B. Whipple, M. Ruta, Structure of aqueous glutaraldehyde, *J. Org. Chem.* 39 (1974) 1666–1668.
- [23] S. Margel, A. Rembaum, Synthesis and Characterization of Poly(glutaraldehyde). A Potential Reagent for Protein Immobilization and Cell Separation, *Macromolecules.* 13 (1980) 19–24.
- [24] J. ichi Kawahara, T. Ohmori, T. Ohkubo, S. Hattori, M. Kawamura, The structure of glutaraldehyde in aqueous solution determined by ultraviolet absorption and light scattering, *Anal. Biochem.* 201 (1992) 94–98.
- [25] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques.* 37 (2004) 790–802.
- [26] L.C.J. Wade, *Química Orgánica*, 5th ed., Pearson Prentice Hall, Madrid, 2004.
- [27] N.R. Kildeeva, P. a. Perminov, L. V. Vladimirov, V. V. Novikov, S.N.

- Mikhailov, About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde, *Russ. J. Bioorganic Chem.* 35 (2009) 360–369.
doi:10.1134/S106816200903011X.
- [28] G. Bayramoğlu, B. Hazer, B. Altıntaş, M.Y. Arica, Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis, *Process Biochem.* 46 (2011) 372–378.
- [29] D.R. Walt, V.I. Agayn, The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, *TrAC Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 425–430.
doi:10.1016/0165-9936(94)85023-2.
- [30] D.S. Rodrigues, A.A. Mendes, W.S. Adriano, L.R.B. Gonçalves, R.L.C. Giordano, Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 51 (2008) 100–109.
- [31] R.O. Cristóvão, S.C. Silvério, A.P.M. Tavares, A.I.S. Brígida, J.M. Loureiro, R.A.R. Boaventura, E.A. Macedo, M.A.Z. Coelho, Green coconut fiber: a novel carrier for the immobilization of commercial laccase by covalent attachment for textile dyes decolourization., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2012) 2827–38.
- [32] M. Khoobi, S.F. Motevalizadeh, Z. Asadgol, H. Forootanfar, A. Shafiee, M.A. Faramarzi, Synthesis of functionalized polyethylenimine-grafted mesoporous silica spheres and the effect of side arms on lipase immobilization and application, *Biochem. Eng. J.* 88 (2014) 131–141.
doi:10.1016/j.bej.2014.04.009.
- [33] P. Monsan, G. Puzo, H. Mazarguil, Étude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde-protéines, *Biochimie.* 57 (1976) 1281–1292.
doi:10.1016/S0300-9084(76)80540-8.
- [34] F.M. Richards, J.R. Knowles, Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent, *J. Mol. Biol.* 37 (1968) 231–233. doi:10.1016/0022-2836(68)90086-7.
- [35] G. Bassani, B. Farruggia, G. Picó, Cationic polyelectrolytes–lipases

- complexes formation as tool for recovery of these enzymes from their natural sources, *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 351–355.
doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.05.012.
- [36] D.H. Lee, C.H. Park, J.M. Yeo, S.W. Kim, Lipase Immobilization on Silica Gel Using a Cross-linking Method, *J. Ind. Eng. Chem.* 12 (2006) 777–782.
- [37] C.F.J. Yagonia, K. Park, Y.J. Yoo, Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on the surface of modified sol–gel matrix, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 69 (2014) 564–570. doi:10.1007/s10971-013-3257-5.
- [38] J. Sun, Y. Jiang, L. Zhou, J. Gao, Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium, *N. Biotechnol.* 27 (2010) 53–58. doi:10.1016/j.nbt.2009.12.001.
- [39] M. Hofmann, M. Winzer, C. Weber, H. Gieseler, Prediction of Protein Aggregation in High Concentration Protein Solutions Utilizing Protein-Protein Interactions Determined by Low Volume Static Light Scattering, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 1819–1828. doi:10.1016/j.xphs.2016.03.022.
- [40] C. Zhou, W. Qi, E.N. Lewis, J.F. Carpenter, Characterization of Sizes of Aggregates of Insulin Analogs and the Conformations of the Constituent Protein Molecules: A Concomitant Dynamic Light Scattering and Raman Spectroscopy Study, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 551–558. doi:10.1016/j.xphs.2015.10.023.
- [41] Z. Yu, J.C. Reid, Y.-P. Yang, Utilizing Dynamic Light Scattering as a Process Analytical Technology for Protein Folding and Aggregation Monitoring in Vaccine Manufacturing, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 4284–4290. doi:10.1002/jps.23746.
- [42] M. Guauque Torres, M. Foresti, M. Ferreira, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity, *AMB Express.* 3 (2013) 25. doi:10.1186/2191-0855-3-25.
- [43] Novozymes, GRAS Notice 000158: Lipase preparation from *Aspergillus niger* expressing a gene encoding a lipase from *Candida antartica*, (2004) 1–50.
- [44] C.R. Llerena-Suster, L.E. Briand, S.R. Morcelle, Analytical characterization

and purification of a commercial extract of enzymes: A case study, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 121 (2014) 11–20.

- [45] J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T. a Jones, The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*., *Structure*. 2 (1994) 293–308. doi:10.1016/S0969-2126(00)00031-9.
- [46] X. Fang, Y. Zhan, J. Yang, D. Yu, A concentration-dependent effect of methanol on *Candida antarctica* lipase B in aqueous phase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 104 (2014) 1–7. doi:10.1016/j.molcatb.2014.03.002.
- [47] C.C. Gruber, J. Pleiss, Lipase B from *Candida antarctica* binds to hydrophobic substrate–water interfaces via hydrophobic anchors surrounding the active site entrance, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 84 (2012) 48–54. doi:10.1016/j.molcatb.2012.05.012.
- [48] D. Kumar, S. Nagar, I. Bhushan, L. Kumar, R. Parshad, V.K. Gupta, Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 87 (2013) 51–61. doi:10.1016/j.molcatb.2012.10.002.

CAPÍTULO V

Evaluación de la influencia de
3-APTS y GLUT sobre la
actividad de CALB
inmovilizada covalentemente

5.1. Introducción

Como se observó en el capítulo anterior, la inmovilización de CALB sobre MAG-AO-QUIT-GLUT (SOP) resulta en un biocatalizador activo y reutilizable, pero con una estabilidad operacional pobre. Las causas principales de este comportamiento fueron el leaching de moléculas de la enzima débilmente adsorbidas al soporte y el cambio conformacional de la enzima inducido por el exceso de GLUT. Las estrategias posibles para minimizar el fenómeno de leaching son las siguientes: i. disminuir la relación GLUT/MAG-AO-QUIT, y, ii. disminuir la concentración de CALB en la inmovilización para promover su desagregación. La primera opción fue descartada debido a la necesidad de ese exceso de entrecruzante para lograr la decantación del soporte, impidiendo la formación de fluidos coloidales estables. Se adoptó la estrategia ii. y, adicionalmente, se incorporó un agente espaciador, en este caso el 3-aminopropiltriétosisilano (APTS, Figura 5.1). El objetivo de este agregado fue incrementar la distancia entre la enzima y el soporte para minimizar su inactivación. Para asegurar la inmovilización covalente de CALB fue necesario adicionar una segunda capa de GLUT en concentraciones controladas (mucho menores que la empleada para entrecruzar QUIT).

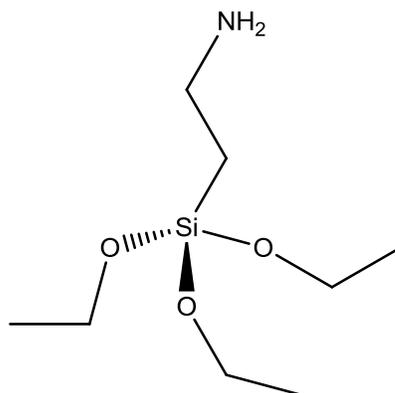


Figura 5.1. Estructura de la molécula de APTS

El GLUT continúa siendo el reactivo más empleado para la fijación de proteínas gracias a la simplicidad de su manipulación, alta reactividad y posibilidad de aplicación a una enorme variedad de soportes naturales o

sintéticos. La superficie a tratar debe contener grupos amino (-NH₂). En muchos casos, los materiales de partida no contienen estos grupos, por lo que son introducidos a partir de moléculas como diaminas [1], 3-APTS [2] o modificación química con amoníaco [3]. De esta manera, el ataque nucleofílico sobre el GLUT (y demás especies derivadas de él) da lugar a aminas secundarias (C-NH-C) además de dobles enlaces C=N. Varios autores han concluido que, en los soportes aminados y activados con GLUT, la inmovilización tiene lugar en dos etapas: una inicial, que involucra la adsorción rápida de la proteína; y otra posterior que incluye la formación del enlace covalente [4,5]. Por esta razón se los ha llamado “matrices heterofuncionales” [6].

Existen numerosos reportes sobre la utilización de APTS reactivo como agente funcionalizante de partículas magnéticas para la posterior inmovilización de proteínas. Kanimozhi y Perinbam acoplaron la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* Lp1 sobre nanopartículas de MAG funcionalizadas con APTS y GLUT. El biocatalizador mantuvo la actividad inicial por 4 ciclos y luego decreció lentamente, mientras que perdió más del 70 % durante 15 días de almacenamiento [2]. El mismo soporte MAG-APTS-GLUT fue aplicado con éxito por Kumar y col. para estudiar la liberación controlada de serratiopeptidasa en ratas [7]. Sojitra y col. inmovilizaron simultáneamente 3 enzimas diferentes (α -amilasa, celulasa y peptidasa) con varias concentraciones de GLUT (12-96 mM). En este caso el entrecruzante fue añadido junto con las enzimas en una suspensión de MAG-APTS. Encontraron que la concentración de GLUT que maximizaba la actividad de las 3 enzimas fue 60 mM (0,6 %)[8].

Este capítulo se orienta a dilucidar el papel que cumplen los aditivos APTS y GLUT en la eficiencia del biocatalizador, su estabilidad operacional y su actividad retenida en función del tiempo de almacenamiento. Para ello se emplearon diferentes proporciones de APTS, GLUT y CALB sobre el soporte estudiado en el capítulo 4. Se realizó un diseño de cribado tendiente a determinar el alcance de cada una de las variables en respuestas seleccionadas. Es real que la literatura abunda en el uso de estos aditivos, pero no están suficientemente estudiados los mecanismos de interacción que permitan comprender y optimizar diferentes estrategias de inmovilización y a su vez aseguren la estabilidad operacional del biocatalizador.

La motivación adicional en este caso fue obtener un catalizador con amplias posibilidades de implementación práctica, incluso capaz de competir con los biocatalizadores comercialmente disponibles. Para alcanzar este objetivo es muy necesaria la comprensión de los aspectos mecanísticos de todo el protocolo de inmovilización.

5.2. Experimental

Se desarrolló un estudio sistemático variando la concentración de los dos modificantes así como la de la lipasa. Se seleccionaron los mejores catalizadores, en términos de su actividad en el primer uso, para evaluar la estabilidad térmica, la estabilidad en el almacenamiento y la capacidad de reutilización.

5.2.1. Selección del diseño de cribado.

Se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV.II (StatPoint Inc.) para diseñar las experiencias y analizar los resultados estadísticamente. En la Tabla 5.1 se muestran los valores seleccionados para las variables independientes y las respuestas a evaluar en función de las mismas.

Tabla 5.1. Variables independientes y respuestas

Variables independientes				Respuestas
Nivel	mg APTS	mg GLUT	mg CALB	X%
-1	0	0	3	CE%
0	200	25	6	AE _{CAT}
+1	400	50	9	AE _{CALB}

La actividad específica se define, en este trabajo, como los mg de AO convertidos por hora y por mg de catalizador (AE_{CAT}), o bien por hora y por mg de lipasa inmovilizada (AE_{CALB}) en las condiciones de reacción establecidas para la esterificación de AO con etanol sin solvente (capítulo II, sección 2.2.2). La carga enzimática (CE %) denota los mg de CALB inmovilizada cada 100 mg de soporte.

Las cantidades nominales de APTS, GLUT y CALB están establecidas para 400, 300 y 200 mg de MAG respectivamente.

En la Tabla 5.2 se detallan las condiciones ingresadas al programa para ejecutar el diseño. La Tabla 5.3 muestra la respuesta del programa en términos

de los posibles diseños a aplicar. A su vez, se definen los términos estadísticos empleados.

Tabla 5.2. Condiciones de borde impuestas al programa

Número de Factores	Puntos Centrales Mínimos por Bloque	Corridas Máximas por Bloque	Sigma Error Exp.	Potencia Deseada	Meta Efecto	Nivel de Confianza
3	1	10	0,5	90,0%	1,5	95,0%

-Factores: variables independientes

-Puntos centrales: corridas hechas al nivel medio de cada uno de los factores, y frecuentemente se replican con el propósito de estimar la magnitud del error experimental.

-Bloque: conjunto de experiencias

-Sigma de error experimental: Se refiere a la desviación estándar σ del error experimental. El error experimental es una medida de la magnitud a la cual los resultados de una simple corrida podría variar si la corrida fuera repetida en las mismas condiciones de los factores experimentales. Mientras más grande sea el error experimental, un mayor número de corridas serán requeridas para estimar un efecto de una magnitud dada. Normalmente se introduce un valor basado en los resultados de experimentos previos. Si ese estimado no está disponible puede fijarse en 1.0. Los “efectos” mostrados serán entonces expresados como un múltiplo de σ .

-Potencia: Una prueba de hipótesis será realizada para determinar si cada efecto es significativamente diferente de cero o no. La Potencia está definida como la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando ésta es falsa.

-Nivel de confianza: Se refiere al nivel de confianza $100(1-\alpha)\%$ usado cuando se construye intervalos de confianza. El valor α es usado también como el nivel del Error Tipo I cuando se prueban hipótesis. El Error Tipo I ocurre cuando la hipótesis nula es falsamente rechazada.

Tabla 5.3. Diseños propuestos por el programa.

Diseño	Corridas	Res.	Puntos Esquina	Puntos Centrales	G.L. Error	Rep.	Bloques	Poten. (%)
Factorial 2^3	12	V+	8	4	5	1	2	92,3
Media fracción saturada 2^3-1	10	III	8	2	6	2	1	93,9

-Resolución: Un diseño de resolución V puede estimar todos los efectos principales y todas las interacciones de dos factores. Un diseño de resolución IV puede estimar todos los efectos principales, sin embargo las interacciones de dos factores se confundirán entre ellos mismos o con efectos de bloque. Resolución III confunde interacciones de dos factores con efectos principales.

-Error grados de libertad: el número de grados de libertad disponible para estimar el error experimental. La potencia de este test estadístico está relacionada con el número de grados de libertad, así como con el número total de ejecuciones en el experimento. Normalmente, al menos deben estar disponibles 3 grados de libertad, aunque siempre es preferible más.

-Réplicas: corridas con las mismas condiciones experimentales

El segundo diseño (2^3-1) fue seleccionado ya que involucra la menor cantidad de experiencias. Es un único bloque de 10 corridas: 8 puntos de esquina y 2 centrales. El diseño de cribado creado por el programa fue aleatorizado y se detalla en la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Diseño experimental aleatorizado

Corrida	APTS	GLUT	CALB
1	0	25	9
2	200	0	6
3	0	50	9
4	0	25	3
5	400	25	3
6	400	50	3
7	400	50	9
8	0	50	3
9	200	0	6
10	400	25	9

5.2.2. Metodologías de modificación del SOP

5.2.2.1. Incorporación de APTS

400 mg de SOP se agitaron magnéticamente (700-800 rpm) durante 24 horas a temperatura ambiente en 4 mL de una solución etanólica de APTS de distintas concentraciones. El sólido se decantó totalmente usando un imán de Nd, el sobrenadante fue descartado y el sólido se lavó 3 veces con 1,5 mL de etanol. A esta formulación se la llamará **SOP_A**.

5.2.2.2. Activación con GLUT

300 mg de SOP_A se agitaron magnéticamente a 700-800 rpm durante 3 horas a 45 °C en 5 mL de una solución acuosa de GLUT de distintas concentraciones. El sólido se decantó totalmente usando un imán de Nd, el sobrenadante fue descartado y el sólido se lavó 3 veces con 1,5 mL de agua. A esta formulación se la llamará **SOP_{AG}**.

5.2.2.3. Inmovilización de CALB

200 mg de SOP_{AG} se agitaron magnéticamente a 700-800 rpm durante 7 horas a temperatura ambiente en 50 mL de una solución acuosa de CALB de distintas concentraciones. El sólido se decantó totalmente usando un imán de Nd, el sobrenadante fue descartado y el sólido se lavó 3 veces con 5 mL de agua. A esta formulación se la llamará **CAT_i**, donde *i* denotará el número de corrida del diseño.

En la Tabla 5.5 se resumen todos los pasos de preparación de cada catalizador. Como se discutirá más adelante, fue necesario realizar dos experiencias adicionales para discernir claramente la influencia de los 3 parámetros estudiados, por lo que el diseño constó de 12 corridas en total. Igualmente, para analizar los resultados, los datos cargados en Statgraphics sólo incluyeron los experimentos 1-10 debido a que el programa no puede evaluar experimentos fuera del dominio experimental original.

Tabla 5.5. Condiciones experimentales de preparación de todos los catalizadores

	400 mg SOP 4 mL etanol 24 horas T ambiente		300 SOP _A 5 mL agua 3 horas 45 °C		200 mg SOP _{AG} 50 mL agua 7 horas T ambiente	
Corrida	mg APTS	Nombre	mg GLUT	Nombre	mg CALB	Nombre
1	0	SOP _{A1}	25	SOP _{AG1}	9	CAT1
2	200	SOP _{A2}	0	SOP _{AG2}	6	CAT2
3	0	SOP _{A3}	50	SOP _{AG3}	9	CAT3
4	0	SOP _{A4}	25	SOP _{AG4}	3	CAT4
5	400	SOP _{A5}	25	SOP _{AG5}	3	CAT5
6	400	SOP _{A6}	50	SOP _{AG6}	3	CAT6
7	400	SOP _{A7}	50	SOP _{AG7}	9	CAT7
8	0	SOP _{A8}	50	SOP _{AG8}	3	CAT8
9	200	SOP _{A9}	0	SOP _{AG9}	6	CAT9
10	400	SOP _{A10}	25	SOP _{AG10}	9	CAT10
11	100	SOP _{A11}	600	SOP _{AG11}	10,4	CAT11
12	0	SOP _{A12}	600	SOP _{AG12}	9	CAT12

5.2.2.4. Reacción test

La medida de conversión para cada catalizador se realizó según el procedimiento descrito en el capítulo II, sección 2.2.2.

5.2.2.5. Determinación de carga enzimática (CE), hierro y silicio

La cantidad de lipasa inmovilizada se estimó mediante la determinación de S por emisión atómica-ICP en los sobrenadantes y lavados de inmovilización. Los fundamentos de la selección de este método frente a los tradicionales basados en UV-V (Bradford, Lowry, etc.) se expondrán exhaustivamente en el capítulo VI. Por esta misma técnica fueron cuantificados hierro y silicio para estimar MAG y APTS.

5.3. Resultados

5.3.1. Caracterización

5.3.1.1. DRIFTS

En la Figura 5.2 se muestran los espectros IR para las muestras SOP_A en las que la concentración de APTS fue cero, es decir que fueron agitadas en etanol puro. El soporte no sufre ningún cambio respecto del estado previo a este tratamiento.

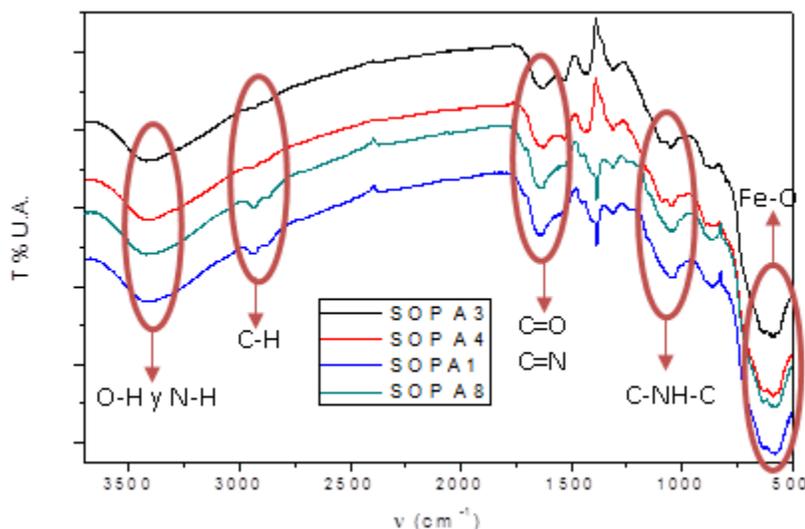


Figura 5.2. Espectros IR de SOP agitado en etanol puro

Aquellas muestras en las que la concentración de APTS fue distinta de cero (Figura 5.3) presentan cambios en la región entre 1200 y 800 cm^{-1} . La contribución de la señal típica del enlace Si-O se observa a 958 cm^{-1} . La banda esperada entre 1200 y 1220 cm^{-1} atribuible a Si-C se superpone con las preexistentes aportadas por los enlaces C-N del QUIT y de la unión GLUT-QUIT.

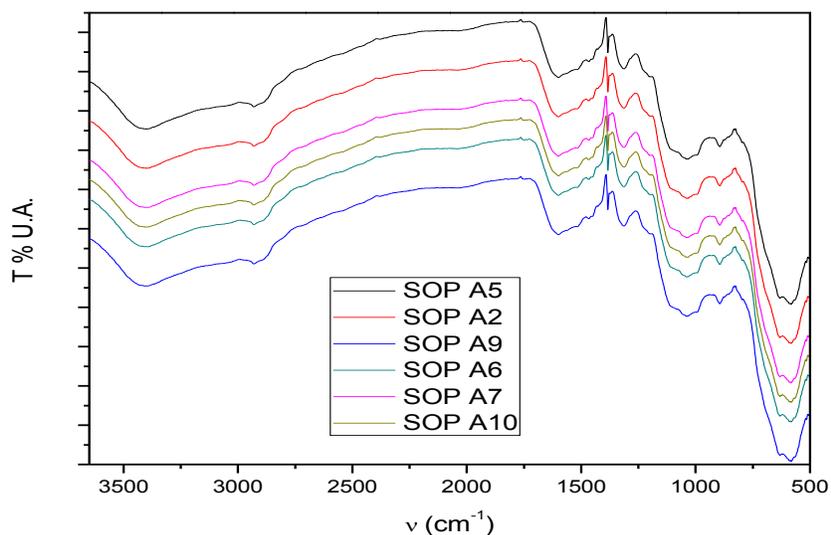


Figura 5.3. Espectros IR de muestras SOP_A

En la Figura 5.4 se señalan las bandas más importantes del APTS.

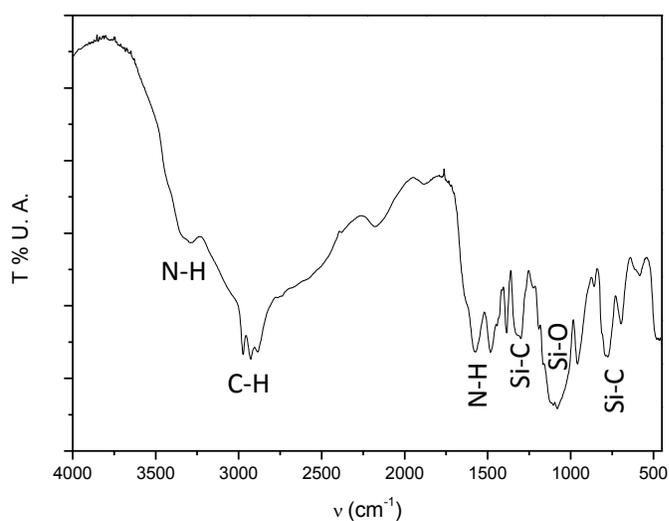


Figura 5.4. Espectro IR de APTS impregnado en KBr.

La banda fina y medianamente intensa observada en algunos espectros a 1380 cm^{-1} corresponde al ion nitrato, comúnmente presente en el KBr comercial [E].

Los soportes SOP_{AG2} y SOP_{AG9} (Figura 5.5) se obtuvieron agitando SOP_{A2} y SOP_{AG9} en agua a 45°C , ya que a estas corridas correspondía un valor cero para la variable GLUT. Este tratamiento no provocó cambios apreciables en los espectros DRIFTS.

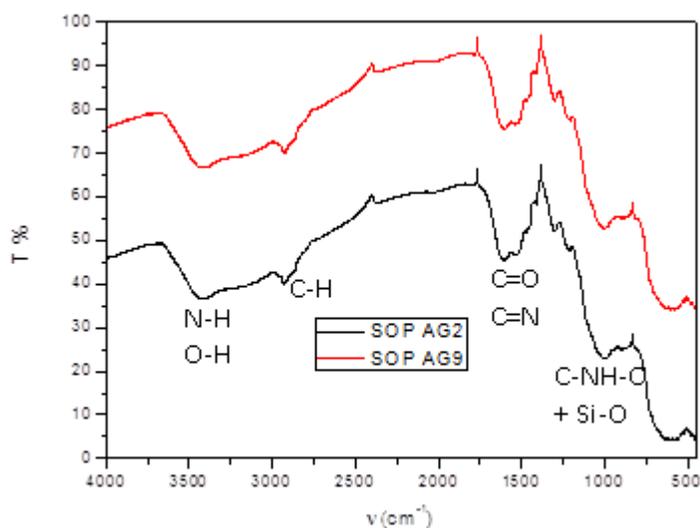


Figura 5.5. Espectros IR de SOP_{AG} sin GLUT.

La incorporación de GLUT sobre las muestras pre-tratadas con APTS (0, 2 y 4 mg/mL) no aporta nuevas señales ya que se suman más enlaces C-N y C=N. En las Figuras 5.6a y 5.6b se muestran las zonas de los espectros DRIFTS correspondientes a las bandas de interés.

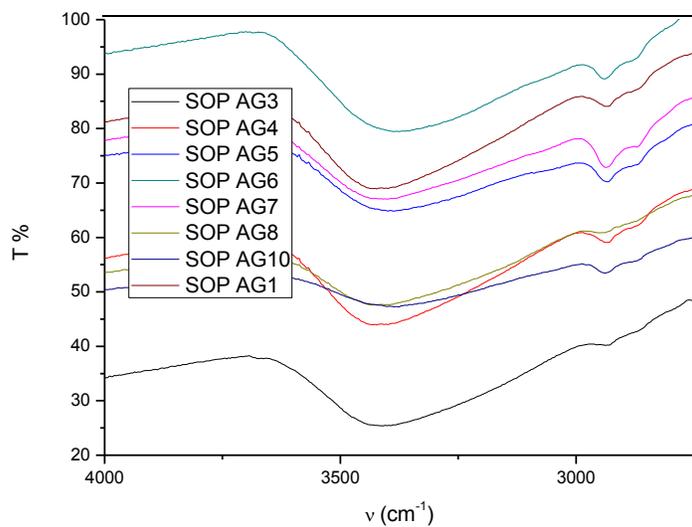


Figura 5.6a Zona de los espectros IR de muestras SOP_{AG} con GLUT correspondientes a la región de absorción de grupos OH y NH

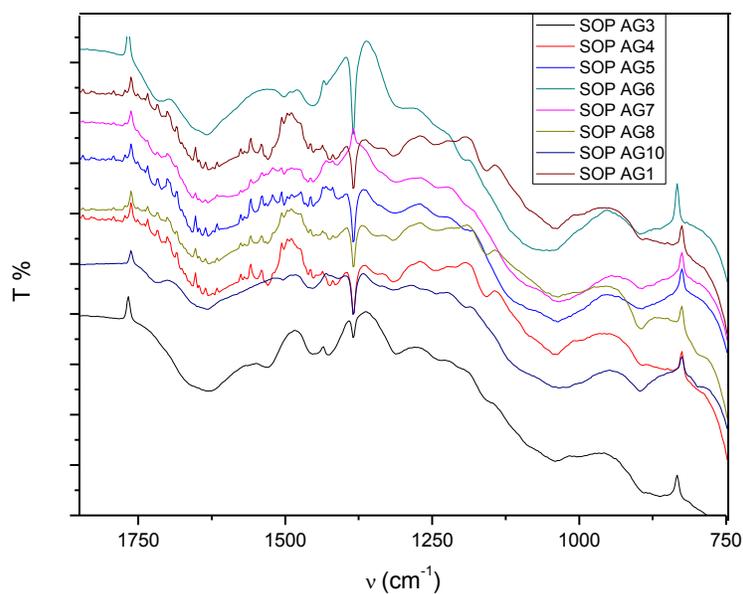


Figura 5.6b. Zona de los espectros IR de muestras SOP_{AG} con GLUT correspondientes a la región de absorción de enlaces C-N, C=N y Si-O

En la etapa de la preparación de los catalizadores donde se realizó la inmovilización de la lipasa, el soporte contenía numerosos modificantes orgánicos cuyas bandas características en el IR se superponen. Por lo tanto, las señales atribuibles al grupo amida de CALB no pueden detectarse claramente en ninguno de los espectros de los catalizadores preparados (Figura 5.7). De ahí que la espectroscopía IR no representa en este caso una técnica útil para confirmar la inmovilización de la lipasa.

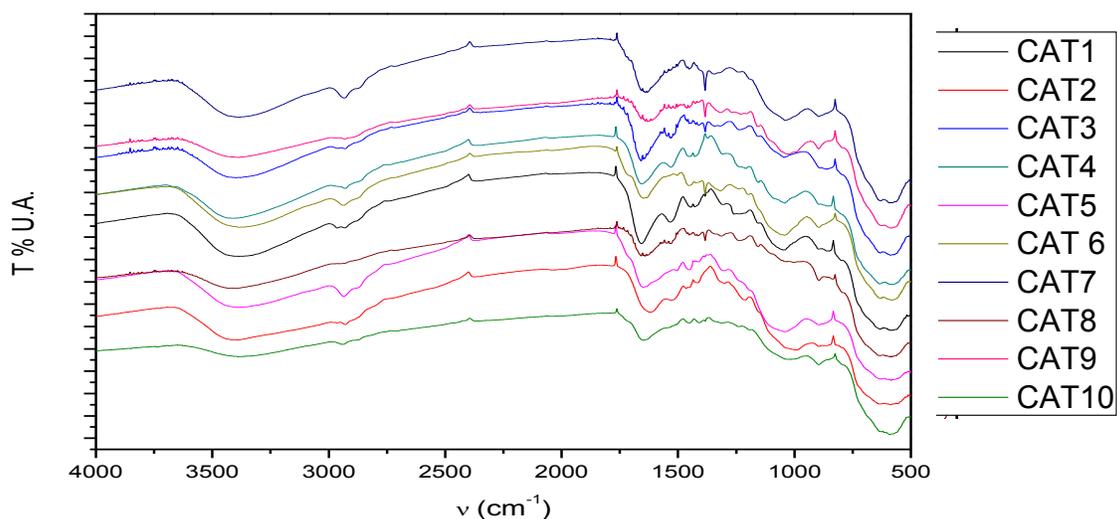


Figura 5.7. Espectros IR de CAT 1 a 10.

Por otro lado, dado el contenido de proteína en el soporte (nunca mayor al 4,5 %) es comprensible que no sea simple la detección, sobre todo por la presencia de bandas comunes con el soporte.

5.3.1.2. Microscopía electrónica y espectroscopía EDX

La técnica SEM combinada con espectroscopía de energías dispersivas de rayos X (EDX) permitió reconocer la presencia de silicio en aquellas muestras seleccionadas tratadas con APTS. Las barras de escala corresponden a 10 micras.

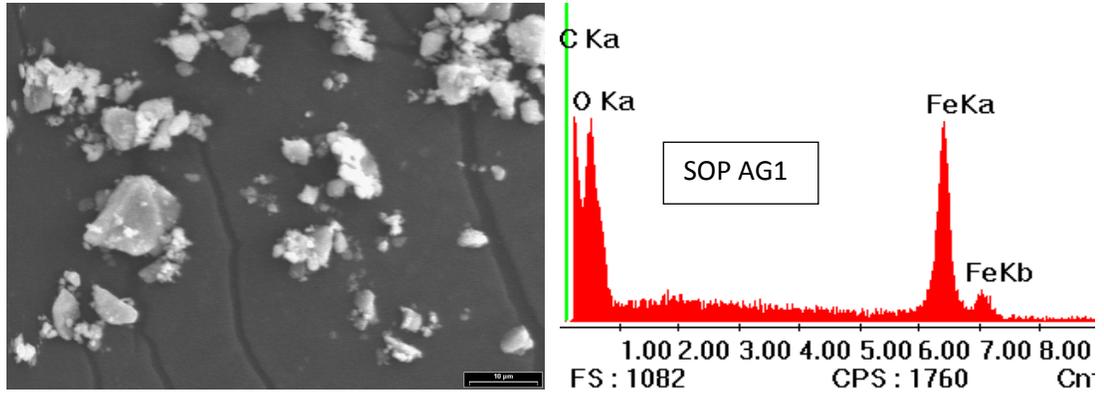


Figura 5.8. Micrografia SEM y espectro EDX de SOP_{AG1}

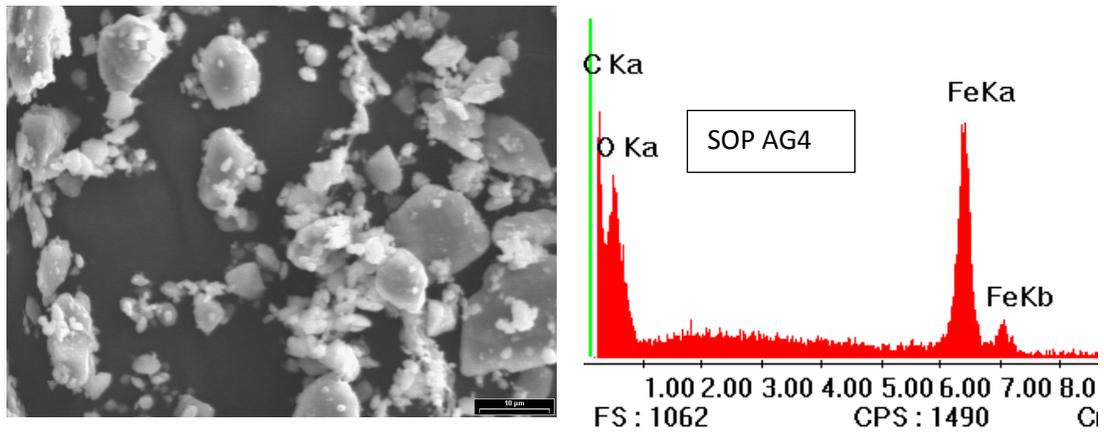


Figura 5.9. Micrografia SEM y espectro EDX de SOP_{AG4}

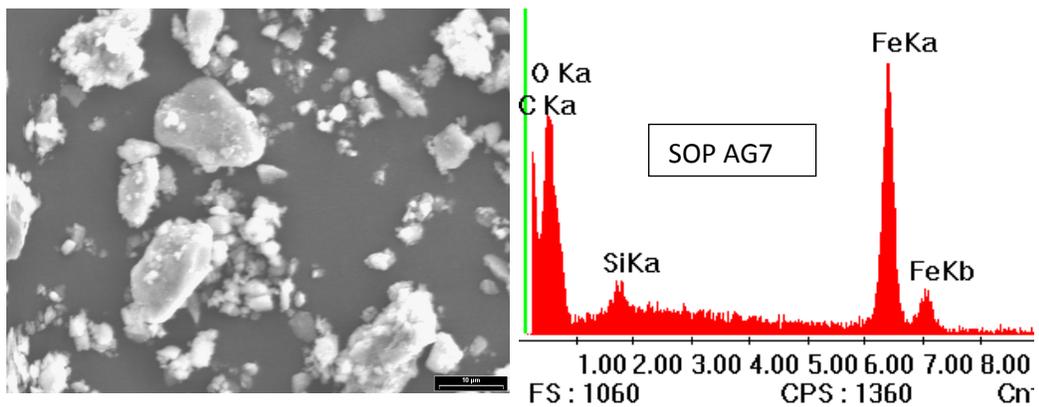


Figura 5.10. Micrografia SEM y espectro EDX de SOP_{AG7}

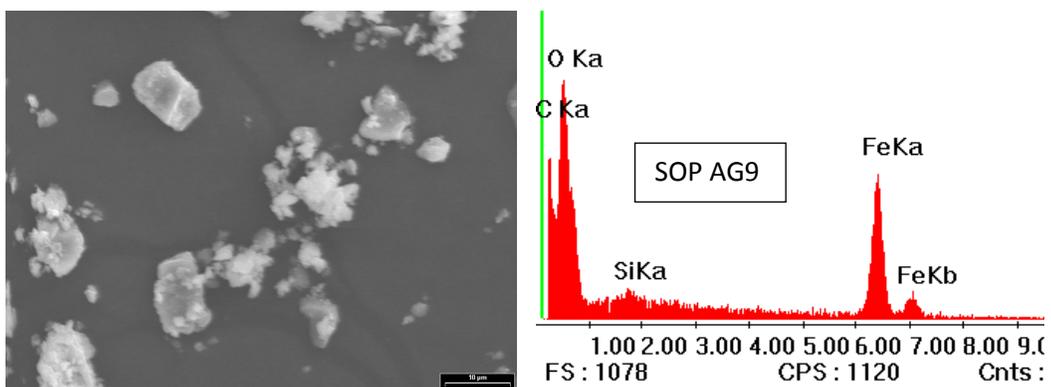


Figura 5.11. Micrografia SEM y espectro EDX de SOP_{AG9}

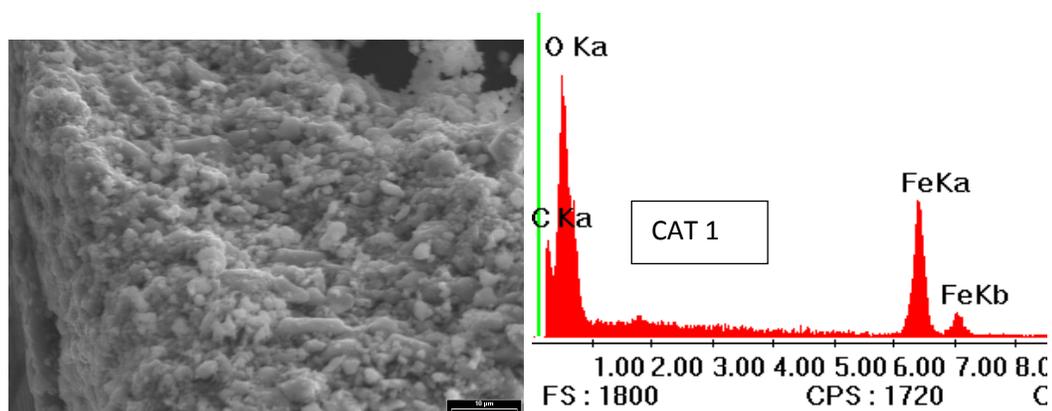


Figura 5.12. Micrografia SEM y espectro EDX de CAT 1

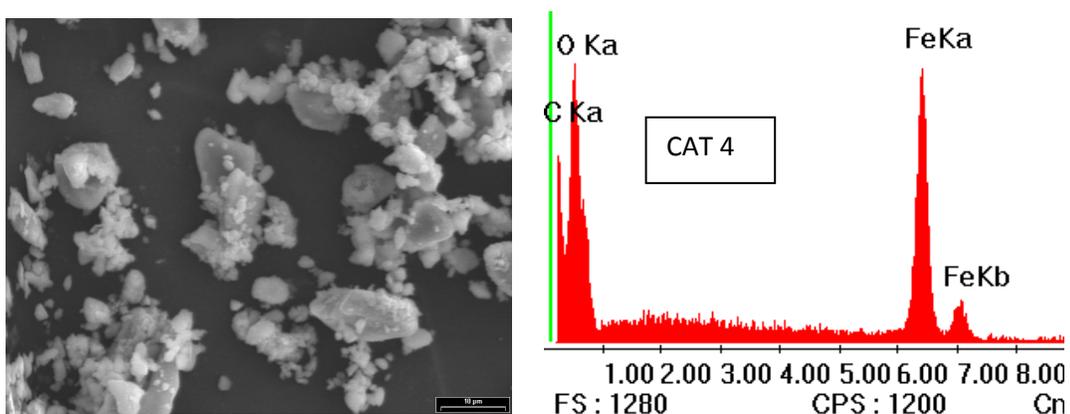


Figura 5.13. Micrografia SEM y espectro EDX de CAT 4

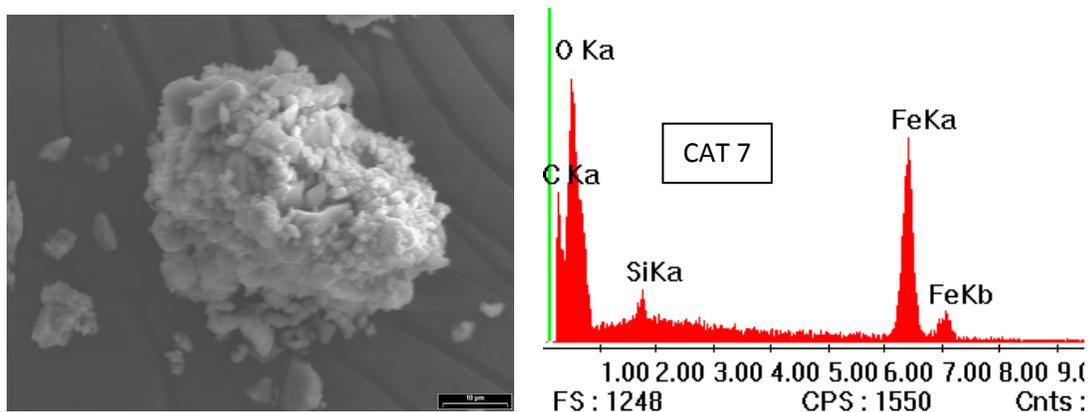


Figura 5.14. Micrografía SEM y espectro EDX de CAT 7

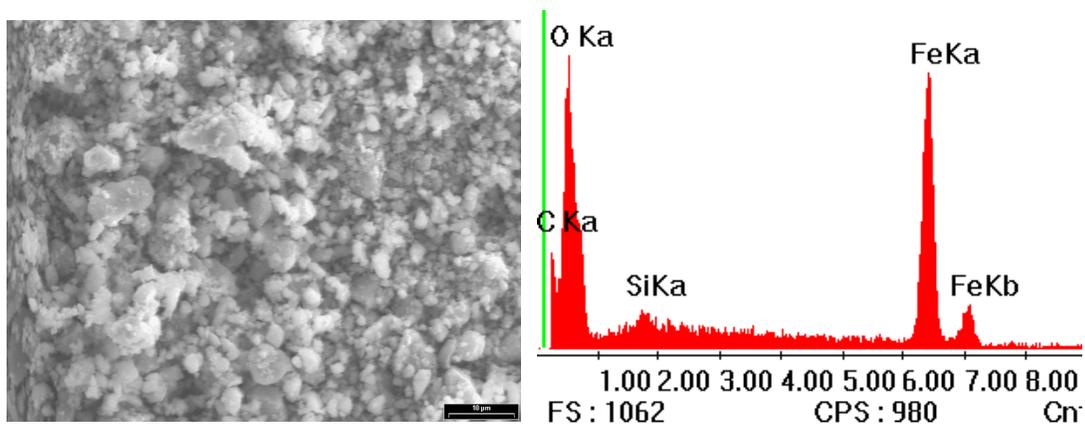


Figura 5.15. Micrografía SEM y espectro EDX de CAT 9

Las muestras fueron caracterizadas también por TEM. Se observaron cambios en la agregación de las partículas del soporte, en función del contenido de CALB. El CAT con mayor concentración de proteína presenta mayores niveles de agregación (CAT7) que los que contiene menor proporción de CALB (CATs 1 y 9).

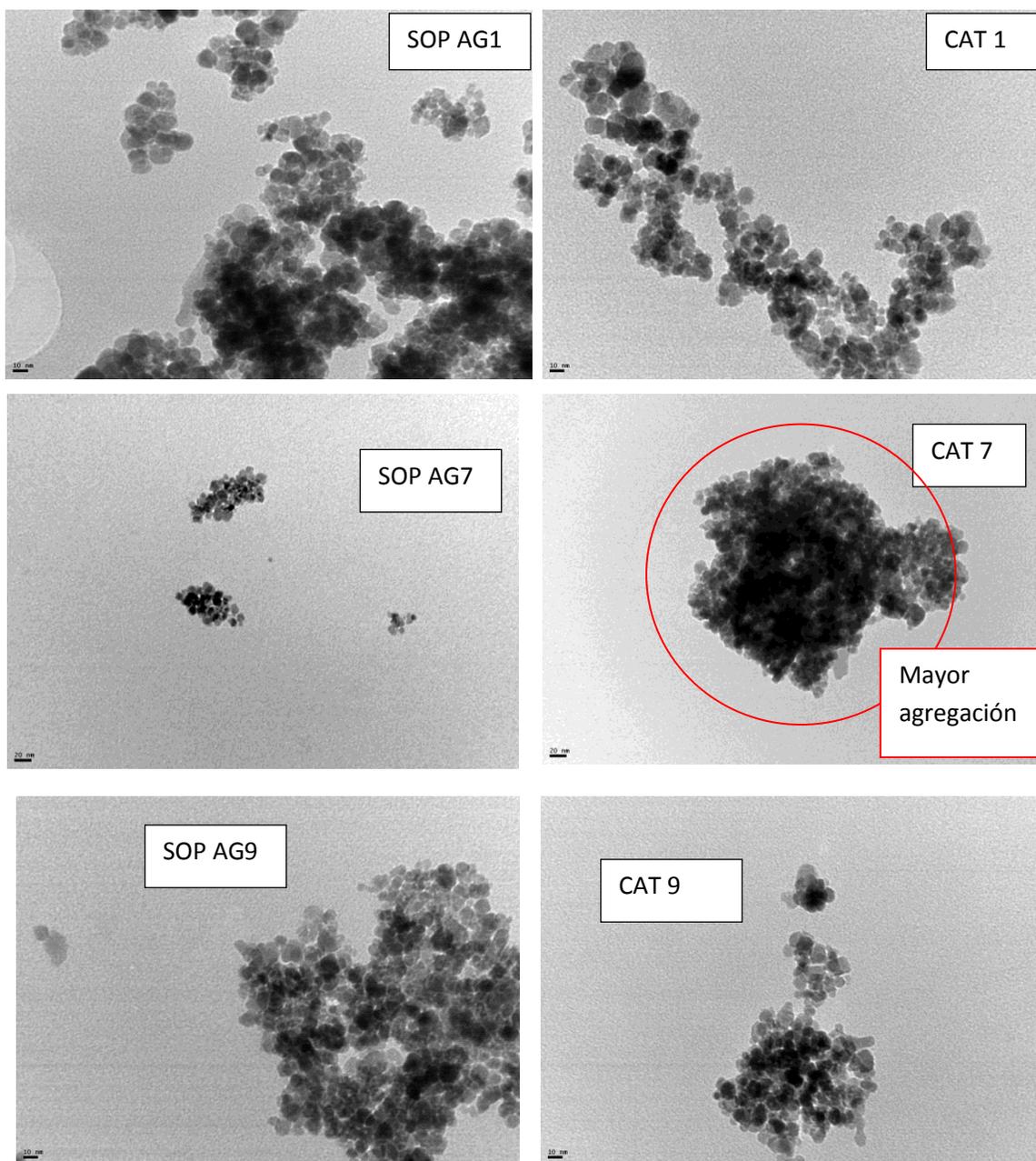


Figura 5.16. Micrografías TEM de muestras seleccionadas SOP_{AG} y CAT. Las barras en las esquinas inferiores izquierdas equivalen a 20 nm.

Esto implica que aún cantidades inferiores al 4,5 % de proteína en el sólido afectan la agregación de los biocatalizadores.

5.3.1.3. DLS

En la Figura 5.17 se comparan los diámetros hidrodinámicos de los diferentes catalizadores. La línea horizontal marca el DH de la muestra SOP, precursora de todos.

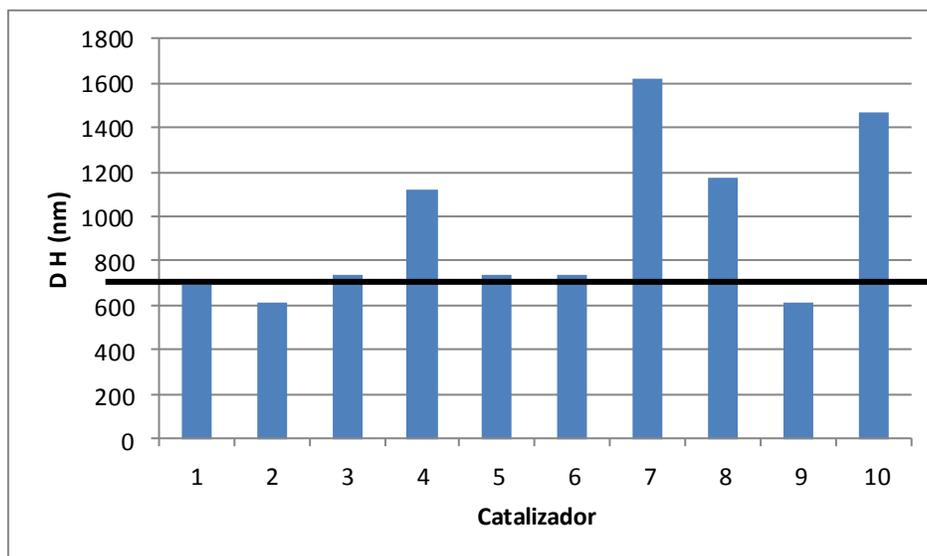


Figura 5.17. Diámetros hidrodinámicos de los distintos CATs.

5.3.1.4. Composición de los CAT mediante EA-ICP

En la Tabla 5.6 se detallan los porcentajes en peso de Fe y Si de cada catalizador. En base a estos datos se calculó la composición en términos de porcentaje de MAG y APTS.

Tabla 5.6. Porcentajes en peso de MAG y APTS en muestras CAT

	Catalizador									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
%Fe	39	45	62	62	52	51	47	50	49	44
%Fe₃O₄	54	62	85	86	72	71	64	70	68	61
%Si	trazas	1,4	trazas	trazas	0,98	0,57	0,65	trazas	0,55	0,23
%APTS	0	11,3	0	0	7,7	4,5	5,1	0	4,3	1,8

5.3.2. Actividad catalítica

5.3.2.1. Variabilidad de respuestas con APTS, GLUT y CALB

Las cuatro respuestas evaluadas para cada CAT se muestran en la Tabla 5.7. Estos valores obtenidos experimentalmente fueron introducidos en el software y analizados separadamente por respuesta.

Tabla 5.7. Respuestas del diseño experimental

CAT	X %	CE %	AE _{CAT}	AE _{CALB}
1	39	2,2	4,19	6,30
2	4	2,1	0,42	0,66
3	35	2,6	3,81	4,73
4	33	1,5	3,53	7,55
5	10	0,7	1,15	5,25
6	16	0,6	1,86	9,89
7	39	3,0	4,11	4,49
8	22	0,9	2,34	7,96
9	3	2,5	0,32	0,42
10	36	3,4	3,8	3,69

5.3.2.1.1. Conversión

La Tabla 5.8 muestra las estimaciones para cada uno de los efectos y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual contempla el error de muestreo. El factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 2,0. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o superiores, normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Tabla 5.8. Errores estándar basados en el error total con 3 g.l. para X%

Efecto promedio	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
	21,6	3,9	
A:APTS	-13,0	12,2	2,0
B:GLUT	20,6	10,3	1,0
C:CALB	16,0	12,2	2,0
AB	12,0	17,2	2,0
AC	7,5	8,6	1,0
BC	2,0	17,2	2,0

VIF= Factor de inflación de varianza

La Figura 5.18 muestra la significancia estadística de cada variable independiente así como la interacción entre ellas (diagrama de Pareto).

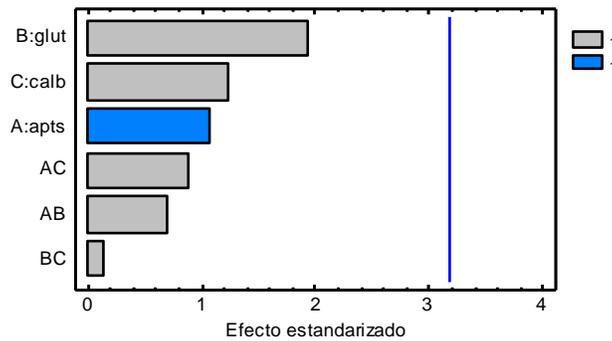


Figura 5.18. Diagrama de Pareto estandarizado para X%

El ANOVA (Tabla 5.9) particiona la variabilidad de conversión en piezas separadas para cada uno de los efectos. Prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, ningún efecto tiene un valor P menor que 0,05, indicando que no son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado (considerando todos los efectos), explica sólo el 76,6 % de la variabilidad en conversión.

Tabla 5.9. Análisis de Varianza para conversión. $R^2 = 76,6 \%$

Fuente	Suma de Cuadrados	G.l.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:APTS	169,0	1	169,0	1,14	0,3641
B:GLUT	592,457	1	592,457	3,99	0,1396
C:CALB	256,0	1	256,0	1,73	0,2804
AB	72,0	1	72,0	0,49	0,5362
AC	112,5	1	112,5	0,76	0,4480
BC	2,0	1	2,0	0,01	0,9149
Error total	445,143	3	148,381		
Total	1900,1	9			

(correlación)

Para explicar la variabilidad de X% fue necesario considerar a CE% como una variable independiente y a GLUT como parámetro significativo. De esta manera, se obtuvo un modelo matemático capaz de ajustarse adecuadamente a los datos experimentales. La dependencia de X% con estos parámetros es descrita por la Ecuación 5.1. El valor R^2 fue 96,2. El máximo se ubica en CE= 2,1% y GLUT= 38 mg (nominal). La Figura 5.18 es la superficie de respuesta que representa a la Ecuación 5.1.

Ecuación 5.1. Conversión en función de mg de GLUT nominales y carga enzimática.

$$X\% = -39,5 + 33,7*CE\% - 6,45*(CE\%)^2 + 2,04*GLUT - 0,0268*(GLUT)^2$$

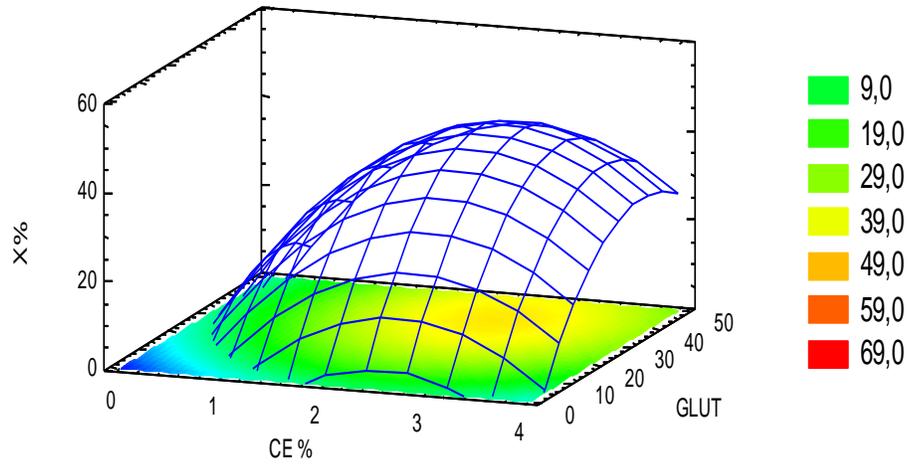


Figura 5.19. Superficie de respuesta X% vs. CE% y mg de GLUT nominal.

En la Figura 5.20 se observa la correlación entre los valores experimentales de conversión y los predichos por la Ecuación 5.1 en función de la carga enzimática obtenida.

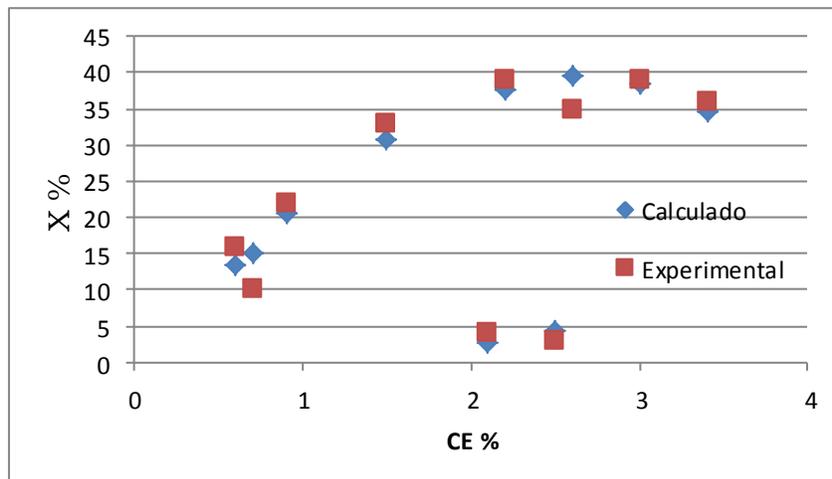


Figura 5.20. Conversión experimental y calculada vs. carga enzimática.

5.3.2.1.2. Carga enzimática

La Tabla 5.10 muestra las estimaciones para cada uno de los efectos y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos. El factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 2,0.

Tabla 5.10. Errores estándar basados en el error total con 3 g.l. para CE%

Efecto promedio	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
A:APTS	0,2	0,321	2,0
B:GLUT	-0,5	0,271	1,0
C:CALB	1,7	0,321	2,0
AB	-0,15	0,454	2,0
AC	0,675	0,227	1,0
BC	0,35	0,454	2,0

La Figura 5.21 muestra la significancia estadística de cada variable independiente así como la interacción entre ellas.

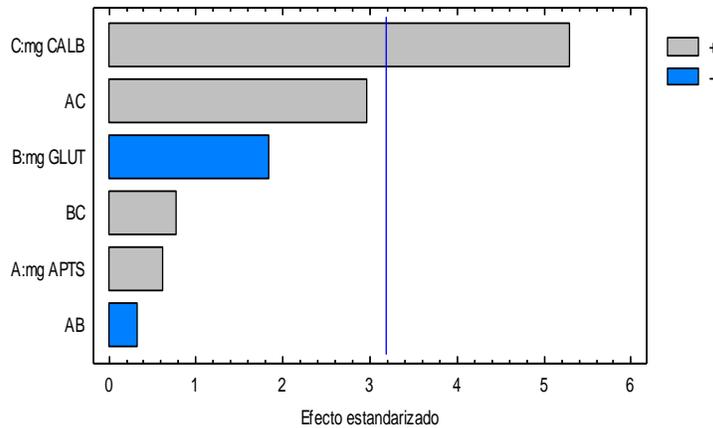


Figura 5.21. Diagrama de Pareto estandarizado para CE%

El ANOVA para CE% se detalla en la Tabla 5.11. En este caso, el efecto CALB tiene un valor P menor que 0,05, indicando que es significativamente diferente de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 5.11. Análisis de Varianza para carga enzimática. R² = 96,4 %

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:mg APTS	0,04	1	0,04	0,39	0,5772
B:mg GLUT	0,35	1	0,35	3,40	0,1624
C:mg CALB	2,89	1	2,89	28,08	0,0131
AB	0,01125	1	0,01125	0,11	0,7627
AC	0,91125	1	0,91125	8,85	0,0588
BC	0,06125	1	0,06125	0,60	0,4966
Error total	0,30875	3	0,102917		
Total (corr.)	8,705	9			

El estadístico R² indica que el modelo, así ajustado (considerando todos los efectos), explica 96,4% de la variabilidad en CE%. El modelo matemático que describe la variabilidad de CE% es la Ecuación 5.2 y es representado gráficamente por la Figura 5.22. Esta superficie no contiene máximos en el dominio experimental explorado (no es convergente).

Ecuación 5.2 Variabilidad predicha de carga enzimática con cantidades nominales de CALB y GLUT

$$CE\% = 1,11 + 0,0256 \cdot (\text{mg CALB})^2 - 0,000213 \cdot (\text{mg GLUT})^2$$

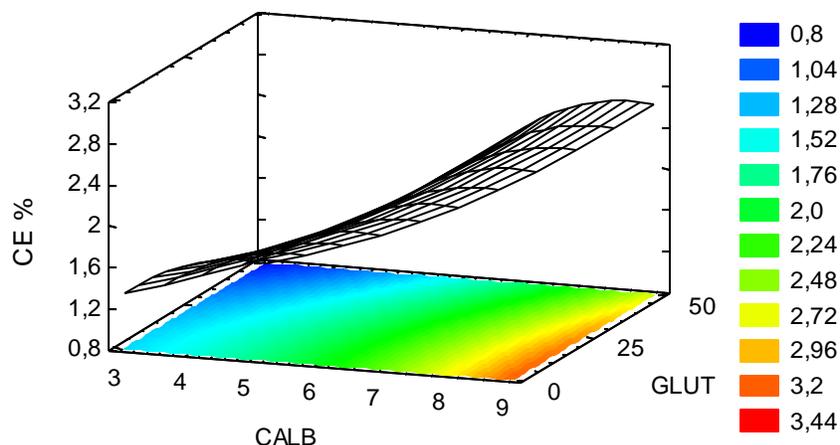


Figura 5.22. Superficie de respuesta de CE% vs. CALB y GLUT nominales.

5.3.2.1.3. Actividad específica por unidad de masa de catalizador

La Tabla 5.12 muestra las estimaciones para cada uno de los efectos y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos. El factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 2,0.

Tabla 5.12. Errores estándar basados en el error total con 3 g.l.

<i>Efecto</i> promedio	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
A:apts	-1,385	1,305	2,0
B:glut	2,241	1,103	1,0
C:calb	1,655	1,305	2,0
AB	1,295	1,846	2,0
AC	0,692	0,923	1,0
BC	0,205	1,846	2,0

La Figura 5.23 muestra la significancia estadística de cada variable independiente así como la interacción entre ellas.

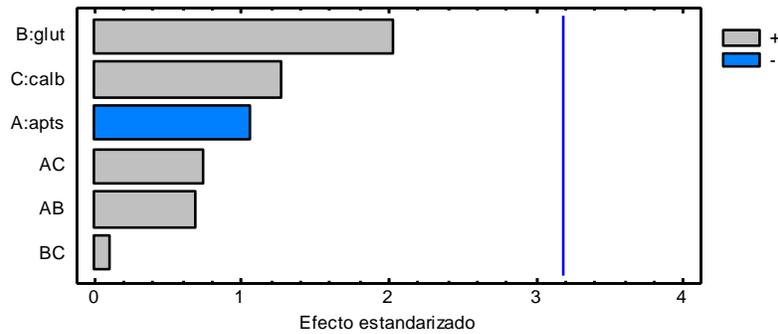


Figura 5.23. Diagrama de Pareto para AE_{CAT}

El ANOVA para AE_{CAT} se detalla en la Tabla 5.13. Como en el caso de X%, ningún efecto tiene un valor-P menor que 0,05, indicando que no son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R² indica que el modelo, así ajustado (considerando todos los efectos), permite justificar sólo el 75,9% de la variabilidad en AE_{CAT}.

Tabla 5.13. Análisis de Varianza para AE_{CAT}.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:apts	1,91822	1	1,91822	1,13	0,3665
B:glut	7,02912	1	7,02912	4,13	0,1352
C:calb	2,73903	1	2,73903	1,61	0,2943
AB	0,838513	1	0,838513	0,49	0,5335
AC	0,959112	1	0,959112	0,56	0,5075
BC	0,0210125	1	0,0210125	0,01	0,9186
Error total	5,11043	3	1,70348		
Total (corr.)	21,2236	9			

Nuevamente, fue necesario considerar en una regresión múltiple a CE% como variable independiente y a GLUT como parámetro significativo. Esto

permitió obtener un modelo que explica satisfactoriamente la variabilidad de AE_{CAT} (Ecuación 5.3), y todos los parámetros son significativos ($p < 0,05$, Tabla 5.14).

Tabla 5.14. Regresión múltiple para AE_{CAT} vs. CE% y GLUT

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	-1,69	0,701	-2,404	0,0530
CE%	0,894	0,228	3,920	0,0078
GLUT	0,186	0,039	4,754	0,0031
GLUT ²	-0,00247	0,0007	-3,544	0,0122

Ecuación 5.3. Variabilidad de AE_{CAT} con CE% y GLUT nominal

$$AE_{CAT} = -1,69 + 0,894*CE\% + 0,186*GLUT - 0,00247*GLUT^2$$

Puesto que el valor-P en el ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0% (Tabla 5.15).

Tabla 5.15. ANOVA para AE_{CAT} vs. CE% y GLUT. $R^2 = 87,7 \%$.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	18,6201	3	6,20671	14,30	0,0038
Residuo	2,60348	6	0,433914		
Total (Corr.)	21,2236	9			

La Ecuación 5.3 es representada en la Figura 5.24.

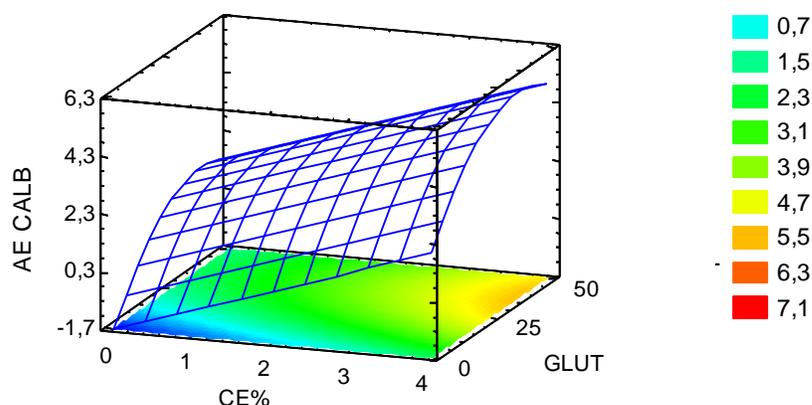


Figura 5.24. Superficie de respuesta AE_{CAT}

5.3.2.1.4. Actividad específica por unidad de masa de CALB inmovilizada

La Tabla 5.16 muestra las estimaciones para cada uno de los efectos y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos. El factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 2,0.

Tabla 5.16. Errores estándar basados en el error total con 3 g.l.

	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
Efecto promedio	140,774	17,6774	
A:apts	-74,94	54,0052	2,0
B:glut	179,564	45,6427	1,0
C:calb	-48,37	54,0052	2,0
AB	95,385	76,3749	2,0
AC	-16,8325	38,1875	1,0
BC	-94,775	76,3749	2,0

La Figura 5.25 muestra la significancia estadística de cada variable independiente así como la interacción entre ellas.

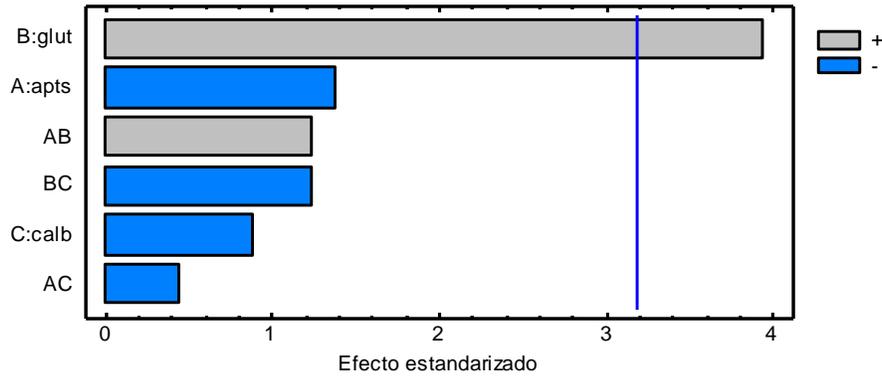


Figura 5.25. Diagrama de Pareto para AE_{CALB}

El ANOVA (Tabla 5.17) calcula que, en este caso, GLUT tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que es significativamente diferente de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R² indica que el modelo, así ajustado (considerando todos los efectos), justifica el 89,5 % de la variabilidad en AE_{CALB}.

Tabla 5.17. Análisis de Varianza para AE_{CALB}. R² = 89,5 %

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:apts	5616,0	1	5616,0	1,93	0,2594
B:glut	45140,7	1	45140,7	15,48	0,0292
C:calb	2339,66	1	2339,66	0,80	0,4364
AB	4549,15	1	4549,15	1,56	0,3003
AC	566,666	1	566,666	0,19	0,6892
BC	4491,15	1	4491,15	1,54	0,3028
Error total	8749,69	3	2916,56		
Total (corr.)	83321,2	9			

La regresión múltiple que permitió obtener un modelo con el máximo ajuste fue la Ecuación 5.4, que surge de considerar a CE% como variable independiente (Tabla 5.18). Esta función se grafica en la Figura 5.26.

Ecuación 5.4. Variabilidad de AECALB con GLUT y CE%

$$AE_{CALB} = 3,92 - 0,00306*GLUT^2 + 0,262*GLUT - 1,47*CE\%$$

Tabla 5.18. Coeficientes y valores P del modelo AE_{CALB} (Ec. 4.4)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimación</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Estadístico T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	3,92366	1,41033	2,78208	0,0319
GLUT ²	-0,00306404	0,00140277	-2,18427	0,0716
GLUT	0,262305	0,0787451	3,33106	0,0158
CE%	-1,47115	0,458569	-3,20814	0,0184

El ANOVA (Tabla 5.19) tuvo un valor menor que 0,05, por lo que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0%.

Si bien el coeficiente del término cuadrático para la variable GLUT tuvo un valor $P > 0,05$ (ver Tabla 5.18) no se eliminó del modelo ya que su exclusión arrojaba un R^2 de apenas 76%.

Tabla 5.19. ANOVA de AE_{CALB} . $R^2 = 87,3 \%$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	72,1819	3	24,0606	13,72	0,0043
Residuo	10,5195	6	1,75326		
Total (Corr.)	82,7014	9			

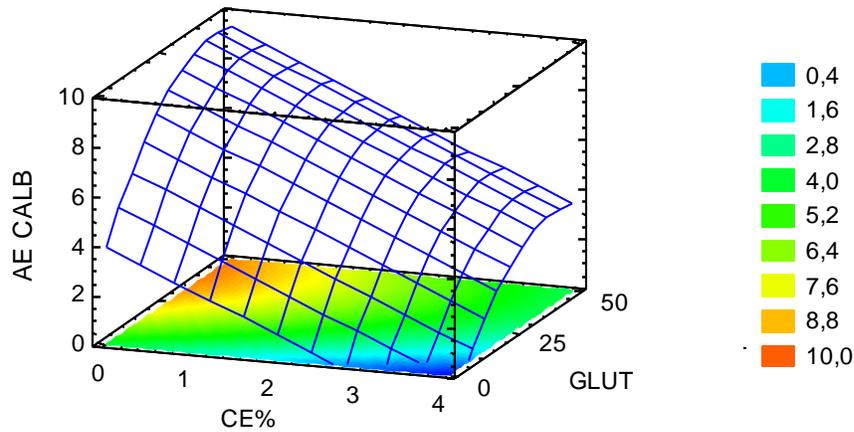


Figura 5.26. Superficie de respuesta para AE_{CALB} .

5.3.2.1.5. Optimización de todas las respuestas

Este procedimiento es útil para determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas. Lo hace maximizando la función de 'deseabilidad'. A partir de los modelos establecidos para cada respuesta, los mismos fueron combinados con la meta de maximizarlas. El programa codifica los valores de cada salida entre 0 y 1 y devuelve una función dependiente de dos variables elegidas (en este caso APTS y GLUT) para un valor medio de la tercera (CALB).

La Tabla 5.20 detalla la deseabilidad calculada y observada para cada corrida. En la Figura 5.27 se muestra la superficie de respuesta estimada para deseabilidad.

Tabla 5.20. Deseabilidad prevista por los modelos y observada experimentalmente.

<i>Fila</i>	<i>X%</i>	<i>CE%</i>	<i>AE_{CAT}</i>	<i>AE_{CALB}</i>	<i>Deseabilidad Prevista</i>	<i>Deseabilidad Observada</i>
1	39,0	2,2	4,19	6,30	0,734038	0,814106
2	4,0	2,1	0,42	0,66	0,288035	0,0860159
3	35,0	2,6	3,81	4,73	0,783784	0,758538
4	33,0	1,5	3,53	7,55	0,568034	0,724412
5	10,0	0,7	1,15	5,25	0,112405	0,285568
6	16,0	0,6	1,86	9,89	0,42248	0,428086
7	39,0	3,0	4,11	4,49	0,840599	0,804644
8	22,0	0,9	2,34	7,96	0,626414	0,526713
9	3,0	2,5	0,32	0,42	0,288035	0,0
10	36,0	3,4	3,8	111,87	0,550516	0,735002

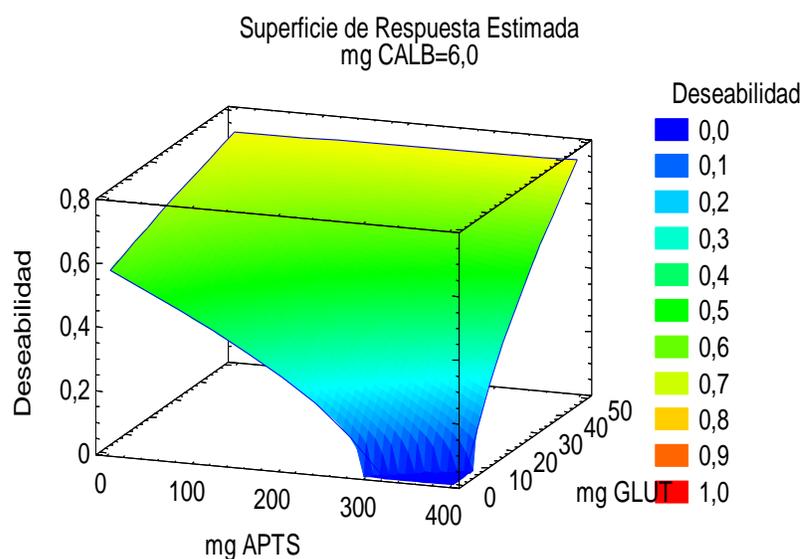


Figura 5.27. Superficie de respuesta para Deseabilidad con CALB constante igual a 6 mg nominal.

5.3.2.2. Estabilidad térmica y operacional.

El catalizador que permitió obtener el mejor valor de conversión (CAT7) fue seleccionado para evaluar su comportamiento a una temperatura mayor y utilizando nuevas relaciones de masa CAT/AO en la reacción test. En la Figura 5.28 se muestran los resultados obtenidos a partir de este análisis.

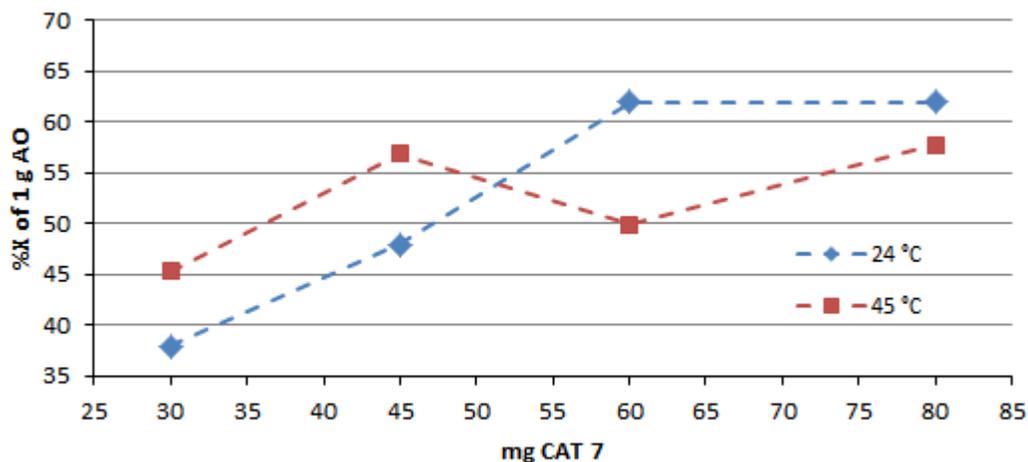


Figura 5.28. X% con masas variables de CAT 7 a 24 y 45 °C.

Es interesante destacar que a cantidades menores a 50 mg la actividad es mayor a 45 °C mientras que es menor a cantidades mayores a 50 mg. Esto indica un impacto potencial de la temperatura en la agregación del biocatalizador.

Se estudió la performance del catalizador CAT7 en sucesivos ciclos de reuso usando 60 mg de CAT por g de AO a 24 °C. Los valores de X% se aprecian en la Figura 5.29.

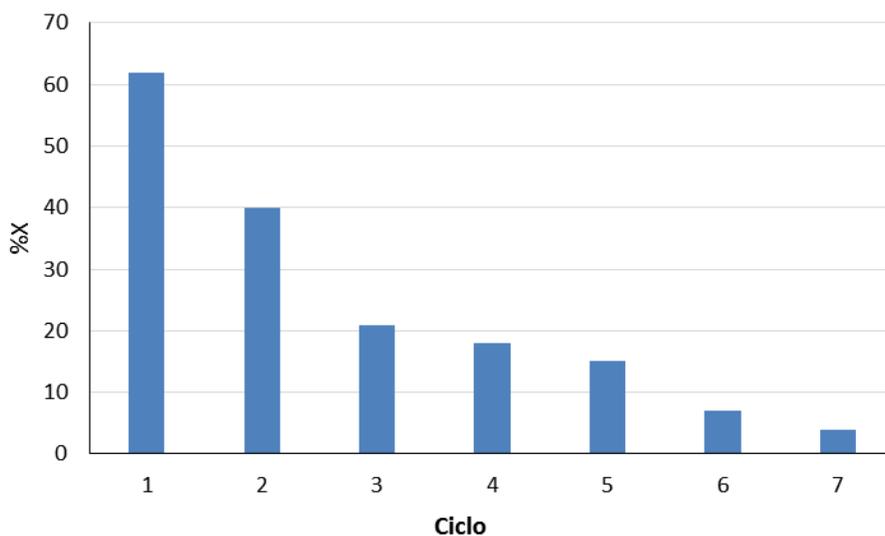


Figura 5.29. X% con 60 mg de CAT7 a T ambiente.

5.3.2.3. Retención de actividad en almacenamiento

Se realizaron medidas de conversión usando CAT7 luego de dos meses de su preparación. Durante ese tiempo el biocatalizador sin uso había sido almacenado en heladera a 4°C. Se obtuvo un valor de X% un 25 % más bajo que el inicial.

Este mismo ensayo fue realizado para el CAT4 cuya única diferencia con el 7 es la ausencia de APTS. En este caso la conversión obtenida luego de 60 días fue prácticamente nula. Los CATs 11 y 12 retuvieron el 90 y 100 % de actividad inicial respectivamente (ver Figura 5.30).

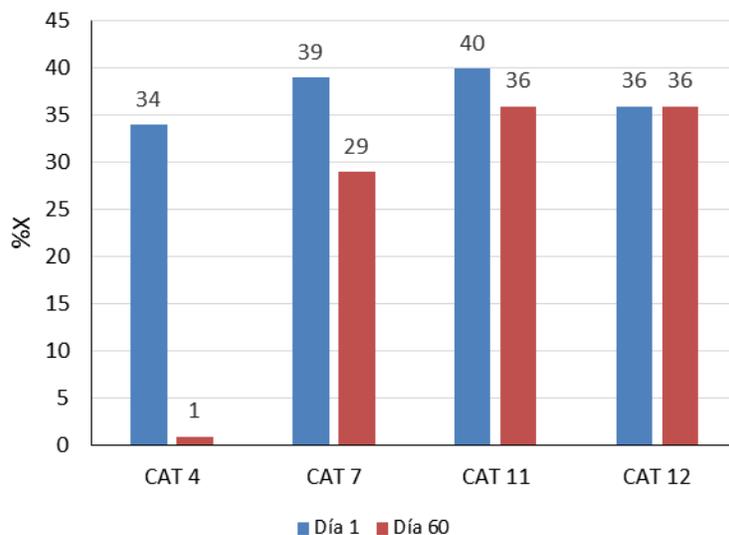


Figura 5.30. X% inicial de CATs seleccionados y luego de 2 meses de almacenamiento.

5.4. Discusión

5.4.1. Influencia de APTS

El APTS tiene la posibilidad de reaccionar con la superficie del material SOP de dos formas diferentes:

- i- a través de los grupos etoxi con los oxhidrilos del QUIT o del hemiacetal cíclico (ver capítulo 4, Fig. 4.9), quedando propilaminos expuestos
- ii- a través del grupo amino con sitios electrofílicos de GLUT, quedando expuestos grupos trietoxisilano.

En las corridas 2 y 9 del diseño experimental (réplicas), la lipasa fue inmovilizada directamente sobre SOP_A (ver Tabla 5.4). A pesar de que su carga enzimática es comparable con la de otros catalizadores, los CATs 2 y 9 resultaron inactivos. Este fenómeno puede explicarse por el acoplamiento de CALB en una conformación inactiva, o bien con el sitio activo inaccesible para el sustrato. Se puede inferir que existiría una contribución de los dos fenómenos. Los resultados de estas dos réplicas fueron reproducibles.

Las cadenas laterales de dos de los aminoácidos que constituyen el sitio activo (Figura 5.31, A y C) contienen grupos funcionales que pueden interactuar tanto con -NH_2 como -Si(OEt)_3 .

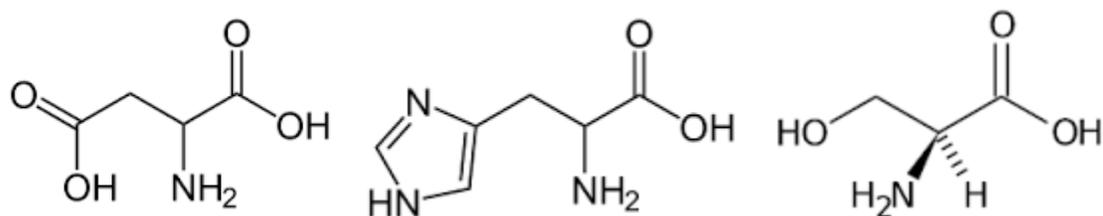
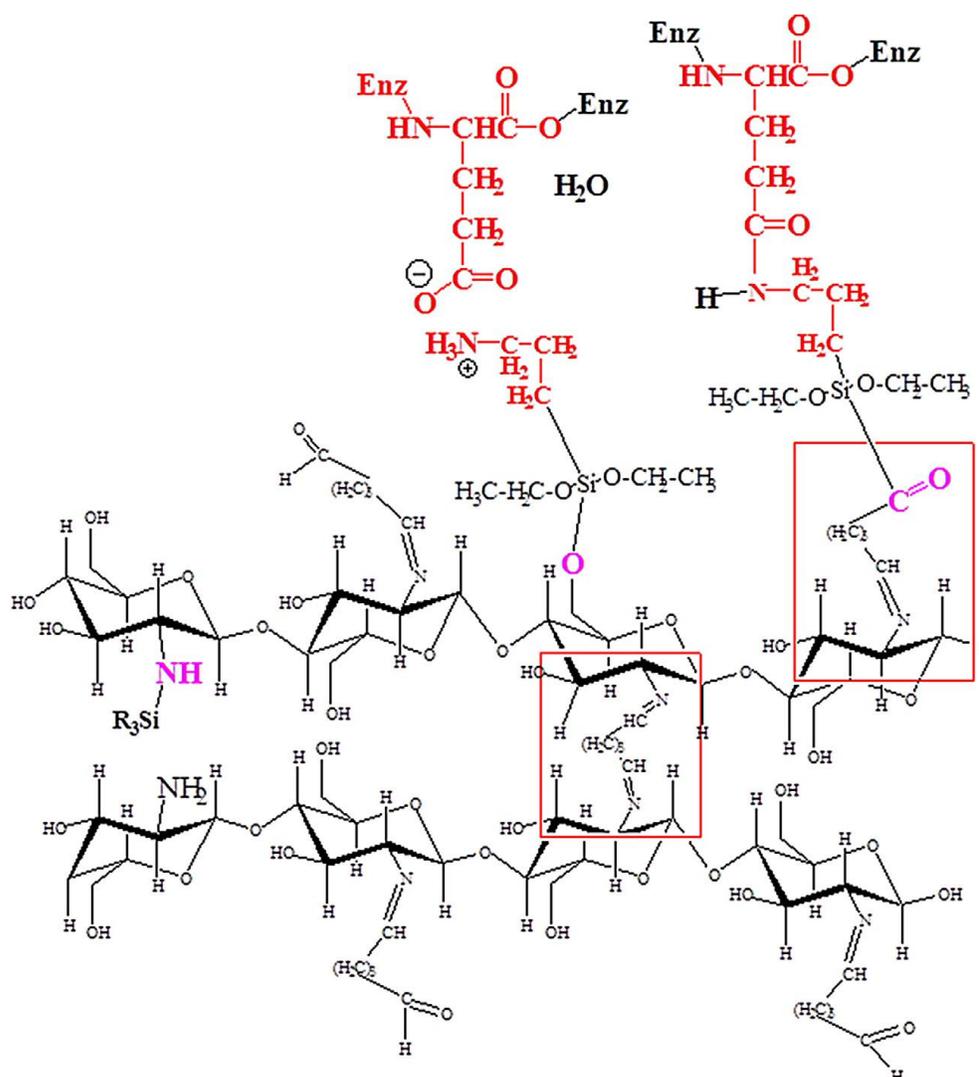


Figura 5.31. A) Ácido aspártico, B) Histidina, C) Serina

La drástica caída de actividad en estos casos es atribuible a interacciones iónicas y covalentes que pueden tener lugar entre residuos aminoácidos cercanos al sitio activo de CALB con APTS, especialmente a través de los grupos etoxi. Las mismas son representadas en el Esquema 5.1. Este esquema muestra interacciones iónicas entre carboxilatos de la enzima y aminos protonados del soporte (aportados por el APTS), así como enlaces covalentes Si-CALB.

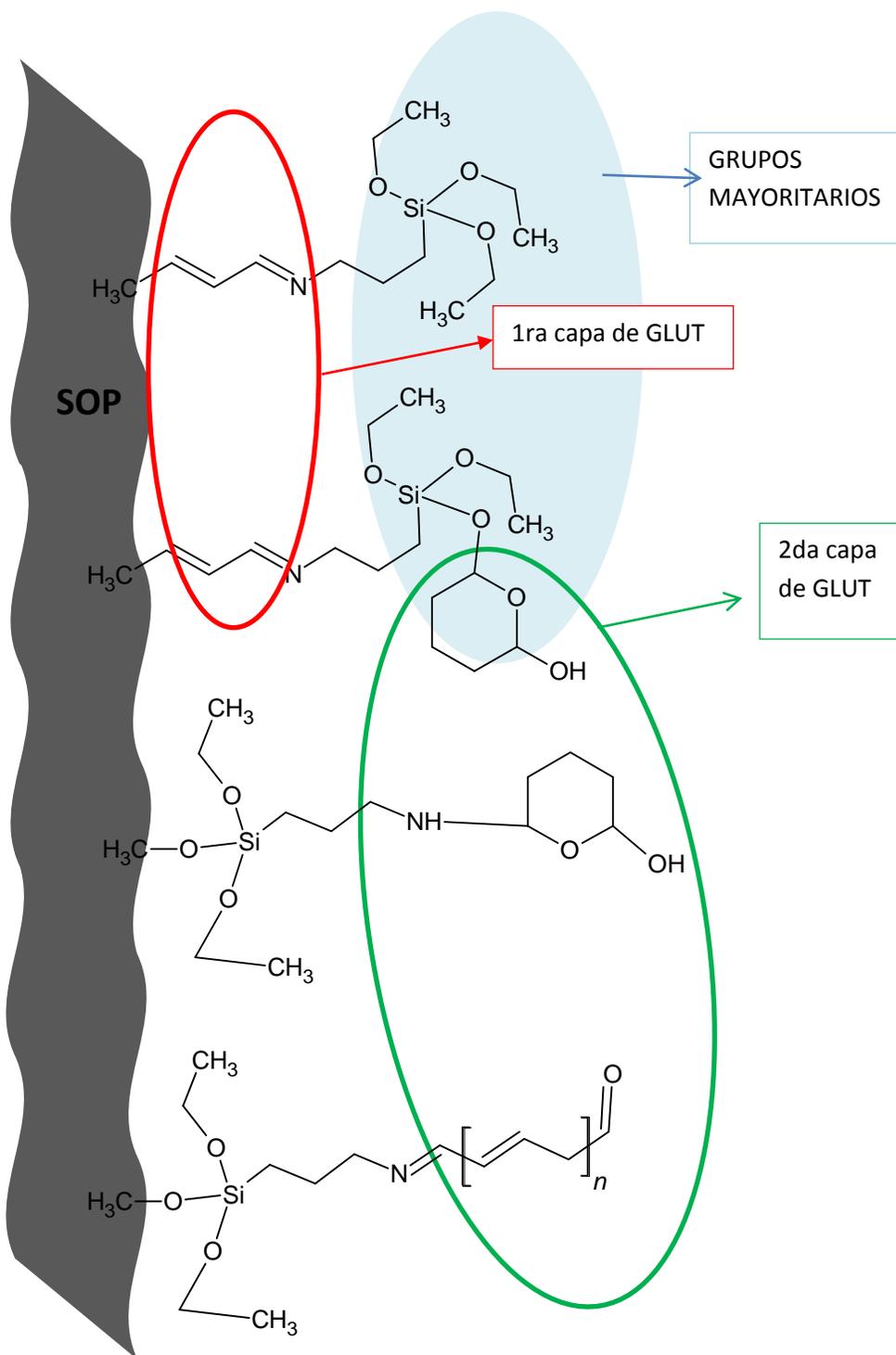
Existe una gran cantidad de trabajos publicados donde un trialcoxisilano se emplea para inmovilizar proteínas, pero siempre sobre superficies ricas sólo en oxhidrilos [2,7-14]. De esta manera, son otros grupos funcionales (-NH_2 , -Ph , -R de longitud variable) los que permanecen libres. No se han encontrado reportes de funcionalización con amino-alcoxisilanos de soportes conteniendo GLUT previamente, al menos a conocimiento de esta tesista.



Esquema 5.1. Interacciones entre CALB y SOP_A

5.4.2. Efecto de la combinación APTS/GLUT

Como se mencionó en el Capítulo 3, la solución de GLUT contiene diferentes especies químicas, varias de las cuales presentan oxhidrilos. Por lo tanto, además de la reacción esperada amino(APTS)-carbonilo(GLUT) existen otros mecanismos posibles que tienen lugar al activar el soporte con esta segunda capa de GLUT. En el Esquema 5.2 se proponen, de forma simplificada, las estructuras resultantes en la superficie de las muestras SOP_{AG}.



Esquema 5.2. Química de la superficie de los materiales SOP_{AG}

En las corridas donde CALB se inmovilizó sobre el SOP previamente tratado con APTS/GLUT, la cantidad nominal de silano no fue un parámetro significativo para las respuestas evaluadas. Sin embargo, al realizar el test de leaching en el ciclo 1 para CAT4 (sin APTS) y CAT7 (con APTS), se obtuvo $12\pm 1\%$ y $20\pm 1\%$ respectivamente indicando que CAT7 desprende mayor cantidad de enzima. Este resultado sugiere que el agente espaciador tiene una influencia negativa en:

-La estabilidad de la unión CALB-SOP_{AG}, y/o

-La cantidad de enzima que puede unirse.

La segunda opción había sido descartada por los modelos estadísticos, ya que CE% no contiene términos dependientes de APTS. De todas maneras, si se comparan las corridas 7 (con APTS) y 12 (sin APTS), donde CALB nominal es igual, la CE% fue 3,0 y 3,6 %. Es posible entonces que la inclusión de esta capa separadora limite el número de sitios reactivos a los que la proteína puede enlazarse, ya que ambas cantidades nominales son suficientes para “apantallar” todo el GLUT-QUIT, pero son muy pocas las moléculas de APTS que exponen el grupo amino. Por lo tanto, al activar con GLUT por segunda vez, la densidad superficial de grupos funcionales reactivos es considerablemente menor que en los soportes sin silano.

Esta teoría fue puesta a prueba por Ozyilmaz quien testeó la inmovilización de CRL sobre silica gel aminada con APTS y activada con GLUT. A partir de esta matriz, preparó dos biocatalizadores: uno con el soporte sin ningún otro tratamiento, y otro en el que luego de GLUT se agregó 1,6-diaminohexano (DAH) como espaciador para agregar una segunda capa de GLUT. Al cuantificar el cambio en el número de grupos aminos libres en los sucesivos pasos de funcionalización, encontró que el soporte con APTS-GLUT contenía $194,6 \mu\text{mol}$ de grupos aldehído por gramo, mientras que APTS-GLUT-DAH-GLUT sólo tenía $69,4 \mu\text{mol}$ por gramo [15].

Con respecto a la labilidad del enlace CALB-GLUT/APTS, no debe desestimarse como promotor de leaching, puesto que cada molécula de CALB tendrá menos enlaces con el soporte. Esta propuesta se representa en la Figura 5.32.

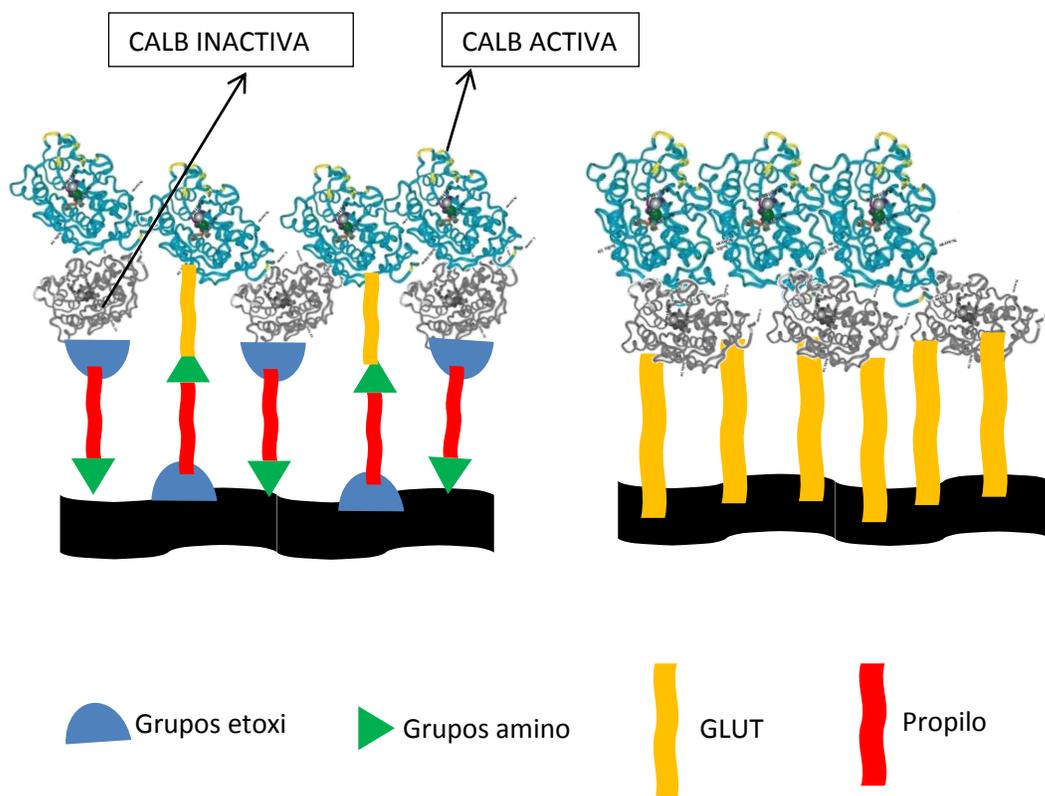


Figura 5.32. Representación de CALB inmovilizada sobre SOP_{AG7} y 12

5.3.3. Efecto de GLUT.

A partir de los modelos obtenidos para las respuestas evaluadas en el diseño experimental (Ecuaciones 4.1 – 4.4), se observa que la influencia de la cantidad nominal de GLUT utilizada sobre SOP_A es crucial. Dentro del dominio explorado, existe una cantidad óptima de entrecruzante donde la conversión es maximizada (ver Figura 5.19).

En aquellas corridas del diseño donde la cantidad de APTS es cero (1, 3, 4 y 8), nuevas moléculas de la segunda capa de GLUT pueden acoplarse aumentando la concentración de grupos reactivos por unidad de superficie. Es decir, los materiales SOP_{AG1} , 3, 4 y 8 no difieren en funcionalidad química con SOP.

Como se explicó en la sección anterior, la incorporación de más GLUT sobre el silano en cantidades controladas disminuyó el número de carbonilos reactivos frente a CALB. Este resultado permite explicar la diferencia en carga

enzimática y X% con, por ejemplo, el catalizador diseñado en el Capítulo 4, donde con 30 mg se alcanzó un 56 % de conversión mientras que CAT 7 dio 39 %.

GLUT tuvo un efecto positivo en la variabilidad de X% dentro de este diseño hasta 38 mg nominales (Ecuación 5.1). Más allá de este valor la actividad decayó. Este comportamiento se encuentra en concordancia con la abundante cantidad de estudios sobre inmovilización enzimática vía enlace covalente.

El efecto desnaturalizante de GLUT ha sido ampliamente reportado. Con la cantidad suficiente se induce un cambio conformacional en la enzima, tanto en forma instantánea al momento de la inmovilización como a lo largo del tiempo de almacenado gracias a grupos aldehído que hayan permanecido libres [6]. La presencia del espaciador pudo minimizar la interacción de la proteína con la excesiva cantidad de GLUT subyacente, conservando la flexibilidad de la estructura.

Ozyilmaz y Yagiz observaron este mismo fenómeno en la síntesis de acetato de isoamilo usando las lipasas de páncreas porcino (PPL) y *Candida rugosa* (CRL) inmovilizadas mediante dos técnicas diferentes:

I-Sobre QUIT sólido, a través de una sola capa de GLUT o bien dos capas separadas por 1,3-diaminpropano.

II-Por atrapamiento, goteando una solución de enzima/QUIT(ac)/alginato de Na sobre GLUT de concentración variable.

Para ambos métodos, encontraron que la actividad inicial era enormemente afectada por la concentración de GLUT ofrecido.

Para el protocolo II, encontraron que el GLUT reaccionó casi exclusivamente con el QUIT, de manera que las enzimas permanecieron adsorbidas sobre el alginato. Los autores atribuyen la mejor performance registrada para el método II a este impedimento del entrecruzamiento [16].

El efecto de GLUT en AE_{CALB} sigue la misma tendencia que en X%. El número de puntos de anclaje por enzima se ha reportado como un parámetro ajustable según se desee menor o mayor rigidez en su estructura una vez inmovilizada. Tradicionalmente se aceptó el concepto de que en la unión unipunto, la enzima tiene casi las mismas propiedades que en el estado libre, ya

que involucra solo un enlace covalente entre un residuo amino y un grupo aldehído. En la unión multipunto, una misma enzima está enlazada a varios grupos reactivos de la superficie, lo cual puede aumentar notablemente la estabilidad de la biomolécula al mantener la configuración activa [17,18]. Según Cristóvão y col., el número de enlaces por molécula se puede controlar mediante el pH del medio de inmovilización [19]. Valores inferiores al pKa de la enzima promoverán la unión unipuntual ya que muchos aminos se encontrarán protonados ($-\text{NH}_3^+$) y por lo tanto no disponibles para el ataque nucleofílico. Por otro lado, con un aumento en la alcalinidad aseguran que, *si el soporte contiene una gran densidad superficial de grupos reactivos*, ocurrirá la inmovilización multipuntual. Considerando las condiciones en las que CALB fue acoplada en este diseño, se puede racionalizar la mayor eficacia

La influencia de la cantidad/concentración de GLUT se pone claramente de manifiesto a partir del método de entrecruzamiento de enzimas para formar agregados insolubles (CLEAs). Por ejemplo, la lipasa de *Bulcolderia cepacia* fue precipitada junto con BSA usando acetona, y luego los agregados fueron entrecruzados usando concentraciones de GLUT 10, 40 y 60 mM [20]. Los agregados lipasa-BSA sin GLUT hidrolizaron mayor masa de aceite de oliva en 10 horas que las CLEAs con GLUT. A tiempos de reacción más prolongados, éstas últimas fueron más productivas que todas las otras formulaciones cuando la concentración de entrecruzante fue 10 mM. Los autores atribuyen estos resultados a la soberrigidización de las moléculas enzimáticas por encima de 10 mM GLUT. Igualmente, las CLEAs con 40 y 60 mM GLUT, aunque menos activas, presentaron mayor estabilidad térmica, por lo tanto serían más apropiadas para reacciones a temperaturas elevadas.

Guauque Torres y col. estudiaron la actividad de CLEAs de TLL en la hidrólisis de trioleína. En el rango de 10-80 mg de GLUT/24 mg TLL, la mayor actividad recuperada se ubicó en 40 mg de GLUT [21]. Valores más bajos que 40 mg no fueron suficientes para entrecruzar a toda la enzima ofrecida, mientras que cantidades mayores provocaron su desnaturalización. Para CLEAs de CALB, los máximos niveles de conversión inicial en síntesis de etiloleato sin solvente se registraron usando una relación de masas GLUT/PP 1,39 dentro del rango 1,11-1,67 [22].

A partir del comportamiento observado tanto en las muestras CAT 1-12 como en la literatura, puede afirmarse entonces que *existe una relación óptima GLUT/soproteína y GLUT/proteína*. Algunos autores han propuesto valores de referencia para estas relaciones, como por ejemplo 2 moles de GLUT por mol de grupos -NH₂ [6]. No obstante, esta relación es difícil de controlar con precisión ya que, como se detalló en el capítulo 4, aunque se conozca la concentración de la solución comercial del entrecruzante, el número preciso de grupos aldehído libres por unidad de volumen no es conocido de antemano. Por lo tanto, es importante informar tanto las concentraciones como las cantidades (mg, µL de solución) utilizadas en los protocolos de inmovilización.

5.4.4. Efecto del parámetro CALB ofrecida

En el sistema estudiado en este capítulo, la cantidad nominal de lipasa en el medio de inmovilización tuvo un claro impacto en CE% y en la estabilidad en almacenamiento. Con el objeto de establecer unívocamente el rol de este parámetro, se compararon los datos correspondientes al catalizador SOP-CALB (capítulo 4) y muestras seleccionadas de este diseño experimental. Los mismos se detallan en la Tabla 5.21.

Tabla 5.21. Actividad retenida (AR) a los 2 meses de almacenamiento (AR%) con 30 mg de CAT/g AO y CE% de muestras seleccionadas.

Muestra	SOP/APTS/GLUT/CALB*	CE%	X% día 0	X% día 60	AR%
SOP-CALB	200/0/0/20,8	3,9	56	50	90
CAT4	200/0/16,4/3	1,5	34	0	0
CAT7	200/200/33,2/9	3,0	39	27	70
CAT11	200/200/400/20,8	3,3	40**	36	90
CAT12	200/0/400/9	3,6	36	36	100

*Relación de masas

**a 45 °C

La variabilidad de AR% con CE% sigue una tendencia lineal hasta 3,5% CE (Figura 5.33).

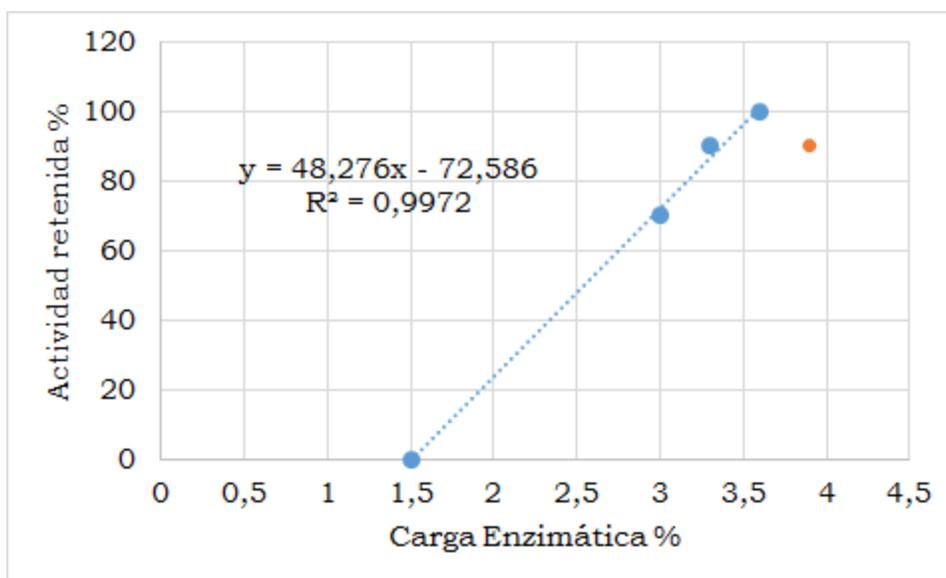


Figura 5.33. Dependencia de AR% con CE%

Si comparamos los CAT 4 y 7, el APTS tiene un aparente efecto beneficioso en la retención de actividad. Sin embargo, el CAT 12 demuestra una total retención de actividad sin el silano, aún con la misma cantidad nominal de proteína.

Como se ha propuesto en la sección anterior, el GLUT tiene también un efecto en detrimento de la actividad enzimática a lo largo del tiempo. Al aumentar la relación CALB/soprote, es menor la cantidad de grupos aldehído (u otros aportados por oligómeros del entrecruzante) que permanecen disponibles para continuar reaccionando con la lipasa. Es muy probable entonces que, al igual que en el catalizador SOP-CALB (capítulo IV), se haya producido una inmovilización mixta: uniones covalentes con GLUT y adsorción por agregación. Aquellas moléculas adsorbidas débilmente son las capaces de retener la conformación activa. Este fenómeno fue propuesto también por Betancor y col. [6] quienes estudiaron la unión de CALB a soportes aminados y activados con GLUT. En este caso, debido al protocolo utilizado, algunos grupos amino quedaron libres y

protonados, confiriéndole un carácter parcialmente iónico a la superficie. A estos soportes le llamaron *matrices heterofuncionales*. En los materiales estudiados en este capítulo, el APTS aporta más grupos etoxi expuestos que aminos (ver Esquema 5.2) por lo que surge un tercer mecanismo posible de unión enzima-soporte.

La significancia estadística de CALB nominal en la variabilidad de CE% se comprobó en la Sección 5.3.2.1.2 (Ecuación 5.2). Según un gran número de estudios publicados, se encuentra que CE vs. proteína ofrecida sigue una tendencia del tipo isoterma de Langmuir: crece con la cantidad de enzima ofrecida hasta alcanzar un máximo que se mantiene aproximadamente constante más allá de ese valor [23–25]. Si se fija el parámetro GLUT en valores constantes (50, 25 y 0 mg nominales) la Ec. 5.2 resulta en las ecuaciones 5.5, 5.6 y 5.7. Las mismas se representan en la Figura 5.34 en forma comparativa con los datos experimentales obtenidos. Cada punto experimental representa uno de los 10 catalizadores preparados.

Ecuación 5.5. $CE\% = 0,57936 + 0,0255757*(mg\ CALB)^2$ GLUT=50

Ecuación 5.6. $CE\%=0,978+0,0255757*(mg\ CALB)^2$ GLUT=25

Ecuación 5.7. $CE\%=1,11089 + 0,0255757*(mg\ CALB)^2$ GLUT=0

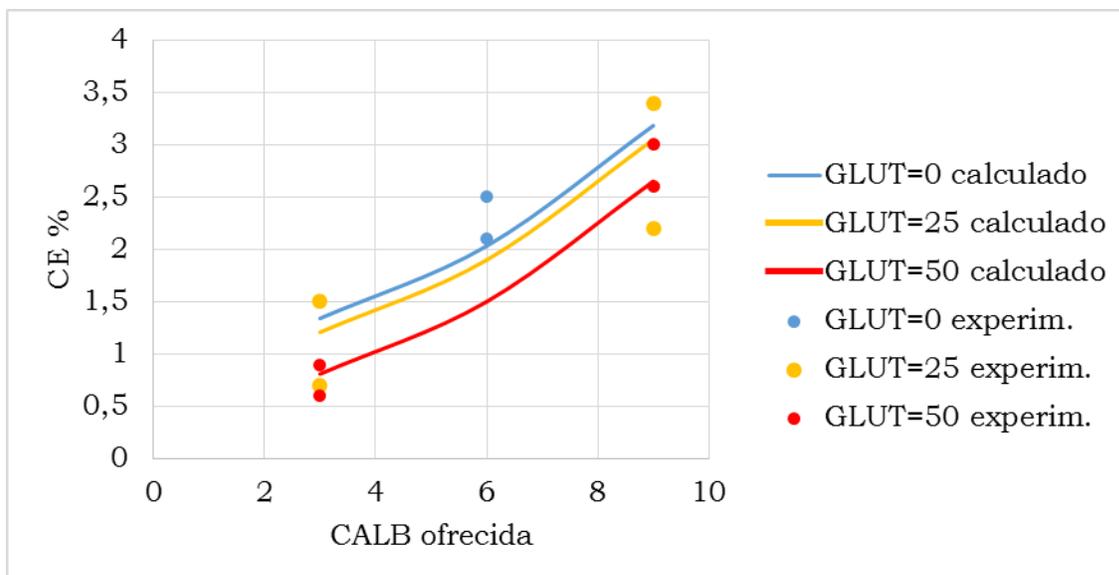


Figura 5.34. CE% en función de mg de CALB ofrecida para las 3 cantidades de GLUT nominal.

En el rango CALB explorado (3 – 9 mg nominales) CE mantuvo una tendencia creciente. Cuando se ofreció una cantidad significativamente mayor (20,8; ver Tabla 5.21) las CE medidas fueron 3,3 y 3,9; por lo que se puede afirmar que estos catalizadores no admiten más de un 4% en peso de enzima.

5.5. Conclusiones del capítulo V

En este capítulo se exploró el rol de las cantidades nominales de los aditivos APTS - GLUT, y de CALB ofrecida, en la performance los biocatalizadores magnéticos preparados. El diseño experimental seleccionado arrojó modelos matemáticos que describen satisfactoriamente la variabilidad de la conversión y la carga enzimática. Las actividades específicas por unidad de masa de catalizador o de lipasa inmovilizada también pudieron predecirse aunque con menor precisión. En las condiciones exploradas, el parámetro APTS no tuvo una

influencia estadísticamente significativa sobre las respuestas evaluadas. En cambio, la cantidad de GLUT y CALB ejercieron un rol crítico en la eficiencia de los catalizadores. Se propusieron mecanismos de inmovilización sobre los diferentes materiales SOP_{AG} que incluyeron enlaces covalentes, tanto con GLUT como con APTS, e interacciones débiles a través de adsorción sobre zonas hidrofóbicas (capas subyacentes de CALB). El mejor catalizador fue sometido a reusos en los que presentó una desactivación total en 7 ciclos por leaching. Aquellos CATs con CE mayores a 2% retuvieron entre 70 y 100% de la actividad inicial luego de dos meses de almacenamiento, mientras que con CE menores se desactivaron totalmente.

Los resultados y conclusiones de este capítulo dieron origen a una publicación en una revista internacional con referato y tres presentaciones a reuniones científicas en formato póster:

-About the role of typical spacer/crosslinker on the design of efficient magnetic biocatalysts based on nanosized magnetite. Paula Nicolás, Verónica L. Lassalle, María L. Ferreira. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 122 (2015) p.296–304.

-Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas para inmovilización de *Candida antarctica* B. Paula Nicolás, Verónica L. Lassalle, María Luján Ferreira. XVIII Congreso Argentino de Catálisis, 30 de octubre al 1 de noviembre de 2013 San Luis, Argentina (póster con presentación oral, PO121).

-Biocatalizadores Basados En Nanocompuestos De Óxido De Hierro Y Quitosano. P. Nicolás, M.L. Ferreira, V. L. Lassalle. I Workshop: Polímeros Biodegradables y Biocompuestos 2013 (BioComp) 5 al 6 de diciembre de 2013, Mar del Plata, Argentina (póster con presentación oral).

-Rol de los aditivos glutaraldehído y 3-aminopropiltriétoxissilano en la performance de biocatalizadores magnetita/quitosano/CALB. Paula Nicolás, Verónica Lassalle, María Luján Ferreira. XIX Congreso Argentino de Catálisis VIII Congreso de Catálisis del Mercosur. 21 al 23 de septiembre de 2015 – Bahía Blanca, Argentina. Editorial de la Universidad Nacional del Sur. Ediuns, 2015. Memoria USB, PDF ISBN 978-987-655-070-3 p. 849.

5.6. Referencias del capítulo V

- [1] G. Bayramoğlu, B. Hazer, B. Altıntaş, M.Y. Arica, Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis, *Process Biochem.* 46 (2011) 372–378.
- [2] S. Kanimozhi, K. Perinbam, Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and its application in immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* Lp1, *Mater. Res. Bull.* 48 (2013) 1830–1836.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.01.024>.
- [3] N. Miletić, R. Rohandi, Z. Vuković, A. Nastasović, K. Loos, Surface modification of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins for improved *Candida antarctica* lipase B immobilization, *React. Funct. Polym.* 69 (2009) 68–75.
- [4] R. Fernandez-Lafuente, C.M. Rosell, V. Rodriguez, C. Santana, G. Soler, A. Bastida, J.M. Guisán, Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method, 1993.
- [5] J.M. Bolivar, C. Mateo, C. Godoy, B.C.C. Pessela, D.S. Rodrigues, R.L.C. Giordano, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, The co-operative effect of physical and covalent protein adsorption on heterofunctional supports, *Process Biochem.* 44 (2009) 757–763.
- [6] L. Betancor, F. López-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 877–882.
- [7] S. Kumar, A.K. Jana, I. Dhamija, Y. Singla, M. Maiti, Preparation, characterization and targeted delivery of serratiopeptidase immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85

- (2013) 413–426. doi:10.1016/j.ejpb.2013.06.019.
- [8] U. V. Sojitra, S.S. Nadar, V.K. Rathod, A magnetic tri-enzyme nanobiocatalyst for fruit juice clarification, *Food Chem.* 213 (2016) 296–305. doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.074.
- [9] Y. Fan, G. Wu, F. Su, K. Li, L. Xu, X. Han, Y. Yan, Lipase oriented-immobilized on dendrimer-coated magnetic multi-walled carbon nanotubes toward catalyzing biodiesel production from waste vegetable oil, *Fuel*. 178 (2016) 172–178. doi:10.1016/j.fuel.2016.03.071.
- [10] I. V. Melnyk, Y.L. Zub, Preparation and characterization of magnetic nanoparticles with bifunctional surface layer $\equiv\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2/\equiv\text{SiCH}_3$ (or $\equiv\text{SiC}_3\text{H}_7-n$), *Microporous Mesoporous Mater.* 154 (2012) 196–199. doi:10.1016/j.micromeso.2011.11.012.
- [11] N.S.K. Gunda, M. Singh, L. Norman, K. Kaur, S.K. Mitra, Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker, *Appl. Surf. Sci.* 305 (2014) 522–530. doi:10.1016/j.apsusc.2014.03.130.
- [12] C.G.C.M. Netto, L.H. Andrade, H.E. Toma, Enantioselective transesterification catalysis by *Candida antarctica* lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles, *Tetrahedron Asymmetry*. 20 (2009) 2299–2304. doi:10.1016/j.tetasy.2009.08.022.
- [13] A. Sahu, P.S. Badhe, R. Adivarekar, M.R. Ladole, A.B. Pandit, Synthesis of glycinamides using protease immobilized magnetic nanoparticles, *Biotechnol. Reports*. 12 (2016) 13–25. doi:10.1016/j.btre.2016.07.002.
- [14] L. Zang, J. Qiu, X. Wu, W. Zhang, E. Sakai, Y. Wei, Preparation of Magnetic Chitosan Nanoparticles As Support for Cellulase Immobilization, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 3448–3454. doi:10.1021/ie404072s.
- [15] G. Ozyilmaz, The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 56 (2009) 231–236. doi:10.1016/j.molcatb.2008.05.008.

- [16] G. Ozyilmaz, E. Yagiz, Isoamylacetate production by entrapped and covalently bound *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipases, *Food Chem.* 135 (2012) 2326–2332. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.062.
- [17] J. Guisán, Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 375–382. doi:10.1016/0141-0229(88)90018-X.
- [18] H.C.T. CARDIAS, C.C. GRININGER, H.C. TREVISAN, J.M. GUI SAN, R.L.C. GIORDANO, Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica, *Brazilian J. Chem. Eng.* 16 (1999) 141–148. doi:10.1590/S0104-66321999000200005.
- [19] R.O. Cristóvão, S.C. Silvério, A.P.M. Tavares, A.I.S. Brígida, J.M. Loureiro, R.A.R. Boaventura, E.A. Macedo, M.A.Z. Coelho, Green coconut fiber: a novel carrier for the immobilization of commercial laccase by covalent attachment for textile dyes decolourization., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2012) 2827–38.
- [20] A.B. Majumder, K. Mondal, T.P. Singh, M.N. Gupta, Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts, *Biocatal. Biotransform.* 26 (2008) 235–242. doi:10.1080/10242420701685601.
- [21] M.P. Guauque Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*, *Biochem. Eng. J.* 72 (2013) 18–23.
- [22] M.P. Guauque Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity, *Biochem. Eng. J.* 90 (2014) 36–43.
- [23] R.M. Blanco, P. Terreros, N. Muñoz, E. Serra, Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 47 (2007) 13–20. doi:10.1016/j.molcatb.2007.03.003.
- [24] Y. Jiang, P. Zheng, L. Zhou, W. Kong, J. Gao, J. Wang, J. Gu, X. Zhang, X.

Wang, Immobilization of lipase in hierarchically ordered macroporous/mesoporous silica with improved catalytic performance, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 130 (2016) 96–103.

- [25] R. Murty, J. Bhat, P.K. a Muniswaran, Hydrolysis of Rice Bran Oil Using Immobilized Lipase in a Stirred Batch Reactor, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7 (2002) 367–370. doi:10.1007/BF02933523.

CAPÍTULO VI

Determinación de la carga
enzimática de biocatalizadores
de CALB-magnetita

En este capítulo se propone un nuevo enfoque en relación a la cuantificación de proteínas en el medio de inmovilización de lipasas, en vista de las grandes limitaciones de los métodos tradicionales basados en espectroscopía UV-Visible. Se estudiaron fuentes de error asociadas principalmente al método de Bradford. Los catalizadores obtenidos en el diseño del capítulo V se utilizaron como muestras de prueba. Las técnicas propuestas, además de las basadas en espectroscopía UV-V, fueron la medición del contenido de azufre por emisión atómica-ICP. En total, se analizaron cuatro protocolos combinando las distintas técnicas.

Se calcularon valores de concentración de lipasa que se correlacionaron adecuadamente con la actividad de cada catalizador. Dichos valores fueron considerados los correctos y en base a éstos se estimaron los errores de los métodos tradicionales. El método clásico de Bradford arrojó errores por defecto entre 400 y 1200% en los valores de carga enzimática.

Es necesario tener presente el protocolo de inmovilización de los CATs del capítulo anterior, ya que los mismos (CAT 1-10) se utilizaron como objeto del estudio en esta sección para comparar los distintos métodos.

6.1. Introducción

El principal propósito de la inmovilización enzimática es mejorar o preservar (al menos en parte) la capacidad biocatalítica de las enzimas para su reuso. Conocer la carga enzimática (CE) resultante es útil para comparar no sólo las actividades de la enzima libre e inmovilizada, sino que también como parámetro comparativo entre catalizadores, y para optimizar el diseño de un biocatalizador en términos de los costos asociados. El cálculo de CE se realiza tradicionalmente por el método indirecto. Esto es, midiendo la concentración de enzima en la solución de inmovilización al inicio y al final, así como en los lavados.

La cantidad inmovilizada se obtiene por diferencia. Otros métodos de cuantificación reportados en la literatura incluyen

- a) El uso de una reacción test con la utilización de una alícuota del sobrenadante de la inmovilización igual, al inicio y al final de la reacción
- b) El uso de una reacción test para el sobrenadante al inicio de la reacción con una cantidad conocida de proteína inicial y luego la utilización de una cantidad fija de biocatalizador final (ejemplo 50 mg) para correlacionar con la cantidad de proteína
- c) La utilización de métodos basados en espectrometría UV-V con o sin un reactivo químico involucrado

En trabajos publicados a lo largo de décadas, los métodos analíticos empleados para determinar esas concentraciones de enzima fueron originalmente diseñados para cuantificar *proteínas* por la técnica de espectrometría UV-V. Los más comunes son los métodos de Lowry [1], Bradford [2], ácido bicinconínico (BCA en inglés) [3] y en menor medida, la reacción de Biuret [4]. La absorbancia a 280 nm (A_{280}), por su parte, no es utilizada para estos fines.

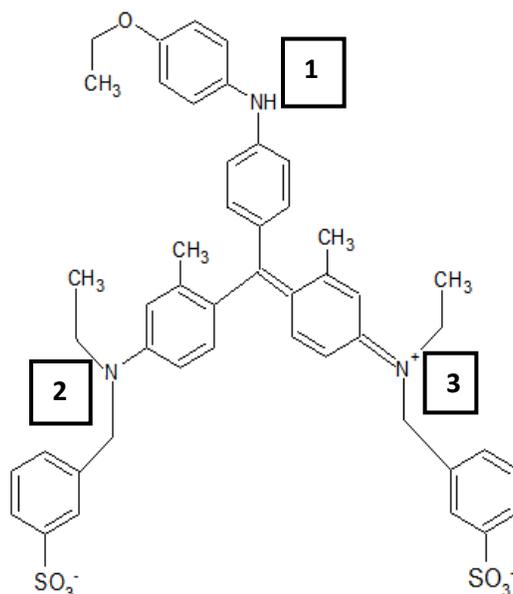
El método Biuret se basa en la formación de complejos de iones Cu^{2+} con las proteínas. Sulfato cúprico es añadido a la solución incógnita a pH fuertemente alcalino. Se desarrolla un color púrpura-violeta por la coordinación del cobre con enlaces peptídicos [4]. Otros aditivos, como tartrato de sodio, son necesarios para evitar la aparición de turbidez en la solución. Inicialmente se propuso para muestras de origen biológico, en las que sólo las proteínas daban una reacción positiva. Sin embargo, las interferencias causadas por presencia de aminas primarias, iones amonio, buffer Tris, sacarosa y glicerol [5] hacen muy limitada su aplicación.

El método de Lowry es una ampliación de la reacción Biuret por la subsecuente adición del reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico) que actúa como agente oxidante de residuos aromáticos de las proteínas, como triptófano y tirosina. De aquí que las respuestas de iguales concentraciones de proteínas diferentes sean dependientes de la naturaleza de la biomolécula y por lo tanto variables. Varias modificaciones

se han propuesto para minimizar esta dependencia, pero el método ha quedado casi en desuso por la disponibilidad de otros más sencillos [5].

El método del BCA es una variante del ensayo de Lowry, ya que este reactivo detecta los iones Cu^+ provenientes del Cu^{+2} que se redujo por reacción con grupos peptídicos en condiciones básicas. Igualmente, esto no elimina la variación de la señal analítica con la composición de la proteína [5].

El método de Bradford, en cambio, emplea el colorante azul de Coomassie brillante G-250 (CBB, Esquema 6.1) en medio ácido. El color de este compuesto (y por ende su absorbancia) puede variar en gran medida según el pH del medio en que se encuentre. A pH 0 o menor, los 3 nitrógenos estarán cargados positivamente y el color es rojo. La absorbancia máxima es a 470 nm. Alrededor de pH 1, el nitrógeno marcado como 1 se desprotona dando un color verde. Su absorbancia máxima es a 645 nm. Al superar el pH 2 y hasta 7 ambos nitrógenos 1 y 2 se encontrarán desprotonados y el anión resultante es azul, con la máxima absorbancia a 595 nm. En medios fuertemente alcalinos la molécula se descompone, y la solución se vuelve rosada [6] y la máxima absorbancia es a 518 nm.



Esquema 6.1. Estructura del CBB a pH 2-7 (forma azul, carga neta -1)

El CBB se puede adquirir comercialmente como parte de un *kit* disuelto en medio ácido (forma roja). Esta solución, conocida ahora como “reactivo de Bradford” (RB), consiste en 0.01% (p/v) de CBB, 4.7% (p/v) de etanol, y 8.5% (p/v) de ácido fosfórico en agua. La utilizada para esta tesis se expende con el quintuple de estas concentraciones y se conoce como “RB 5X”. La albúmina de suero bovino (BSA) es la proteína patrón más empleada para confeccionar la curva de calibrado, independientemente de la proteína o enzima a cuantificar.

En la Figura 6.1a se pueden apreciar los colores adoptados por el RB 5X en soluciones acuosas de distinto pH. Los espectros en el visible de cada muestra se presentan en la Figura 6.1b.

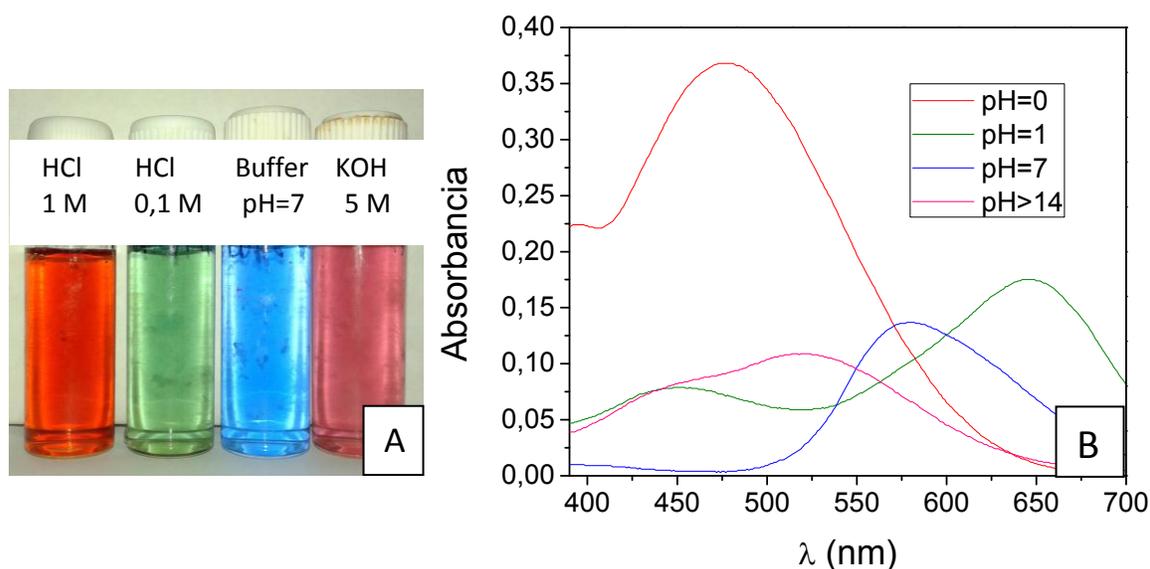


Figura 6.1.a-RB 5X en soluciones de diferente pH.

b-Espectros UV-V de las soluciones en 6.1a

El CBB se une a las proteínas en medio ácido para dar un complejo de color azul ($\lambda_{max} = 595$ nm), cuya intensidad es linealmente proporcional a la concentración en ciertos rangos.

Inicialmente, cuando el método de Bradford surgió (año 1976) y hasta mucho tiempo después, no se tenía un conocimiento cabal del mecanismo de

interacción colorante-proteínas. Uno de los trabajos más actuales que intentó dilucidarlo es el de Georgiou y col. quienes buscaban una forma de incrementar la sensibilidad del método clásico mediante el agregado de ácido tricloroacético y sulfato de amonio. Concluyeron que además de la forma aniónica (azul), la especie neutra (verde) también es capaz de unirse a las proteínas a través de interacciones hidrofóbicas [7]. Compton y Jones habían publicado esa conclusión dos décadas antes, junto con la interacción iónica sulfonato-proteína [8]. A partir de estos antecedentes, se pueden considerar estas dos posibilidades de interacción del CBB con proteínas: a través de residuos de aminoácidos que puedan estar protonados (arginina, lisina, e histidina) con los sulfonatos, y mediante zonas neutras del CBB (anillos bencénicos, metilos y metilenos) con grupos poco polares en la cadena proteica (triptófano, fenilalanina) [7].

Desde la publicación del trabajo de Marion Bradford, muchos investigadores comenzaron a encontrar dificultades o incongruencias en la aplicación de este método, como variabilidad de la respuesta ante diferentes proteínas [9,10], baja sensibilidad [11] o interferencia de otras especies no proteicas [12,13].

Igualmente, debido a su sencillez, rapidez y bajo costo, el método de Bradford sigue siendo el más utilizado para conocer la CE de virtualmente cualquier enzima en cualquier soporte [14–18], así como en investigaciones pertenecientes a otros campos. Es notable que a pesar de existir numerosas advertencias e intentos por minimizar los errores inherentes al método de Bradford, siempre es el artículo original [2] el que es citado sin ninguna aclaración sobre si fue necesario o no realizar modificaciones al protocolo.

Ahmad y Saleemuddin diseñaron una variante del método de Bradford más sofisticada para el caso específico de proteínas inmovilizadas en soportes sólidos, que se conoce como *método directo*. Exploraron dos clases de celulosa y microbolillas de vidrio como carriers (Sephacrose, Sephadex). Inmovilizaron hemoglobina, ovalbúmina, citocromo C, BSA y aldolasa. Propusieron incubar a T ambiente el material cuyo contenido proteico se quiere conocer, en una solución acuosa de CBB al 0,1%, con 10 % de ácido acético y 25 % de isopropanol. Los autores afirmaron que con este tratamiento las proteínas inmovilizadas se unen

a CBB de forma reversible. Luego lavaron el colorante no unido al sólido y finalmente eluyeron el CBB que sí había quedado unido usando NaOH en metanol. Esta solución fue acidificada y la absorbancia se midió a 605 nm. Como testigos, utilizaron papeles de filtro en los que embebieron cantidades conocidas de proteína. Estos papeles fueron tratados como las muestras para armar la curva de calibrado de cada analito [19]. Cuando se quiso extender este engorroso protocolo a otras proteínas, no se logró distinguir la señal de los testigos de la correspondiente al blanco de reacción [20]. La baja sensibilidad y el trabajoso procedimiento son probablemente las razones por las que este método directo no ha sido más difundido.

Investigaciones previas del grupo dirigido por la Dra. Ferreira demostraron que sólo con agitación de las soluciones de diversas proteínas puras en agua su espectro de absorción en el UV cambiaba significativamente debido a la desagregación de las moléculas, lo cual implica un mayor número de grupos reactivos expuestos [21]. Por lo tanto, la señal del complejo proteína-colorante estará sujeta a múltiples variables como por ejemplo la agitación previa o no de la muestra. Además observaron un importante impacto, en los resultados de cuantificación, cuando se usaba una solución reguladora -por ej. buffer de fosfatos- como medio de inmovilización [22-24]. Es importante aclarar que PBS (Phosphate Buffer Solution) es un reactivo universalmente utilizado como solvente de inmovilización.

Considerando la experiencia previa del grupo en la inexactitud de los métodos basados en UV para determinación de proteínas y la literatura publicada sobre las distintas falencias del método de Bradford en particular (y el conocimiento informal de las falencias de otros métodos por comunicaciones privadas de colegas), se admitió la necesidad de emplear otra técnica para el cálculo de CE. Es por esto que la determinación de azufre por emisión atómica con atomizador de plasma acoplado inductivamente (EA-ICP en inglés) se propone como alternativa. Al conocer el número de aminoácidos que contienen en su estructura química este heteroátomo dentro de la secuencia de la enzima y su peso molecular, pueden calcularse los mg de proteína presentes en las soluciones

comerciales, los medios de inmovilización e incluso en los mismos catalizadores sólidos, si éstos son sometidos a una digestión química que los disuelva.

El uso del contenido de azufre como herramienta para el cálculo de concentraciones de proteína fue reportado por otros autores. En dichos trabajos utilizaron espectrometría de reflexión total de fluorescencia de rayos X para determinar varios heteroátomos en muestras biológicas [25,26].

6.2. Experimental

La determinación de la carga enzimática (CE) en los catalizadores 1-10 del capítulo 4 se realizó mediante cuatro protocolos diferentes:

- I) Cuantificación de proteína por el método de Bradford ($\lambda = 595 \text{ nm}$) en el caldo comercial, la solución de inmovilización antes y después del contacto con el soporte, así como en los lavados; *usando albúmina bovina (BSA en inglés) como patrón para calibración en el rango de concentración.*
- II) Cálculo de concentración de CALB en el caldo comercial por cuantificación de S con EA-ICP. Posteriormente se usó el método de Bradford para determinar proteína en el sobrenadante de inmovilización y lavados, *con BSA como patrón.*
- III) Cálculo de concentración de CALB en el caldo comercial por cuantificación de S con EA-ICP, y usar el método de Bradford estándar para determinar proteína en el sobrenadante de inmovilización y lavados, *con CALB como patrón, proveniente del mismo preparado usado para inmovilizar.*
- IV) Cálculo de concentración de CALB en el caldo comercial, en el sobrenadante de inmovilización y en los lavados por cuantificación de S con EA-ICP.

6.2.1. Curvas de calibrado con BSA como patrón

Al aplicar el método de Bradford, se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante del reactivo [27]. Existen dos rangos de concentración en los que se sugiere trabajar con BSA: rango micro (1.2 a 10.0 $\mu\text{g/ml}$) y rango estándar (0.2 a

0.9 mg/ml). En el primero, el reactivo de Bradford comercial se usa diluido 1:5 y se denota "RB 1X". En el segundo se usa puro (RB 5X). Se prepararon soluciones stock de BSA en NaCl 0,15 M, tal como indica el protocolo de Bradford [2]. En ambos rangos los testigos de BSA se diluyeron con buffer fosfato pH = 7 o con agua destilada. Recordemos que el PBS tiene pH 7,4. En la Tabla 6.1 se especifican los volúmenes empleados. Para cada testigo y muestra, se registró el espectro completo 400 a 700 nm usando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Para estimar la desviación estándar del método, en el rango micro (dilución con agua) se realizaron 3 réplicas de cada punto.

Tabla 6.1. Curvas de calibrado con BSA como patrón.

RANGO ESTÁNDAR							
	Testigos de BSA			Medición de absorbancia			
	μL Stock BSA 2,5%	μL buffer o agua	mg BSA/ mL	μL de testigo	mL RB 1X	A 595 nm buffer	A 595 nm agua
Blanco	0	1000	0	100	5	----	----
1	8	992	0,20	100	5	0,241	0,206
2	16	984	0,40	100	5	0,459	0,453
3	24	976	0,60	100	5	0,581	0,629
4	30	970	0,75	100	5	0,738	0,718
5	36	964	0,90	100	5	0,839	0,925
RANGO MICRO							
	Testigos de BSA			Medición de absorbancia			
	μL Stock BSA 0,1%	mL buffer o agua	μg BSA/ mL	μL de testigo	μL RB 5X	A 595 nm buffer	A 595 nm agua*
Blanco	0	5	0	1600	400	-----	-----
1	6	5	1,2	1600	400	0,080	0,012
2	10	5	2	1600	400	0,150	0,071
3	20	5	4	1600	400	0,190	0,156
4	30	5	6	1600	400	0,292	0,214
5	40	5	8	1600	400	0,351	0,331
6	50	5	10	1600	400	0,409	0,369

*promedio de tres réplicas

6.2.2. Curva de calibrado con CALB como patrón

Para el método III donde CALB se usó como patrón, la curva de calibrado se construyó en el rango micro diluyendo con agua, de tal forma que las absorbancias registradas a 595 nm entren en el mismo rango de los testigos de BSA (0,01-0,4). Se preparó una solución stock a partir del caldo concentrado, diluyéndolo 1:10 con agua. La concentración del patrón admitida como correcta fue la calculada a través del contenido de azufre. En la Tabla 6.2 se especifican los volúmenes utilizados de cada solución.

Tabla 6.2. Curva de calibrado con CALB como patrón.

	μL Stock CALB 1,8 mg/mL*	mL agua	μg CALB/ mL	μL de testigo	μL RB 5X	A 595 nm agua
Blanco	0	5	0	1600	400	----
1	34,7	5	12,5	1600	400	0,135
2	41,6	5	15	1600	400	0,130
3	52	5	18,75	1600	400	0,179
4	69,4	5	25	1600	400	0,239
5	83,3	5	30	1600	400	0,245

*concentración determinada por azufre (EA-ICP)

6.2.3. Determinación de S por EA-ICP

El método para determinar S por EA-ICP es el indicado en la norma EPA 200.7 [28]. Se emplearon patrones certificados marca Chem-Lab (Bélgica). El cálculo de concentración de CALB a través de la determinación de S (métodos II, III y IV) se realizó teniendo en cuenta que su masa molar es de 33 kDa y cada molécula de esta lipasa contiene 5 metioninas y 7 cisteínas, por lo tanto 12 átomos de azufre [29].

6.2.4. Muestras control

Se agitó el soporte SOP_{AG7} en agua destilada durante 7 horas, sin agregado de lipasa. A esto se le llamará de aquí en adelante *Muestra control*. Este control fue analizado por el método de Bradford micro, para comprobar si presentaba reacción positiva ante CBB.

El soporte sólido seco (SOP_{AG7}) fue sometido a un screening elemental cualitativo con fluorescencia de rayos X para detectar presencia de azufre como residuo proveniente de la síntesis de magnetita. El equipo utilizado fue un espectrómetro PHILIPS PW 1400, con ánodo de Rh y detector de Ge bajo atmósfera de He.

6.2.5. Análisis de las muestras

El caldo comercial puro se analizó usando el protocolo de Bradford tanto en el rango micro como el estándar.

La técnica SDS-PAGE (electroforesis de gel de poli-acrilamida – dodecilsulfato de sodio) se aplicó para evaluar la pureza del preparado comercial en relación a la presencia de otras proteínas. La muestra se trató y analizó según el procedimiento descrito en [30].

Los sobrenadantes de inmovilización y lavados fueron analizados por el método de Bradford sólo en el rango micro, realizando las diluciones necesarias para que la absorbancia perteneciera a la zona lineal.

6.3. Resultados

6.3.1. Curvas de calibrado

Las curvas de calibrado obtenidas mediante el método de Bradford usando BSA como patrón se muestran en la Figura 6.2 (rango estándar) y 6.3 (rango micro). Este último se empleó para el cálculo de CE según el método I. La ecuación elegida fue la correspondiente a BSA diluida en agua destilada, ya que las muestras a analizar (caldo comercial, sobrenadante de inmovilización y lavados) no contenían buffer.

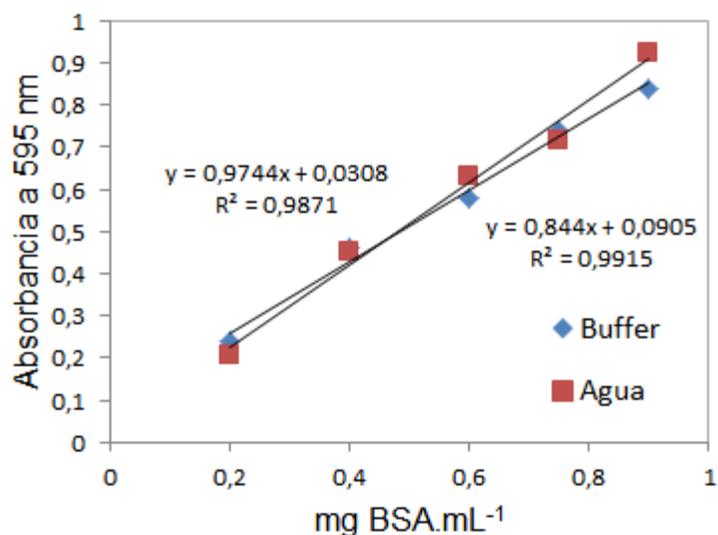


Figura 6.2. Curvas de calibrado del método de Bradford en el rango estándar.

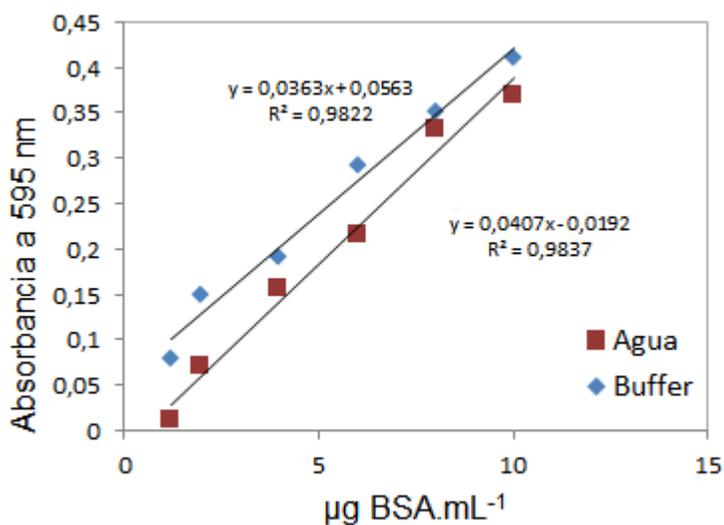


Figura 6.3. Curvas de calibrado del método de Bradford en el rango micro.

La Figura 6.4 incluye las curvas de BSA y CALB en el rango micro. Las concentraciones de los testigos de CALB (puntos rojos) fueron determinadas mediante el contenido de S por EA-ICP.

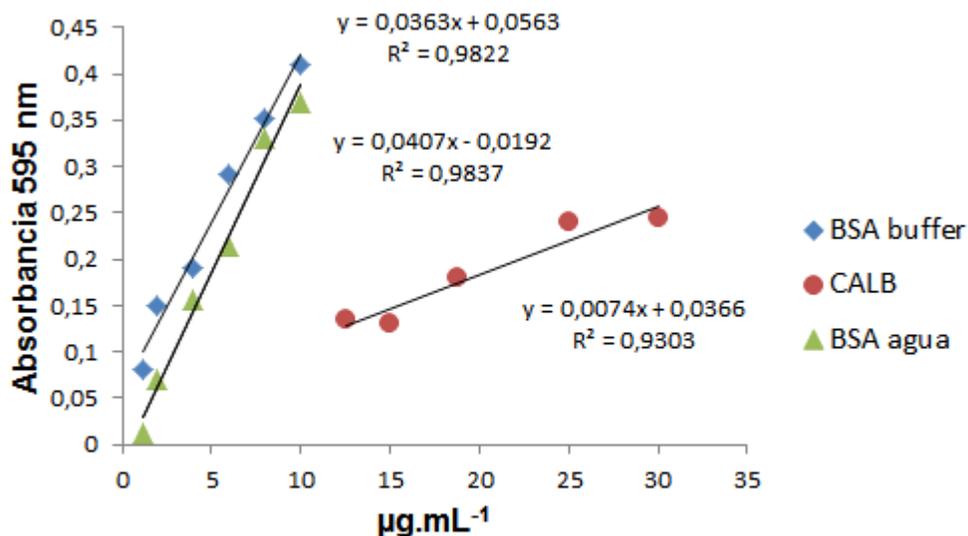


Figura 6.4. Curvas de calibrado del método de Bradford con BSA o CALB como patrón de concentración.

6.3.2. Análisis del caldo comercial

La Tabla 6.3 resume las concentraciones de proteína en la solución provista por Novonordisk, obtenidas mediante diferentes protocolos. Se incluye también un valor obtenido por otro grupo de investigación. La Tabla 6.4 informa resultados de tres diluciones de este caldo.

Tabla 6.3. Concentraciones de proteína en caldo comercial de CALB

Técnica	Método de Bradford estándar	Método de Bradford micro	Emisión atómica ICP	SDS-PAGE
Analito	Proteína total	Proteína total	CALB	CALB
Resultado (mg/mL)	2,7	3,5	17,7	15,2 [30]

Tabla 6.4. Proteína detectada por el método de Bradford en diluciones del caldo comercial

$\mu\text{g/mL}$ CALB por EA-ICP	$\mu\text{g/mL}$ de proteína por Bradford micro	Error relativo %
12,5	2,2	82
18,8	3,4	82
25,0	5,0	80

Finalmente, el caldo crudo fue sometido a un análisis SDS-PAGE para evaluar la presencia de otras proteínas no enzimáticas (Figura 6.5)

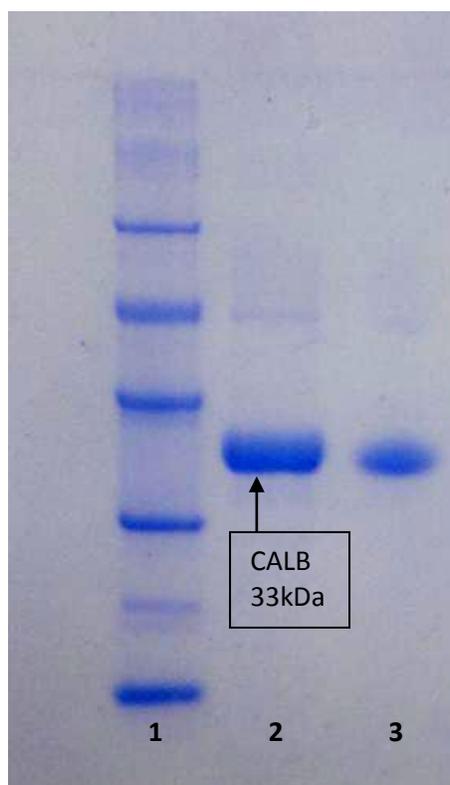


Figura 6.5. SDS-PAGE del caldo comercial de CALB. 1- Marcadores de peso molecular. 2 y 3-Caldo comercial de CALB.

6.3.3. Análisis de las muestras control

La Figura 6.6 muestra el espectro UV-V del control con el reactivo de Bradford en las mismas proporciones que en el ensayo micro (1600 μL de muestra y 400 μL de RB 5X). A 595 nm la absorbancia es 0,1.

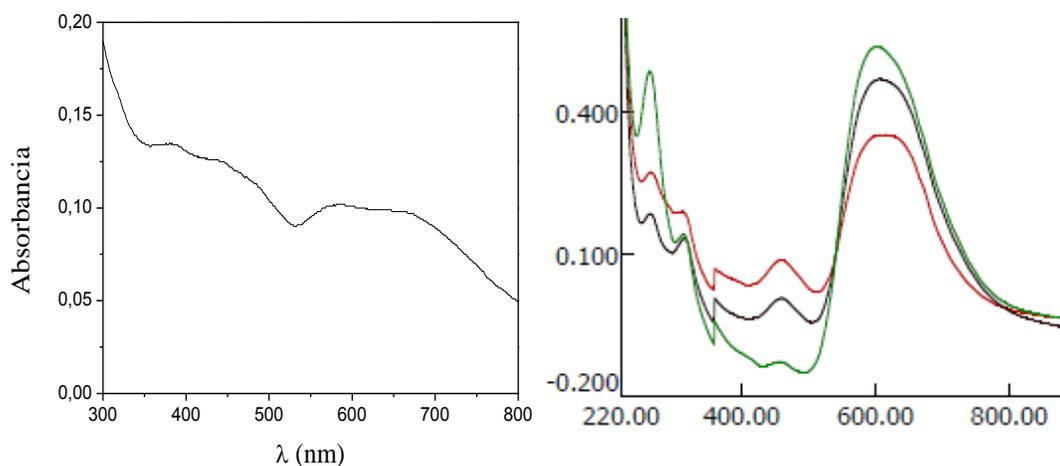


Figura 6.6. Espectro UV-V de A) la muestra control con RB 5X, B) sobrenadantes de inmovilización a tiempo = 0 (3, 6, 9 mg de CALB/50 mL) diluidos a un cuarto con BR 5X.

La Figura 6.7 es el espectro XRF del soporte. La señal correspondiente a la radiación Ka del S (presente como impureza en la magnetita) se indica en el círculo rojo.

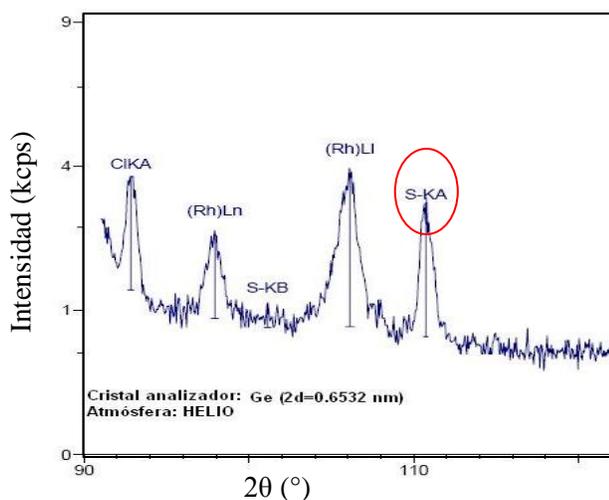


Figura 6.7. Espectro XRF del soporte sólido SOP_{AG7}.

En la Tabla 6.5 se muestran los resultados obtenidos para CE de cada catalizador con los diferentes métodos estudiados. El valor considerado correcto es el promedio de los métodos III y IV.

Tabla 6.5. Cargas enzimáticas determinadas por los 4 métodos.

Catalizador	mg de enzima ofrecida a 100 mg de soporte (b)	Carga enzimática (mg CALB cada 100 mg de soporte)					Error (%) método I por defecto (a)	Error (%) método II por exceso
		I- Bradford clásico	II- Bradford clásico y EA-ICP	III- Bradford (patrón CALB) y EA-ICP	IV- Sólo EA-ICP	Prom. III y IV		
1	4,5	0,42	4,0	2,6	1,85	2,2	424	46
3	4,5	0,51	4,1	2,1	3,0	2,6	410	37
4	1,5	0,26	1,5	1,5	1,5	1,5	477	-2
5	1,5	(c)	1,0	0,8	0,62	0,7	∞	31
6	1,5	0,09	1,3	0,9	0,42	0,6	567	54
7	4,5	0,22	3,9	3,0	3,0	3,0	1264	22
8	1,5	0,09	1,3	1,3	0,55	0,9	900	31
10	4,5	0,29	3,9	3,1	3,75	3,4	1072	13

a-Error% = [(valor en negrita - valor evaluado) / valor evaluado] x 100

b-Determinado por AE-ICP

c-La cantidad de proteína detectada después de la inmovilización fue mayor que la ofrecida al inicio

Como se mencionó en el capítulo V, los catalizadores 2 y 9 (réplicas) resultaron inactivos a pesar de tener cargas enzimáticas en el mismo orden que los demás. La inmovilización de la lipasa a través de grupos funcionales cercanos al sitio activo justificó este comportamiento. La actividad de los demás catalizadores siguió una tendencia que concuerda con la CE. Por esta razón, los CAT 2 y 9 fueron excluidos del estudio sobre los métodos analíticos para proteínas, puesto que el resultado aparentemente anormal de su CE no se

relaciona en forma alguna con la manera de determinarla sino con el mecanismo de inmovilización.

En la Figura 6.8 se compara la variabilidad de la conversión de cada catalizador en función de su carga enzimática, calculada por el método de Bradford clásico y mediante el promedio III-IV.

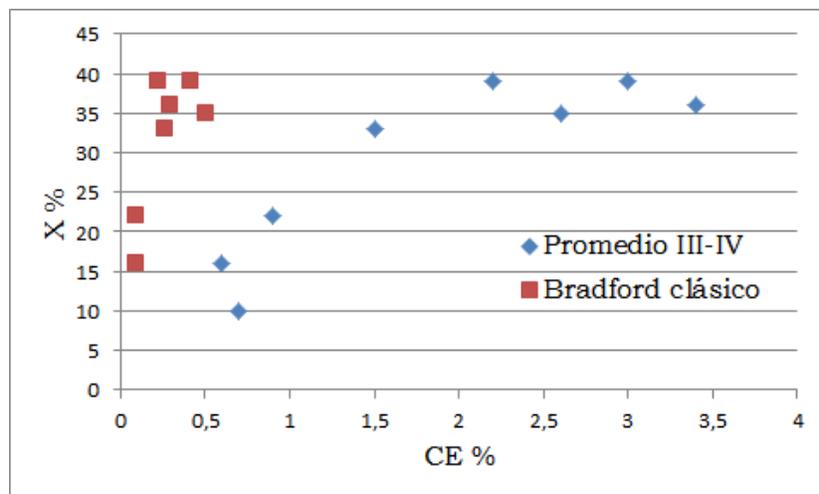


Figura 6.8. Variación de la conversión de los catalizadores vs. su CE calculada por el método de Bradford y por los métodos III-IV

6.4. Discusión.

Se obtuvieron grandes diferencias en los valores de CE y de proteína total al calcularlas por el método de Bradford o por combinaciones de éste con EA-ICP. Esas diferencias pueden atribuirse a varias fuentes de error. A continuación, cada una de ellas se analizará indicando de qué forma afectan a la concentración de proteína detectada, tanto en el caldo comercial como en el medio de inmovilización.

6.4.1. Influencia de la naturaleza del patrón usado para cuantificar proteína.

Como se señaló al comienzo de este capítulo, la BSA es siempre la proteína elegida como estándar de concentración al emplear el método de Bradford [14–18] indistintamente de la especie incógnita.

La pendiente de la curva de calibrado de BSA en el rango micro (Figura 6.4, testigos en agua) es 5,5 veces más alta que la de CALB. Esto arroja errores del orden de 82 % por defecto en la determinación de proteína total (Tablas 6.4 y 6.5) del caldo comercial. Llerena Suster y col. utilizaron esta lipasa purificada para realizar la misma comparación en el rango estándar, obteniendo un valor 2,16 veces más grande para la albúmina [30].

Considerando el mecanismo de interacción CBB-proteína, se deduce que el tipo de unión entre ellos será variable de acuerdo a la composición de aminoácidos: a mayor cantidad de grupos $-NH_2$ libres y expuestos por biomolécula, mayor cantidad de colorante adsorberá y por lo tanto la señal analítica resultará más intensa. Aquellas proteínas débilmente enlazadas al colorante darán como resultado una subestimación de su concentración. Según el Protein Data Bank, CALB contiene 317 aminoácidos con 18 residuos reactivos ante CBB (9 Lys, 8 Arg y 1 His). En cambio, BSA tiene 583 aminoácidos con 98 residuos reactivos (59 Lys, 22 Arg y 17 His). Esto justifica la mayor absorbancia medida al usar BSA, ya que cada molécula reaccionará con aproximadamente 80 CBBs más que CALB.

Diversos investigadores reportaron las mencionadas falencias asociadas al método de Bradford, usando una gran variedad de analitos. Ya en 1977 Pierce y Suelter demostraron que quimotripsina A, pepsina, tripsina, γ -quimotripsina y lisozima daban pendientes de entre 1,4 y 5,8 veces menor que BSA, mientras que para citocromo C era 20 % mayor [9]. Congdon y col., en un intento por explicar la interacción CBB-proteína, advirtieron que la variabilidad de color entre diferentes proteínas se debía mayormente al distinto número de argininas y lisinas en su estructura química. Otra causa que sugirieron para estos resultados erróneos tiene que ver con la absortividad molar del complejo formado CBB-proteína. Según los autores, este valor difiere con la identidad del patrón así tengan la misma cantidad de residuos reactivos frente a CBB [31].

Giraudi y col. comprobaron una subestimación de la concentración de proteína total al intentar cuantificar peroxidasa de rábano picante conjugada con esteroides usando el método de Bradford. En este artículo, atribuyeron ese resultado al menor número de residuos aminoacídicos disponibles para

interactuar con CBB [32]. El mismo efecto fue observado para α , β y γ globulinas [33].

Szöllösi y col. aseveraron directamente que los métodos colorimétricos, incluyendo Bradford, no son adecuados para cuantificar proteínas intrínsecamente desestructuradas [10].

El mismo proveedor del reactivo de Bradford incluye en el manual de instrucciones una lista de 23 proteínas diferentes que fueron utilizadas para preparar gravimétricamente soluciones de 10 mg/mL, y luego los métodos biuret, Lowry y Bradford fueron aplicados a cada una. De las 23 especies, sólo 5 arrojaron resultados de 10 ± 1 mg/mL con el CBB; 3 dieron entre 12 y 16; 4 entre 20 y 26 y 11 entre 4 y 8,3 [27]. Esto equivale a errores de hasta 160 % por exceso y 60 % por defecto, calculándolo de la misma forma que en la Tabla 6.5.

Algunos autores intentaron revertir este defecto mediante diversas modificaciones al procedimiento de Bradford, tales como:

- Alterar las relaciones muestra/colorante o muestra/ácido fosfórico para cada proteína a cuantificar [34]

- Agregado de NaOH al RB o a la muestra [35]

- Expresar las concentraciones de testigos como número de grupos NH_2 reactivos en lugar de mg de proteína [36]. Sin embargo esta estrategia no contempla el fenómeno de agregación que determina que no todos los grupos NH_2 de la proteína queden expuestos y disponibles para reaccionar con CBB.

Tampoco tiene en cuenta las interacciones hidrofóbicas, ni resuelve la segunda pero no menos importante fuente de error: las interferencias.

En particular, para el caso de CALB cuantificada por Bradford, la respuesta es muy baja. Con el método I, al restar la proteína detectada final (sobrenadante y lavados) a la inicial, prácticamente no hubo diferencia, por lo tanto los valores de CE fueron muy bajos ($<0,55$ %) para todos los CATs, a pesar de su amplio rango de actividades (ver Fig. 6.8). El mismo problema fue encontrado para penicilinasa inmovilizada en silica gel cuando se determinó por el método de Bradford directo [19], aunque los investigadores apuntaron a la

desactivación de la enzima como potencial causa de la anomalía en la correlación actividad-CE [37].

En el CAT5 se encontró más proteína al final que al inicio. Esta observación requiere de una explicación que excede la influencia del patrón elegido, ya que sugiere la presencia de especies no proteicas reactivas frente al CBB que aparecen en el medio de inmovilización al ponerse en contacto con el soporte. Las mismas forman parte de las interferencias, que se analizan en la sección siguiente.

6.4.2 Influencia de las interferencias

Las enzimas se adquieren por lo general comercialmente en forma de sólidos liofilizados o disueltas en medios líquidos (caldos). Raramente se informa de fábrica la pureza o concentración de esos preparados. En su lugar, se suele proveer el valor Unidades de Enzima (UE). Por ejemplo, la solución utilizada en esta tesis tiene, según el proveedor, “> 5000 LU/g de líquido” [38]. En forma de polvo, se informa “~9 U/mg” [39]. Como se detalló en el Capítulo I Sección 1.3, estas magnitudes deben interpretarse en función de múltiples variables, lo cual dificulta su utilidad en cuanto a indicador de concentración de proteína o de enzima.

En el Capítulo IV Sección 4.4.3, se había indicado que el preparado comercial de CALB utilizado para esta tesis contiene numerosas especies químicas diferentes (glicerol, sorbitol, benzoato de sodio y sorbato de potasio [40]). El exhaustivo proceso de análisis y purificación llevado a cabo por Llerena Suster y col. [30] identificó además una cantidad detectable de ácidos nucleicos. Por lo tanto, además de la lipasa, todas estas sustancias estarán presentes en el medio de inmovilización cuando el producto se utiliza tal como se recibe.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que la agitación vigorosa del soporte en agua (o buffer) durante tiempos prolongados posibilita la lixiviación de distintos componentes del soporte.

Si se utiliza una solución reguladora como medio de inmovilización, se suman moléculas de ácidos débiles, protones e iones provenientes de su sal como posibles fuentes de interferencias.

6.4.2.1. Interferencias en el método de Bradford

Contemplando el mecanismo de reacción colorante-proteína, eventualmente, cualquier especie química capaz de actuar como un ácido de Lewis interaccionará a través de los grupos sulfonatos del CBB.

Conjuntamente con el diseño del método analítico, Bradford estudió la reactividad con el CBB de una serie de sustancias de presencia o uso común en determinaciones bioquímicas. Observó que el buffer Tris, ácido acético, 2-mercaptoetanol, sacarosa, glicerol, EDTA y trazas de detergentes (Triton X-100, SDS) provocaban un aumento significativo de la absorbancia a 595 nm, pero los consideró como interferencias evitables si se los incluía en el blanco de reactivos. En cambio, 1% de detergentes, fenol, solución para diálisis y acetona generaban errores demasiado grandes como para corregirse [2].

Otros investigadores encontraron interferencias adicionales, como fármacos [41], azúcares [42] o polímeros [43,44]. Silvério y col. estudiaron sistemáticamente un gran número de sales y polímeros en diferentes concentraciones. Hallaron una importante contribución de sales básicas como carbonatos [13]. Propusieron la dilución de las muestras como solución, ya que al disminuir la concentración de los compuestos su efecto se minimiza. Sin embargo, esta estrategia deja de ser útil para sistemas donde la concentración inicial de proteína a determinar es muy baja.

Wenrich y Trumbo demostraron la reacción positiva del CBB con ADN y ARN que aumentaban la concentración real de proteína hasta un 18 % según la identidad del analito [12]. Como ya se mencionó anteriormente, los ácidos nucleicos son una impureza común en los preparados comerciales de enzima.

La absorbancia de 0,1 a 595 nm registrada cuando el RB es agregado a la muestra control representa una contribución significativa en comparación con la señal de las muestras en el rango micro (menor a 0,4 para BSA y a 0,245 para CALB). Esta señal al UV-V se debería a la presencia de especies químicas derivadas de la disgregación del soporte. Se incorporarían al medio especies como hierro y clusters APTS/GLUT capaces de formar complejos con el CBB [45]. Para verificar esta hipótesis se preparó una mezcla de APTS y GLUT en agua. El

producto formado es un sólido amarillo que precipita. Al agregar una gota de RB 5X la suspensión se solidifica tornándose más oscura hasta separarse en dos fases: una sólida y otra líquida de color azul. Estas evidencias pueden observarse en la Figura 6.9.



Figura 6.9. Reacción entre APTS y GLUT en agua y el posterior agregado de RB 5X.

Si la mezcla se realiza en etanol, el producto es soluble como se aprecia en la Figura 6.10. Cuando se agregó una gota de RB 5X la solución tomó un color azul intenso (Fig. 6.10).

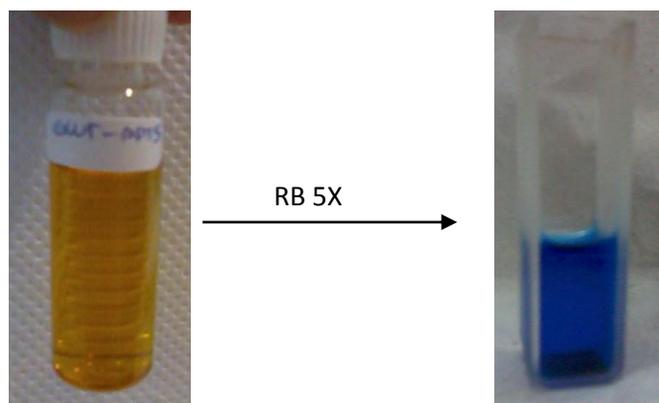


Figura 6.10. Producto de reacción APTS-GLUT en etanol y el posterior agregado de RB 5X.

Tanto el espectro de la muestra control como la reacción positiva de APTS-GLUT ante CBB evidencian la importante interferencia que constituyen estas especies en la determinación de proteína en el medio de inmovilización.

El fenómeno de agregación de proteínas conduce a interferencias adicionales en la cuantificación usando Bradford.

Dos diluciones del sobrenadante de inmovilización de CAT 7 fueron analizadas por el método de Bradford clásico (Procedimiento I): una sin agitarla, y la otra luego de 30 minutos de agitación magnética. Estos procedimientos conducen a soluciones de proteínas con diferente nivel de agregación.

Los espectros del complejo con CBB se muestran en la Figura 6.11. La absorbancia aumentó en casi todo el espectro cuando la muestra fue agitada. A 595 nm la A pasó de 0,154 a 0,179. Esto es una evidencia de la desagregación de la enzima ya que al existir mayor número de grupos reactivos expuestos a la solución, más moléculas de CBB se unirán formando el complejo azul.

6.4.2.2. Interferencias en el método de determinación de S por EA-ICP

Cuando se utilizó solamente emisión atómica para calcular CE (método IV en la Tabla 6.5), se tuvo en cuenta que al desintegrarse parcialmente el soporte durante las 7 horas de agitación, trazas de azufre podían incorporarse al medio líquido desde la magnetita, donde se encuentra como sulfatos provenientes de las sales de Fe empleadas en la coprecipitación (ver Fig. 6.7). Para corregir el valor de S proveniente únicamente de CALB, se utilizó la relación de absorbancias en el UV-V a 595 nm de la muestra y el control (sobrenadante de la agitación del soporte en agua, sin CALB, Sección 6.3.3.) como “factor de corrección”. Por ejemplo, para el CAT 1, la A de una dilución apropiada del sobrenadante fue 0,32. La misma dilución del control tuvo A = 0,05. Como $0,05/0,32 = 0,15$ se asume que el 15 % del S detectado *en esa muestra* no proviene de CALB. Entonces los ppm de S medido por ICP fueron multiplicados por 0,85 y este valor fue usado para calcular lipasa remanente en solución.

El hecho de asumir que se disgrega la misma proporción de S en el soporte puro que en el soporte en presencia de proteína (incluso en distintas concentraciones) forma parte del error inherente al método de cuantificación propuesto.

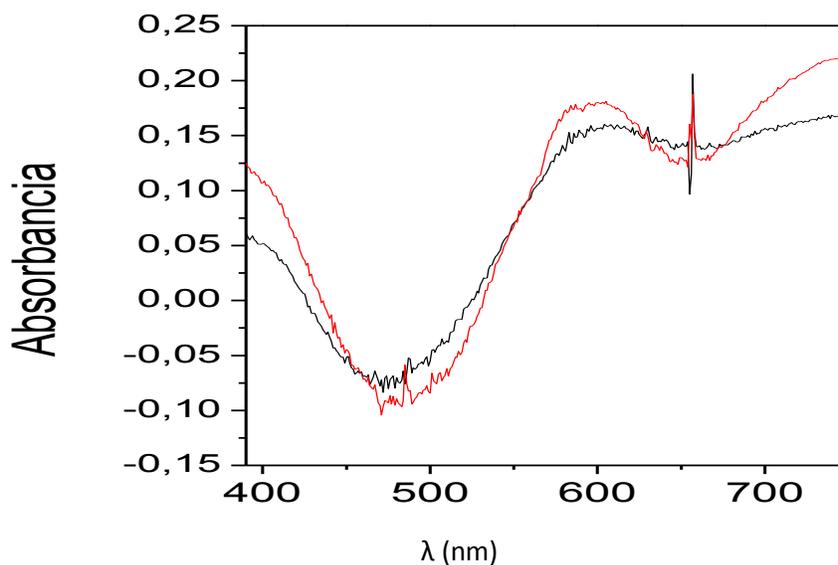


Figura 6.11. Espectros UV-V de diluciones del sobrenadante de inmovilización de CAT 7 con CBB, sin agitación (negro) y agitado (rojo).

6.5. Conclusiones del capítulo VI

Se estudiaron cuatro métodos de cálculo de la carga enzimática de CALB inmovilizada en los soportes magnéticos a través de la combinación de dos procedimientos analíticos: cuantificación de proteína por el método de Bradford y de azufre por emisión atómica-ICP.

La aplicación del método colorimétrico clásico (método I) resultó en valores de CE hasta 1200% menores a los considerados correctos, debido a la baja concentración de proteína medida en el caldo comercial de partida y el medio de inmovilización. La principal fuente de error fue el empleo de BSA como patrón de concentración.

Cuando se usó EA-ICP para conocer CALB en el caldo comercial, (método II) la cantidad de lipasa ofrecida fue corregida, pero permaneció la subestimación de proteína en el sobrenadante por la elección incorrecta del patrón.

Al emplear CALB como patrón (método III), las CE fueron algo mayores a las calculadas sólo por EA (método IV). Interferencias provenientes de la desintegración del soporte aumentaron la respuesta en ambas técnicas. Las mismas son, *en este sistema*, hierro y conjugados APTS-GLUT para Bradford, y S de la magnetita para EA. Esta última interferencia pudo ser corregida.

Las CE que mejor se correlacionaron con la actividad de cada catalizador fueron el promedio de los métodos III y IV.

Si bien la técnica propuesta como complemento (EA-ICP) requiere equipamiento especial y operador calificado, no siempre presentes en todo laboratorio, la magnitud de los errores cometidos por espectrometría UV-V justifican el gasto que implica la derivación de esos análisis a otros laboratorios.

Es necesario purificar los caldos comerciales de enzima u otras proteínas antes de emplearlos para separarlas de fracciones insolubles y si es posible, ácidos nucleicos. También deben analizarse por SDS-PAGE para comprobar pureza en cuanto a otras proteínas.

Si se conoce la cantidad de metioninas y cisteínas en la secuencia de aminoácidos, el método de S por EA-ICP es aplicable a virtualmente cualquier proteína, en medios de inmovilización u otros.

Cada soporte en particular puede inducir a distintas interferencias, de aquí la necesidad de hacer un estudio individual en función del sistema.

El método de Bradford es válido sólo si se cuenta con un patrón de la misma especie a cuantificar, la muestra se encuentra libre de interferencias (o son conocidas y se pueden agregar al blanco) y se emplea junto con otra técnica complementaria de mayor exactitud, como la propuesta en este capítulo.

Por último, vale destacar que la publicación de estas controversiales conclusiones fue desestimada por una 15 revistas científicas diferentes, bajo la respuesta común de que el método de Bradford es sencillo y económico. Con los

resultados presentados en este capítulo, quedó demostrado que la magnitud de los errores cometidos por el método de Bradford obliga a cambiar la metodología tradicional de cuantificación de proteínas incluso cuando esto implique usar técnicas más complejas, con equipamiento costoso y/o solo disponibles en contados laboratorios.

Los resultados y conclusiones de este capítulo dieron origen a una publicación en una revista internacional con referato y una presentación a reunión científica internacional:

-Quantification of immobilized *Candida antarctica* lipase B (CALB) using ICP-AES combined with Bradford method Paula Nicolás, Verónica L. Lassalle, María L. Ferreira. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 97 (2017) p. 97–103

-Importance of the analytical method choice for enzyme loading determination in immobilization. Paula Nicolás, Verónica L. Lassalle, María Luján Ferreira. 1° Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones. 23 al 26 de setiembre de 2014, Búzios, Brasil.

6.6. Referencias del capítulo VI

- [1] O.H. Lowry, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [2] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [3] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.

- [4] A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. David, DETERMINATION OF SERUM PROTEINS BY MEANS OF THE BIURET REACTION, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751–766.
- [5] C. V. Sapan, R.L. Lundblad, N.C. Price, Colorimetric protein assay techniques, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29 (1999) 99–108.
- [6] Y. Cao, J. Zhao, Y.L. Xiong, Coomassie Brilliant Blue-binding: a simple and effective method for the determination of water-insoluble protein surface hydrophobicity, *Anal. Methods.* 8 (2016) 790–795.
- [7] C.D. Georgiou, K. Grintzalis, G. Zervoudakis, I. Papapostolou, Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 391–403.
- [8] S.J. Compton, C.G. Jones, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal. Biochem.* 151 (1985) 369–374.
- [9] J. Pierce, C.H. Suelter, An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination, *Anal. Biochem.* 81 (1977) 478–480.
- [10] E. Szöllősi, E. Házy, C. Szász, P. Tompa, Large systematic errors compromise quantitation of intrinsically unstructured proteins, *Anal. Biochem.* 360 (2007) 321–323.
- [11] J.C. Bearden, Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* 533 (1978) 525–529.
- [12] B.R. Wenrich, T.A. Trumbo, Interaction of nucleic acids with Coomassie Blue G-250 in the Bradford assay, *Anal. Biochem.* 428 (2012) 93–95. doi:10.1016/j.ab.2012.06.014.
- [13] S.C. Silvério, S. Moreira, A.M.F. Milagres, E.A. Macedo, J.A. Teixeira, S.I. Mussatto, Interference of some aqueous two-phase system phase-forming components in protein determination by the Bradford method, *Anal. Biochem.* 421 (2012) 719–724.

- [14] A. Wang, F. Du, X. Pei, C. Chen, S.G. Wu, Y. Zheng, Rational immobilization of lipase by combining the structure analysis and unnatural amino acid insertion, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 132 (2016) 54–60.
- [15] C. Cui, N. Guan, C. Xing, B. Chen, T. Tan, Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase Ylip2 for the biocatalytic synthesis of phytosterol ester in a water activity controlled reactor, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 146 (2016) 490–497.
- [16] M. Aghababaie, M. Beheshti, A. Razmjou, A.-K. Bordbar, Covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on a novel functionalized Fe₃O₄@SiO₂ dip-coated nanocomposite membrane, *Food Bioprod. Process.* 100 (2016) 351–360.
- [17] K.C. Badgular, B.M. Bhanage, Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of β -amino ester compounds, *Process Biochem.* 51 (2016) 1420–1433.
- [18] N. Rueda, C.S. dos Santos, M.D. Rodriguez, T.L. Albuquerque, O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 128 (2016) 10–18.
- [19] H. Ahmad, M. Saleemuddin, A coomassie blue-binding assay for the microquantitation of immobilized proteins, *Anal. Biochem.* 148 (1985) 533–541.
- [20] M. Orschel, A. Katerkamp, M. Meusel, K. Cammann, Evaluation of several methods to quantify immobilized proteins on gold and silica surfaces, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 10 (1998) 273–279.
- [21] V.L. Lassalle, S. Pirillo, E. Rueda, M.L. Ferreira, An accurate UV/visible method to quantify proteins and enzymes: Impact of aggregation, buffer concentration and the nature of the standard, *Curr. Top. Anal. Chem.* 8 (2011) 83–93.
- [22] J.C.J. Quilles, R.R. Brito, J.P. Borges, C.C. Aragon, G. Fernandez-Lorente, D.A. Bocchini-Martins, E. Gomes, R. da Silva, M. Boscolo, J.M. Guisan,

- Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents, *Biochem. Eng. J.* 93 (2015) 274–280.
- [23] J. Long, A. Jiao, B. Wei, Z. Wu, Y. Zhang, X. Xu, Z. Jin, A novel method for pullulanase immobilized onto magnetic chitosan/Fe₃O₄ composite nanoparticles by in situ preparation and evaluation of the enzyme stability, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 109 (2014) 53–61.
- [24] P. Esmailnejad-Ahranjani, M. Kazemeini, G. Singh, A. Arpanaei, Study of Molecular Conformation and Activity-Related Properties of Lipase Immobilized onto Core–Shell Structured Polyacrylic Acid-Coated Magnetic Silica Nanocomposite Particles, *Langmuir.* 32 (2016) 3242–3252. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.langmuir.5b03614> (accessed December 20, 2016).
- [25] M. Mertens, C. Rittmeyer, B.O. Kolbesen, Evaluation of the protein concentration in enzymes via determination of sulfur by total reflection X-ray fluorescence spectrometry † limitations of the, (2001) 2157–2164.
- [26] A. Wittershagen, P. Rostam-Khani, O. Klimmek, R. Groß, V. Zickermann, I. Zickermann, S. Gemeinhardt, A. Kröger, B. Ludwig, B.O. Kolbesen, Determination of metal-cofactors in enzyme complexes by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 52 (1997) 1033–1038.
- [27] Bio-Rad Protein Assay, (n.d.). http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf.
- [28] EPA-200.7, (n.d.). <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-200.7.pdf>.
- [29] J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T. a Jones, The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica.*, *Structure.* 2 (1994) 293–308.
- [30] C.R. Llerena-Suster, L.E. Briand, S.R. Morcelle, Analytical characterization and purification of a commercial extract of enzymes: A case study, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 121 (2014) 11–20.

- [31] R.W. Congdon, G.W. Muth, A.G. Splittgerber, The Binding Interaction of Coomassie Blue with Proteins, *Anal. Biochem.* 213 (1993) 407–413.
- [32] G. Giraudi, C. Baggiani, C. Giovannoli, Inaccuracy of the Bradford method for the determination of protein concentration in steroid-horseradish peroxidase conjugates, *Anal. Chim. Acta.* 337 (1997) 93–97.
- [33] E.M.A. van Wilgenburg, M. G. M. Werkman, W.H. van Gorkom, J.B.J. Soons, Criticism of the Use of Coomassie Brilliant Blue G-250 for the Quantitative Determination of Proteins, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19 (1981) 301–304.
- [34] S.M. Read, D.H. Northcote, Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein, *Anal. Biochem.* 116 (1981) 53–64.
- [35] C.M. Stoscheck, Increased uniformity in the response of the Coomassie blue G protein assay to different proteins, *Anal. Biochem.* 184 (1990) 111–116.
- [36] H.K. Ku, H.M. Lim, K.H. Oh, H.J. Yang, J.S. Jeong, S.K. Kim, Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: Comparison with two calculation models, *Anal. Biochem.* 434 (2013) 178–180. doi:10.1016/j.ab.2012.10.045.
- [37] M.C. Gosnell, H.A. Mottola, Determination of activity and amount of silica-immobilized penicillinase, *Microchem. J.* 37 (1988) 149–154.
- [38] Precio CALB libre, (n.d.). <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/13170?lang=es®ion=AR>.
- [39] Precio CALB liofilizada, (n.d.). <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/62288?lang=es®ion=AR>.
- [40] L. Gregg, P. Hvass, GRAS notification regarding Lipozyme (CALB L) provided by Novozymes NorthAmerica to the Food and Drug Administration LUNA No. 2004-39073-01, 2004.

- [41] T. Marshall, K.M. Williams, Drug interference in the Bradford and 2,2'-bicinchoninic acid protein assays, *Anal. Biochem.* 198 (1991) 352–354.
- [42] S.P. Banik, S. Pal, S. Ghorai, S. Chowdhury, S. Khowala, Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins, 2009.
- [43] N. Carlsson, A. Borde, S. Wölfel, B. Åkerman, A. Larsson, Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers, *Anal. Biochem.* 411 (2011) 116–121.
- [44] H. Barbosa, N.K.H. Slater, J.C. Marcos, Protein quantification in the presence of poly(ethylene glycol) and dextran using the Bradford method, 2009.
- [45] and H.U. Toshinao ISHII, Aya SORITA, Masayoshi, SAWAMURA, Hirozo KUSUNOSE, Determination of the Reaction Product of Glutaraldehyde and Amine Based on the Binding Ability of Coomassie Brilliant, *Anal. Sci.* 13 (1997) 5–9. doi:10.2116/analsci.13.5.

Capítulo VII

Optimización del protocolo de
inmovilización de CALB sobre
MAG-lisina

Hasta este punto, se estudió la actividad de CALB inmovilizada covalentemente sobre soportes previamente activados con GLUT a base de MAG-QUIT. En este capítulo, se analiza la influencia del tipo de soporte usando nanopartículas de magnetita modificadas con LIS. Se promovió, en principio, la adsorción simple de la CALB sobre MAG(SDS)-LIS. En una etapa posterior se realizó el entrecruzamiento post-inmovilización usando concentraciones variables de GLUT.

Se fijó la concentración GLUT óptima en términos de la actividad del biocatalizador. Se preparó un nuevo catalizador usando MAG(SDS)-LIS con esa concentración de GLUT para activar el soporte e inducir el anclaje covalente de la enzima. Se evaluó la performance de ambos catalizadores.

7.1. Introducción

El empleo de aminoácidos (AA) como funcionalizantes para inmovilización enzimática ha sido escasamente reportado. Por ejemplo, la epoxi-agarosa se modificó con cisteína para obtener un soporte sin carga neta. Este AA reacciona a pH 7 a través del grupo tiol (-SH) dejando libres el carboxilato y el amino protonado, cuyas cargas se compensan. Luego la epoxi agarosa fue activada con GLUT para inmovilizar CALB. Posteriormente a 2 horas de tratamiento no se registró actividad catalítica en el sobrenadante. Sin embargo la enzima resultó débilmente adsorbida dado que al extraer el biocatalizador y lavar se detectó la presencia de enzima en los líquidos de lavado.

El tratamiento del soporte en la solución de enzima durante un período de 24h aseguró la inmovilización irreversible. [1]. Los autores de este trabajo calificaron de “sorprendentemente estables” a las bases de Schiff formadas a lo largo de tiempos prolongados de contacto lipasa-soporte.

El ácido glutámico fue empleado en su forma polimérica junto con gelatina para inmovilizar una esterasa por atrapamiento en presencia de una carbodiimida. El biocatalizador obtenido perdió el 60 % de su actividad inicial al llegar al quinto ciclo [2].

En este capítulo se pretende encontrar un método eficiente de inmovilización de CALB en magnetita a través de la interacción con un AA que permita obtener un biocatalizador activo, operacionalmente estable y resistente a tiempos de almacenamiento prolongados. Dada la versatilidad, bajo costo y biocompatibilidad de la lisina, se seleccionó este AA para evaluar dos posibles estrategias de inmovilización: i-entrecruzamiento con GLUT post-adsorción de CALB; ii-uniión covalente de CALB usando una concentración óptima de GLUT.

7.2. Experimental

Se estudiaron dos rutas de inmovilización de CALB, Método “**A**” y Método “**B**”. En el Método “**A**” la lipasa fue adsorbida sobre el MAG aminada con lisina, y luego se trató con soluciones de GLUT de diferentes concentraciones.

En el Método “**B**” se promovió la inmovilización covalente de CALB usando la concentración óptima de GLUT surgida del análisis implementado a partir del protocolo **A**.

Método A

7.2.1. Adsorción de CALB sobre MAG(SDS)-LIS y entrecruzamiento con GLUT

El material obtenido según el procedimiento descrito en el capítulo III, sección 3.2.1.5 se utilizó como soporte para adsorción simple de la lipasa, siguiendo el protocolo de la sección 2.2.5 (capítulo II). A esta formulación se la llamará **MAG(SDS)-LIS-CALB**.

300 mg de MAG(SDS)-LIS-CALB se dispersaron en 5 mL de soluciones de GLUT de concentraciones variables entre 0,05 y 2,5 % (masa de GLUT en 100 mL de solución). La relación masa de sólido/volumen de solución de GLUT se mantuvo fija en 300 mg/5 mL. La suspensión se agitó magnéticamente por 3 horas a temperatura ambiente. A estos catalizadores se los llamará **A**, seguido de la concentración de aldehído utilizada (% masa en volumen): **A0,05 – A2,5**.

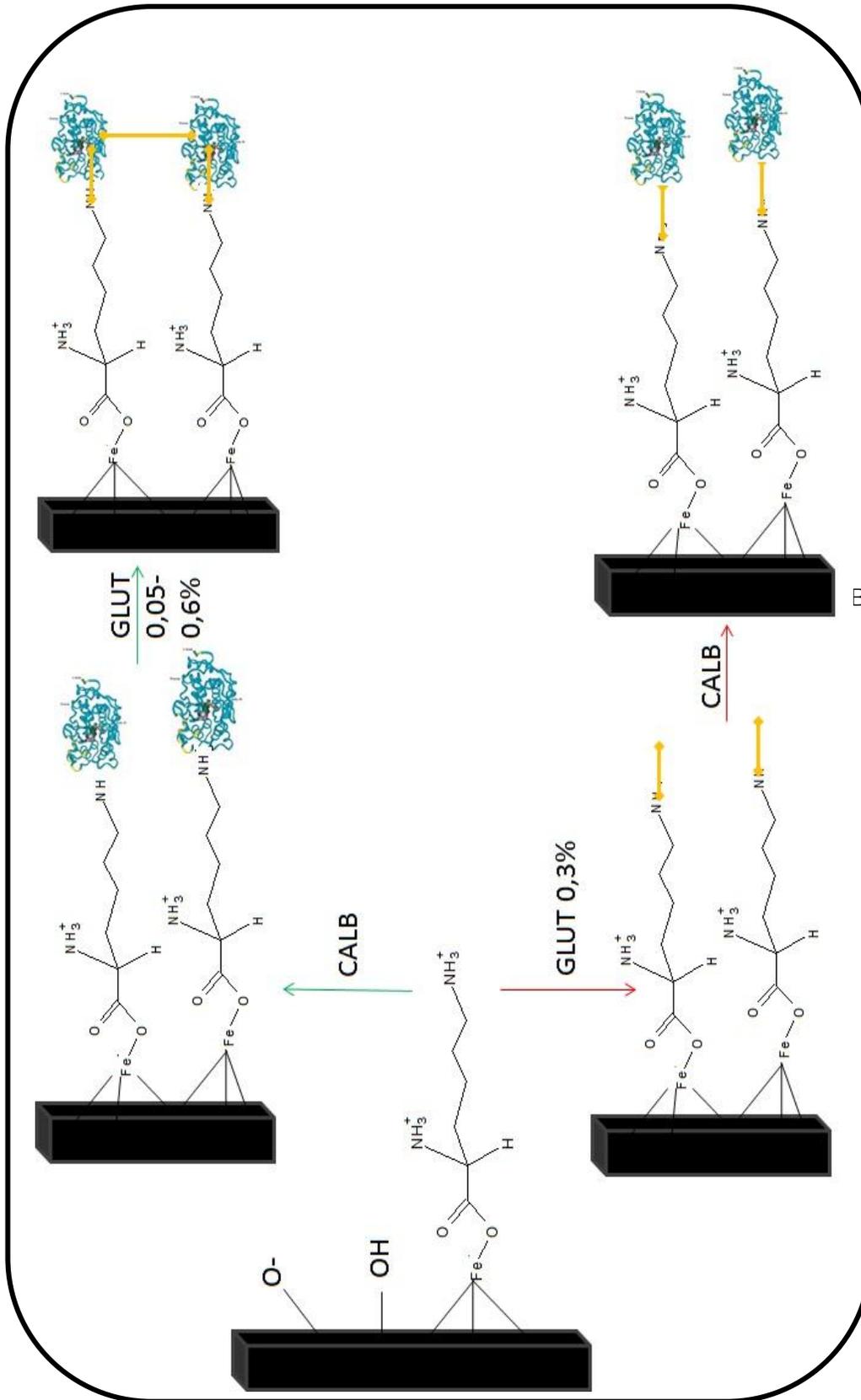
Método B:

7.2.2. Activación con GLUT del soporte aminado e inmovilización covalente

300 mg de MAG(SDS)-LIS se dispersaron en 5 mL de GLUT 0,03 %, durante 3 horas a 45 °C. El sólido se recuperó por decantación magnética y fue lavado 3 veces con agua destilada y secado. A este soporte lo llamaremos **MAG(SDS)-LIS-GLUTO,3**.

200 mg de soporte MAG(SDS)-LIS-GLUTO,3 se agitaron 7 horas en 33 mL de agua destilada conteniendo 1,1 mL del caldo comercial. Estas cantidades corresponden a las proporciones soporte/lipasa/agua del protocolo 2.2.3. El catalizador obtenido de esta forma será llamado **B**.

El Esquema 7.1 representa las dos rutas de síntesis de los biocatalizadores estudiados en este capítulo.



Esquema 7.1. Caminos de inmovilización de CALB sobre MAG(SDS)-LIS

7.3. Resultados

7.3.1. Caracterización

7.3.1.1. DRIFTS

En la Figura 7.1 se muestran los espectros IR de CALB inmovilizada por adsorción simple.

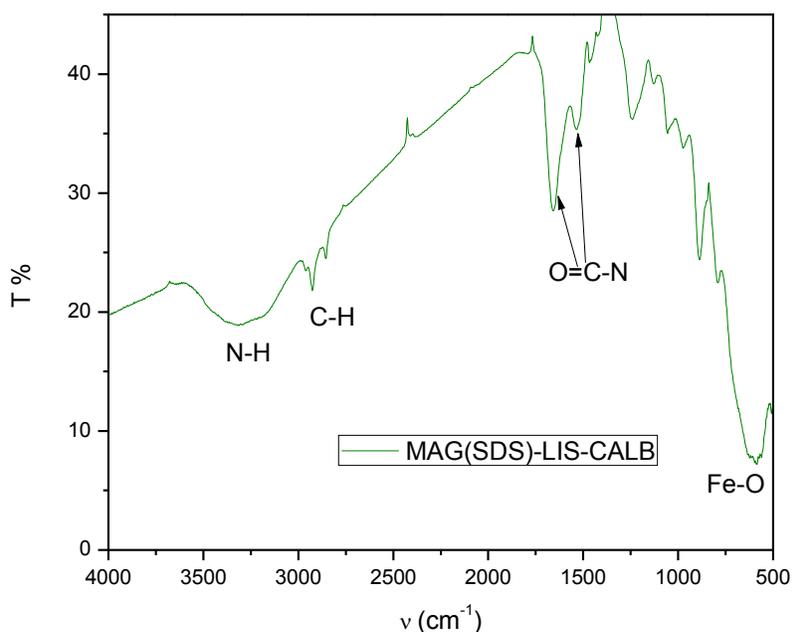


Figura 7.1. Espectro IR de MAG(SDS)-LIS-CALB

La presencia de las bandas a 1720, 1590 y 3200-3400 cm^{-1} atribuibles al grupo amida es una confirmación de la incorporación de la lipasa en la muestra MAG(SDS)-LIS-CALB .

La Figura 7.2 muestra los espectros de MAG(SDS)-LIS-CALB-GLUTX tratadas con concentraciones variables del entrecruzante.

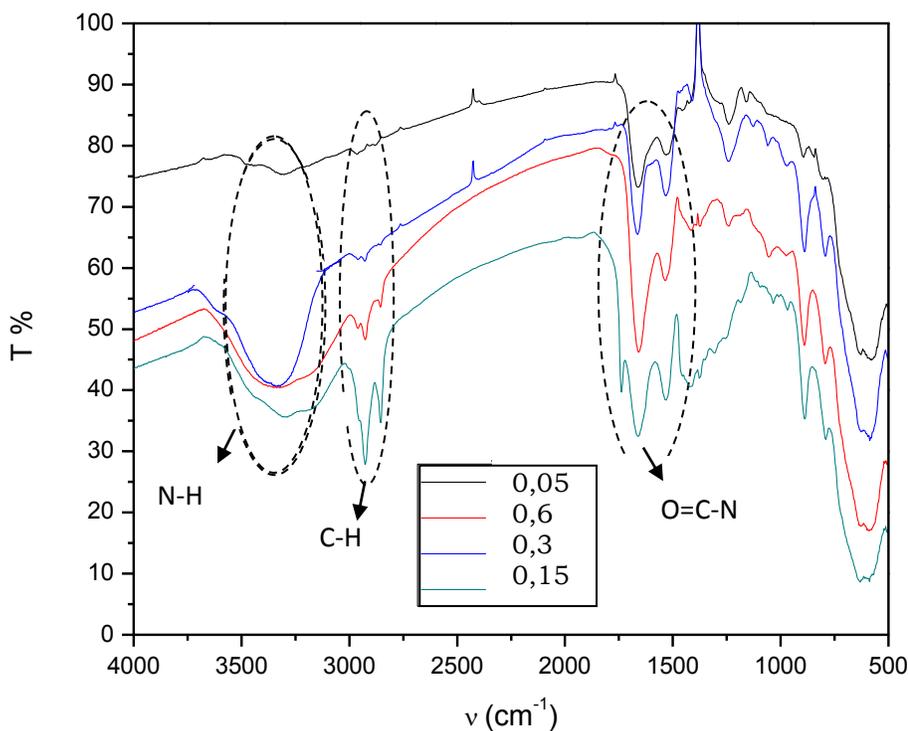


Figura 7.2. Espectros IR de MAG(SDS)-LIS-CALB-GLUTX, X=0,05-0,6%

La incorporación de GLUT *luego* de la adsorción física de CALB es difícil de apreciar a partir de los espectros de IR ya que las señales asociadas al grupo carbonilo aldehídico y las bandas correspondientes a los nuevos enlaces C-N o C=N que pueden formarse, se solapan en la misma región (1400-1750 cm^{-1}).

En la Figura 7.3, es posible detectar la presencia de GLUT sobre MAG(SDS)-LIS a partir de la disminución de intensidad de la banda a 1624 cm^{-1} por la desaparición de enlaces N-H y el incremento de las ubicadas entre 1000-1250. Sin embargo, existe contribución de agua en esta zona y de otros grupos funcionales. Además se hacen más notorias las señales de metilenos (CH_2) entre 2750 y 3000, y se suma el estiramiento de C=N alrededor de 3300.

La lipasa aporta numerosos grupos amida que aumenta las bandas entre 1500 y 1650 y a 3250 cm^{-1} .

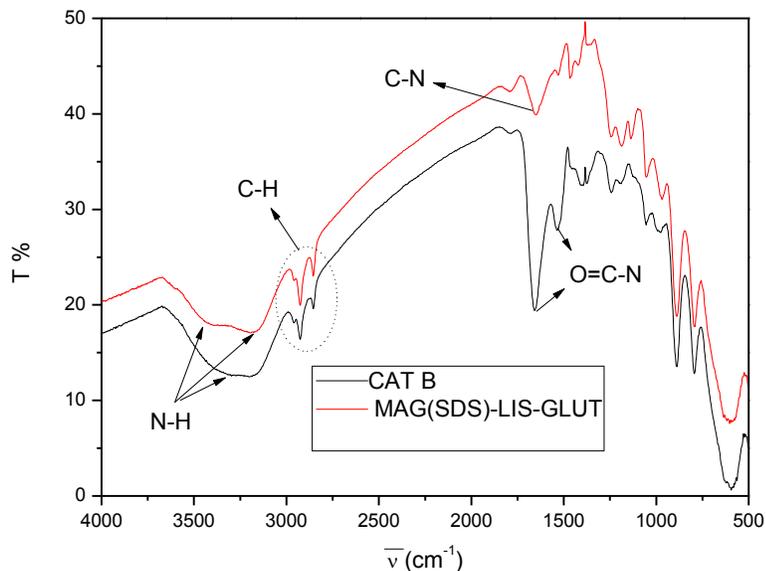


Figura 7.3. Espectros IR de MAG(SDS)-LIS, con GLUT como agente activador del soporte y CALB inmovilizada covalentemente.

7.3.1.2. Electroforesis y DLS

La Tabla 7.1 informa los valores de DH y ζ pot para los diferentes tipos de partículas preparadas. La adsorción simple de la lipasa invierte el signo del ζ pot respecto del precursor MAG(SDS)-LIS (Cap. III) ya que su propia carga superficial es negativa. El entrecruzamiento con GLUT (muestras A) mantiene esta carga. La inmovilización covalente sobre GLUT (catalizador B) resultó en un material también negativamente cargado. Esto puede atribuirse a la carga superficial, en concordancia con la carga de CALB a ese pH (5.7).

Los tamaños medidos en dispersión acuosa y expresados en términos de diámetros hidrodinámicos, muestran una fuerte tendencia a la agregación de las partículas.

Tabla 7.1. Diámetros hidrodinámicos en agua y potencial ζ de catalizadores A, B

Muestra	Dh (nm)	IPD	Zpot \pm Sd (mV)*
MAG(SDS)-LIS-CALB	948	0,347	-20,3 \pm 4,42
A0,05 (usado 7 veces)	479	0,163	33,8 \pm 7,0
A0,15	501	0,225	-29,9 \pm 5,07
A0,3	601	0,224	-24,4 \pm 4,73
B	742	0,382	-16,3 \pm 3,95

*pH 5,7

7.3.1.3. Microscopía electrónica

En la Figura 7.4 se muestran las imágenes TEM de MAG(SDS) lavada, MAG(SDS)-LIS, MAG(SDS)-LIS-CALB y tres de los catalizadores A (GLUT post-adsorción).

Las partículas modificadas con el aminoácido adoptaron forma esférica, de tamaños entre 10 y 30 nm.

La adsorción de la enzima provoca una importante aglomeración y un aumento en la polidispersión de la muestra. De manera que es posible encontrar algunas partículas aisladas del orden de 20nm aproximadamente, que se señalan en círculos rojos en la Fig. 7.4. El tratamiento posterior con GLUT 0,5-0,6% no altera significativamente el aspecto de los agregados, sin embargo ya no es posible detectar partículas de menor tamaño aisladas.

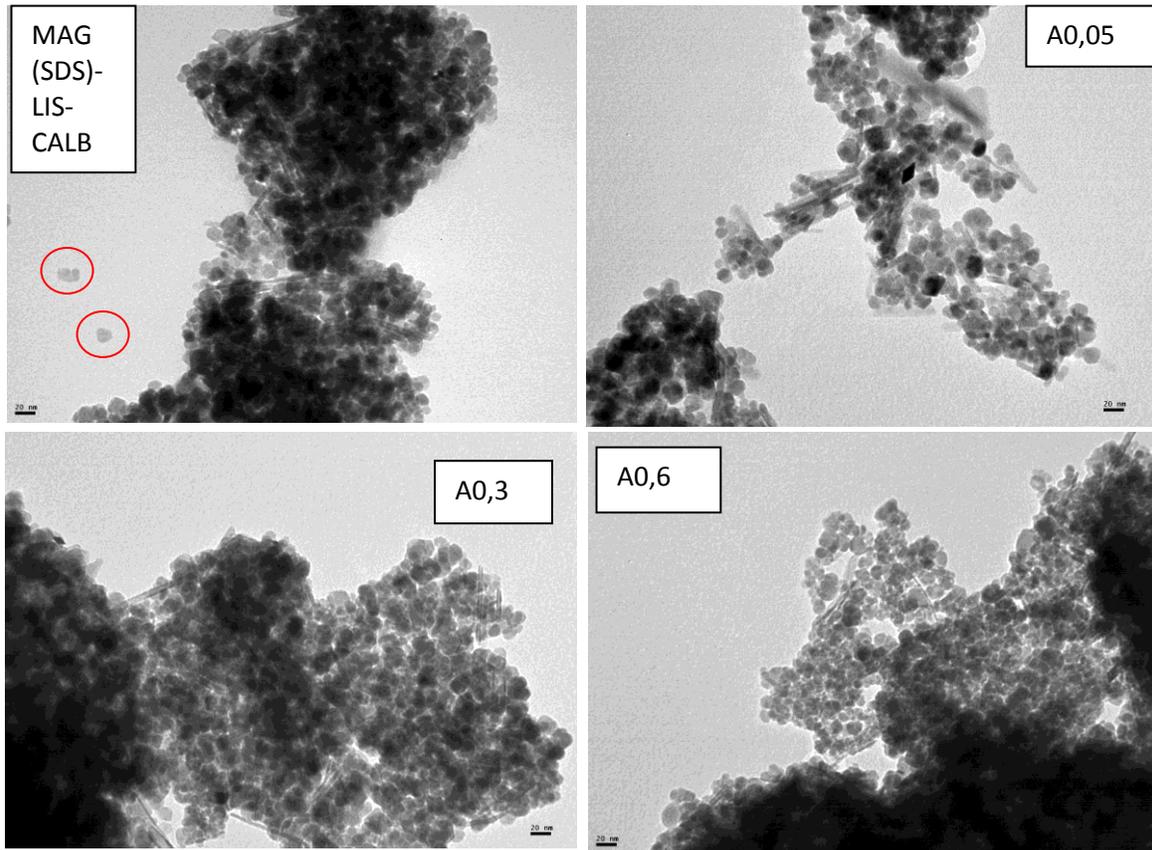


Figura 7.4. Micrografías TEM de muestras seleccionadas a una magnificación de 270000 X. Las barras de escala en las esquinas representan 20 nm.

Las micrografías del catalizador B exhiben zonas en las que se distinguen los cristales de MAG a pesar de su elevada aglomeración.

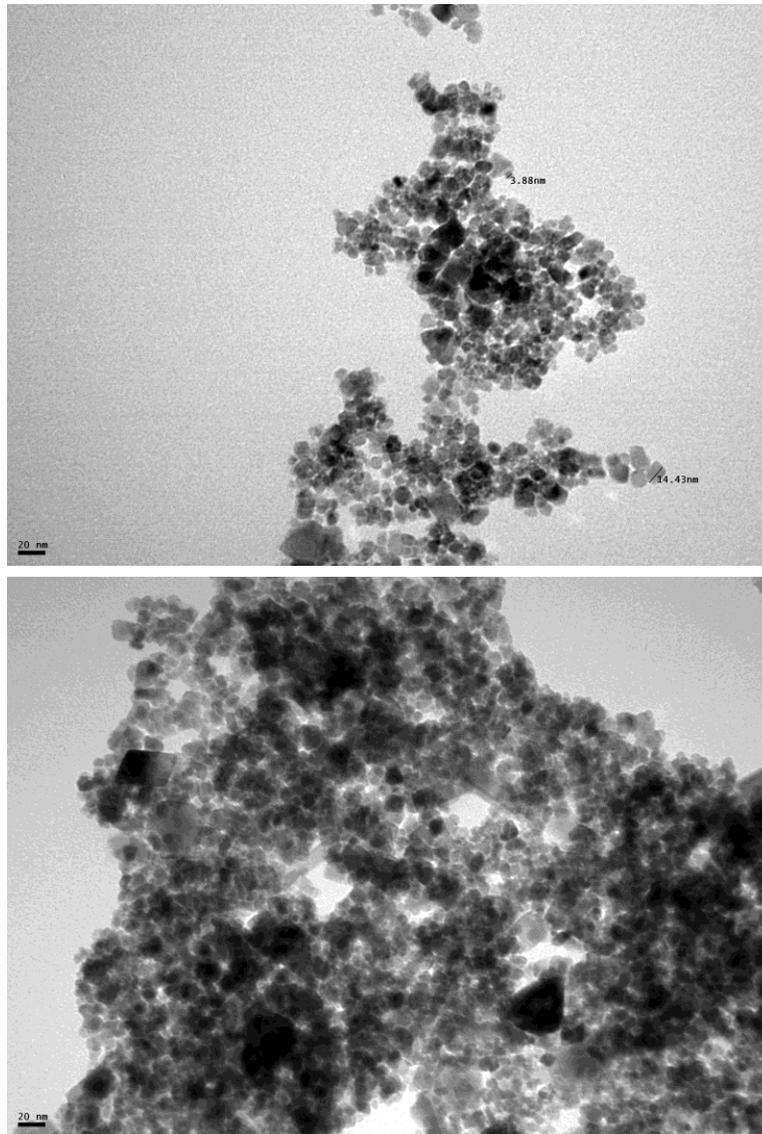


Figura 7.5. Micrografías TEM de distintas zonas del catalizador B. La barra en la esquina inferior izquierda representa 20 nm.

7.3.2. Actividad catalítica

7.3.2.1. CALB entrecruzada post-adsorción

Los catalizadores se testearon, en términos de su actividad, de acuerdo a las condiciones establecidas en el capítulo II: 30 mg de catalizador, 1 g de AO, 0,2 g de agua, 0,15 mL de etanol, 45 °C, 3 horas. Entre un ciclo y el siguiente, el catalizador fue lavado. Los resultados se muestran en la Figura 7.6, donde los valores de conversión son representados por las barras azules y el leaching en rojo en función del ciclo catalítico para cada concentración de GLUT explorada.

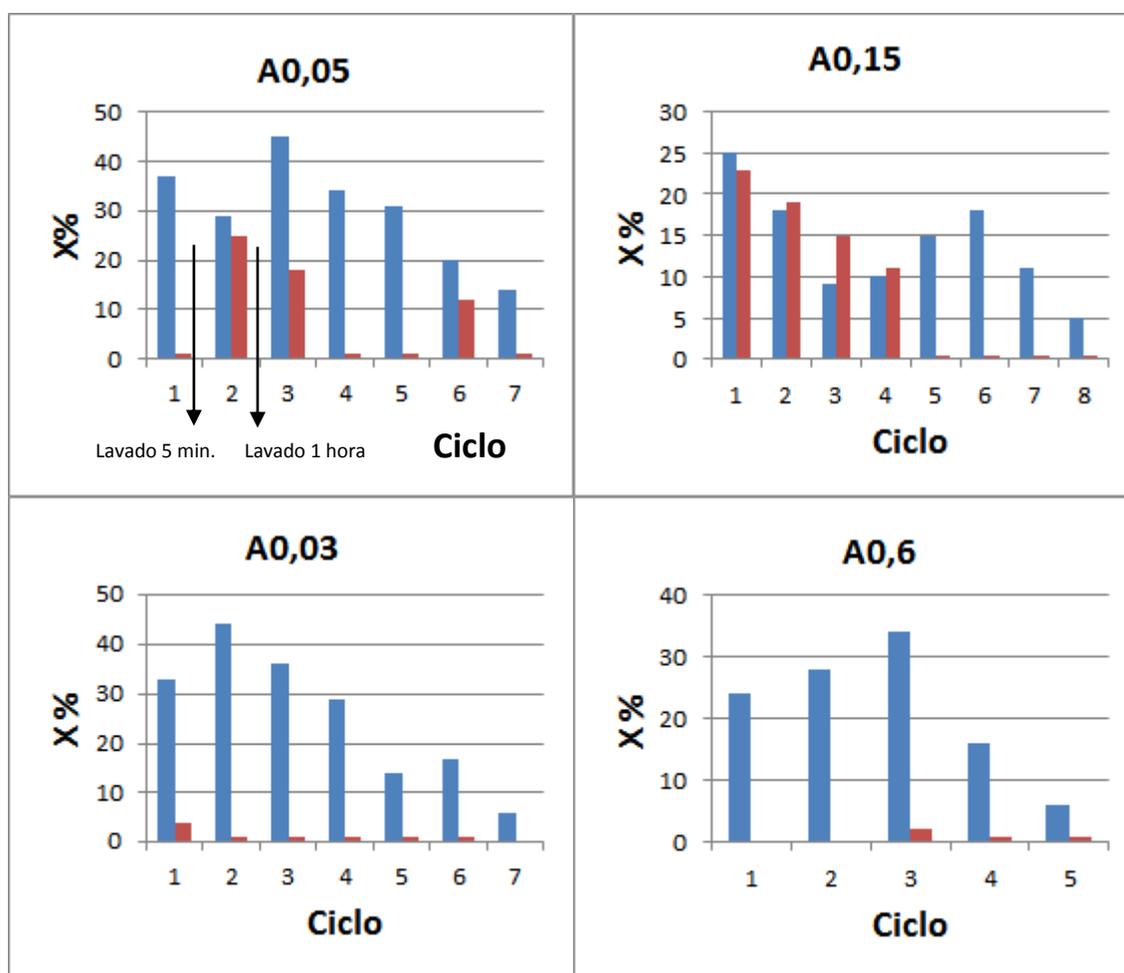


Figura 7.6. Conversión (azul) y leaching (rojo) de catalizadores A0,05-0,6. El A2,5 resultó totalmente inactivo ya en el primer uso.

El A0,05 fue lavado 5 minutos luego del primer uso. Su actividad decayó de 37 a 29 %. A partir del segundo ciclo el tiempo de lavado se aumentó a una hora para minimizar la inhibición por producto o sustrato. Efectivamente, al tercer uso la conversión aumentó considerablemente a 45 %. Por lo tanto, el protocolo de lavado establecido para todos los ciclos posteriores, para este y el resto de los catalizadores fue el siguiente:

- i- Lavado de una hora con etanol/heptano 1/1 bajo agitación magnética
- ii- Lavado de 5 minutos con etanol absoluto para remover restos de heptano, agitando magnéticamente.
- iii- El sólido se dejó secar a T ambiente antes de reutilizarlo.

Al emplear bajas concentraciones nominales de GLUT(0,05 y 0,15 %) se apreció la desorción de gran parte de la enzima inmovilizada; mientras que usando concentraciones mayores prácticamente no se detectó leaching.

La estabilidad operacional fue pobre en todos los casos ya que la actividad fue disminuyendo progresivamente hasta desaparecer en 8 ciclos o menos.

7.3.2.2. CALB inmovilizada covalentemente: catalizador B.

La eficiencia del catalizador B, en términos de la masa de AO convertida en la reacción test, superó ampliamente a cualquiera de los catalizadores "A" analizados. Como se aprecia en la Figura 7.7, en el primer uso mostró una conversión del 61 % con 30 mg de catalizador. La actividad decayó gradualmente a alrededor del 40 % X y se mantuvo constante hasta, al menos, el octavo uso. Se encontró un leaching significativo sólo en los 2 primeros ciclos; en el resto resultó notablemente bajo.

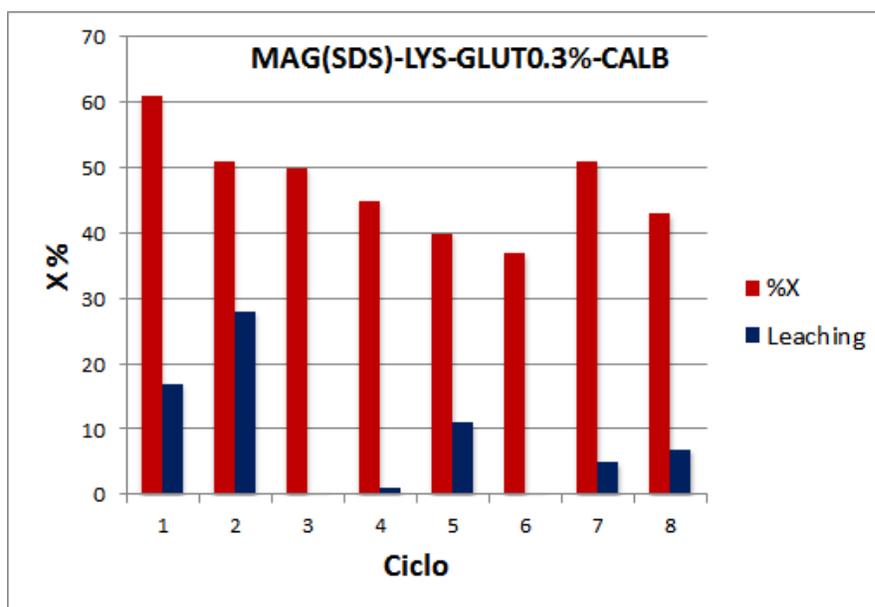


Figura 7.7. Conversión y leaching de 30 mg de catalizador B.

7.3.2.3. Estabilidad en almacenamiento

Los catalizadores A0,3 y B fueron reservados sin uso a 4 °C durante un período determinado para evaluar su estabilidad en función del tiempo de almacenamiento. Esta característica, junto con la estabilidad operacional, representan parámetros de suma importancia en relación a la potencial implementación práctica en el ámbito industrial de un catalizador.

Tanto A0,3 como B retuvieron prácticamente la totalidad de su actividad inicial después de 4 y 6 semanas respectivamente. Estos resultados se esquematizan en la Figura 7.8.

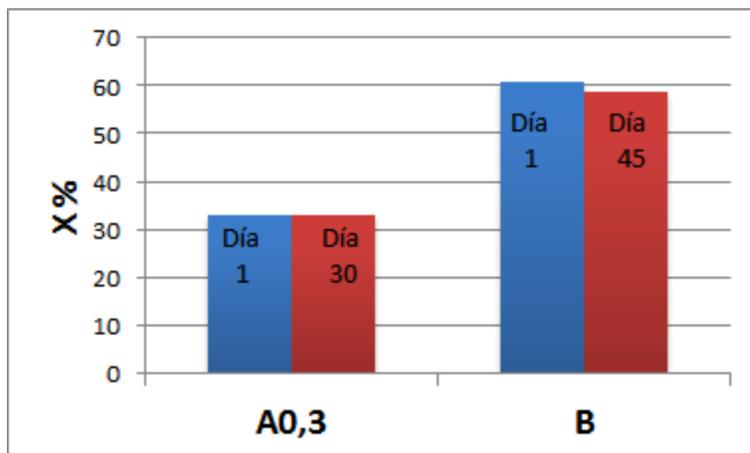


Figura 7.8. Conversión de 30 mg de catalizador/g AO a 45 °C luego de ser almacenados por períodos prolongados.

7.4. Discusión

7.4.1. Influencia de la concentración de GLUT

Como se pudo apreciar en la Fig. 7.5, la concentración nominal de GLUT (en el rango 0,05-0,6 %) en los tratamientos post-adsorción, no tuvo un gran impacto sobre la conversión inicial de los catalizadores “A”. Cuando la enzima adsorbida físicamente se trató con GLUT al 2,5 %, la conversión en el primer ciclo fue nula. Ese mismo porcentaje de entrecruzante fue usado en el catalizador del capítulo IV pre-inmovilización (SOP-CALB). Esta diferencia con SOP-CALB se debe a la distinta naturaleza de MAG-AO-QUIT y MAG(SDS)-LIS. El soporte con QUIT permite la incorporación de una gran cantidad de GLUT por contener una fracción mayor de modificante orgánico. El análisis elemental realizado sobre SOP indicó que el contenido de C era de un 8% y el de N 0,5 %. En cambio, cuando MAG(SDS)-LIS fue analizado por EA-ICP, el N fue indetectable.

En cuanto al efecto fijador de GLUT, el aumento de la concentración minimizó la desorción en los reusos. Entonces, puede inferirse que existe un

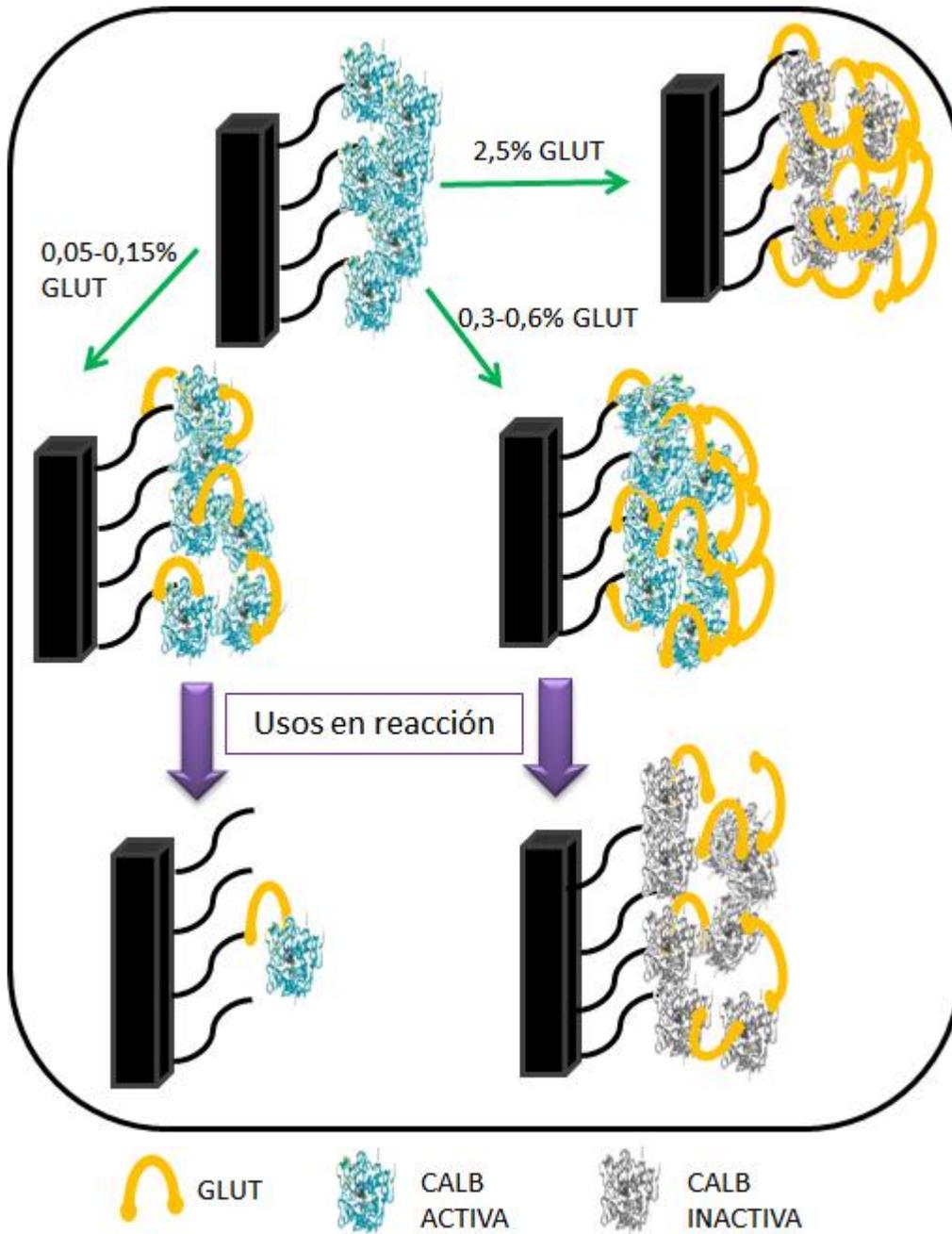
equilibrio entre el beneficio del entrecruzamiento, que dota de estabilidad operacional al catalizador; y el perjuicio de la desnaturalización de la enzima.

Este efecto dual del GLUT se ha observado en diferentes protocolos de inmovilización. Por ejemplo, la D-aminoácido-oxidasa fue adsorbida en Sepabeads®/poli-etilénimida y entrecruzada con 0,2-2% GLUT. Mientras la actividad decreció continuamente con esta concentración, la resistencia al leaching fue máxima en 0,5 % [3]. Comportamientos similares mostraron la hidrolasa de *Fusarium moniliforme* CGMCC 0536 [4], y CLEAs de lipasa de *Thermomyces lanuginosa* [5,6] y de CALB, respectivamente [7].

El mecanismo de reacción GLUT-proteína se había establecido ya en el capítulo IV, y está dado por las interacciones de los grupos funcionales de la enzima libre con la amplia variedad de grupos funcionales derivadas del dialdehído.

Los CATs obtenidos a partir del método A, en cambio, interactúan mediante unión covalente con el soporte y el entrecruzamiento enzima-enzima en el mismo paso. Se propone entonces que bajas concentraciones de GLUT no proveen la cantidad suficiente de grupos funcionales para fijar covalentemente todas las moléculas de CALB a la lisina. Además, existe la limitación de que sólo las especies de menor tamaño (monómero o dímero) lograrán difundir a través de la voluminosa capa de CALB adsorbida en la superficie, lo cual facilita la lixiviación. Esta hipótesis explicaría los altos niveles de leaching medidos para A0,05 y A0,15.

Si la cantidad de GLUT post-adsorción es excesiva, no sólo se logrará un entrecruzamiento intenso entre enzimas; sino que esa capa externa de entrecruzante puede obstruir el acceso del sustrato hasta el sitio activo de la lipasa. Este proceso se representa en el Esquema 7.2.



Esquema 7.2. Efecto del GLUT sobre CALB adsorbida en MAG(SDS)-LIS

7.4.2. Influencia del protocolo de inmovilización

Analizando la relación conversión/leaching de los catalizadores A0,05-0,6 (Fig. 7.6) surge que el A0,03 es el que mejor performance presentó, al lograr niveles de conversión medibles hasta en el séptimo ciclo, y con baja desorción de enzima. Es por esta razón que 0,3 % GLUT fue la concentración elegida para activar el soporte MAG(SDS)-LIS en el método de inmovilización "B". El catalizador B resultó altamente eficiente tanto en términos de conversión como estabilidad operacional y en almacenamiento.

En la Figura 7.9 se compara la cantidad total de AO convertido por los diferentes catalizadores preparados en todos los ciclos ensayados. El B fue capaz de catalizar la esterificación de aproximadamente el doble de ácido graso que A0,3, esto es 3576 mg de AO convertido por B vs. 1774 mg para A0,3.

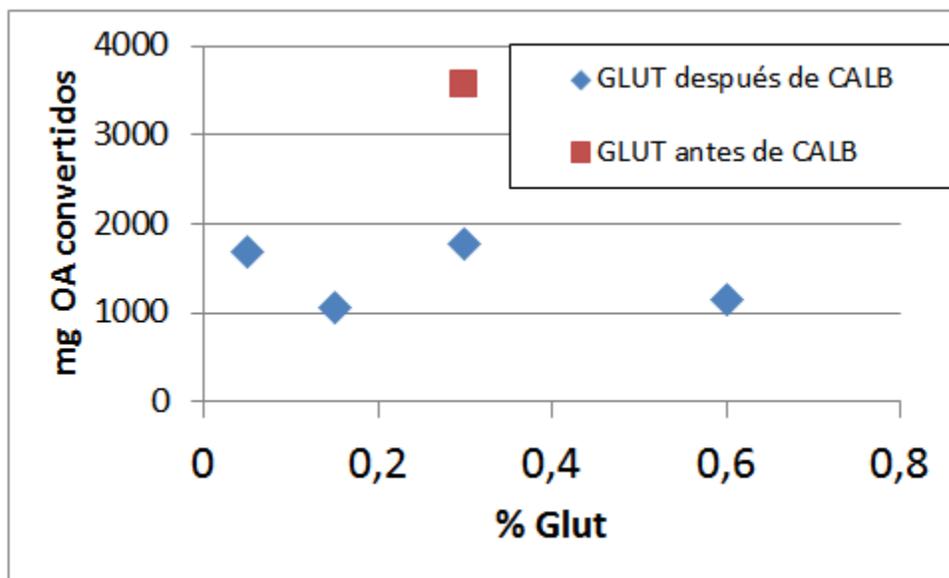


Figura 7.9. Cantidades de AO convertido por 30 mg de cada catalizador en todos los ciclos. A2,5 resultó totalmente inactivo.

La activación con GLUT de soportes aminados se ha estudiado intensamente desde hace décadas. Monsan propuso en 1978 que la cantidad óptima es dos moléculas de GLUT por cada grupo $-NH_2$ [8]. Teniendo en cuenta

las reacciones intra e intermoleculares que experimenta este entrecruzante (ver capítulo IV sección 4.4.1), el control de esta proporción es difícil de lograr ya que en las soluciones comerciales abundan las especies poliméricas y con otros grupos funcionales [9]. Aún purificando esta mezcla (por ejemplo, mediante destilaciones o adsorbentes de alta área [10]) para obtener GLUT monomérico, su aplicación como agente fijador de proteínas daría lugar a uniones covalentes fácilmente reversibles. Por lo tanto, al momento de establecer un protocolo de inmovilización, será necesario realizar un screening con GLUT comercial menor al 1% (masa de GLUT/100 mL de solución) ya que cada enzima se comportará de manera diferente según su composición de aminoácidos y conformación estructural.

La cantidad de GLUT ofrecida en el CATA0,3 y B fue la misma, sin embargo se manifiestan diferentes comportamientos en ambos catalizadores. Esto es, B conserva su actividad durante los sucesivos reusos mientras que A0,3 se desactiva. La hipótesis que justifica estas diferencias es que 0,3% de GLUT en relación a la proteína inmovilizada sería la concentración óptima para que, mediante el procedimiento “B”, CALB reaccione con el número mínimo necesario de puntos de anclaje que aseguran su inmovilización irreversible. Esto implica que no permanecen grupos aldehído libres [11].

El descenso de la conversión del catalizador B respecto del primer ciclo, es atribuible al desprendimiento de la capa de enzima adsorbida sobre aquellas inmovilizadas covalentemente. El mismo comportamiento se evidenció al estudiar el CAT SOP-CALB tal como se describió en el capítulo IV.

En el caso del método “A”, en cambio, el GLUT ofrecido estaría involucrado en la reacción enzima-enzima y enzima-soporte. Como la primera interacción ocurre primero por cuestiones difusionales, el sobre-entrecruzamiento es inevitable, favoreciendo la desorción de agregados de lipasa entrecruzados. Estos agregados no necesariamente son catalíticamente activos, de manera que podrían ser indetectables a partir de medidas de leaching, de acuerdo a la metodología adoptada en esta tesis para cuantificar la pérdida de enzima.

7.4.3. Competitividad del catalizador B frente a Novozyme® 435

Al haber encontrado un protocolo de inmovilización que permite obtener un catalizador activo, operacionalmente resistente y estable por períodos prolongados de almacenamiento, es posible realizar una comparación con un catalizador comercial en términos de la relación productividad/costo. Se seleccionó Novozyme® 435 debido a que también contiene CALB inmovilizada.

En la Tabla 7.2 se detallan los costos de fabricación por gramo del catalizador B y el precio de Novozyme® 435. Todos los reactivos son de marca Biopack excepto los solventes (heptano y etanol) que son de Dorwill, además del GLUT y el caldo enzimático cuyo origen es Sigma-Aldrich.

Tabla 7.2. Costos de los reactivos para fabricar 1 g de catalizador B y precio de Novozyme® 435.

Reactivo	Presentación	Precio (dólares)	Necesario p/1 g de MAG	Precio p/1g	% del total
FeCl ₃ .6H ₂ O	5 kg	31,50	2,3362 g	0,01	0,07
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 kg	24,20	1,2005 g	0,03	0,13
SDS	1 kg	47,83	0,1616 g	0,01	0,03
NH ₄ OH 26-30%	5 L	30,27	3,74 mL	0,02	0,10
Heptano	1 L	40,00	10 mL	0,40	1,79
Etanol abs.	1 L	11,14	10 mL	0,11	0,50
Lisina.HCl	250 g	20,68	1 g	0,08	0,37
GLUT	2,5 L al 50%	791,06	0,1 mL	0,03	0,14
CALB caldo	50 mL	197,00	5,5 mL	21,67	96,87
COSTO TOTAL 1 g DE CATALIZADOR B USD				22,37	
COSTO 1 g DE NOVOZYM® 435 USD				56,84	

Si bien Novozyme® 435 es mucho más activo por mg de catalizador, presenta varias desventajas que obstaculizan su reuso, como por ejemplo pobre estabilidad química y mecánica en el medio de reacción y el leaching, que es inevitable por estar CALB adsorbida en una resina hidrofóbica [12]. Otra limitación se asocia a procesos de separación más complejos. Su remoción para implementar ciclos de reuso requiere de filtración que, en un medio de reacción viscoso (como la esterificación de ácidos grasos sin solvente) resulta más tedioso y conduce a pérdidas del catalizador asociada estas prácticas. En cambio, el catalizador B presenta las siguientes ventajas:

- 1) Es un 60 % menos costoso que Novozyme® 435
- 2) Presenta una satisfactoria resistencia química en el medio de reacción
- 3) Conserva la totalidad de su actividad durante tiempos prolongados de almacenamiento

- 4) Es fácilmente removible del medio de reacción mediante decantación magnética, posibilitando su rápido lavado y reuso.

Vale destacar que el 97% del costo de fabricación de B proviene del caldo de CALB, por lo cual el producto MAG(SDS)-LIS-GLUT es un material que constituye por sí mismo un potencial soporte comercializable como adsorbente de proteínas.

7.5. Conclusiones

En este capítulo se evaluaron dos protocolos de inmovilización de CALB sobre MAG(SDS)-LIS: adsorción simple seguida de entrecruzamiento con GLUT, y la unión covalente sobre el soporte previamente activado con GLUT. Por ambos métodos se obtuvieron biocatalizadores altamente eficientes en la síntesis de etiloleato logrando minimizar el leaching. Se mantuvieron niveles satisfactorios de actividad por, al menos, 8 ciclos para el catalizador obtenido por segundo procedimiento. A0,3 y B retuvieron al menos el 90% de la actividad inicial luego 4 a 6 semanas de almacenamiento. El CAT preparado a partir de CALB covalentemente inmovilizada sobre MAG(SDS)-LIS-GLUT resultó ser el más productivo en términos de cantidad de ácido graso convertido por unidad de masa, y su costo de fabricación es un 60 % más bajo que el correspondiente al valor comercial de Novozyme® 435.

Fue necesaria una minuciosa evaluación de la concentración de GLUT **luego** de la adsorción simple de CALB para encontrar la cantidad que maximiza la actividad y estabilidad de la lipasa inmovilizada covalentemente. Las relaciones molares entrecruzante/soporte y entrecruzante/proteína son igualmente importantes para optimizar la eficiencia del biocatalizador.

7.6. Referencias del capítulo VII

- [1] D.I. Bezbradica, C. Mateo, J.M. Guisan, Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 102 (2014) 218–224.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.02.021>.

- [2] L. Yang, X. Li, X. Li, Z. Su, C. Zhang, M. Xu, H. Zhang, Improved stability and enhanced efficiency to degrade chlorimuron-ethyl by the entrapment of esterase SulE in cross-linked poly (γ -glutamic acid)/gelatin hydrogel, *J. Hazard. Mater.* 287 (2015) 287–295.
- [3] F. López-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports, *J. Biotechnol.* 119 (2005) 70–75.
- [4] L. Hua, Z.-H. Sun, P. Zheng, Y. Xu, Biocatalytic resolution of dl-pantolactone by glutaraldehyde cross-linked cells of *Fusarium moniliforme* CGMCC 0536, *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 161–166.
- [5] W.-W. Zhang, X.-L. Yang, J.-Q. Jia, N. Wang, C.-L. Hu, X.-Q. Yu, Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 115 (2015) 83–89.
- [6] M.P. Guauque Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*, *Biochem. Eng. J.* 72 (2013) 18–23.
- [7] M.P. Guauque Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity, *Biochem. Eng. J.* 90 (2014) 36–43.
- [8] P. Monsan, Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization, *J. Mol. Catal.* 3 (1978) 371–384.
- [9] J. ichi Kawahara, T. Ohmori, T. Ohkubo, S. Hattori, M. Kawamura, The structure of glutaraldehyde in aqueous solution determined by ultraviolet absorption and light scattering, *Anal. Biochem.* 201 (1992) 94–98.
- [10] P.J. Anderson, Purification and quantitation of glutaraldehyde and its effect

on several enzyme activities in skeletal muscle., *J. Histochem. Cytochem.* 15 (1967) 652–61.

- [11] D.H. Lee, C.H. Park, J.M. Yeo, S.W. Kim, Lipase Immobilization on Silica Gel Using a Cross-linking Method, *J. Ind. Eng. Chem.* 12 (2006) 777–782.
- [12] C. José, R.D. Bonetto, L.A. Gambaro, M. del P.G. Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, L.E. Briand, Investigation of the causes of deactivation–degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol–aqueous media, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 71 (2011) 95–107.

Capítulo VIII

Conclusiones y trabajo
a futuro

La presente tesis se desarrolló sobre dos líneas de investigación complementarias: por un lado, la síntesis y caracterización de partículas magnéticas, y por otro, la aplicación de la técnica de inmovilización de enzimas sobre un soporte sólido. El trabajo estuvo enfocado en la inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB).

1. Síntesis de soportes

La forma, tamaño e hidrofiliicidad de las partículas de MAG pudieron controlarse durante la coprecipitación a través del tipo y concentración de estabilizante orgánico utilizado. El mismo debió estar presente en el medio de reacción al momento de la nucleación y crecimiento de los cristales.

No fue posible evaluar efecto del tamaño y forma de las partículas que componían el soporte debido a que aquellas formulaciones que dieron origen a cristales con formas distintas a la esférica (MAG coprecipitada con hexametilentetraamina) no fueron capaces de dispersarse en agua. Esto impidió su funcionalización con grupos amino y por ende no pudieron promoverse interacciones con CALB.

La MAG coprecipitada en presencia de ácido oleico o dodecilsulfato de sodio pudo ser funcionalizada con grupos amino mediante la incorporación de quitosano o lisina. El polímero da lugar a cúmulos de nanopartículas atrapadas en una red de la fase orgánica, mientras que el aminoácido recubre los núcleos magnéticos de forma controlada favoreciendo la monodispersión.

2. Inmovilización

Cuando la inmovilización se realizó sobre el soporte compuesto por MAG-AO-QUIT tratado con un exceso de glutaraldehído (GLUT), la enzima se acopló a la superficie del sólido mediante un mecanismo mixto:

- Enlace covalente con grupos funcionales de GLUT
- Adsorción física de otras moléculas de lipasa sobre las anteriores, formando una segunda capa.

En los ciclos catalíticos, aquellas moléculas de CALB débilmente adsorbidas actúan como enzima libre, perdiéndose en cada uso a causa del

leaching. Las inmovilizadas covalentemente se desactivaron a causa del exceso de GLUT subyacente.

Se estudió sistemáticamente la influencia de las cantidades nominales de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS), GLUT y CALB ofrecidas al soporte MAG-AO-QUIT-GLUT sobre la performance de los catalizadores. Se obtuvieron modelos matemáticos que describen satisfactoriamente la variabilidad de la conversión y la carga enzimática resultantes. Las variables críticas que determinaron la actividad catalítica fueron GLUT y CALB. La carga enzimática tuvo un rol preponderante en la retención de actividad durante el almacenamiento. El mecanismo de inmovilización fue también mixto, registrándose leaching en cada uso para el catalizador más activo.

3.Determinación de carga enzimática

Se comprobó que el tradicional método de Bradford con albúmina bovina o BSA como patrón de concentración para proteínas subestima severamente la concentración de CALB en el medio de inmovilización. Los errores provinieron principalmente de

- La identidad del estándar empleado para construir la curva de calibrado y
- Las interferencias causadas por especies químicas provenientes del soporte (APTS-GLUT y hierro).

La combinación de Bradford (*usando CALB como estándar*) y determinación de azufre por emisión atómica permitió calcular una carga enzimática que se correlacionó adecuadamente con la actividad.

Fue posible desarrollar un biocatalizador eficiente inmovilizando CALB sobre un soporte sólido constituido por MAG(SDS)-LIS. Se encontró que 0,3 % es la concentración óptima de GLUT para entrecruzar CALB post-adsorción física sobre MAG modificada con lisina. Esta proporción de entrecruzante maximiza la actividad y minimiza el leaching, aunque el catalizador se desactivó totalmente antes del octavo ciclo.

Cuando la misma concentración de GLUT fue utilizada para activar el soporte MAG(SDS)-LIS, la inmovilización covalente permitió obtener el mejor biocatalizador de los preparados en este trabajo:

-Fue activo y operacionalmente estable ya que retuvo el 66 % de su actividad inicial hasta al menos el octavo ciclo.

-Pudo ser almacenado por tiempos prolongados sin degradarse.

-Se registraron bajos niveles de leaching

-El material de soporte no se vio afectado química o mecánicamente en las condiciones de reacción estudiadas

-El costo de fabricación fue sólo el 40 % del valor comercial de Novozime435®

4.Trabajo a futuro

Como trabajo a futuro se propone estudiar el aprovechamiento de las nanopartículas magnéticas que constituyen la dispersión coloidal estable (MAG-AO-QUIT) mediante la síntesis de un material compuesto por bolillas de vidrio macroscópicas (2 mm de diámetro) recubiertas de las partículas magnéticas.

Además, los conocimientos adquiridos sobre la coprecipitación de nanopartículas de MAG se aplicarán a la preparación de otros materiales magnéticos nanoparticulados útiles en la adsorción selectiva de proteínas de interés comercial. Se pretende utilizar nanopartículas (NPs) basadas en óxidos de Fe (magnetita, maghemita) o ferritas modificadas convenientemente para que resulten selectivas a las proteínas a separar.

Esta propuesta implica trabajar en el diseño de las NPs para proveer de los grupos funcionales adecuados manteniendo las propiedades de interés que determinan su eficiencia (principalmente tamaño y superparamagnetismo).

El recubrimiento con sílice (SiO_2) de las NPs permitirá un adecuado control de tamaño y asegurará la estabilidad de las partículas en dispersión. A la estructura de las NPs con Si se incorporarán grupos específicos para la interacción con proteínas: grupos tiol y metales como Cu y Zn.

Se evaluará el desempeño de las nanopartículas en la separación de proteínas modelo como albúmina bovina (BSA) y lisozima (Lys). Se estudiarán interacciones de cada una de estas proteínas con los nanosistemas preparados. Se explorará la eficiencia de separación de los mismos usando ambas proteínas en solución de agua destilada y en mezclas que simulen sistemas biológicos más complejos. Asimismo, se estudiará mediante herramientas de cálculo de mecánica molecular y semiempírico las interacciones de las proteínas con las distintas formulaciones de NPs preparadas.

Se aspira a continuar este trabajo en el transcurso de la beca postdoctoral de CONICET otorgada para el período abril 2017-abril 2019.

