

**INMOVILIZACIÓN DE LIPASA DE *Candida antarctica* B SOBRE
NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA: ESTUDIO DE SU ESTABILIDAD Y
ACTIVIDAD CATALÍTICA**

OSCAR JAVIER MARTINEZ VILLABONA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013**

**INMOVILIZACIÓN DE LIPASA DE *Candida antarctica* B SOBRE
NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA: ESTUDIO DE SU ESTABILIDAD Y
ACTIVIDAD CATALÍTICA**

OSCAR JAVIER MARTINEZ VILLABONA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Químico

DIRECTOR:

RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ, PhD

CODIRECTOR:

LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIMES, MSc

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

DEDICATORIA

A mis padres, a mis tías Amparo y Elga, por su valiosa confianza, cariño y apoyo que me han brindado durante este proceso de formación y poder cumplir con este proyecto trazado en mi vida.

A Lina Morantes, por brindarme su compañía, cariño y comprensión, por darme fuerza en los momentos que más necesitaba y por su orientación durante el transcurso de este camino.

A mis hermanos, familiares y amigos, por la orientación en muchas oportunidades para alcanzar la realización de mis metas.

AGRADECIMIENTOS

A la educación pública por permitirme la formación en esta institución.

A los profesores Gonzalo Rodrigo Torres Sáez, Roberto Fernandez-Lafuente, por las enseñanzas recibidas, la dedicación, la confianza depositada y apoyo incondicional en este proceso.

Al profesor Juan Manuel Urbina por su ilustración y colaboración.

A la Escuela de Química, al Laboratorio de rayos-X y al Laboratorio de Microscopia de la Universidad Industrial de Santander por sus análisis y servicios técnicos.

A los miembros del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología.

A Andrés Escorcía por vincularme en el GIBIM para realizar mi proyecto de grado.

Y finalmente a todas las personas enlazadas de una u otra forma en el tiempo de realización de este proyecto de grado, especialmente a mis amigos, Julieth Escorcía, Yeison Peña, Mauricio Ayala, Carolina Zarate, Jhonatan Lozano, Marlon Cáceres y Ludwing Alfonso Calderón. Por la orientación, trabajo de equipo, horas de estudio y momentos de diversión.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	22
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
1.2. JUSTIFICACIÓN	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GENERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MARCO DE REFERENCIA	26
3.1 MARCO DE ANTECEDENTES	26
3.2 MARCO TEÓRICO	27
3.2.2 Estructura de las lipasas	30
3.2.3 Mecanismo de acción de las lipasas	32
3.2.4 Estabilización y modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas ...	33
3.2.5 Ingeniería del medio de reacción	33
3.2.6 Ingeniería del derivado	34
3.2.7 Inmovilización de las lipasas con distintas orientaciones	34
3.2.8 Inmovilización sobre partículas	36
3.2.9 Nanotecnología	37
3.2.10 Magnetita	39
3.2.11 Nanopartículas recubiertas	40
3.2.12 Inmovilización de Enzimas	40
4. METODOLOGÍA	43
4.1 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	43
4.1.1 Estudio del efecto de la temperatura y agitación sobre la síntesis de las nanopartículas magnéticas	45

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	45
4.2.1 Espectroscopia infrarroja	46
4.2.2 Caracterización de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS).....	46
4.2.3 Potencial zeta	47
4.2.4 Análisis por DRX.....	47
4.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	48
4.3.1 Recubrimiento de las nanopartículas con grupos amino primarios terminales	49
4.3.2 Recubrimiento de las nanopartículas con glutaraldehído	49
4.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS RECUBIERTAS	49
4.5 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.....	49
4.5.1 Cuantificación de proteína	50
4.5.2 Determinación de la actividad catalítica de la lipasa.....	50
4.5.3 Inmovilización de la enzima sobre las nanopartículas magnéticas	50
4.5.4 Efecto del pH en la cinética de inmovilización	51
4.5.5 Determinación de la estabilidad térmica	51
4.5.6 Reciclado del biocatalizador de lipasa inmovilizada	51
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	53
5.1.1 Efecto de la temperatura y agitación en la síntesis de las nanopartículas	56
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	58
5.2.1 Espectroscopía infrarroja	58
5.2.2 Caracterización por dispersión de luz dinámica.....	59
5.2.3 Potencial zeta de las NPs magnéticas.....	60
5.2.4 Caracterización de NPs por difracción de rayos X.....	62
5.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	63
5.3.1 Funcionalización de las NPs con grupos amino.....	63
5.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs FUNCIONALIZADAS.....	65
5.4.1 Espectroscopía infrarroja	65
5.4.2 Caracterización de las nanopartículas por dispersión de luz dinámica.....	71

5.4.3 Funcionalización de las NPs aminadas con glutaraldehído	72
5.5 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	77
5.5.1 Cuantificación de proteína	77
5.5.2 Determinación de la actividad enzimática	78
5.5.3 Inmovilización de enzima en los diferentes soportes	79
5.5.4 Efecto del pH en el proceso de inmovilización	85
5.5.5 Estabilidad térmica del soporte activado con glutaraldehído	87
5.5.6 Reciclado del soporte de magnetita	88
6. CONCLUSIONES	90
7. RECOMENDACIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXOS	98

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Fuentes comunes de las lipasas	30
Tabla 2. Condiciones de medida de DRX en la muestra de magnetita	48
Tabla 3. Tipos de soportes para inmovilización de enzimas	51
Tabla 4. Tamaño del diámetro de las NPs en nanómetros determinados por DLS	57

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Reacciones que pueden ser catalizadas por lipasas.	29
Figura 2. Conformaciones estructurales de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	31
Figura 3. Mecanismo de activación de las lipasas en interfaces hidrofóbica.	32
Figura 4. Adsorción de lipasas sobre superficies de carácter hidrofóbico.....	35
Figura 5. Grupos reactivos más comunes sobre la superficie de las nanopartículas.	37
Figura 6. Comparación relativa del tamaño de una partícula de 10 nm y el diámetro de una proteína típica.	38
Figura 7. Grupos amino que pueden ser unidos empleando reacciones de alquilación o acilación.	41
Figura 8. Diagrama general de la metodología.	43
Figura 9. Montaje para la síntesis de las nanopartículas magnéticas.	44
Figura 10. Equipo infrarrojo BRUKER TENSOR 27 con el accesorio ATR.	46
Figura 11. Equipo de dispersión de luz dinámica Zetasizer Nano ZS90.	47
Figura 12. Mecanismos de condensación de los complejos acuo.....	54
Figura 13. Montaje que se emplea para secar las NPs.....	55
Figura 14. Imagen por SEM de las nanopartículas magnéticas y NaCl.	56
Figura 15. Espectro IR de la magnetita.....	58
Figura 16. Histograma de diámetro promedio de las NPs en nanómetros [nm] y el % de distribución por número.	59

Figura 17. Histograma de diámetro promedio de las NPs en nanómetros [nm] y el % de distribución por número.	60
Figura 18. Potencial zeta de las nanopartículas de magnetita sintetizadas en agua destilada.....	61
Figura 19. Perfil de DRX de las nanopartículas de magnetita.....	62
Figura 20. Deposición de silanos en medio anhidro.....	63
Figura 21. Mecanismo de reacción entre el APTS y la magnetita en medio acuoso.	65
Figura 22. Nanopartículas recubiertas con APTS utilizando como solvente etanol a una temperatura ambiente de 25°C.	66
Figura 23. Nanopartículas recubiertas con APTS utilizando como solvente etanol a 40°C.	68
Figura 24. Nanopartículas recubiertas con APTS en un medio de reacción que contiene una mezcla de diclorometano y agua.	69
Figura 25. Representación esquemática de los enlaces que se pueden formar en superficie de las nanopartículas.....	70
Figura 26. Infrarrojo de las nanopartículas recubiertas con grupos amino.....	71
Figura 27. Histograma del tamaño promedio de las NPs recubiertas en nm y el % de distribución por número.....	72
Figura 28. Hidratación del glutaraldehído en medio ácido.	73
Figura 29. Formación del hemiacetal a partir del ácido conjugado del diol geminal.	74
Figura 30. Mecanismo propuesto de recubrimiento de nanopartículas con grupos amino y su activación con glutaraldehído.	76
Figura 31. Nanopartículas aminadas y reducidas con borohidruro.	77

Figura 32. Cuantificación de proteína inmovilizada al soporte.	78
Figura 33. Velocidad de reacción de la CALB en diferentes concentraciones.	79
Figura 34. Cinética de inmovilización de la CALB en nanopartículas de magnetita.	80
Figura 35. Estructura superficial de la CALB, en rojo los ácidos aspárticos y glutámicos que se encuentran en la superficie.	81
Figura 36. Cinética de inmovilización de CALB en soportes activados con grupos aminos.	82
Figura 37. Cinética de inmovilización de CALB en magnetita recubierta con grupos amino y activada con glutaraldehído.....	84
Figura 38. Inmovilización de CALB en Nanopartículas de magnetita activadas con glutaraldehído.	85
Figura 39. Inmovilización de CALB en Nanopartículas de magnetita activadas con glutaraldehído.	86
Figura 40. Estabilidad térmica de la CALB inmovilizada en NPS recubierta con Glu.	87
Figura 41. Efecto de la reutilización de la enzima inmovilizada.	88

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Reportes de tamaño en la caracterización de las NPs	98
Anexo B. Reporte de Potencial Zeta	100
Anexo C. Curva de calibración para la cuantificación de proteína	101

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
Å	Angstrom
APTS	(3-(2-amino-etil-amino)propil)trimetoxisilano
ATR	Reflectancia total atenuada
CALB	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> B
cP	Centipoise
DLS	Dispersión de luz dinámica
DLS	Dispersión de luz dinámica
DRX	Difracción de rayos X
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
Glu	Glutaraldehído
h	Horas
LDH	Lactato deshidrogenasa
Lid	Tapadera de la lipasa
M	Molar
Mg	Miligramos
Min	Minutos
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de sodio
NPs	Nanopartículas
°C	Grados Celsius
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PMMA	polimetilmetacrilato
pNP	p-nitrofenol.
p-NPB	p-nitrofenilbutirato
rpm	Revoluciones por minuto

RESUMEN

TÍTULO: INMOVILIZACIÓN DE LIPASA DE *Candida antarctica* B SOBRE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA: ESTUDIO DE SU ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD CATALÍTICA*.

AUTOR: OSCAR JAVIER MARTINEZ VILLABONA**

PALABRAS CLAVES: Nanopartículas, Magnetita, Inmovilización de Enzimas, Actividad y estabilidad enzimática.

En este estudio, se realizó la síntesis de nanopartículas de magnetita por el método de coprecipitación de Fe^{2+} y Fe^{3+} en solución de hidróxido de sodio. Las nanopartículas fueron recubiertas con (3-(2-amino-etil-amino)propil)trimetoxisilano (APTS) 5% (v/v). Posteriormente, se hicieron reaccionar con glutaraldehído (10% v/v) a pH 7. Inmediatamente después, se agregó una solución (0.05 mg/mL) de lipasa *Candida antarctica* B (CALB) para su inmovilización covalente. La lipasa de *Candida antarctica* B fue inmovilizada también por interacciones iónicas en el soporte de magnetita y magnetita aminada. A su vez, se logró también la inmovilización covalentemente en la superficie de las nanopartículas magnéticas recubiertas con glutaraldehído. Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas por Difracción de Rayos-X (DRX) obteniendo una fase cristalina de Fe_3O_4 correspondiente a la magnetita. El tamaño de las partículas se determinó por la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) obteniéndose un tamaño promedio de 11 nm. Además, se identificaron los grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas que son los responsables de la interacción proteína-soporte por Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF). La actividad enzimática de la CALB inmovilizada y soluble se determinó en solución salina de buffer de fosfato con la hidrólisis del sustrato p-nitrofenilbutirato (pNPB). Se realizaron los ensayos de cuantificación de proteína por el método de Bradford; también se estudió el efecto del pH en la inmovilización de la proteína y determinó la estabilidad térmica de la CALB inmovilizada en el soporte recubierto con glutaraldehído (Glu). Finalmente, se determinó la actividad de la CALB en un proceso de reutilización del bioconjugado.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ciencias Escuela de Química. Director Rodrigo Gonzalo Torres Sáez, PhD.
Codirector Luis Oveimar Barbosa Jaimes, MSc.

ABSTRACT

TITLE: IMMOBILIZATION OF *Candida antarctica* LIPASE B ON MAGNETITE NANOPARTICLES: STUDY OF STABILITY AND CATALYTIC ACTIVITY*

AUTHOR: OSCAR JAVIER MARTINEZ VILLABONA **

PALABRAS CLAVES: Nanoparticles, Magnetite, Immobilization of enzymes, Enzymatic activity and stability.

In this research, the synthesis of magnetite nanoparticles was performed by coprecipitation of Fe_2^+ and Fe_3^+ in solution of sodium hydroxide. The nanoparticles were coated with (3-(2-amino-ethyl-amino) propyl) trimethoxysilane (APTS) 5% (v/v) and then were reacted with glutaraldehyde (10% v/v) at pH 7. Immediately thereafter was added a solution (0.05 mg / mL) of *Candida antarctica* lipase B (CALB) for its immobilization. *Candida antarctica* lipase B was immobilized by ionic interactions on the support of magnetite and aminated magnetite. Also achieved covalently immobilizing on the surface of magnetic nanoparticles coated with glutaraldehyde. The obtained nanoparticles were characterized by X-ray Diffraction (XRD) obtaining a crystal phase of Fe_3O_4 corresponding to the magnetite. The particle size was determined by the technique of Dynamic Light Scattering (DLS) to obtain an average size of 11 nm. Furthermore, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) identified the functional groups on the surface of the nanoparticles that are responsible for the protein-support interaction. The enzymatic activity of the immobilized and soluble CALB was determined in saline solution of phosphate buffer with the hydrolysis of p-nitrophenylbutyrate (pNPB). Assays to quantify protein were performed by the Bradford method; also, the effect of pH on immobilization of the protein and the thermal stability of the CALB immobilized on the support coated with glutaraldehyde (Glu) was studied. Finally, the CALB activity in a process of reusing the bioconjugate was determined.

* Grade Project

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director Rodrigo Gonzalo Torres Sáez, PhD.
Codirector Luis Oveimar Barbosa, MSc.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas que pueden catalizar una gran variedad de reacciones con sustratos orgánicos, naturales y sintéticos: poseen una elevada especificidad y selectividad, lo cual las convierte en catalizadores ideales para llevar a cabo reacciones en biosíntesis orgánica. A pesar de estas ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado debido a las limitaciones que la mayoría de éstas presentan; inestabilidad en condiciones drásticas de pH, presión y temperatura. Además, son inhibidas por diferentes tipos de sustratos y productos de reacción. Por otra parte, al ser solubles en agua, se dificulta su separación del sustrato y de los productos de reacción [1].

Con el fin de revertir los problemas mencionados anteriormente, la ingeniería enzimática ha desarrollado a lo largo de los últimos años, nuevas técnicas de estabilización de enzimas que pretenden mejorar las propiedades biocatalíticas de las enzimas. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la inmovilización sobre soportes, modificación química y manipulación genética. En éstas, las técnicas de inmovilización de enzimas sobre soportes se han propuesto como una solución para obtener biocatalizadores reutilizables. A través de la inmovilización enzimática se puede también aumentar el rendimiento de la enzima por el mejoramiento de sus limitaciones, como estabilidad, actividad, especificidad, selectividad o inhibiciones por sustratos y reactivos.

Entre las diversas técnicas de inmovilización, el uso de soportes para inmovilizar enzimas se produce a través de acoplamiento covalente o físico. El uso de nanopartículas (NPs) como soportes de inmovilización permitiría aumentar notablemente la actividad de las enzimas debido a la gran capacidad área superficial que presentan estas nanoestructuras [2].

En general, los métodos de inmovilización de enzimas se clasifican en dos grandes categorías como lo son: la inmovilización por enlace químico y la inmovilización por confinamiento.

Los métodos de inmovilización enzimática por enlace químico pueden ser divididos a su vez en dos tipos: enlazado o unión a un soporte y entrecruzamiento de proteína. Estos métodos se fundamentan en la activación de grupos funcionales del soporte para que reaccionen con los nucleófilos de las proteínas. Entre los veinte aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son la lisina, cisteína, tirosina e histidina, y en menor medida la metionina, triptófano, arginina y el ácido aspártico. Estos son los aminoácidos que se encuentran en general en el exterior de la estructura proteica ya que los demás poseen un carácter hidrófobo.

En la inmovilización enzimática por confinamiento se lleva a cabo el entrecruzamiento molecular, mediante el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de proteínas. Como reactivos bifuncionales se emplean di-aldehídos, di-iminoésteres, di-isocianatos, di-amidas si están activadas con carbodimida. El resultado del entrecruzamiento enzimático genera biocatalizadores robustos de enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles [1].

La inmovilización enzimática también se puede llevar a cabo en diferentes tipos de partículas, lo más común es en partículas no porosas y de forma esférica. Sin embargo, la revolución de la ciencia en materiales nanotecnológicos ha proporcionado partículas de tamaños y formas ilimitadas, incluyendo partículas amorfas, esféricas o agregados, así como formas complicadas geométricamente como barras, tubos, cubos, triángulos y conos. Además, nuevas estructuras simétricos orgánicos han surgido en el rango de los nanómetros que incluyen

fullerenos, nanotubos de carbón y dendrímeros, que son estructuras definidas altamente simétricas usadas como andamios moleculares en la bioconjugación [3].

Las nanopartículas y micropartículas son usadas en pruebas y ensayos de aglutinación, métodos ELISA de captura de partícula, pruebas de flujo lateral, ensayos de fase sólida, ensayos de proximidad de centelleo, ensayos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ensayos basados en superparamagnetismo y sistemas de separación magnética, biosensores, como potenciadores de señales espectrales de Raman, ensayos de dispersión de luz, y como etiquetas fluorescentes o manchas para descubrir moléculas [3].

La activación de las nanopartículas con glutaraldehído provoca que la superficie del soporte sea revestida con un compuesto químicamente reactivo, capaz de inmovilizar covalentemente las proteínas. Sin embargo, una capa de grupos catiónicos (los grupos amino), hace que sea un intercambiador iónico. De hecho, se ha demostrado en la mayoría de los casos, la adsorción enzimática en soportes de glutaraldehído activados a baja fuerza iónica es más rápida que la unión covalente. Además, los dímeros de glutaraldehído pueden conferir cierta propiedad hidrofóbica a la superficie de soporte, y puede afectar la inmovilización de algunas enzimas [4].

Existen diversas enzimas que pueden ser inmovilizadas para catalizar procesos bioquímicos. Entre éstas, las lipasas se constituyen como una de las más versátiles por su capacidad de catalizar diversos tipos de reacciones, tales como esterificación, hidrólisis, aminólisis, entre otras. Las lipasas son enzimas que tienen una alta afinidad por las superficies hidrofóbicas, tales como: gotas de aceite (sustrato natural), un soporte hidrófobo o proteínas hidrofóbicas. Esto es una consecuencia del mecanismo catalítico de las lipasas, lo cual les permite actuar en la interfaz de gotas de aceite. Esto implica para la lipasa el movimiento de una cadena polipeptídica llamada "lid" o tapadera que aísla el sitio activo del medio. El entorno del centro activo de la lipasa y la cara interna de la tapadera son hidrófobos,

y después del movimiento tapadera, la lipasa se adsorbe sobre las gotas de aceites. Así, la naturaleza hidrófoba de glutaraldehído podría permitir la adsorción de lipasas a través de este mecanismo, antes que pueda tener la unión covalente. Esta flexibilidad del centro activo de lipasas ha hecho que sus propiedades funcionales (actividad, selectividad, especificidad) puedan ser fácilmente moduladas a través de diversas técnicas de ingeniería de proteínas, siendo la inmovilización de lipasas una de las más prometedoras (de hecho, cualquier inmovilización de las lipasas es probable que se altere sus propiedades positivamente o negativamente) [4].

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enzimas son biocatalizadores versátiles que funcionan con gran especificidad para catalizar gran variedad de reacciones químicas en la naturaleza. Un ejemplo de ello lo constituyen las lipasas, las cuales son enzimas que catalizan la reacción de hidrólisis de los triglicéridos a ácidos grasos de cadena larga y glicerol. A pesar de encontrarse ampliamente distribuidas en la naturaleza, son las de origen microbiano aquellas de mayor interés en la industria química farmacéutica, debido a que presentan alta especificidad y elevada regio y enantioselectividad [5].

Los biocatalizadores presentan diversas ventajas y usos en condiciones suaves de reacción [6]. Sin embargo, las enzimas libres por lo general tienen poca estabilidad a altas temperaturas y a condiciones drásticas de pH, por ejemplo, la termoestabilidad de la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) a 70°C en 2-butanona disminuye al 50% y en o-xileno al 75% en 1 hora [7]. Además, las enzimas son difíciles de recuperar y reutilizar, por lo tanto los desafíos primordiales para las investigaciones donde se emplean estos biocatalizadores son mejorar su estabilidad, conservar y aumentar su actividad catalítica y finalmente, lograr su reutilización [8], [9].

Además, una de las tareas más importantes de la industria es lograr el desarrollo de nuevos métodos para mejorar la estabilidad de la enzima. La inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos se considera una técnica empleada que logra este propósito siempre y cuando se eviten los problemas de difusión y se supere la baja carga de inmovilización de la enzima sobre el soporte. Todo lo anterior se desarrolla con el fin de impedir la contaminación de los productos (fármacos) con las enzimas utilizadas, que al final pueden causar efectos perjudiciales para la salud.

En este trabajo, se utilizará como enzima modelo la lipasa de *Candida antarctica B*, esta se inmovilizará en nanopartículas magnéticas con el fin de lograr estabilizar la enzima y lograr reutilizarla por varios ciclos en reacciones con sustratos de tipo lipídico de baja solubilidad en medio acuoso.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas son comúnmente los catalizadores químicos preferidos por la industria farmacéutica, ya que son más selectivos, generan productos con mayor pureza y altos rendimientos de reacción en aplicaciones biológicas. Los principales beneficios de las enzimas inmovilizadas sobre soportes son la recuperación de las mismas después de su uso y la disminución de la contaminación del complejo de reacción. Además, con la inmovilización de enzimas se facilita su reutilización y se amplían sus aplicaciones sin que pierda su actividad a cambios bruscos de temperatura y pH [7].

El éxito de una enzima inmovilizada para aplicaciones prácticas es fuertemente dependiente de las propiedades de los soportes utilizados, los cuales deben proporcionar al sistema una prolongada actividad enzimática. En los últimos años, se han utilizado una gran variedad de soportes de tamaños nano-métricos, de naturaleza orgánica o inorgánica, en la inmovilización de enzimas [9].

La actividad enzimática, la estabilidad de los biocatalizadores y el área superficial son maximizadas con soportes de partículas pequeñas. Sin embargo, la recuperación de estas partículas en sistemas de reacción donde se han inmovilizado las enzimas sigue siendo difícil y las técnicas convencionales para su separación aún son insuficientes. A diferencia de otros soportes, el soporte de nanopartículas de magnetita presenta propiedades magnéticas que permiten alcanzar una separación rápida debido a un campo magnético externo. Además, tiene una alta capacidad de inmovilización de enzimas y es químicamente estable

[10]. En vista de esto, la presente investigación busca la síntesis de nanobiocatalizadores de lipasa de *Candida antarctica* B inmovilizados en soportes de nanopartículas de magnetita activadas, con el fin de aprovechar las propiedades magnéticas, para emplearlos en reacciones de hidrólisis.

El empleo de magnetita (Fe_3O_4) modificada con grupos amino y activada con glutaraldehído como soporte en la inmovilización de la enzima CALB permitirá obtener preparaciones de lipasa inmovilizada que pueden ser retiradas rápidamente del medio de reacción, reutilizarla en varios ciclos, aumentar su actividad enzimática y soportar cambios drásticos de temperatura y pH conservando su estabilidad.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nanobiocatalizadores de lipasa de *Candida antarctica* B inmovilizados en nanopartículas de magnetita.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar las nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 como soporte de inmovilización de enzimas.
- Evaluar el efecto de la temperatura y la velocidad de agitación sobre el tamaño de las nanopartículas magnéticas durante el proceso de síntesis.
- Caracterizar las nanopartículas por las técnicas DRX, DLS e IR-FT.
- Modificar las nanopartículas sintetizadas con grupos amino primarios y aldehídos.
- Caracterizar las nanopartículas recubiertas empleando las técnicas DRX, DLS e IR-FT.
- Inmovilizar la lipasa de *Candida antarctica* B en las nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas con grupos aminos y aldehídos.
- Determinar la actividad y la estabilidad enzimática de los diferentes nanobiocatalizadores de la lipasa de *Candida antarctica* B.

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1 MARCO DE ANTECEDENTES

Un requisito importante para la inmovilización de proteínas es que la matriz debe proporcionar un entorno inerte y biocompatible, es decir, no debe interferir con la estructura nativa de la proteína, de ese modo podría poner en peligro su actividad biológica [11]. La inmovilización de enzimas en soportes nanométricos como esferas, fibras y tubos, ha sido recientemente estudiada en la literatura. Como ejemplos se pueden encontrar, la inmovilización enzimática en nanotubos de sílice [11]. Esta se desarrolla dentro de bicapas de fosfolípidos, en películas de Langmuir-Blodgett, dentro de una matriz de polímero, en galerías de fosfato de α -circonio, en materiales mesoporosos, sobre partículas de látex de poliestireno, en nanopartículas de oro absorbidas en polímeros, zeolitas y en películas de lípido graso térmicamente evaporado. Todos estos soportes han sido desarrollados cada uno con pros y contras característicos. Las microesferas de polímero y varias nanopartículas metálicas también han sido exitosas cuando se conjugan con proteínas y enzimas [12].

La superficie de las nanopartículas se ha modificado con moléculas, enzimas y sondas de biomembranas proporcionándoles propiedades únicas de biofuncionalidad. Qhobosheane y colaboradores (2001) inmovilizaron lactato deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa en nanopartículas de sílice mostrando excelentes actividades enzimáticas y capacidades de detección [12].

El fundamento de usar estructuras a nanoescala para la inmovilización de enzimas es lograr reducir las limitaciones por difusión de los soportes y maximizar el área superficial funcional de estos mismos, lo cual permite incrementar la carga de la enzima [13]. Además, las características físicas de las nanopartículas como la

difusión mejorada y la movilidad de partícula pueden afectar la actividad catalítica inherente de enzimas enlazadas [14]. La estabilidad térmica, la superficie aumentada y la resistencia a la irradiación son otras ventajas que aceleran sus aplicaciones potenciales en fotodetectores, celdas solares, biosensores, nanogeneradores y cerámicas [15]. En años recientes, se han empleado varios tipos de nanopartículas en la producción de diferentes nanoestructuras como nanobarras, nanotubos, nanocables, nanoanillos, entre otras [16].

Finalmente, en una de las investigaciones más recientes sobre nanotecnología, Domenica y colaboradores (2003) presentaron la conjugación de nanopartículas superparamagnéticas con un oligodesoxirribonucleótido marcado con fluorescencia (ODN), capaz de plegarse en una hélice de guanina unimolecular cuádruple, estable en condiciones adecuadas, a través de su unión a una secuencia de un aptámero de trombina.

3.2 MARCO TEÓRICO

3.2.1 Lipasas

Hace casi 100 años atrás, el microbiólogo C. Eijkmann publicó que varias bacterias podían producir y secretar lipasas. Cuando se aceptó que las lipasas podían permanecer en la conformación activa en disolventes orgánicos, los estudios se enfocaron a desarrollar estas enzimas en herramientas ideales para el químico orgánico. Pero, ¿qué es lo que hace tan atractivas las lipasas? En primer lugar, suelen mostrar quimioselectividad, regioselectividad y estereoselectividad. En segundo lugar, son fácilmente disponibles en grandes cantidades debido a que muchos de ellos se pueden producir con altos rendimientos a partir de organismos microbianos, hongos y bacterias. En tercer lugar, muchas estructuras cristalinas de las lipasas han sido resueltas, facilitando considerablemente el diseño de estrategias racionales de ingeniería de proteínas. Finalmente, no requieren por lo

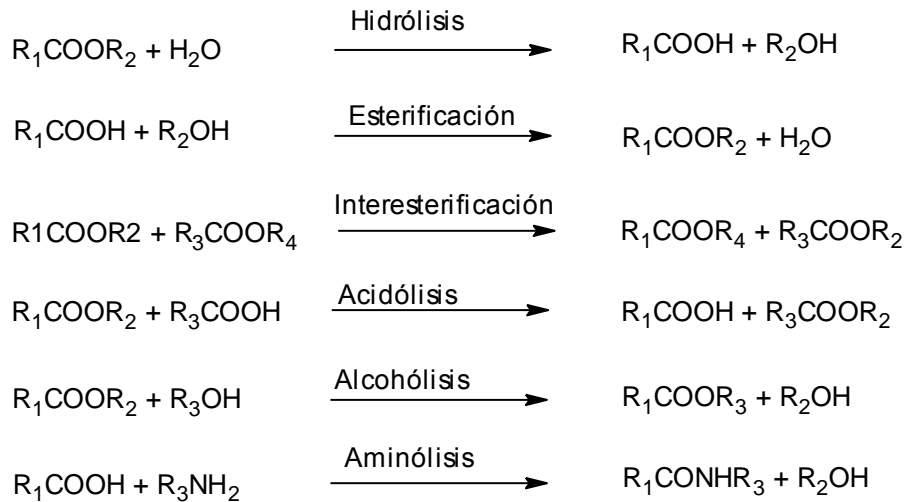
general cofactores ni catalizan reacciones secundarias. Estas propiedades hacen a las lipasas el grupo más utilizado de los biocatalizadores en la química orgánica. Esto se refleja en más de 1000 artículos originales sobre las lipasas que aparecen cada año y su interés en muchas reacciones de resolución de fármacos quirales [17].

Las lipasas de origen microbiano disfrutan de la mayor importancia a nivel industrial ya que son más estables en comparación con las lipasas de plantas y animales. Además, pueden ser obtenidas en grandes cantidades a bajo costo. La mayoría de las lipasas se obtienen de forma extracelular, con un peso molecular que oscila entre ~33 y ~65 kD. Más del 50% de las lipasas provienen de levaduras [18].

Las lipasas catalizan una amplia gama de reacciones, incluyendo hidrólisis, inter-esterificación, alcoholólisis, acidólisis, esterificación y aminólisis (**Figura 1**). En la hidrólisis, estas lipasas catalizan el rompimiento del enlace éster de ácido graso del triacilglicerol y liberan ácidos grasos. La reacción es reversible y su dirección depende del contenido de agua presente en la mezcla de reacción [18].

La caracterización bioquímica y molecular de un número de diferentes fuentes de lipasas ha mostrado la gran cantidad de heterogeneidad en ellas con respecto a la especificidad, secuencia de aminoácidos y propiedades catalíticas.

Figura 1. Reacciones que pueden ser catalizadas por lipasas



Fuente: Houde, Alain and Kademi, Ali and Leblanc, Danielle. Lipases and their industrial applications. Applied Biochemistry and Biotechnology 2004, 118 1-3, p 155-170

Las lipasas se pueden producir fácilmente a gran escala en cultivos de microorganismos en un fermentador, sin embargo su uso era hasta hace poco limitado a la industria de lácteos y oleoquímica. En los últimos años del siglo XX el uso de las lipasas ha sido enfocado en la biotecnología, la fabricación de productos farmacéuticos y plaguicidas, la producción de una proteína unicelular y la preparación de biosensores.

Las lipasas se han convertido en una parte integral de la industria alimentaria moderna y se utilizan en la preparación de una variedad de productos de los jugos de frutas, alimentos horneados, fermentación vegetal y los productos lácteos enriquecidos. También se utilizan en la industria del cuero para el procesamiento del mismo, en las pieles, en el tratamiento de lodos activados y otros productos de desecho aeróbico donde eliminan la capa delgada de las grasas y, al hacerlo, facilitan el transporte de oxígeno. Algunas de las fuentes comunes de lipasas se tabulan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Fuentes comunes de las lipasas

Fuente	Nombre
Mamífero	Lipasa pancreática humana. Lipasa pancreática caballo. Lipasa pancreática del cerdo. Lipasa pancreática de cerdo de Guinea
Fungi	<i>Rhizomucormeihei</i> <i>Pencilliumcamberti</i> <i>Humicolalanuginosa</i> <i>Rhizopusoryzae</i> <i>Aspergillus níger</i> <i>Candida rugosa</i> Lipasa <i>Candida antarctica</i> A Lipasa <i>Candida antarctica</i> B <i>Geotrichiumcandidum</i>
Bacteriano	<i>Chromobacteriumviscosum</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Bacillus thermocatenulatus</i> <i>Staphylococcus hyicus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>

Fuente: Vakhlu Jyoti, Kour Avneet, Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning, Electronic Journal of Biotechnology 2006 9:1 69-85 p.
(<http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/sources.htm>)

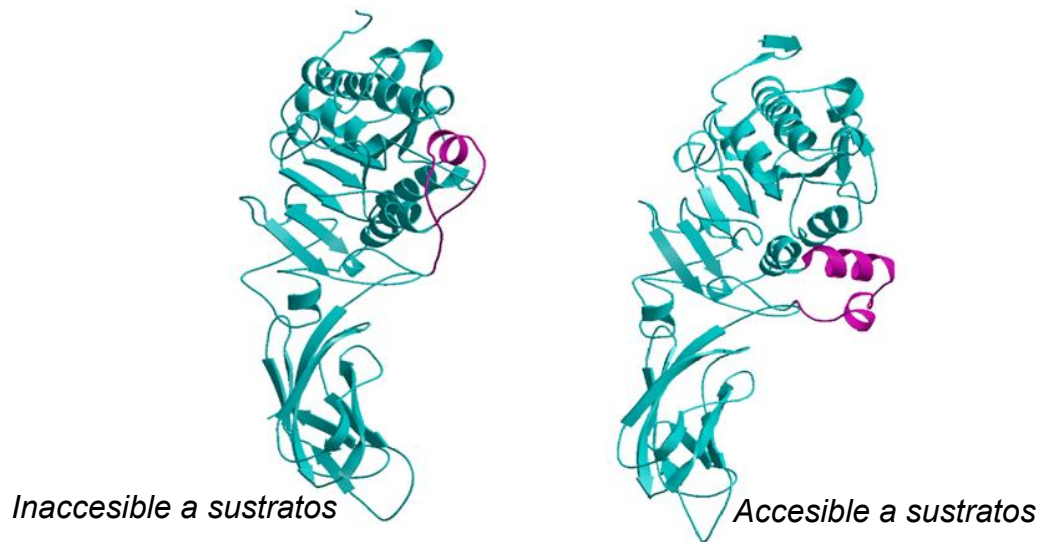
3.2.2 Estructura de las lipasas

Las técnicas cristalográficas nos permiten ver las estructuras de las lipasas de diferentes orígenes, identificándose en general la estructura de tipo α/β hidrolasa. Empleando las técnicas cristalográficas se determinó que en la mayoría de las lipasas existe una cadena peptídica móvil, la cual es conocida como tapadera o "lid". Su estructura consiste de una o dos alfa hélices cortas unidas al cuerpo de las lipasas y es de naturaleza flexible. Brzozowski y colaboradores (1991), confirmaron y demostraron la existencia del lid sobre el sitio activo de las lipasas.

La investigación sobre las conformaciones estructurales de las lipasas permitió establecer que en presencia de medios acuosos homogéneos, la enzima cristaliza con el centro activo totalmente aislado por el lid del medio de reacción, haciendo inaccesible la ubicación del sustrato al sitio activo de la enzima, lo cual se conoce como la conformación cerrada (**Figura 2**). Esta cadena polipeptídica presenta en su cara interna una serie de residuos hidrofóbicos que interactúan con las zonas hidrofóbicas que rodean al sitio activo de la lipasa [19].

Figura 2. Conformaciones estructurales de la lipasa B de *Candida antarctica*

En color morado se puede observar el "Lid", a la derecha se observa la configuración abierta y a la izquierda la configuración cerrada.



Fuente: Barbosa O., Resolución cinética de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol vía reacciones de acetilación mediante la utilización de lipasas inmovilizadas. Trabajo de grado para optar título de Magister en química. Universidad Industrial de Santander, 2009.

Cuando la enzima cristaliza en presencia de interfaz hidrofóbica se obtiene la conformación totalmente accesible al sustrato, es decir, la configuración abierta, en la cual se observa el desplazamiento del lid debido a interacciones de puentes

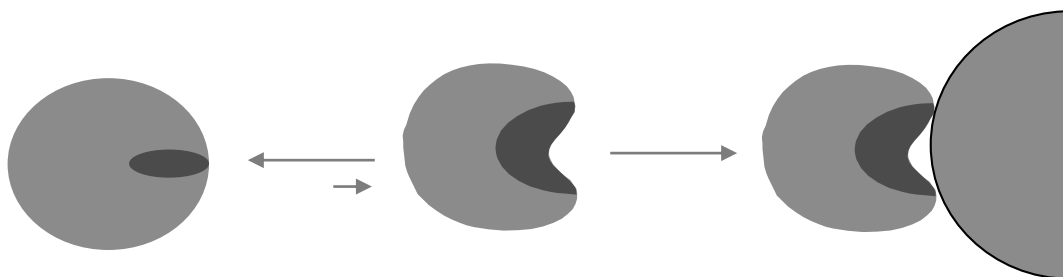
salinos y puentes de hidrógeno con su superficie exterior. Las características estructurales, funcionales, selectivas y de actividad de las lipasas están dadas por la presencia y posición del lid.

3.2.3 Mecanismo de acción de las lipasas

La información de las conformaciones estructurales de las lipasas obtenidas a través de la técnica de difracción de rayos X, permitió establecer que en su mecanismo catalítico ocurre el fenómeno de activación interfacial de la lipasa. Este término es utilizado para describir el gran incremento de la actividad en este tipo de enzimas al entrar en contacto con una interfase hidrofóbica, como micelas de sustratos, solventes orgánicos y lípidos.

La **Figura 3** representa el mecanismo de activación inter-facial que presentan las lipasas en medio hidrofóbico. Se debe resaltar que las lipasas en medio acuoso presentan actividad catalítica debido al equilibrio de la conformación abierta y cerrada.

Figura 3. Mecanismo de activación de las lipasas en interfaces hidrofóbica



Fuente: Cesar Mateo, Jose M. Palomo, Gloria Fernandez-Lorente, Jose M. Guisan, Roberto Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, Enzyme and Microbial Technology, 2007 40:6 p 1456.

3.2.4 Estabilización y modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas

La posibilidad de generar derivados enzimáticos estables en las condiciones de operación de las reacciones de biotransformación es uno de los principales objetivos en la inmovilización enzimática. Las lipasas presentan un equilibrio conformacional y es de interés que al inmovilizarlas se puedan modular sus propiedades catalíticas debido a la fácil alteración del centro activo. Las propiedades de la enzima se pueden modificar haciendo uso de dos herramientas: ingeniería del medio de reacción e ingeniería del derivado [20].

3.2.5 Ingeniería del medio de reacción

El término ingeniería del medio hace referencia a la posibilidad de provocar un cambio en las propiedades de la proteína en la medida que las condiciones del medio son modificadas. En la literatura se encuentra que las propiedades catalíticas de las lipasas, como estereoespecificidad y selectividad, pueden ser fácilmente moduladas por las condiciones del medio de reacción [21].

El cambio de las condiciones del medio de reacción pueden afectar todo el balance de interacciones en la enzima, por ejemplo, los solventes de carácter hidrofóbico favorecen la exposición del centro activo de la lipasa y fortalecen las interacciones electrostáticas entre la parte exterior del lid y la superficie de la enzima generando una forma abierta; el cambio en el pH altera el tipo y la cantidad de interacciones electrostáticas entre el lid y el resto de la superficie de la proteína, y la fuerza iónica hace desfavorable la exposición del bolsillo hidrofóbico porque debilita las interacciones del lid con el resto de la proteína. Por lo tanto, las condiciones experimentales afectan fuertemente al equilibrio entre las conformaciones abierta y cerrada, la conformación del centro activo y las propiedades catalíticas que presentan las lipasas [19].

3.2.6 Ingeniería del derivado

Los grandes cambios conformacionales que implican la apertura y cierre del lid en las lipasas, inducen a preparar nuevos derivados enzimáticos implicando diferentes zonas que estén lejos o cerca del sitio activo de las enzimas, otorgando mayor o menor rigidez a la estructura peptídica o alterando el microambiente de la enzima.

Las diferentes herramientas para la modificación de las propiedades de las lipasas son: la inmovilización unipuntual, inmovilización multipuntual, modificación química, modificación genética, modificación química en fase sólida, insolubilización de las proteínas mediante la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) y entrecruzamiento de enzimas cristalizadas (CLECs).

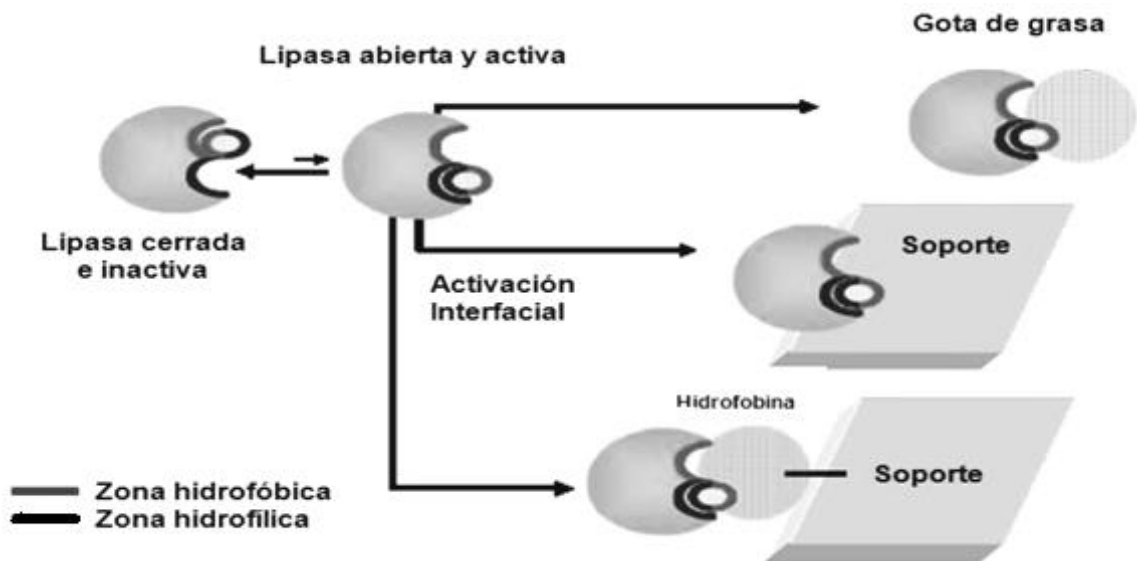
El desarrollo de diversas estrategias de inmovilización sobre una gran variedad de soportes activados con diferentes grupos funcionales ha permitido inmovilizar proteínas de forma controlada en la superficie de diferentes soportes activados [22].

3.2.7 Inmovilización de las lipasas con distintas orientaciones

Las enzimas se inmovilizan sobre los soportes a través de algún tipo de interacción entre la superficie de la proteína y el soporte. Estas interacciones pueden aumentar o disminuir la actividad y enantioselectividad del catalizador. Las lipasas al ser inmovilizadas en soportes multifuncionales han logrado modificar la orientación de la enzima inmovilizada.

La adsorción de las lipasas se ve favorecida sobre soportes hidrofóbicos y la orientación del sitio activo de la enzima se ubica frente al soporte, como se puede observar en la **Figura 4**.

Figura 4. Adsorción de lipasas sobre superficies de carácter hidrofóbico



Fuente: Barbosa O., Resolución cinética de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol vía reacciones de acetilación mediante la utilización de lipasas inmovilizadas. Trabajo de grado para optar título de Magister en química, Universidad Industrial de Santander, 2009.

Las lipasas por tener un bolsillo hidrofóbico tienen afinidad por las superficies hidrofóbicas, que facilitan el desarrollo de métodos eficientes de inmovilización. Los lípidos hacen desplazar el equilibrio hacia la conformación abierta de las lipasas exponiendo al medio el bolsillo hidrofóbico. Estudios han demostrado que derivados de la misma lipasa inmovilizada en el mismo soporte, variando la fuerza iónica y detergentes, hacen cambiar su actividad específica [4].

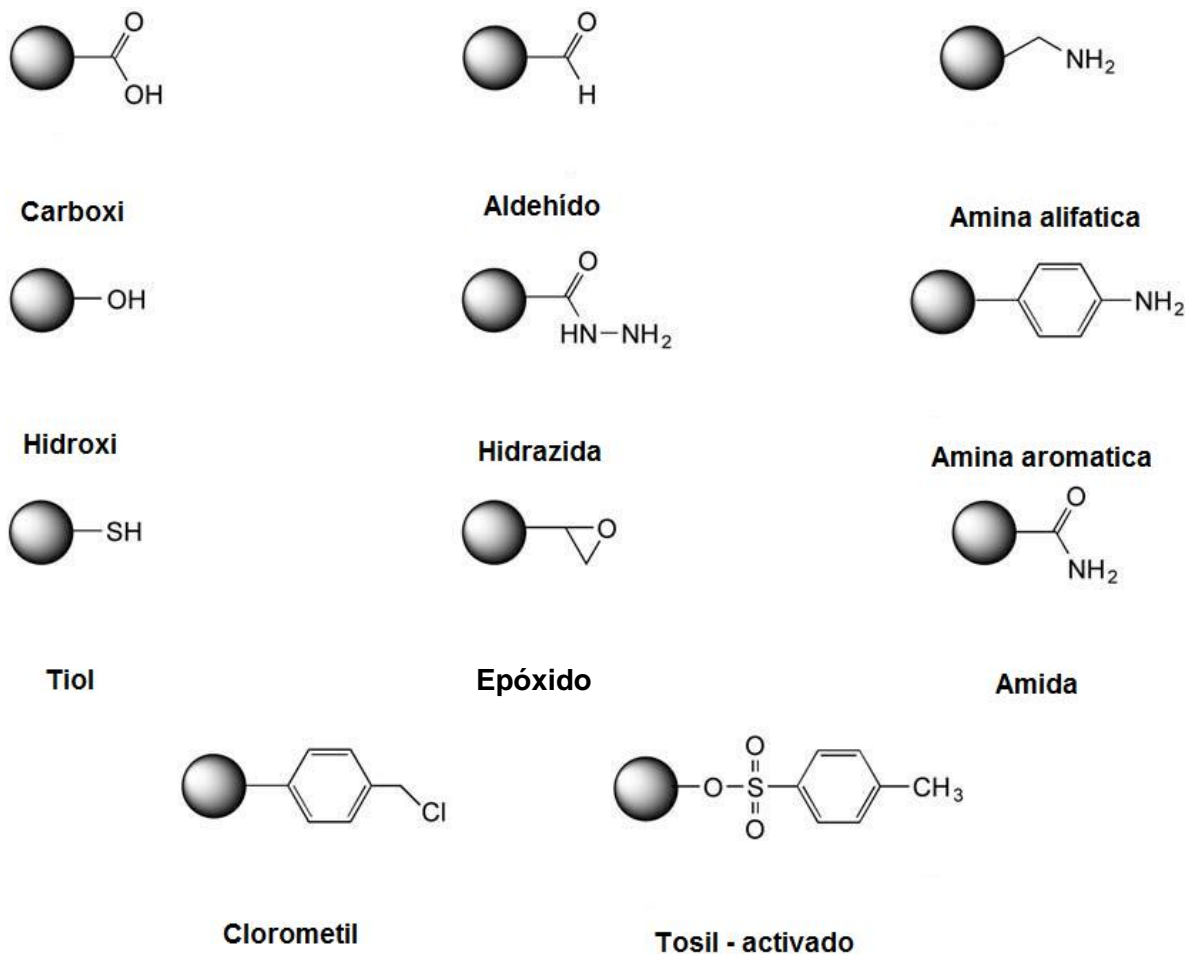
Las lipasas también se pueden inmovilizar covalentemente por la cadena lateral o radical, para lo cual sólo se requiere un grupo funcional que haga o reciba un ataque nucleofílico para formar la unión covalente.

3.2.8 Inmovilización sobre partículas

Las micropartículas y nanopartículas son utilizadas en ensayos biológicos desde hace varias décadas atrás y en otros numerosos experimentos. Los materiales que se emplean para las partículas son de naturaleza no porosa, de forma esférica o amorfa, también son de diferente composición y algunos materiales tienen límites de forma y tamaño. Las partículas de tamaño aproximado a los micrones tienden a precipitar en condiciones normales de gravedad; cuando el tamaño de las partículas disminuye tienden a formar verdaderas suspensiones coloidales.

Las biomoléculas se pueden inmovilizar en las nanopartículas por el simple método de la adsorción, que consiste en usar fuerzas no covalentes para adsorber las lipasas en partículas hidrofóbicas. Algunas partículas contienen grupos funcionales activos en su superficie; la cantidad de estos grupos se puede variar y la modificación de los grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas se denomina funcionalización. Los grupos más frecuentes sobre las partículas se muestran en la **Figura 5**.

Figura 5. Grupos reactivos más comunes sobre la superficie de las nanopartículas que tienen la capacidad de acoplamiento covalente con otras funciones



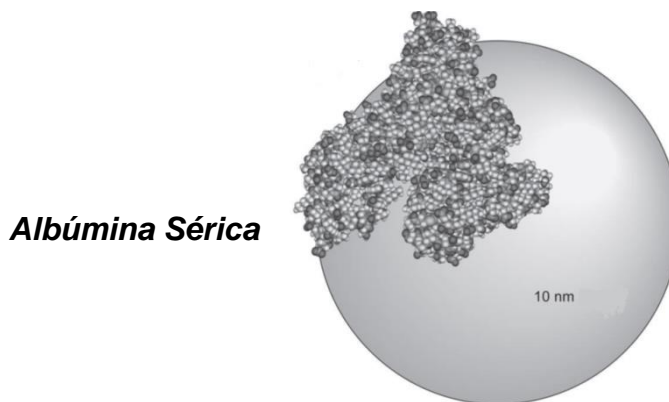
Fuente: Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2 ed. USA: Elsevier. 2008. p 582-590

3.2.9 Nanotecnología

La nanotecnología engloba los campos de la ciencia y la técnica que estudia, obtiene y manipula de manera controlada materiales, sustancias y dispositivos de dimensiones muy reducidas. Entre sus numerosas aplicaciones se pueden citar el desarrollo de energías, materiales y procesos no contaminantes, la construcción de diminutos robots que navegan por nuestras arterias, ordenadores del tamaño de una partícula de polvo y tejidos “inteligentes” autorreparables. La ciencia de la

miniaturización extrema está impregnada de todos los sectores del desarrollo científico, económico e industrial. La nanotecnología se basa en reconocer las partículas con tamaños inferiores a 100 nanómetros (para contextualizar el tamaño de una proteína humana y las nanopartículas se muestra la **Figura 6**).

Figura 6. Comparación relativa del tamaño de una partícula de 10 nm y el diámetro de una proteína típica, Albúmina Sérica Humana, cerca de 7 nm



Fuente: Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2 ed. USA: Elsevier. 2008. p 582-590.

Con tamaños tan pequeños, las partículas adoptan nuevas propiedades y nuevos comportamientos físico-químicos. Esto sucede porque las nanopartículas tienen tamaños menores a las partículas características asociadas al fenómeno particular; frecuentemente expresan una "nueva" química y física, lo que lleva a un nuevo comportamiento que depende del tamaño. Así, por ejemplo, se ha observado que la estructura electrónica, conductividad, reactividad, temperatura de fusión y propiedades mecánicas varían cuando las partículas alcanzan tamaños inferiores a cierto valor crítico. Esta tecnología ofrece enormes potencialidades que contribuirán a avances significativos en amplias y variadas áreas tecnológicas, que van desde producir materiales más resistentes y ligeros hasta la reducción del tiempo de transporte de un fármaco nanoestructurado en el sistema circulatorio del cuerpo humano. También se podrán usar para el incremento de la capacidad de almacenamiento de las cintas magnéticas, el suministro de procesadores más

veloces para los ordenadores, etc. Además, el área de investigación de la nanotecnología es interdisciplinaria, cubre una amplia variedad de temas, desde la química de la catálisis de nanopartículas hasta la física del láser de punto cuántico. Como resultado de ello, los investigadores de cualquier área en particular necesitan investigar más allá de su experticia para poder apreciar las implicaciones limítrofes de la nanotecnología; además de aprender cómo contribuir a este interesante y novedoso campo [23].

3.2.10 Magnetita

Algunos óxidos de hierro tienen aplicaciones interesantes para las tecnologías actuales y futuras. Aparte de poseer propiedades adecuadas para cumplir diversas funciones, son relativamente abundantes en la naturaleza y su obtención en forma sintética no es complicada.

La magnetita, de fórmula Fe_3O_4 , $\text{Fe}^{\text{II}}\text{OFe}_2^{\text{III}}\text{O}_3$ o $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{O}_4$, se conoce como tetróxido de trihierro u óxido ferroso férrico y su color es negro. De fórmula general AB_2O_4 del grupo de la espinela (MgOAl_2O_3). Es cúbica, con parámetro $a_0 = 8,3963 \text{ \AA}$, ferrimagnética y semiconductor. El oxígeno forma la red cúbica de caras centradas, deja 32 espacios octaédricos y 64 tetraédricos; los octaédricos están ocupados por Fe^{2+} y Fe^{3+} , y los tetraédricos por Fe^{3+} . El hierro supone el 72,4% y el oxígeno el 27,6% en masa. A temperatura elevada puede cambiar ligeramente debido a que la red puede aceptar un exceso de iones trivalentes. Los iones ferrosos y férricos de las posiciones octaédricas comparten los electrones de valencia, lo que permite que sea un compuesto frecuentemente no estequiométrico y de elevada conductividad eléctrica [24].

La carga y la naturaleza del material de recubrimiento determinan la estabilidad, biodistribución, metabolismo, farmacocinética y farmacodinámica de las nanopartículas. Recientemente, estas nanopartículas magnéticas incluyen el

etiquetado y separación celular. Las células que expresan un ligando específico en cualquier estado de enfermedad podrían ser identificadas mediante el etiquetado de nanopartículas de óxido de hierro con el anticuerpo. Estas células marcadas con óxido de hierro se pueden separar por un proceso llamado magnetofóresis. Las nanopartículas de óxido de hierro magnético se han utilizado también para transfretar el ADN. Este proceso aumenta la eficiencia de los métodos de transfección convencionales y disminuye la toxicidad. Finalmente, las nanopartículas de óxido de hierro muestran excelentes resultados en el tratamiento del cáncer por hipertermia magnética [25].

3.2.11 Nanopartículas recubiertas

La superficie de las nanopartículas son recubiertas con aminas primarias y glutaraldehído para enlazar las nanopartículas al ligando (enzima) y al mismo tiempo elevar su reactividad frente a los mismos. Las nanopartículas recubiertas pueden tener aminas secundarias o terciarias presentes en su superficie, pero estas deben ser evitadas para el acoplamiento covalente. Las aminas secundarias y terciarias son poco reactivas comparando con las aminas primarias que típicamente dan mejores resultados con respecto a la unión covalente con el ligando.

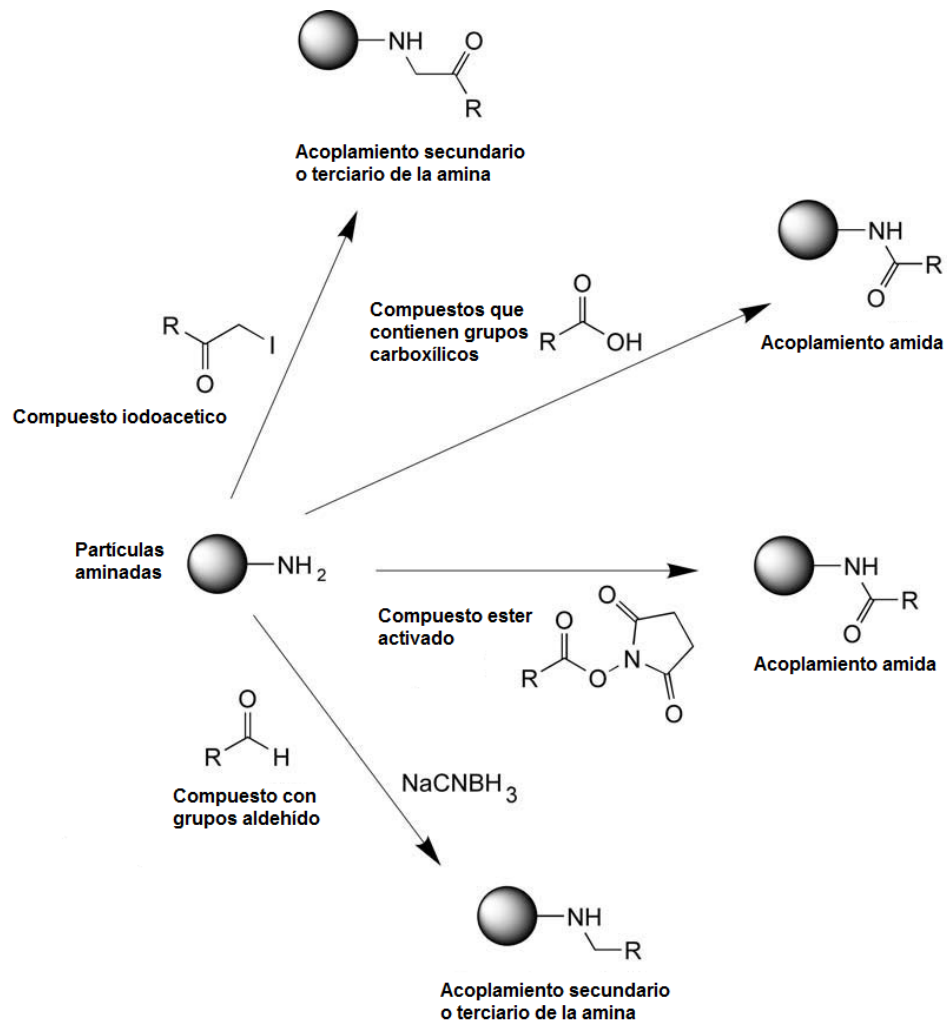
Los silanos son empleados para recubrir sustratos en condiciones apróticas, estas condiciones pueden ser dadas por solventes como tolueno, tetrahidrofurano y cloroformo que no dan ni aportan protones al medio de reacción. Las nanopartículas son recubiertas con aminosilanos que aportan el grupo amino primario en la superficie de las nanopartículas.

3.2.12 Inmovilización de Enzimas

Las aminas primarias y los grupos aldehído son utilizados para una inmovilización covalente, empleando un número de rutas de reacción (**Figura 7**). El acoplamiento

es dado por el grupo carboxilo que se encuentra en el ligando (enzima) que es atacado por el grupo amino que se encuentra en las nanopartículas y el grupo aldehído es atacado por los aminos que se encuentran en la enzima [3].

Figura 7. Grupos amino que pueden ser unidos empleando reacciones de alquilación o acilación, como resultado una amina secundaria o terciaria



Fuente: Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2 ed. USA: Elsevier. 2008. p. 582-590

Algunas de las ventajas del uso de enzimas inmovilizadas son el aumento de la estabilidad de la enzima, la posible reutilización del derivado que disminuyen los costos del proceso, la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo

y control adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada, la purificación de los productos y la prevención del crecimiento microbiano [3].

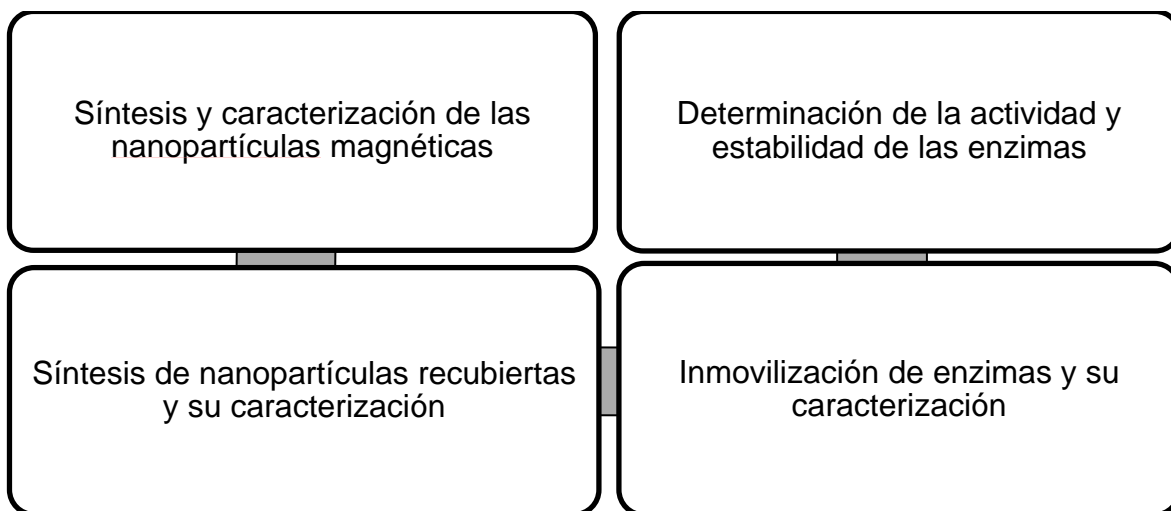
Algunos de los inconvenientes del proceso de inmovilización son la alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte (donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte), la pérdida de actividad enzimática durante el proceso de inmovilización y la tendencia a aumentar el costo del biocatalizador con respecto a la enzima nativa.

4. METODOLOGÍA

En los experimentos explicados en esta sección se emplearon los siguientes reactivos: lipasa de *Candida antarctica B* obtenida de Coldanzimas LTDA., el (3-(2-amino-etil-amino)propil)trimetoxisilano adquirido de la marca Sigma-Aldrich, el cloruro de hierro(II) tetrahidratado conseguido de la marca Panreac, el cloruro de hierro (III) comprado a la marca CARLO ERBA. Todos los reactivos para síntesis y solventes fueron de grado analítico, suministrados por Sigma-Aldrich.

En la **Figura 8** se expone un esquema general del procedimiento llevado a cabo en la presente investigación, el cual tiene tres partes fundamentales: la primera es la síntesis de las nanopartículas magnéticas, la segunda es la activación de la superficie con grupos amino y el recubrimiento de estos grupos con glutaraldehído. Finalmente, la inmovilización de la enzima para evaluar su actividad y estabilidad.

Figura 8. Diagrama general de la metodología

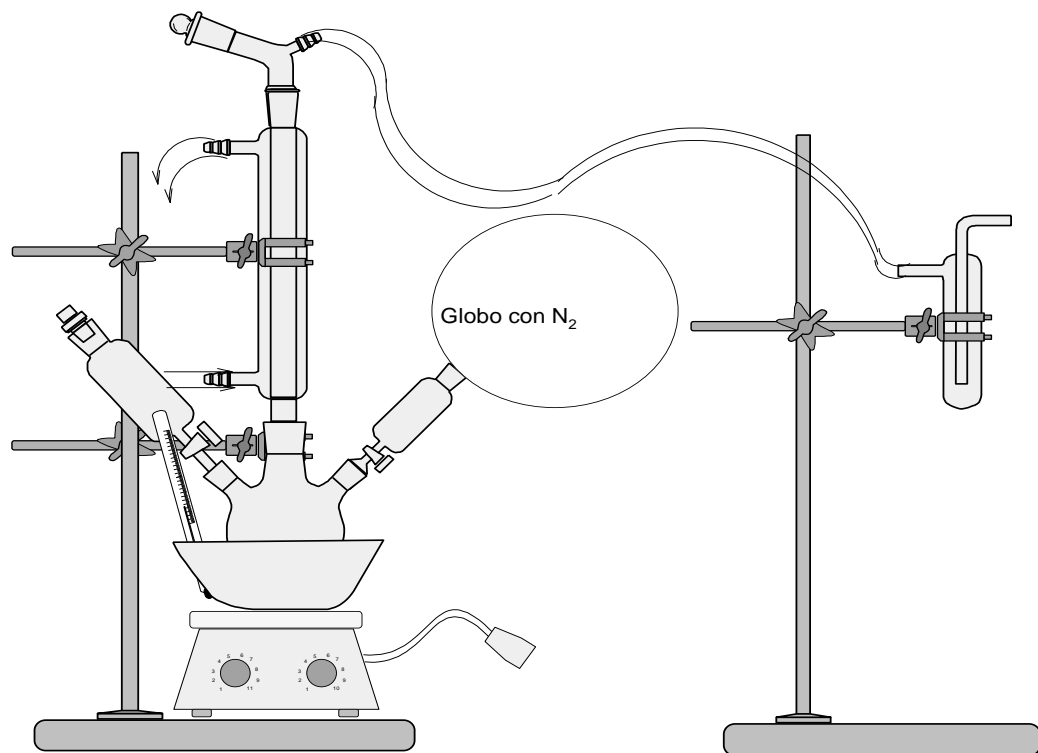


Fuente: Autor.

4.1 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Las nanopartículas magnéticas se sintetizaron en una atmósfera inerte y con agitación constante en una plancha de calentamiento (**Figura 9**); el gas utilizado para generar la atmósfera inerte fue argón con el cual se purgó el sistema durante media hora y después se agregó 7 mL (1,5 mol/L) de una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) a un balón de tres bocas. Posteriormente, para la síntesis de las nanopartículas (NPs) se mezclaron 7 mL (0,18 mol/L) de solución acuosa de cloruro de hierro II (FeCl_2) y 7 mL (0,36 mol/L) de solución acuosa de cloruro de hierro III (FeCl_3). Después de añadir toda la solución acuosa de hierro, se esperó una hora para garantizar la formación del precipitado oscuro, correspondiente a la magnetita (Fe_3O_4) [26].

Figura 9. Montaje para la síntesis de las nanopartículas magnéticas



Fuente: Autor.

Al finalizar la etapa de condensación se formó una mezcla de magnetita y cloruro de sodio dentro del balón de tres bocas a pH 13. Por esto se hizo precipitar la magnetita con un imán y se retiró el sobrenadante; la suspensión se lavó con agua hasta obtener pH 7 y estar seguros que no existían trazas de cloruro de sodio.

En este punto de la síntesis, a partir de la magnetita limpia se tomó una muestra de las nanopartículas para hacer el análisis de DLS.

4.1.1 Estudio del efecto de la temperatura y agitación sobre la síntesis de las nanopartículas magnéticas

Mediante el control de las condiciones experimentales de temperatura y agitación se logró controlar la cinética de la reacción, de tal manera que se formaran cristales de diferentes tamaños nanométricos. Para el proceso de síntesis de las nanopartículas se realizó un diseño experimental con el fin de estudiar o relacionar el efecto de la temperatura y la agitación sobre el tamaño de las mismas. Para ello se llevó a cabo series de ensayos a diferentes temperaturas (25°C, 50°C, 80°C) y a cada temperatura se hicieron tres cambios de la velocidad de agitación (150rpm, 400rpm, 700rpm) para realizar un total de nueve experimentos [27].

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

La caracterización molecular de las nanopartículas se realizó por IR-TF; la técnica DLS se utilizó para determinar el potencial Zeta de las partículas en dispersión y el tamaño de las nanopartículas. La caracterización cristalográfica se realizó por DRX.

4.2.1 Espectroscopia infrarroja

La caracterización de los compuestos por infrarrojo se llevó a cabo con el equipo BRUKER TENSOR 27 con el accesorio ATR (**Figura 10**). Todos los espectros de infrarrojo se adquirieron con este accesorio.

Figura 10. Equipo infrarrojo BRUKER TENSOR 27 con el accesorio ATR



Fuente: Autor.

4.2.2 Caracterización de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS)

La caracterización se llevó a cabo en un equipo Zetasizer Nano ZS90 que se muestra en la **Figura 11**, con una celda de bajo volumen de marca Malvern. En el análisis se requirieron los siguientes parámetros: índice de refracción de la magnetita igual a 1,51, índice de refracción del dispersante polietilenglicol (PEG) igual a 1,429, viscosidad del dispersante igual a 16,1118 cP, temperatura del análisis de 25°C y tiempo de estabilización de la muestra de 120 segundos. La calidad de los resultados en todos los análisis fue bueno (**Good**).

4.2.3 Potencial zeta

Las nanopartículas de hierro fueron analizadas por el equipo DLS (**Figura 11**). El ensayo se realizó con 1000 μL de una solución acuosa que contenía 20 μL de nanopartículas y 20 μL de polietilenglicol. El potencial Zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática o de carga entre las partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que afectan la estabilidad. Su medición trae una perspectiva detallada de las causas de la dispersión, la agregación o floculación, y se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones [27].

Figura 11. Equipo de dispersión de luz dinámica Zetasizer Nano ZS90



Fuente: Autor.

4.2.4 Análisis por DRX

Preparación y montaje de la muestra: La muestra fue pulverizada en un mortero de ágata. El espécimen seleccionado de la muestra fue montado en un porta muestra de polimetilmetacrilato (PMMA) mediante la técnica de llenado frontal.

Toma de datos de difracción: Se realizó en un difractómetro de polvo marca BRUKER modelo ADVANCE con Geometría DaVinci bajo las condiciones mostradas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones de medida de DRX en la muestra de magnetita

Parámetro	Datos
Voltaje	40(kV)
Corriente	30(mA)
Rendija de Divergencia	0,6mm
Rendijas Soller Primario	2.5°
Muestreo	0,01526° 2 θ
2theta Rango de Medición	3,5-70° 2 θ
Radiación	CuK α 1
Filtro	Níquel
Detector	Lineal LynxEye
Tipo de barrido	A pasos
Tiempo de muestreo	0,4 segundos

Tipo de Análisis: El análisis cualitativo de las fases presentes en la muestra se realizó mediante comparación del perfil observado con los perfiles de difracción reportados en la base de datos PDF-2 del *International Centre for Diffraction Data* (ICDD).

4.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Se hicieron reaccionar covalentemente las nanopartículas que poseen grupos alcóxido en la superficie con aminosilano (APTS). De esta forma se recubrió la superficie de las NPs con grupos amino primario, para posteriormente activar su superficie con glutaraldehído.

4.3.1 Recubrimiento de las nanopartículas con grupos amino primarios terminales

Se adicionó 400 mg de nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) anteriormente sintetizadas, en 30 mL de solvente (etanol, diclorometano, diclorometano-agua) que contenían 5% en volumen de (3-(2-amino-etil-amino)propil)trimetoxisilano (APTS). Esta mezcla se agitó a una velocidad de 400 rpm en una placa de agitación magnética durante 12 horas, a una temperatura de 40°C y atmósfera inerte. Las nanopartículas se retiraron por decantación magnética de la mezcla de reacción y se hicieron lavados con etanol y agua para eliminar el APTS sin reaccionar [26].

4.3.2 Recubrimiento de las nanopartículas con glutaraldehído

Las nanopartículas recubiertas con grupos amino se hicieron reaccionar con una solución acuosa de glutaraldehído (Glu) al 10% en volumen. Para ello se agregó a 10 mg de nanopartículas recubiertas con grupos amino 5 mL de la solución de glutaraldehído que se encontraba a pH 7 y se dejó reaccionar durante 24 horas. Las NPs se aislaron del medio por decantación magnética y se removieron los residuos de Glu lavando tres veces con solución tampón de fosfato pH 7 y 25 mM. Este soporte se utilizó inmediatamente para evitar su desactivación [4].

4.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS RECUBIERTAS

Después de recubiertas las nanopartículas con grupos amino y activadas con el Glu, se realizó la caracterización molecular por IRFT-ATR. El tamaño de las nanopartículas se caracterizó por DLS.

4.5 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Se realizó una dilución 1/100 de la lipasa de *Candida antarctica* B en tampón de fosfato a pH 7 y se agitó hasta que la mezcla estuviera homogénea (aproximadamente 30 min). Esta solución fue agregada a 10 mg de NPs magnéticas y durante seis horas se mantuvo en constante agitación a 100 rpm. A la solución que contenía las NPs y la dilución enzimática se le evaluó cada hora la actividad enzimática de la suspensión y la del sobrenadante [28].

4.5.1 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford, a una longitud de onda de 595 nm. La curva de calibración se realizó empleando albúmina de suero bovino (fracción V) en buffer fosfato pH 7 y 25 mM. La cantidad de proteína pegada al soporte se halló midiendo la concentración de proteína en el sobrenadante antes de adicionar el soporte y a las seis horas de adicionar el soporte [29].

4.5.2 Determinación de la actividad catalítica de la lipasa

La actividad catalítica de la lipasa en los diferentes soportes se cuantificó midiendo la velocidad inicial de la reacción a partir de mediciones de absorbancia a 348 nm, producida por la formación del p-nitrofenol (pNP) en la hidrólisis del p-nitrofenilbutirato (pNPB) en solución tampón de fosfato de potasio (25 mM y pH 7) a 25 °C. En la reacción de hidrólisis se agregaron a la celda 20 µL de solución de lipasa (sobrenadante o suspensión) y 20 µL de p-nitrofenilbutirato con 2,5 mL de solución tampón fosfato [4].

4.5.3 Inmovilización de la enzima sobre las nanopartículas magnéticas

La inmovilización de la enzima se realizó empleando 10 mg de los soportes: A, B y C. Estos soportes se diferencian por el grupo funcional que tienen en la superficie (Ver **Tabla 3**). Además, se detallan las condiciones de reacción.

Tabla 3. Tipos de soportes para inmovilización de enzimas

Tipo de soporte	Clase de derivado	Condiciones de Inmovilización
A	NPs + CALB	25 mM, pH 7, 25°C
B	NPs + APTS + CALB	25 mM, pH 7, 25°C
C	NPs + APTS + Glu + CALB	25 mM, pH 7, 25°C

4.5.4 Efecto del pH en la cinética de inmovilización

La inmovilización de la enzima se realizó a pH 8 y pH 10 en el soporte NPs-APTS-Glu. La determinación de la actividad se efectuó como se indica en la sección 4.5.2 y la inmovilización se llevó a cabo como se describe en la sección 4.5.3.

4.5.5 Determinación de la estabilidad térmica

El ensayo de estabilidad térmica se realizó para el soporte NPs-APTS-Glu-CALB. Inicialmente el soporte se incubó en solución tampón de fosfato a pH 7 y 25 mM a una temperatura de 50 °C. Luego se tomó una muestra de la suspensión periódicamente para medir su actividad catalítica como se describió en la sección 4.5.2 [30].

4.5.6 Reciclado del biocatalizador de lipasa inmovilizada

La actividad del soporte NPs-APTS-Glu-CALB se midió siete veces consecutivas acorde al procedimiento establecido en la sección 5.4.2. Entre cada ciclo, se lavó tres veces con 3 mL de solución tampón y después de cada serie de lavados se midió su actividad catalítica.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y en todos los casos la varianza fue inferior al 5%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La síntesis del biocatalizador magnético fue desarrollada en tres etapas: la primera etapa fue la síntesis de la magnetita (sección 5.1), la segunda etapa fue enfocada en la activación de la superficie de las nanopartículas con grupos amino y glutaraldehído (sección 5.2). La tercera y última etapa se basó en la determinación de la actividad y estabilidad catalítica de los soportes (sección 5.3).

5.1 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

En la síntesis de las nanopartículas se observó que, en el instante que se mezcla la solución de hierro con la solución oxidante se generó un cambio de coloración en el medio de reacción, tomando un color negro característico de la magnetita. También se obtuvieron ensayos erróneos que se diferenciaron en la coloración de la mezcla al agregar la solución de hierro, tomando un color marrón el cual indica que se formó la maghemita, otro mineral de hierro, en lugar de la magnetita. Esto se debe a la presencia de moléculas de oxígeno en la atmósfera, lo provoca que la magnetita pase a maghemita, que es un estado más oxidado del mineral de hierro. Realizando varios ensayos se determinó que se logra una atmósfera totalmente inerte purgando el sistema durante 30 min con gas de argón o nitrógeno.

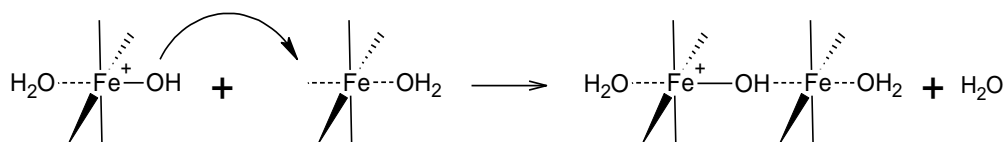
En la **Figura 12** se muestra los dos posibles mecanismos de formación de la magnetita. El proceso de olación consiste en eliminación de agua y formación de puentes hidroxilo [31]. Por otra parte, en el proceso de oxolación no existe ninguna molécula de agua en la esfera de coordinación de los complejos, y por lo tanto, no existe un grupo saliente para que se lleve a cabo la condensación. En este caso, la condensación tiene que proceder a través de un mecanismo asociativo de dos pasos que conduce a la formación de puentes oxo (oxolación). Para estos complejos de hierro la condensación ocurre rápidamente debido a la reactividad de las esferas

de coordinación, y por lo tanto, es difícil detener el proceso para determinar las especies que son formadas.

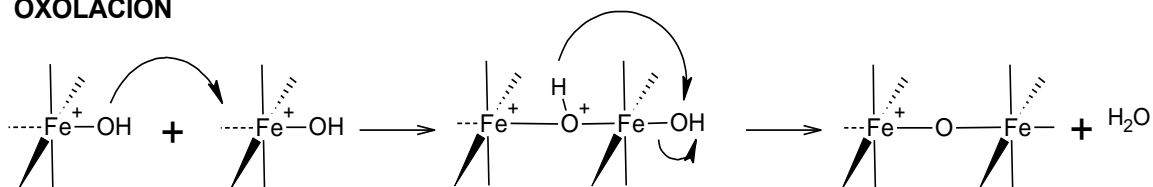
De manera general, la síntesis se realiza en fase acuosa para formar complejos hexacoordinados acuo $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ a partir de los cationes de hierro.

Figura 12. Mecanismos de condensación de los complejos acuo

OLACIÓN



OXOLACIÓN



Fuente: Jolivet Jean-Pierre, Chaneac Corinne, Tronc Elisabeth, Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks, Chem. Commun. 2004 481-487 p.

Después de obtener las NPs, éstas se lavaron inicialmente con agua y luego con etanol absoluto. El etanol se empleó como azeótropo para retirar las posibles moléculas de agua presentes y evitar que interaccionaran con la estructura de las nanopartículas, las cuales se aislaron empleando un rotoevaporador (**Figura 13**) y se analizaron posteriormente por espectroscopia infrarroja. Una evidencia de la presencia de agua en la estructura se observó en este análisis debido a la aparición de una banda intensa a 3300 cm^{-1} .

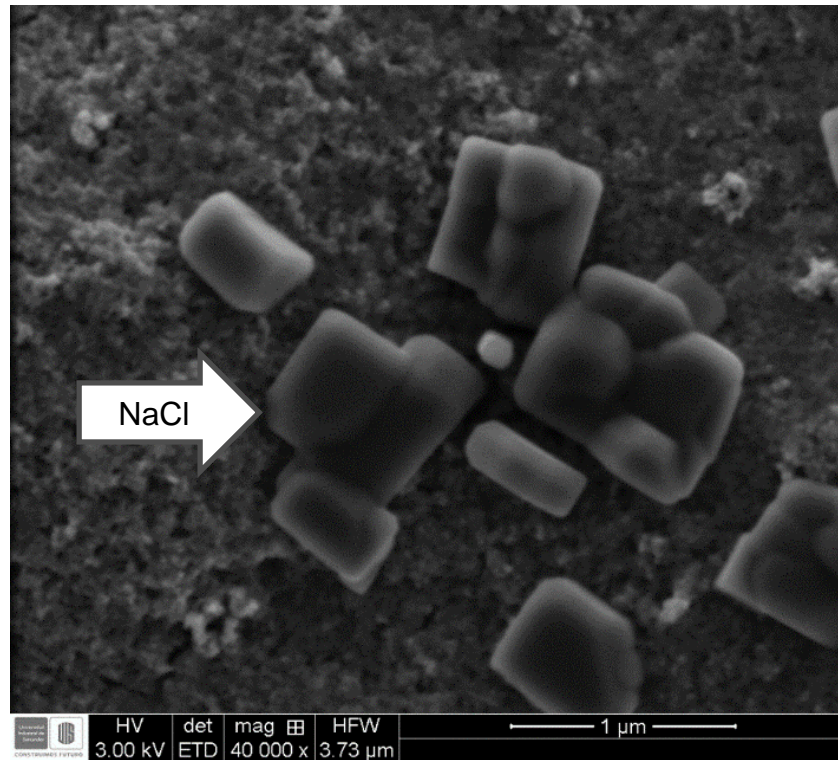
Figura 13. Montaje que se emplea para secar las NPs



Fuente: Autor.

El ensayo elemental por SEM (**Figura 14**) reveló que la cantidad de lavados propuestos inicialmente eran insuficientes para retirar el cloruro de sodio presente en la muestra, lo cual no garantizaba que la magnetita se encontrara pura. El cloruro de sodio presente en la muestra se observó en cristales de forma cuadrada y con un tamaño aproximado de $0.5 \mu\text{m}$. El material que se observa alrededor de los bloques son las nanopartículas magnéticas. Debido a estos resultados se pudo mejorar y optimizar el proceso realizando más lavados.

Figura 14. Imagen por SEM de las nanopartículas magnéticas y NaCl



Fuente: Laboratorio de Microscopía de la Universidad Industrial de Santander.

5.1.1 Efecto de la temperatura y agitación en la síntesis de las nanopartículas

El diámetro promedio de las partículas en nanómetros se determinó por dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés). Los tamaños son reportados por poblaciones y se pueden observar en el **Anexo 1**, en el cual se adjuntan dos reportes de las síntesis de magnetita realizadas. En la **Tabla 4** se exponen los resultados de las poblaciones superiores al 98% de las síntesis variando los parámetros de temperatura y agitación.

Tabla 4. Tamaño del diámetro de las NPs en nanómetros determinados por DLS

Temperatura	rpm	DLS [d. nm]	DLS [d. nm]	DLS [d. nm]
25°C	150	252	5,37	24,05
	400	299	5,42	9,697
	700	106	10,87	11,28
50°C	150	14,21	97,36	6,62
	400	37,93	18,38	6,68
	700	43,04	7,46	17,37
80°C	150	14,09	12,14	28.43
	400	56,28	2,93	23,53
	700	11,00	15,11	14,12

En el análisis de los resultados se puede concluir que el tamaño de las partículas no presenta un patrón de comportamiento definido con la temperatura y la agitación. Después de los experimentos, se puede asegurar que el factor más influyente en el tamaño de las nanopartículas es la velocidad de agregación y la concentración de la solución de hierro. La velocidad de agregación se procuró controlar con un embudo de agregación, pero se requiere instrumentos de alta precisión en el flujo de la solución de hierro para observar una correlación y diferencias significativas en el tamaño de las partículas. Si la agregación no tiene suficiente precisión no se podrá observar si al aumentar o disminuir la velocidad se genera un cambio en el tamaño de la partícula.

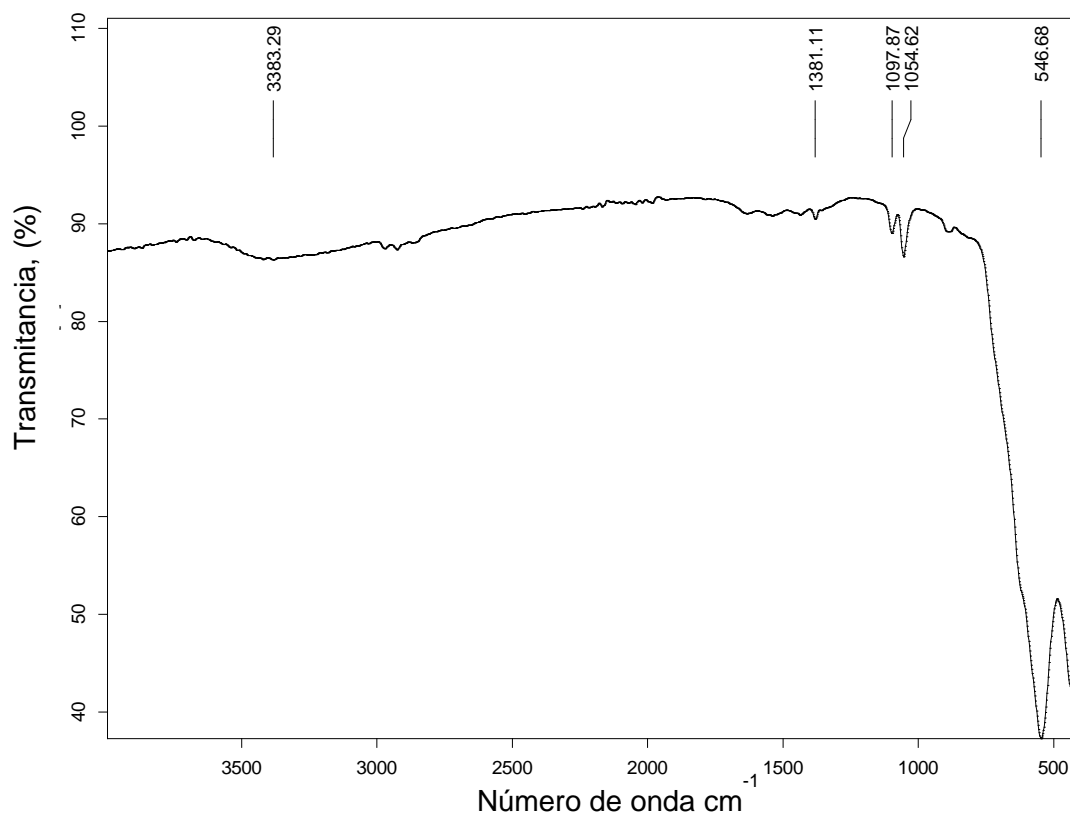
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

La formación del mineral de magnetita se comprobó por las técnicas de espectrometría de adsorción infrarroja y DRX; mientras que el tamaño de partícula y el potencial Z se determinó por DLS.

5.2.1 Espectroscopía infrarroja

El espectro infrarrojo se observa en la **Figura 15**, donde se puede apreciar la vibración de mayor intensidad a 546 cm^{-1} correspondiente al enlace Fe-O y una señal a 3.383 cm^{-1} correspondiente a una cantidad mínima de moléculas de agua presentes en la muestra.

Figura 15. Espectro IR de la magnetita



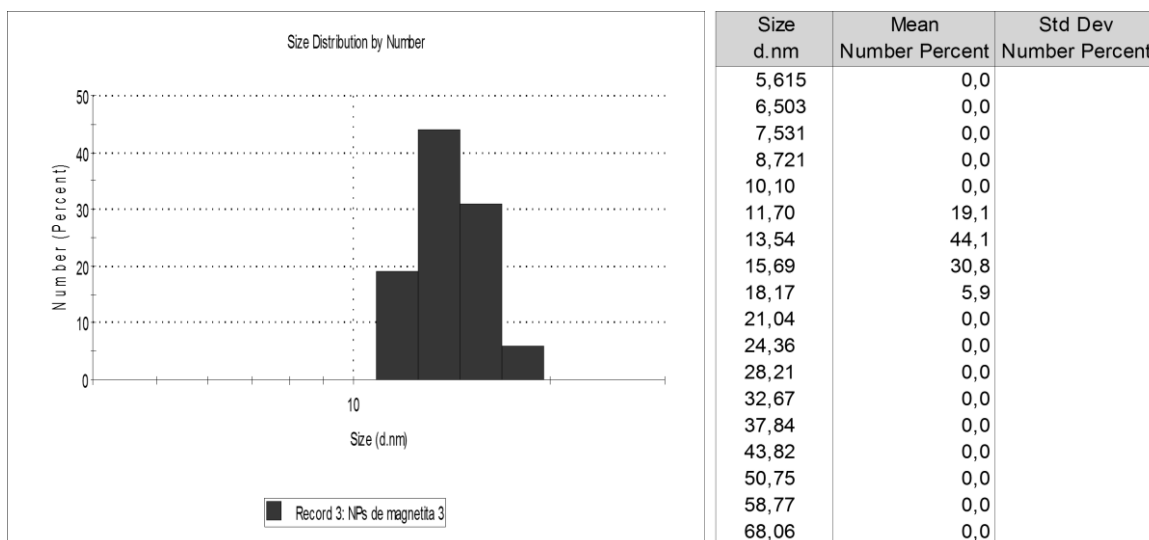
Fuente: Autor.

5.2.2 Caracterización por dispersión de luz dinámica

Los resultados expuestos en la **Tabla 4** muestran que controlando la velocidad de agregación se pueden tener tamaños de nanopartículas desde 2,9 Å hasta 299 Å. Las variables de temperatura y agitación requieren gran precisión para lograr la correlación de los tamaños, de lo contrario es ineficiente para conseguir una correlación tamaño-temperatura o tamaño-agitación.

En las **Figuras 16 y 17** se muestra el histograma con una distribución por número de las nanopartículas sintetizadas a 80°C y 700 rpm. En el **Anexo 1** se encuentran los reportes completos del análisis y las condiciones donde se lograron estas dispersiones. La **Figura 16** muestra que el tamaño promedio obtenido fue de 14,12 nm de diámetro con una desviación estándar de 1,728 nm (estos valores conseguidos son por número con un Pdi igual a 0,370).

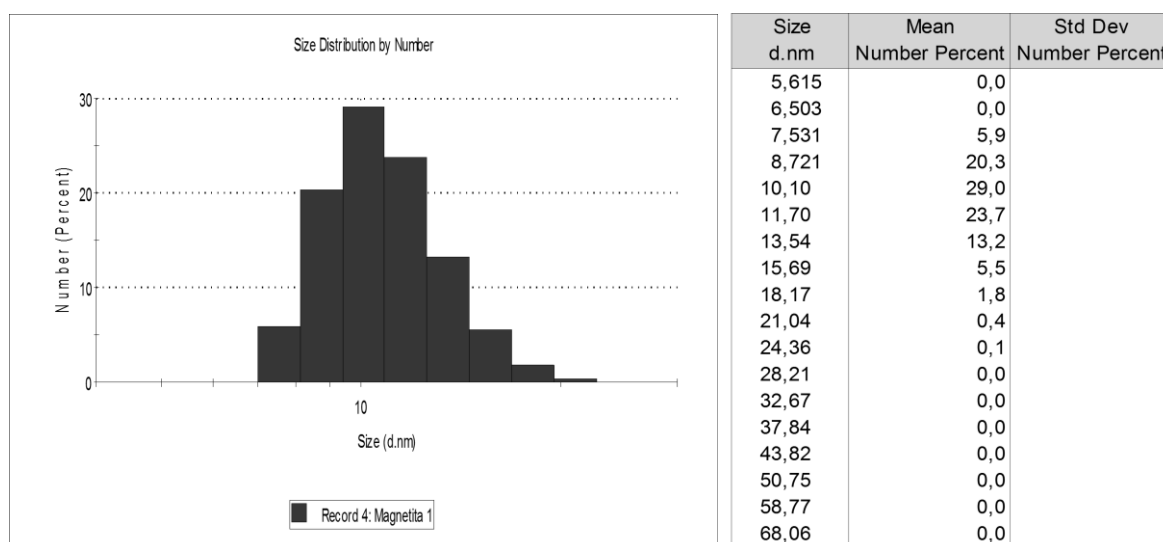
Figura 16. Histograma de diámetro promedio de las NPs en nanómetros [nm] y el % de distribución por número



Fuente: Autor.

La **Figura 17** muestra que el tamaño promedio logrado fue de 11,00 nm de diámetro con una desviación estándar de 2,364 nm (estos valores obtenidos son por número con un Pdi igual a 0,194).

Figura 17. Histograma de diámetro promedio de las NPs en nanómetros [nm] y el % de distribución por número



Fuente: Autor.

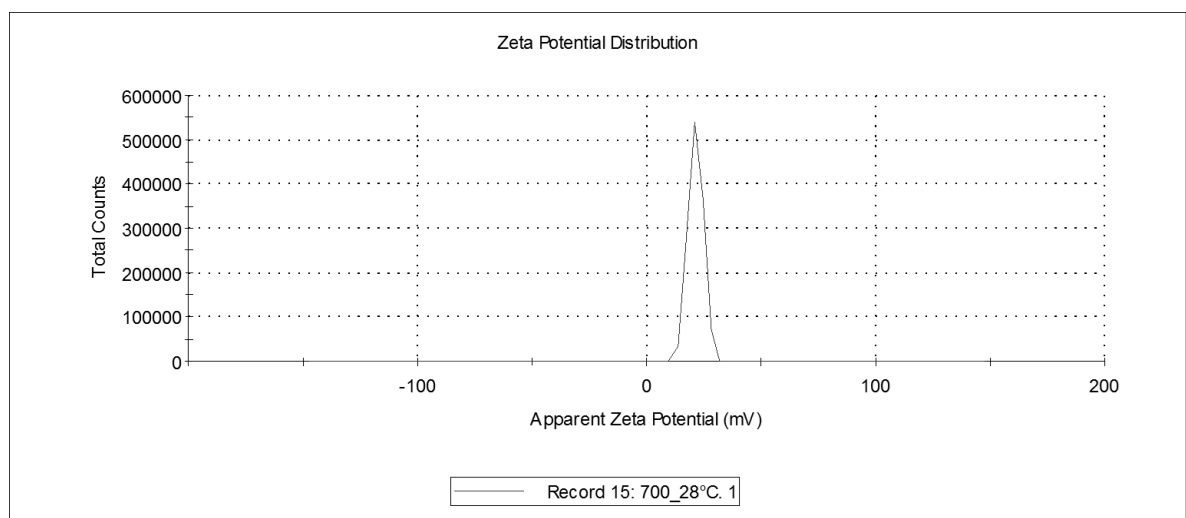
Se comprobó la reproducibilidad de los resultados reproducibles en la síntesis de las nanopartículas magnéticas al realizar diferentes mediciones durante varios días bajo las mismas condiciones (80 °C y 700 rpm).

5.2.3 Potencial zeta de las NPs magnéticas

El potencial zeta se empleó para determinar la estabilidad de las NPs en medio acuoso. En la **Figura 18** se observa la gráfica del potencial zeta medido para las NPs sintetizadas de magnetita en agua destilada obteniendo una carga de 21,4 mV.

Este resultado da un indicio de la estabilidad potencial del sistema en suspensión. Teóricamente, las partículas con potenciales zeta más positivos que 30 mV se consideran estables. Como el potencial zeta obtenido es pequeño y positivo, no habrá ninguna fuerza para prevenir que las partículas se junten y floculen [32].

Figura 18. Potencial zeta de las nanopartículas de magnetita sintetizadas en agua destilada



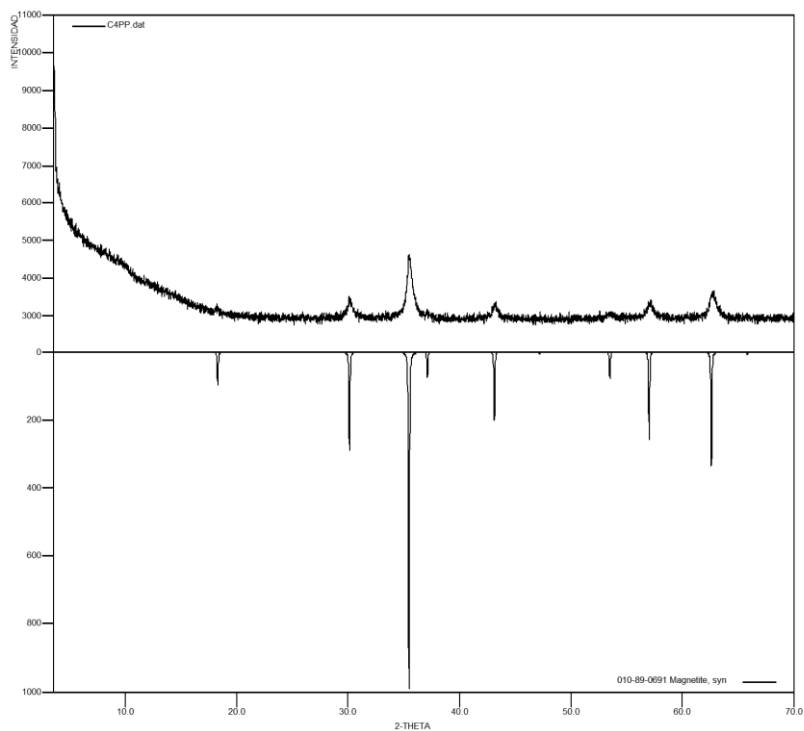
Fuente: Autor.

Se realizó una modificación en el procedimiento de síntesis de las NPs que consistió en cambiar el agua destilada por agua tipo I (18.2Ω). Con este cambio se consiguió un potencial zeta de 711 mV con una desviación de 140 mV (**Anexo 2**). La posible explicación del aumento en el potencial es porque el agua destilada tiene impurezas que afectan la estructura cristalina de la magnetita. Usando agua tipo I las impurezas disminuyen y durante la síntesis se forma una mejor estructura cristalina.

5.2.4 Caracterización de NPs por difracción de rayos X

El resultado del análisis cualitativo (**Figura 19**) demuestra que existe un sólido con fase cristalina de Fe_3O_4 . El perfil de difracción de la magnetita es similar al de maghemita [33], por esta razón es difícil distinguir el mineral con base a este análisis únicamente, debido a que tienen la misma estructura de espinela-inversa y son isomorfos. Además, las nanopartículas de magnetita se interconvierten a maghemita por exposición al medio ambiente. Con estos resultados es posible que se obtuviera cualquiera de las dos fases posibles, por lo tanto se realizaron análisis de IR-FT para corroborar que el patrón de DRX medido correspondía efectivamente a la magnetita con tarjeta número 010-89-0691 perteneciente a la base de datos PDF-2. Al comparar sus espectros de IR-FT, la maghemita muestra un corrimiento de la banda correspondiente a la vibración Fe-O (619 cm^{-1}) hacia números de onda mayores con respecto a la magnetita (546 cm^{-1}).

Figura 19. Perfil de DRX de las nanopartículas de magnetita



Fuente: Laboratorio de Difracción de Rayos X (INF-191-12), Universidad Industrial de Santander.

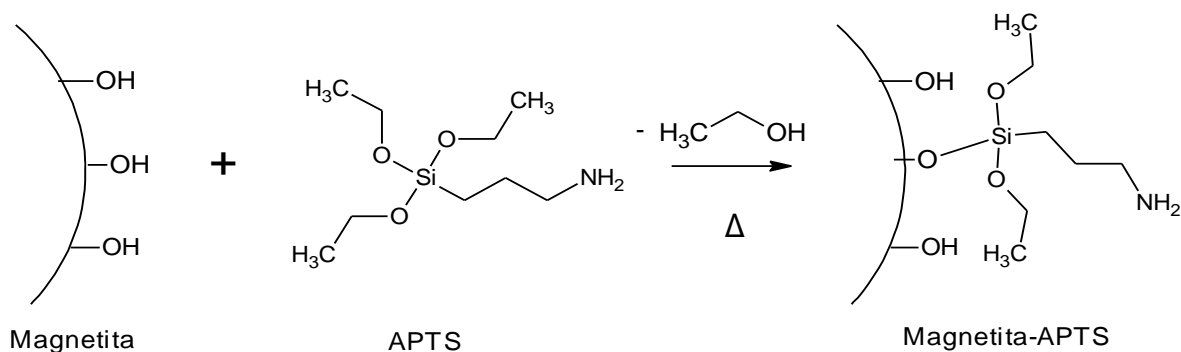
5.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

La activación o funcionalización de las nanopartículas magnéticas consistió en realizar dos procedimientos antes de inmovilizar la enzima. El primero fue recubrir las nanopartículas con APTS y el segundo fue hacer que las nanopartículas aminadas reaccionaran con glutaraldehído.

5.3.1 Funcionalización de las NPs con grupos amino

En el recubrimiento de las nanopartículas magnéticas, se realizaron pruebas para determinar el efecto del medio de reacción en la transformación de la superficie de las nanopartículas. Las pruebas consistieron en cambiar las características del solvente para la reacción entre las NPs y el APTS. Los solventes utilizados fueron etanol, diclorometano y la mezcla diclorometano-agua. El recubrimiento se comprobó con la espectrometría de adsorción infrarroja. El mecanismo de reacción para el recubrimiento de las partículas en medio anhidro se muestra en la **Figura 20**.

Figura 20. Deposición de silanos en medio anhidro



Fuente: C. a. Schlecht and J. a. Maurer, "Functionalization of glass substrates: mechanistic insights into the surface reaction of trialkoxysilanes," *RSC Advances*, vol. 1, no. 8, p. 1446, 2011.

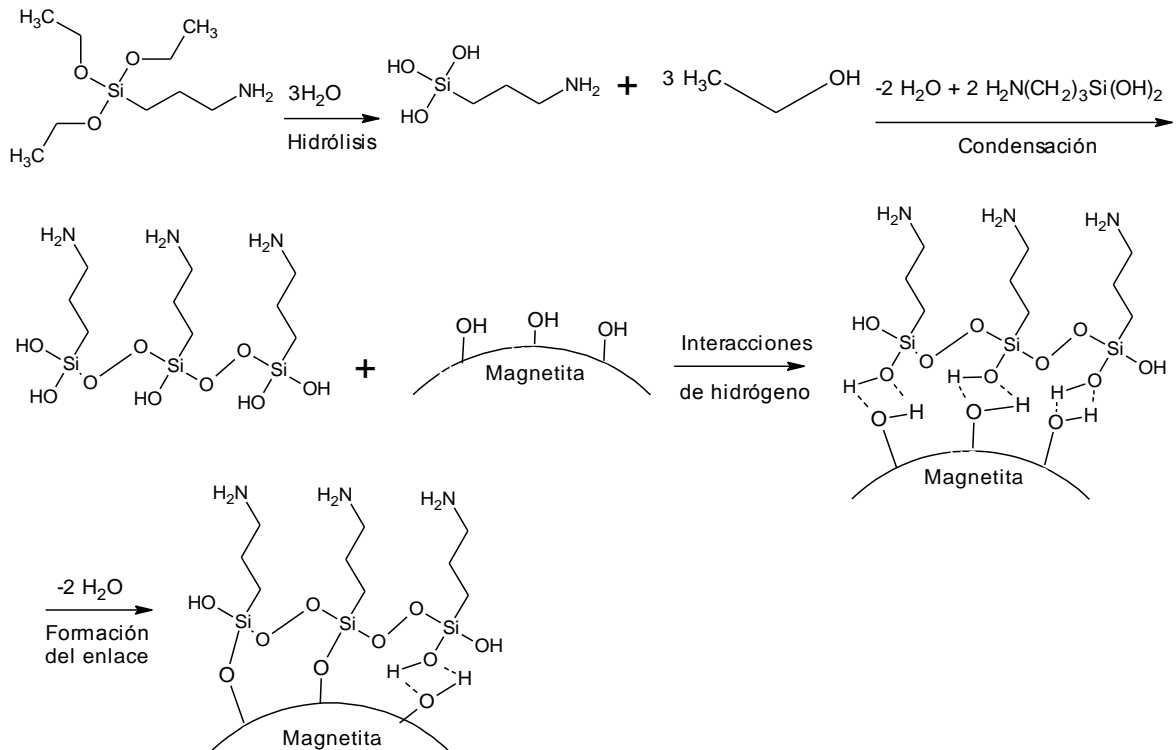
En esta reacción el grupo hidroxilo se encuentra en la superficie de las nanopartículas, este realiza un ataque nucleofílico directo a la superficie del silicio y el grupo etoxi sale del APTS reaccionando con el hidrógeno que se encontraba en la superficie de las NPs, dejando como producto de reacción etanol. El mecanismo propuesto para esta reacción es de tipo adición-eliminación, que es un mecanismo planteado para la reacción de silanos con superficies de vidrio [34]. En el proceso de síntesis se generó una monocapa de las nanopartículas (NPs) durante 12 horas a 40°C. Este método es complicado debido a que se debe tener una larga preparación y un riguroso control para estabilizar la mezcla y poder lograr resultados reproducibles [35].

El recubrimiento de las nanopartículas (NPs) también se realizó en presencia de agua (**Figura 21**), esto es debido a que el organosilano posee dos clases de grupos funcionales, un grupo amino primario que puede usarse para reaccionar con sustratos y un grupo alcoxi que puede generar fácilmente la hidrólisis del silano.

La reacción del APTS con las NPs en presencia de agua es diferente al mostrado en la **Figura 20**, debido a que se lleva a cabo en tres etapas: la primera genera la hidrólisis del silano, la segunda es la condensación de los grupos silanol y la tercera es la formación del enlace entre la magnetita y el silicio.

La hidrólisis que experimenta el organosilano es una reacción muy rápida y el grupo reactivo silanol es formado con facilidad; este grupo silanol puede condensarse con otros grupos silanol recién formados, para establecer una especie muy pequeña de trímero o dímero. La condensación formada es estable y puede interaccionar con los grupos hidroxilo presentes en la superficie de la magnetita y formar un enlace irreversible entre el silicio y el oxígeno que se encuentra en la superficie de las nanopartículas [35, 36].

Figura 21. Mecanismo de reacción entre el APTS y la magnetita en medio acuoso



Fuente: B. Arkles, "Techniques for Silylation." CHEMTECH, pp. 56–61, 1977.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs FUNCIONALIZADAS

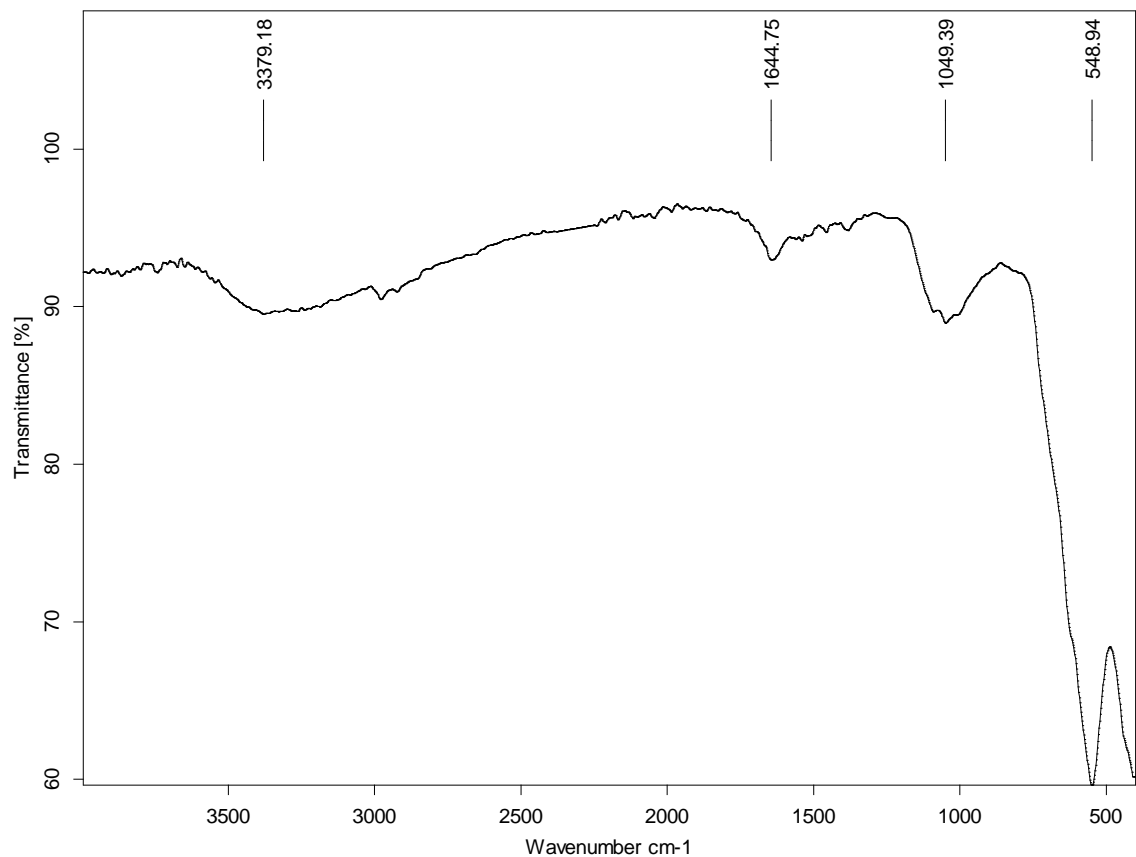
La superficie de la magnetita fue recubierta con grupos amino; esta reacción se realizó en atmósfera inerte y se comprobó con la espectrometría de adsorción infrarroja y DLS.

5.4.1 Espectroscopía infrarroja

La estructura de la magnetita se analizó por espectroscopía infrarroja observando en el espectro (**Figura 22**) la modificación con etanol a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Las vibraciones del

enlace del óxido de hierro Fe-O en sitios tetraédricos y octaédricos se observan aproximadamente a 548 cm^{-1} . La modificación de las NPs en su superficie con APTS es confirmada por las bandas de 1049 cm^{-1} que se asignan a las vibraciones del Si-O; las bandas correspondientes al $-\text{CH}_2$ no se alcanzan a definir, pero se cree que son los dos picos de muy baja intensidad cerca de los 3.000 cm^{-1} . Como consecuencia de esto, las nanopartículas se estarían modificando en baja proporción con grupos amino. Se confirma con el análisis infrarrojo que la fase cristalina de la magnetita se conserva después de la aminación y al usar etanol como solvente a temperatura ambiente.

Figura 22. Nanopartículas recubiertas con APTS utilizando como solvente etanol a una temperatura ambiente de 25°C

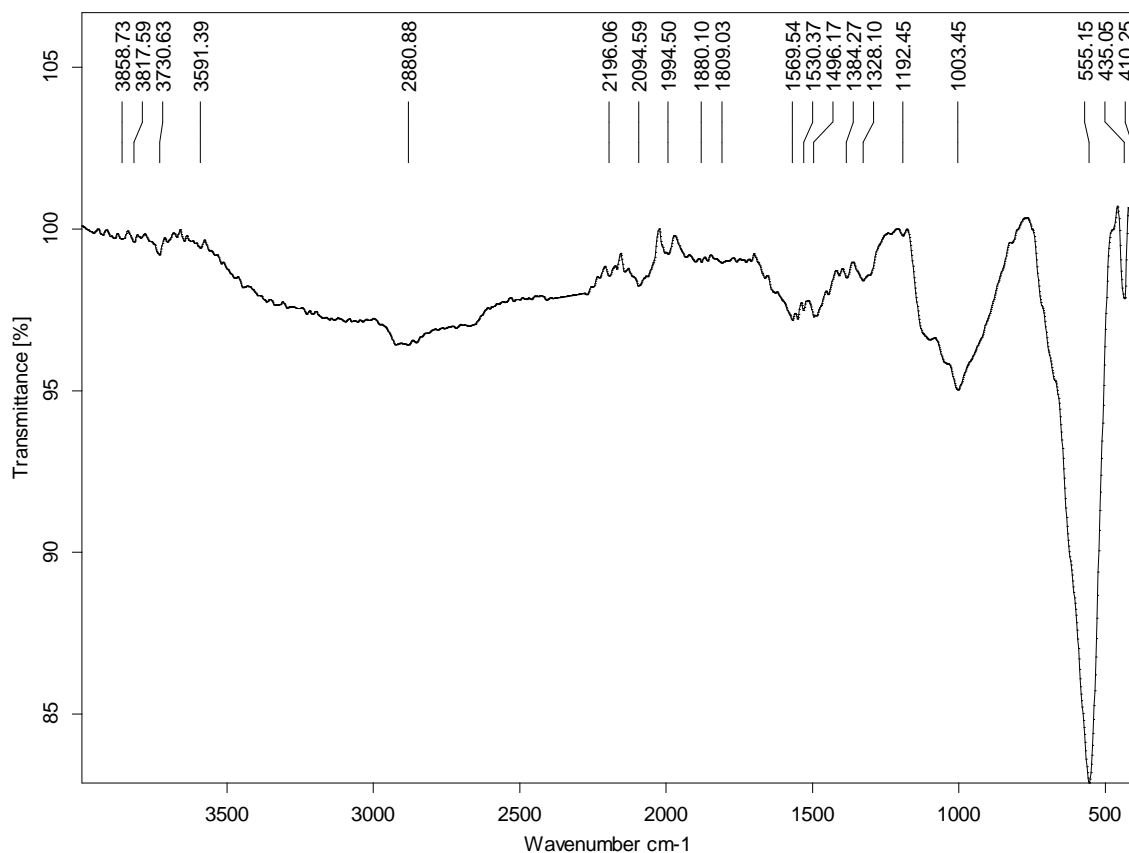


Fuente: Autor.

Con base en el mecanismo mostrado en la **Figura 20** se establece que, podemos aumentar el rendimiento de la reacción entre el APTS y las NPs y obtener una mayor cantidad de grupos amino en la superficie de las NPs, mediante el calentamiento de la mezcla de reacción a 40 °C. El resultado del recubrimiento de las nanopartículas se comprobó por espectrometría infrarroja y se muestra en la **Figura 23**.

Las vibraciones del enlace Fe-O aparecen a 555 cm^{-1} y la modificación de la superficie de las NPs con APTS es confirmada por la banda a 1.003 cm^{-1} que se asigna a las vibraciones del Si-O. Comparando las intensidades de las bandas de Si-O mostradas en las **Figuras 22** y **23** respectivamente, podemos afirmar que la banda es más intensa cuando la reacción se lleva a 40 °C. Ahora, podemos asegurar que en la superficie de las NPs se encuentran más grupos amino, debido al cambio de temperatura.

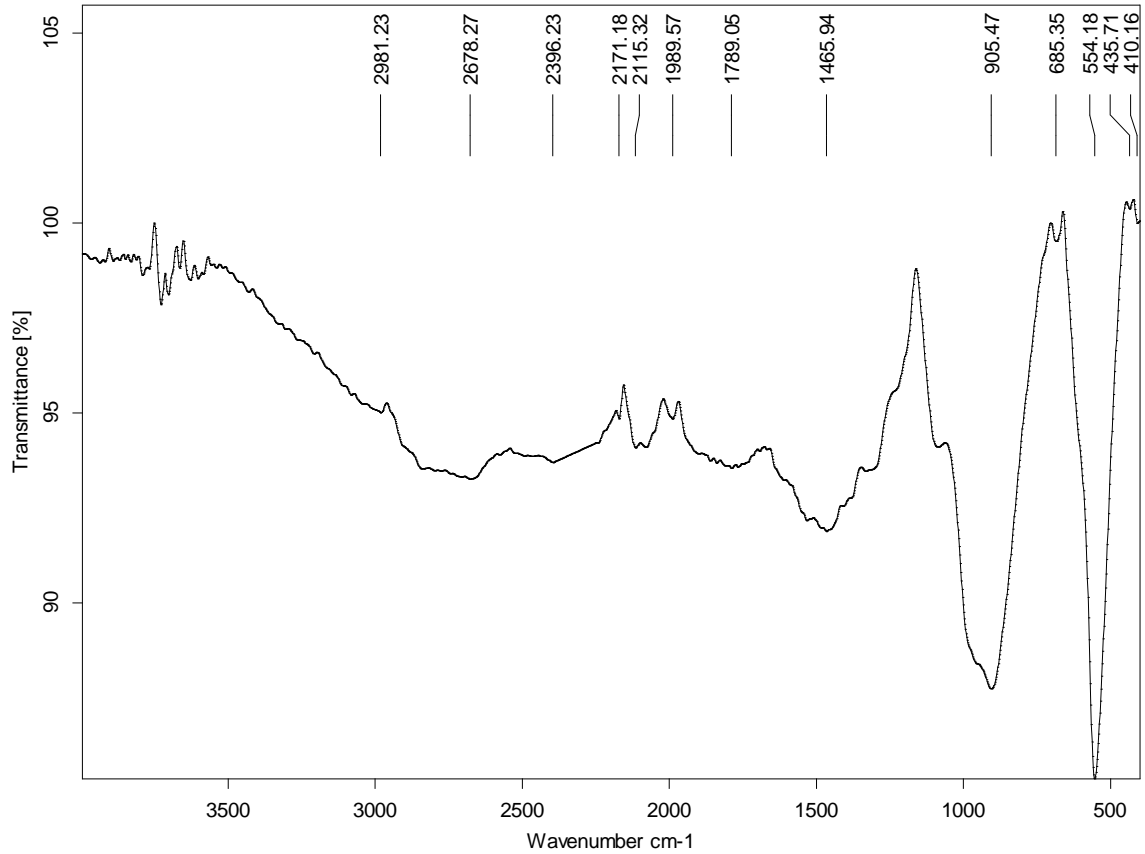
Figura 23. Nanopartículas recubiertas con APTS utilizando como solvente etanol a 40°C



Fuente: Autor.

En esta investigación se optimizó la reacción para recubrir la superficie de las nanopartículas con la mayor cantidad de grupos amino, ya que al tener más grupos aminos disponibles en la superficie de las nanopartículas se puede inmovilizar mayor cantidad de proteína. Para optimizar la reacción de las NPs con el APTS se encontró que se requiere estudiar el efecto del solvente en el recubrimiento y el número de moléculas de APTS en la superficie. Con este fin se cambió el solvente de la reacción de etanol a diclorometano y agua al 1% v/v. En la **Figura 24** se puede observar los resultados del análisis de infrarrojo.

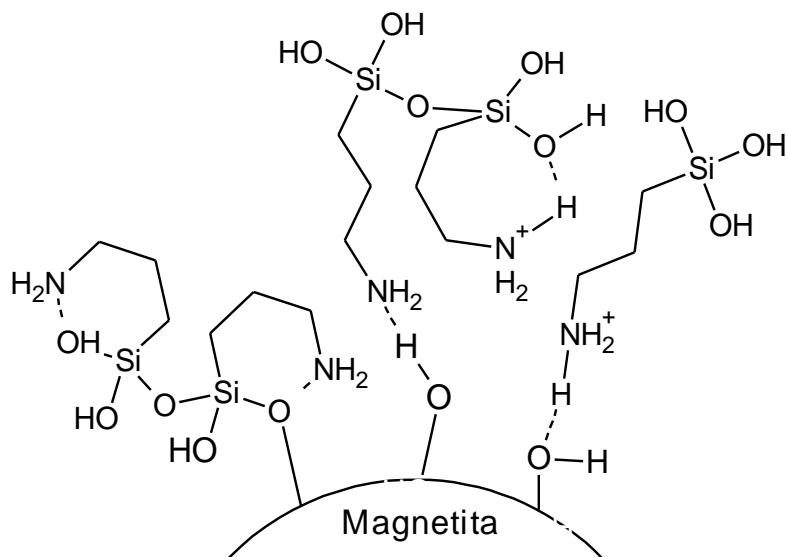
Figura 24. Nanopartículas recubiertas con APTS en un medio de reacción que contiene una mezcla de diclorometano y agua



Fuente: Autor.

En este espectro se observan las bandas características de las vibraciones del enlace Fe-O a 554 cm^{-1} y la modificación de la superficie de las NPs con APTS es confirmada por la banda de 905 cm^{-1} que es asignada a las vibraciones del Si-O. Las bandas anchas no son características de los grupos $-\text{CH}_2$ y $-\text{NH}_2$, pero se atribuyen a la polimerización del APTS en un medio que contiene agua o a las diversas formas estables que puede tomar el APTS al generar interacciones de hidrógeno con moléculas vecinas de silanos o con las NPs (**Figura 25**).

Figura 25. Representación esquemática de los enlaces que se pueden formar en superficie de las nanopartículas



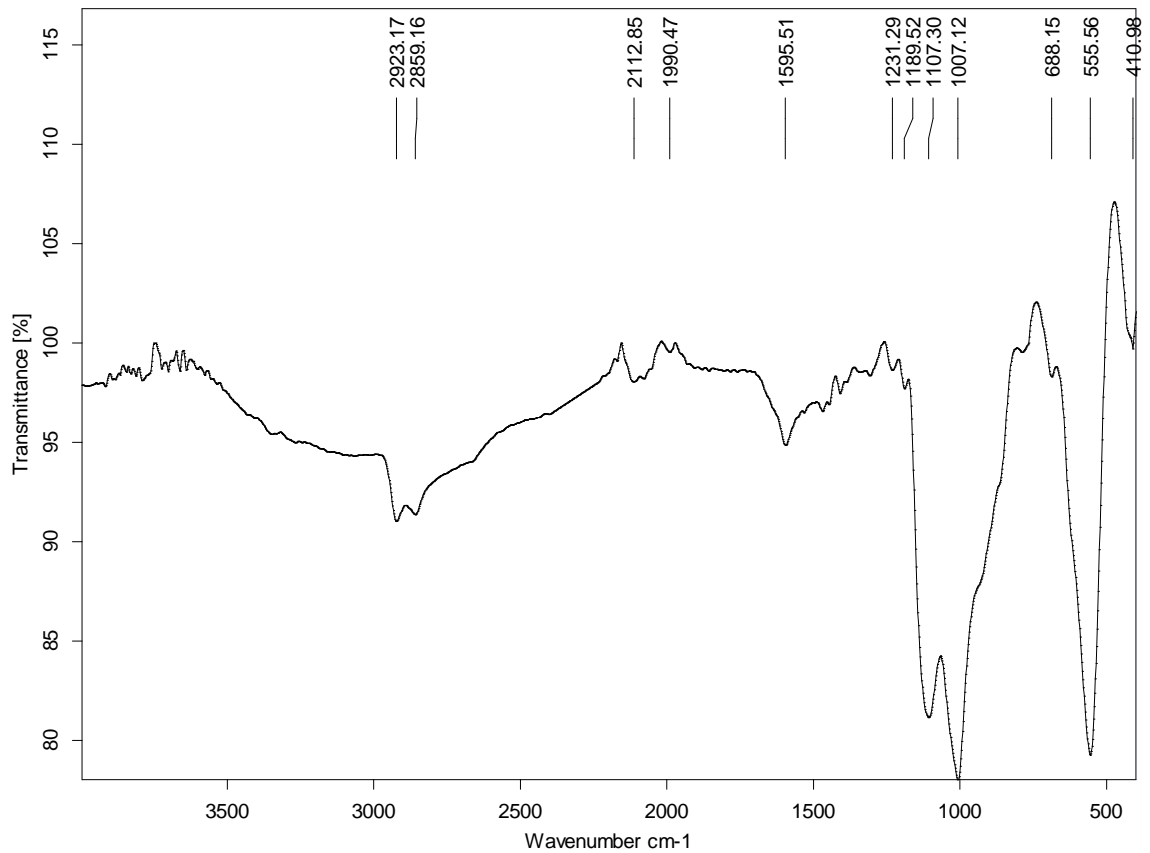
Fuente: V. Sunkara and Y.-K. Cho, "Investigation on the mechanism of aminosilane-mediated bonding of thermoplastics and poly(dimethylsiloxane).," ACS applied materials & interfaces, vol. 4, no. 12, pp. 6537–44, Dec. 2012.

Los enlaces mostrados en la **Figura 25** solamente se pueden observar cuando son empleados silanos que poseen un grupo amino libre y grupos alcóxido. En solución acuosa se hace favorable estas reacciones debido a la rápida hidrólisis del amino silano en agua y a las temperaturas elevadas durante la reacción [36].

En la **Figura 26** se pueden distinguir las vibraciones asimétricas y simétricas del -CH_2 a 2.923 y 2.859 cm^{-1} respectivamente. En la región comprendida desde 950 hasta 1.250 cm^{-1} se observan las vibraciones del enlace Si-O-Si y las bandas más intensas de este enlace a 1.231 y 1.007 cm^{-1} . La banda de 1.107 cm^{-1} se debe a los Si-O-Si anclados en la superficie de las nanopartículas. Esta región del espectro también muestra una pequeña banda de 1.189 cm^{-1} debido al balanceo del -CH_2 de

los grupos etoxi que no reaccionaron ($\text{SiO-CH}_2\text{-CH}_3$). La vibración tipo tijera del -NH_2 se establece a 1.595 cm^{-1} [37].

Figura 26. Infrarrojo de las nanopartículas recubiertas con grupos amino

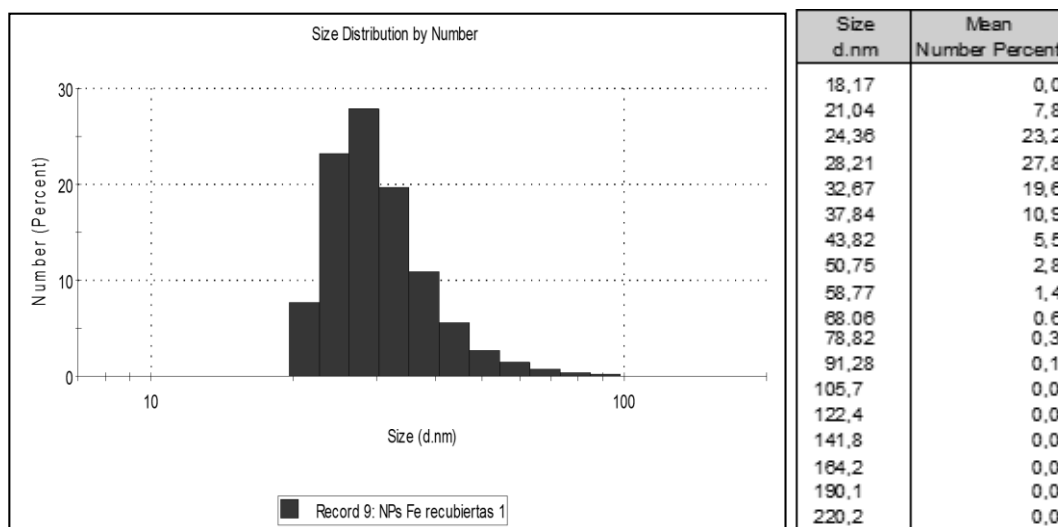


Fuente: Autor.

5.4.2 Caracterización de las nanopartículas por dispersión de luz dinámica

La **Figura 27** muestra que el tamaño obtenido fue de 31,13 nm de diámetro con una desviación estándar de 8,996 nm. Los resultados obtenidos se expresan en distribución por número con un Pdi igual a 0,446.

Figura 27. Histograma del tamaño promedio de las NPs recubiertas en nm y el % de distribución por número



Fuente: Autor.

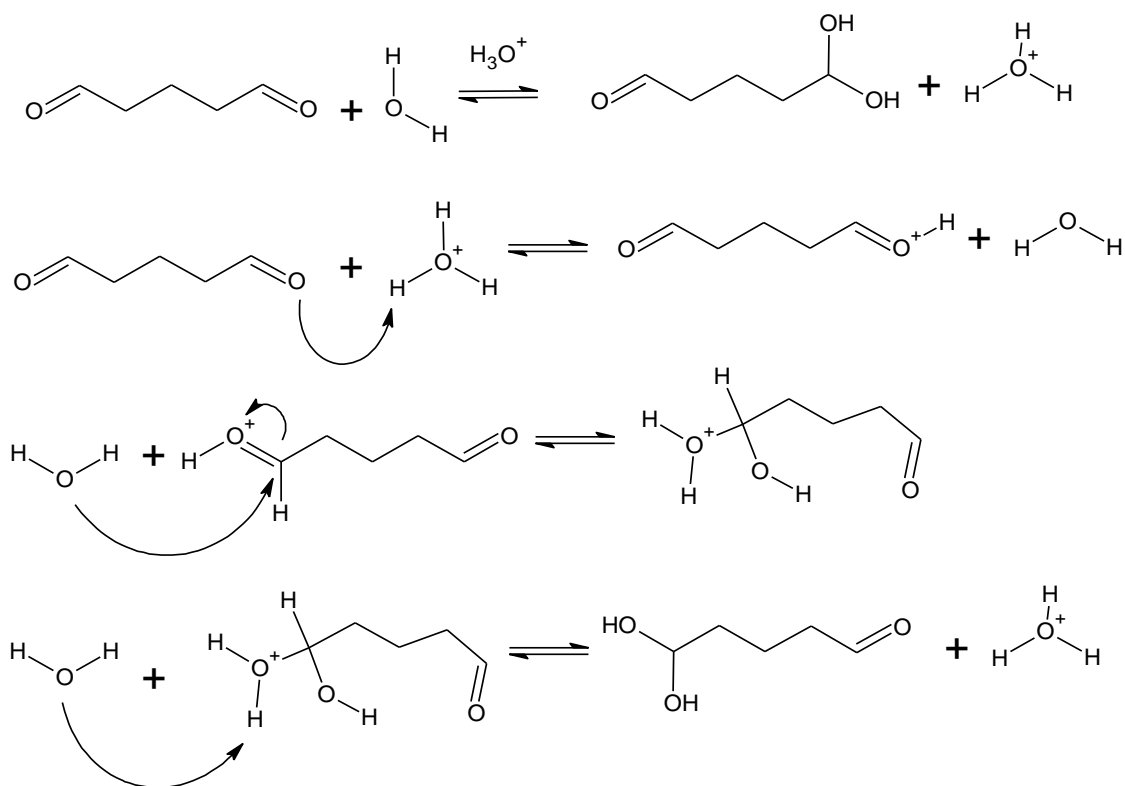
Este resultado demuestra que las nanopartículas aumentan su tamaño en 17 nm (120%) de diámetro cuando son recubiertas con los grupos amino. El aumento del tamaño es debido a la capa de APTS que recubre las nanopartículas; otro factor a considerar es la agregación que puede ocurrir durante las doce horas de reacción.

5.4.3 Funcionalización de las NPs aminadas con glutaraldehído

El mecanismo de hidratación del glutaraldehído (**Figura 28**) consta de tres pasos: el primero y el último son transferencias rápidas de protón entre oxígenos y el segundo es una adición nucleofílica. Inicialmente, el catalizador ácido activa al grupo carbonilo para recibir el ataque nucleofílico de una molécula de agua. La protonación del oxígeno hace que el carbono carbonílico del glutaraldehído sea mucho más electrofílico. Luego se da la adición nucleofílica del agua al ácido

conjugado del aldehído para formar el ácido conjugado del diol geminal y finalmente, en una etapa rápida, ocurre la transferencia del protón del ácido conjugado del diol geminal a una molécula de agua.

Figura 28. Hidratación del glutaraldehído en medio ácido



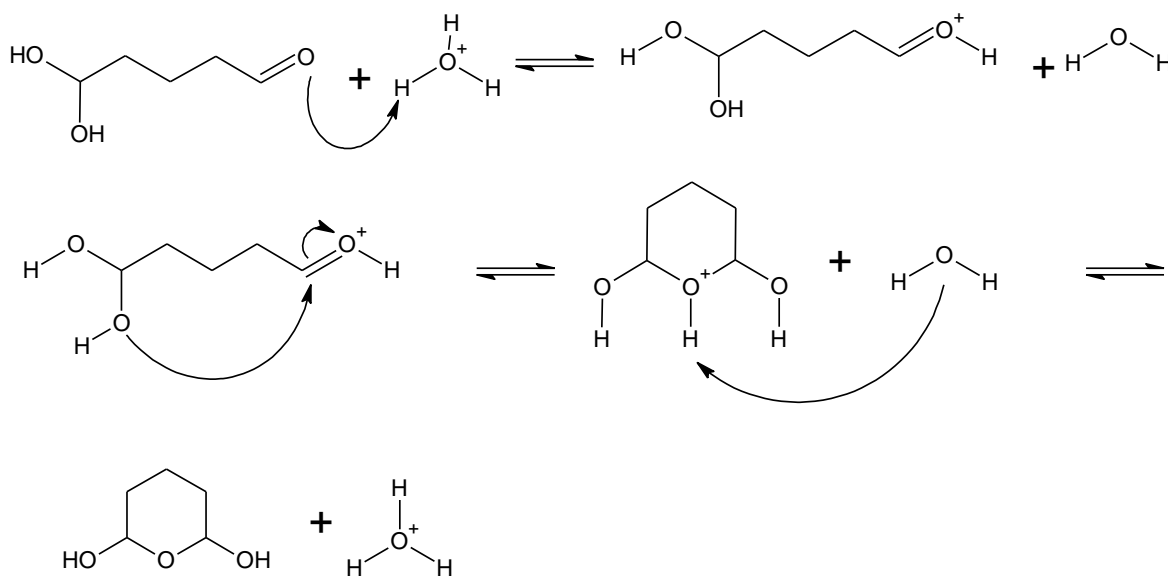
Fuente: F. A. Carey, "ALDEHÍDOS Y CETONAS: ADICIÓN NUCLEOFÍLICA AL GRUPO CARBONILO," in in *Química orgánica*, Sexta edic., Mexico: McGraw-Hill Interamericana, 2006, pp. 712–750.

La estructura del glutaraldehído en solución acuosa ha sido objeto de debate, más que cualquier otro reactivo de reticulación ya que puede existir en su forma más simple, pero también como un dialdehído monomérico o como un dímero, trímero y/o como un polímero. Debido a esto, se planteó una posible estructura del Glu, ya

que no se puede asegurar con certeza la conformación adoptada bajo el mecanismo empleado. Por lo tanto, la eficacia de la inmovilización con glutaraldehído y las controversias entorno a su comportamiento químico podrían ser racionalizadas con la multiplicidad de sus estructuras, que dependen de las condiciones de la solución.

A partir de la transformación del glutaraldehído hidratado se formó el hemiacetal como producto de la adición nucleofílica del alcohol al aldehído. En la **Figura 29** se observa que la primera etapa del mecanismo de reacción se caracteriza por la adición nucleofílica al grupo carbonilo catalizada por ácido y el oxígeno del alcohol ataca al grupo carbonilo para formar el hemiacetal. Este hemiacetal reacciona con el amino primario que se encuentra en la superficie de las nanopartículas [38].

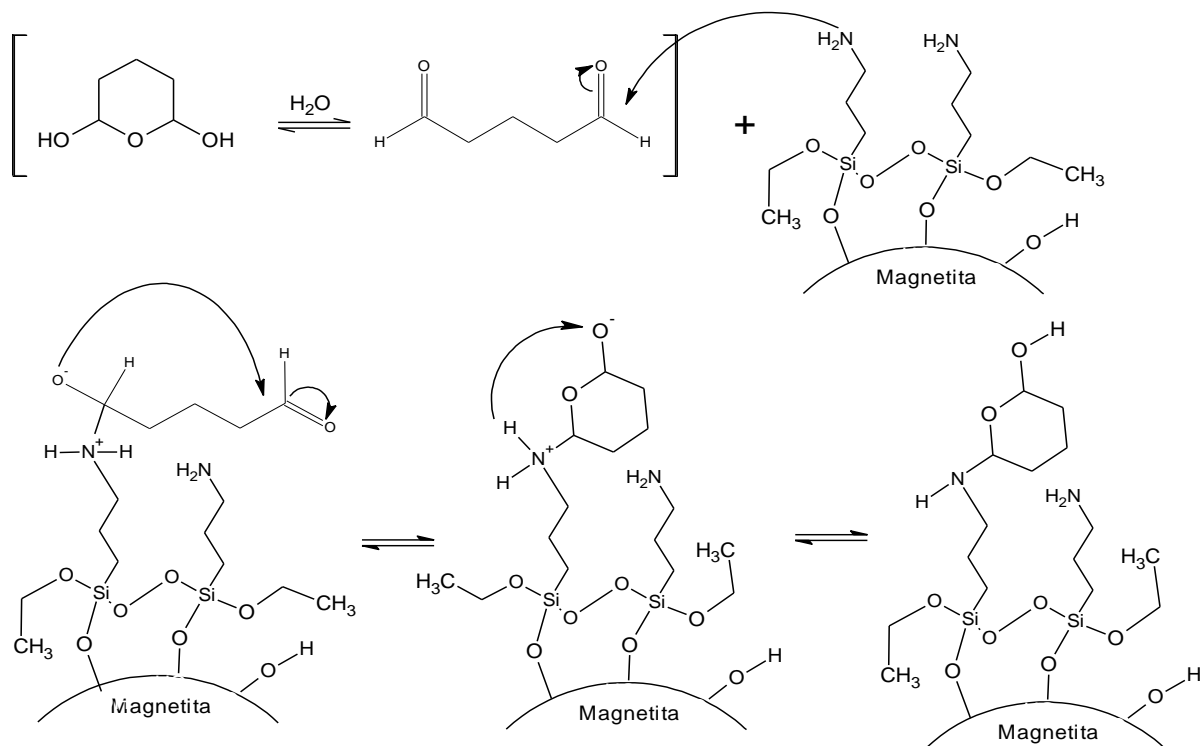
Figura 29. Formación del hemiacetal a partir del ácido conjugado del diol geminal



Fuente: F. A. Carey, "ALDEHÍDOS Y CETONAS: ADICIÓN NUCLEOFÍLICA AL GRUPO CARBONILO," in *Química orgánica*, Sexta edic., Mexico: McGraw-Hill Interamericana, 2006, pp. 712–750.

Una vez obtenido el hemiacetal, se hizo reaccionar con las nanopartículas recubiertas con grupos amino (**Figura 30**). En la primera parte se muestra el equilibrio conformacional del glutaraldehído en solución acuosa, donde consta de la forma cíclica y la forma abierta [39]. La reacción comienza cuando el grupo amino realiza el ataque nucleofílico al carbono electro-deficiente del glutaraldehído que presenta la conformación abierta, a su vez el grupo amino dona su par de electrones libres para formar el enlace nitrógeno-carbono y el oxígeno recibe el par de electrones del enlace doble, adquiriendo una carga negativa. El oxígeno cargado negativamente ataca el carbono electrodeficiente que se encuentra en el extremo del glutaraldehído generando la forma cíclica del dialdehído. Cuando adquiere la forma cíclica el oxígeno recibe el par de electrones y adquiere una carga negativa que es neutralizada por el transporte de protones desde el nitrógeno al oxígeno.

Figura 30. Mecanismo propuesto de recubrimiento de nanopartículas con grupos amino y su activación con glutaraldehído

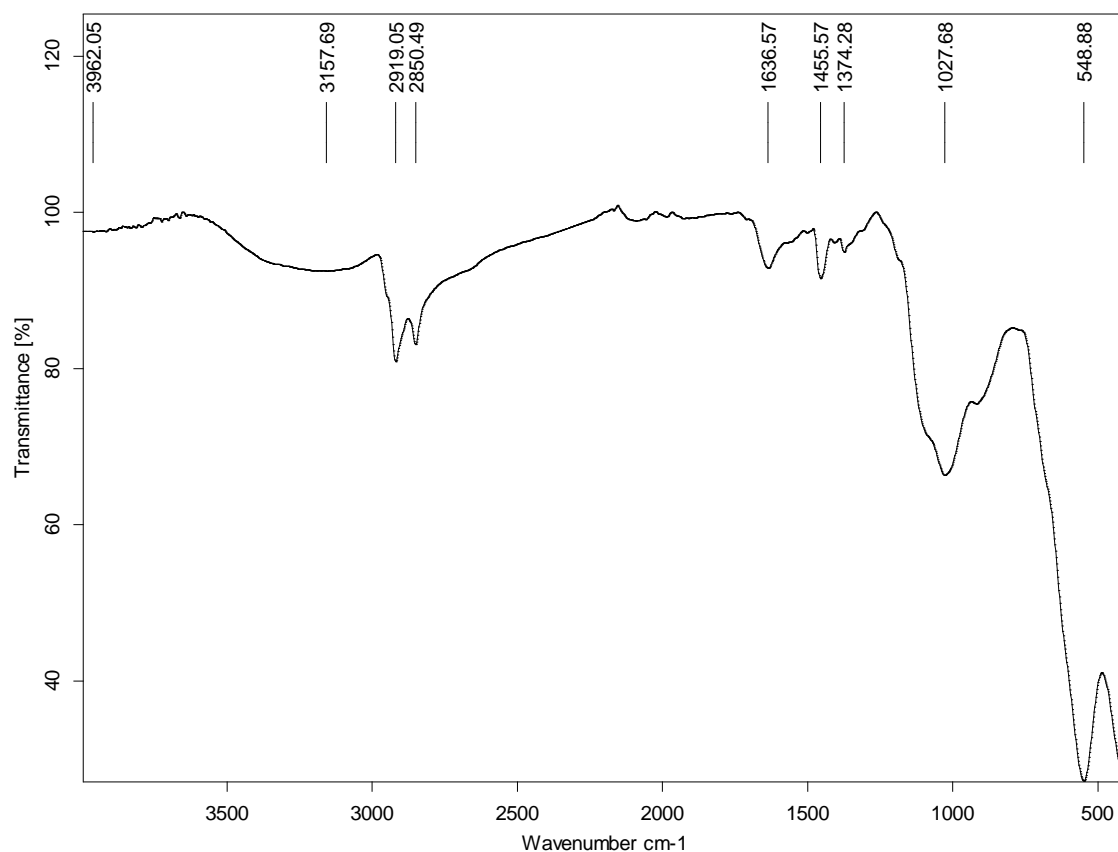


Fuente: Autor.

Otro posible producto de la reacción entre las nanopartículas aminadas y el glutaraldehído es la formación de una base de Schiff o imina. Se llevó a cabo la reacción a pH neutro entre las NPs aminadas con el Glu y después se realizó una reducción con borohidruro de sodio para comprobar por espectrometría infrarroja si había formación de la imina.

La **Figura 31** demuestra que no hay bandas que indiquen la formación de la imina en las nanopartículas después de la reducción con borohidruro. Por lo tanto, se descartó este posible mecanismo de reacción.

Figura 31. Nanopartículas aminadas y reducidas con borohidruro



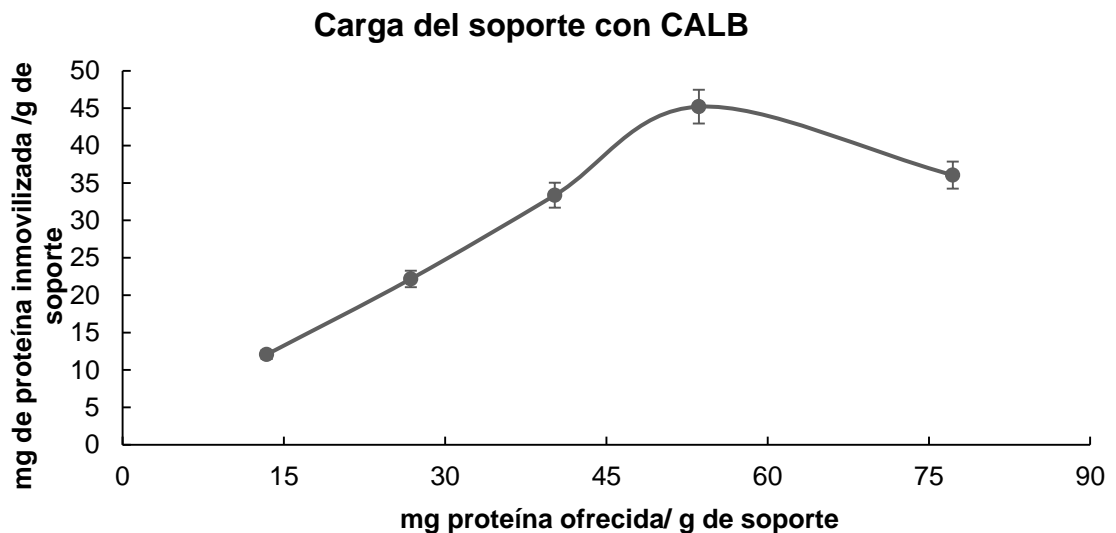
Fuente: Autor.

5.5 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

5.5.1 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford en un rango de 0,01 mg/mL a 0,1 mg/mL (**Anexo 3**). La carga de proteína en el soporte se muestra en la **Figura 32**.

Figura 32. Cuantificación de proteína inmovilizada al soporte



Fuente: Autor.

Se determinó la carga de proteína en el soporte de NPs-APTS-Glu y se comprobó que se adhirieron 45 mg de proteína por gramo de soporte. La carga del soporte se comparó con el trabajo realizado por Marciello et al., (2012), siendo nuestros resultados mejores que los reportados por estos autores.

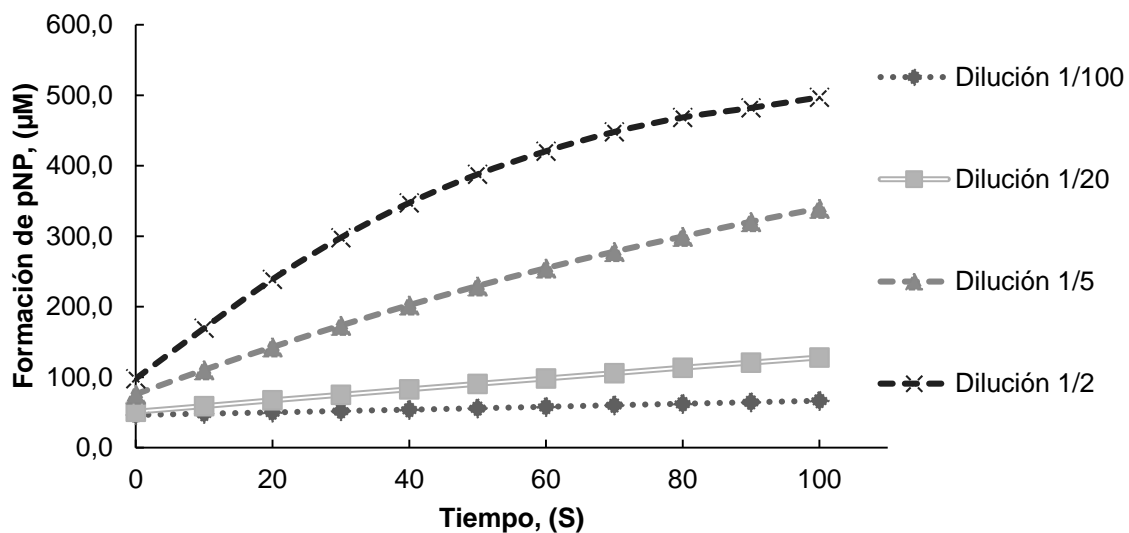
5.5.2 Determinación de la actividad enzimática

En la **Figura 33** se aprecia la velocidad de reacción de la CALB con p-NPB con diferentes disoluciones del extracto crudo, a pH 7 y temperatura ambiente.

Las velocidades de reacción varían con la temperatura y la concentración de los reactivos. Por esta razón, para una reacción independiente de la cantidad de sustrato se requiere una tendencia lineal y las diluciones 1/20 y 1/100 son las que presentaron esta característica. Por lo tanto, para todos los experimentos donde se empleó la enzima se trabajó con la dilución 1/100 para asegurar que la velocidad de

reacción no dependa de la concentración de sustrato. La pendiente corresponde a la velocidad de reacción, obteniendo para la dilución 1/100, un valor igual a 0,203 $\mu\text{M/s}$.

Figura 33. Velocidad de reacción de la CALB en diferentes concentraciones



Fuente: Autor

5.5.3 Inmovilización de enzima en los diferentes soportes

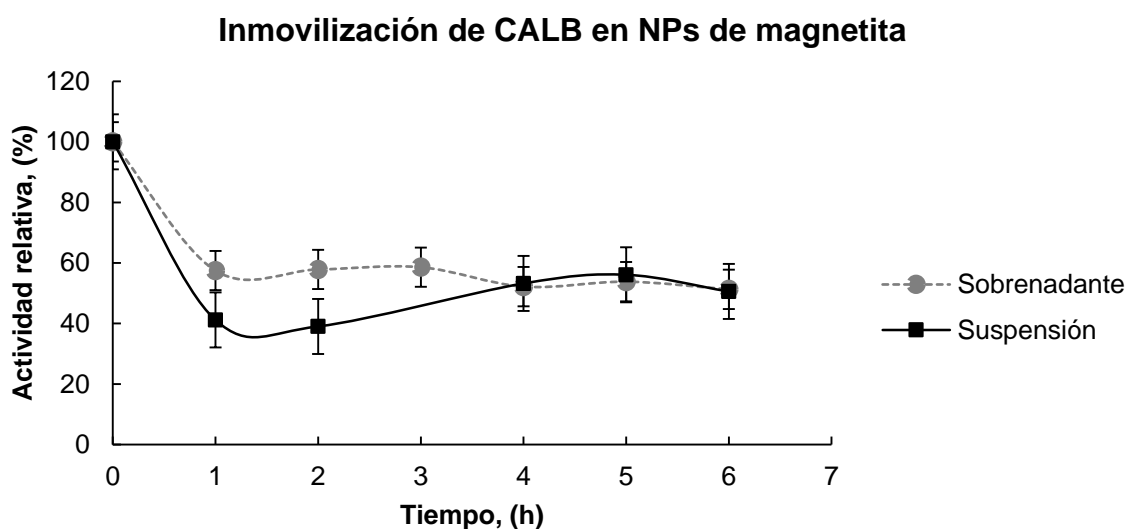
El proceso de inmovilización se llevó a cabo en los tres soportes utilizados durante seis horas de reacción, después de este periodo de tiempo no se obtuvieron resultados relevantes en la cinética de inmovilización.

5.5.3.1 Inmovilización en nanopartículas magnéticas

El primer soporte empleado para inmovilizar la CALB a pH 7 y temperatura ambiente fue la magnetita y su cinética de inmovilización se muestra en la **Figura 34**. Aquí se

observa que durante la primera hora de inmovilización el sobrenadante pierde aproximadamente el 30% de su actividad, y esta actividad perdida es adquirida por el soporte. La actividad del sobrenadante se mantiene casi constante durante las siguientes cinco horas esto nos indica que la proteína se pegó rápidamente durante la primera hora a las nanopartículas.

Figura 34. Cinética de inmovilización de la CALB en nanopartículas de magnetita

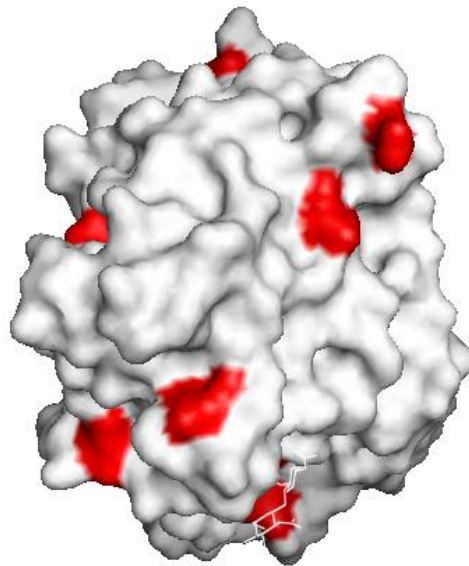


Fuente: Autor.

La proteína pegada en la cinética de inmovilización con nanopartículas sin recubrir es de 24,85 mg/g de soporte de magnetita. Debemos resaltar que la inmovilización se llevó a cabo sobre un soporte de magnetita que posee características hidrófilas y la enzima no puede ser adsorbida por el soporte por interacción hidrofóbica [41]. Además, debido a que el medio de reacción presenta baja fuerza iónica y pH neutro, la interacción enzima-soporte es de naturaleza iónica. En la **Figura 35** se muestra un modelo de la estructura de la superficie de la enzima con los aminoácidos que

se encuentran cargados negativamente; estos aminoácidos se ionizan dependiendo de las condiciones de pH.

Figura 35. Estructura superficial de la CALB, en rojo los ácidos aspárticos y glutámicos que se encuentran en la superficie



Fuente: Protein Data Bank (PDB-1TCA); The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.

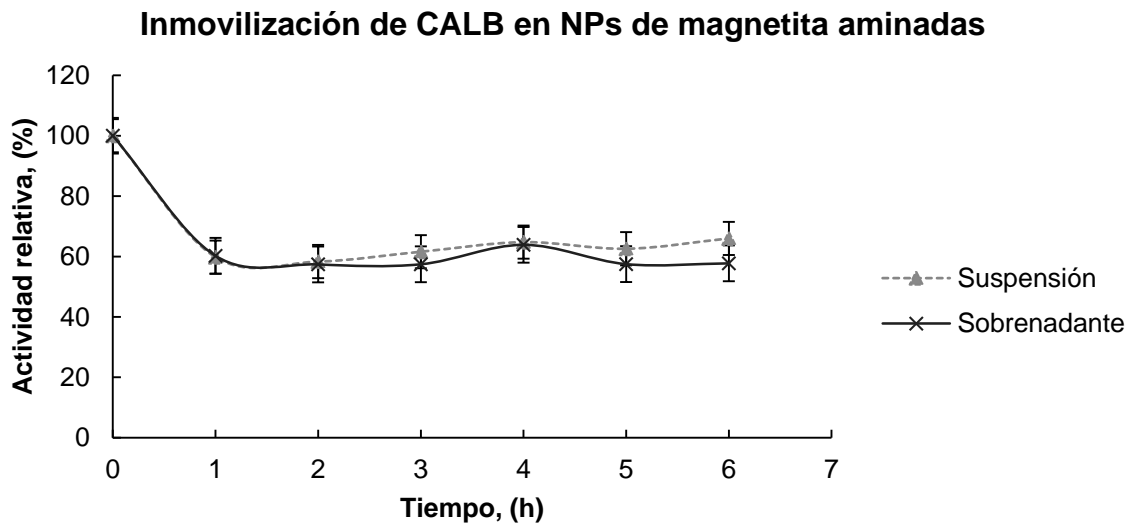
La enzima de CALB se puede encontrar con cargas negativas en la superficie a pH 7, debido a los residuos (15) de ácido aspártico (pKa 3.9) y ácido glutámico (pKa 4.1) que pierden su protón a pH neutro. Estas cargas negativas en la superficie de la enzima se encuentran interaccionando con las nanopartículas que están cargadas positivamente [42].

El intercambio iónico produce una pérdida de actividad alrededor del 35%. Por lo tanto, la inmovilización a baja fuerza iónica parece proceder primero a través de un intercambio iónico de la proteína con la superficie de las nanopartículas, seguido por una posible unión covalente entre la enzima y el soporte [43].

5.5.3.2 Inmovilización de CALB en nanopartículas magnéticas activadas con grupos amino.

El segundo soporte empleado para inmovilizar la CALB a pH 7 y temperatura ambiente fue la magnetita activada con grupos amino; la cinética de inmovilización con este soporte se muestra en la **Figura 36**. En esta figura se observa que durante la primera hora de inmovilización el sobrenadante perdió aproximadamente el 40% de su actividad, y esta actividad es adquirida luego por el mismo soporte. La actividad del sobrenadante se mantuvo constante durante las siguientes cinco horas, esto indicó que la proteína se pegó rápidamente durante la primera hora a las nanopartículas.

Figura 36. Cinética de inmovilización de CALB en soportes activados con grupos aminos



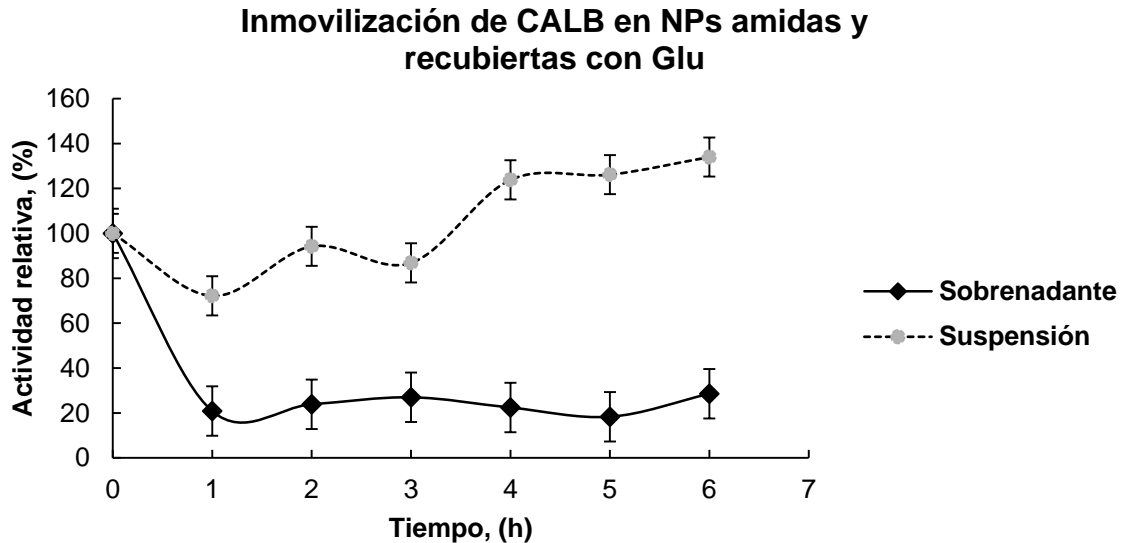
Fuente: Autor.

La proteína pegada sobre las NPs recubiertas con grupos aminos durante el proceso de inmovilización fue de 27,75 mg/g de soporte; aquí debemos resaltar que la inmovilización se llevó a cabo sobre un soporte de magnetita aminada que posee características menos hidrófilas que la magnetita sin recubrir, evitando que la enzima pueda ser adsorbida en el soporte por interacción hidrofóbica [41]. Además, el medio de reacción presentó baja fuerza iónica y pH neutro al igual que la primera inmovilización, por lo tanto, también se estimula la interacción iónica enzima-soporte. Esta interacción se realiza por los aminoácidos que se encuentran cargados negativamente (**Figura 35**) y los grupos amino que se encuentran cargados positivamente en la superficie de las NPs. Se observó también que a las seis (6) horas de inmovilización la enzima puede comenzar un proceso de estabilización covalente debido al pequeño aumento de actividad que presentó la suspensión [43]. Se obtuvo que el proceso de inmovilización con grupos amino en la superficie de las NPs es más eficiente, debido a que el grupo amino se encuentra libre y móvil en la superficie de las nanopartículas, llegando a espacios poco profundos cargados negativamente que se encuentra en la superficie de la enzima.

5.5.3.3 Inmovilización de CALB en NPs magnéticas recubiertas con grupos amino y activadas con Glu.

El tercer soporte empleado para inmovilizar la CALB a temperatura ambiente y pH 7 fue magnetita recubierta con grupos amino (APTS) y activada con glutaraldehído (Glu). La cinética de inmovilización se muestra en la **Figura 37**. En esta cinética se observó que durante la primera hora de inmovilización el sobrenadante pierde aproximadamente el 80% de su actividad, lo cual indica que la enzima se adsorbe en el soporte de magnetita casi en su totalidad bajo las condiciones de inmovilización empleadas. La actividad del sobrenadante se mantuvo constante durante las siguientes cinco horas, esto nos indicó que la proteína se pegó rápidamente durante la primera hora a las nanopartículas y debido al glutaraldehído presente en la superficie de estas, la enzima logra estabilizarse, consiguiendo aumentar su actividad hasta en un 130% comparada con la actividad inicial.

Figura 37. Cinética de inmovilización de CALB en magnetita recubierta con grupos amino y activada con glutaraldehído



Fuente: Autor.

Este soporte puede ser considerado como soporte heterofuncional que contiene grupos -OH, -NH₂ y glutaraldehído en su superficie. Por lo tanto, la inmovilización a baja fuerza iónica parece proceder primero a través de un intercambio iónico de la proteína en los grupos amino del soporte, seguido por la unión covalente entre la enzima adsorbida y el glutaraldehído. Sin embargo, la estabilización de la enzima fue mejorando con el tiempo y ese incremento se le atribuye al glutaraldehído. El glutaraldehído reacciona fácilmente con los nucleófilos de la enzima después del intercambio iónico, generando resultados prometedores en la inmovilización de enzimas [43]. También, esta mejora en la actividad puede ocurrir por una activación interfacial de la lipasa en la capa bastante hidrófoba de las moléculas de glutaraldehído y esta se presenta después del intercambio iónico con el soporte [44].

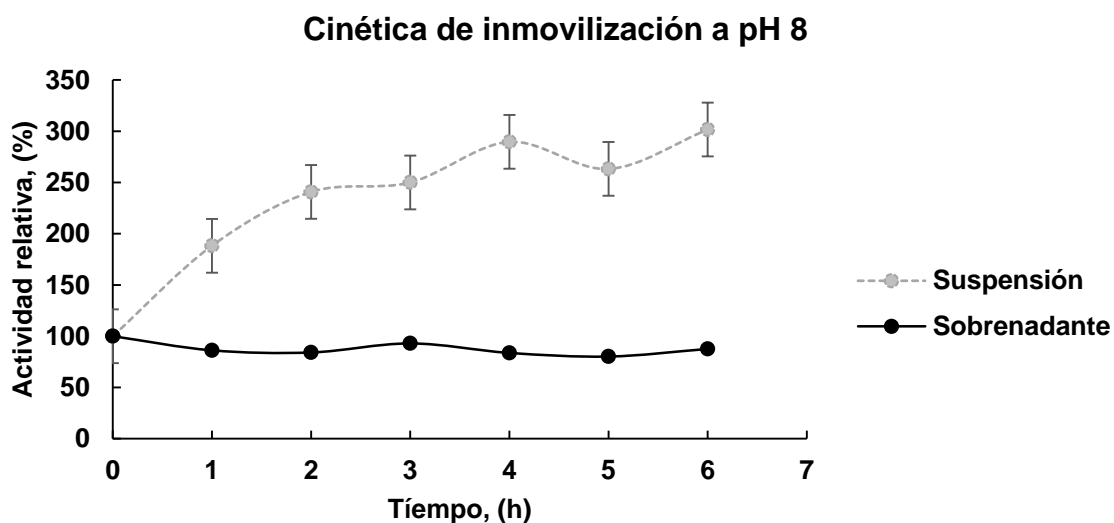
La proteína pegada en la cinética de inmovilización fue de 47,10 mg/g de soporte; debemos resaltar que la inmovilización se llevó a cabo sobre un soporte de

magnetita que posee características hidrófilas y la enzima no puede ser adsorbida por el soporte por este tipo de interacción [41]. Además, debido a que el medio de reacción presenta baja fuerza iónica y pH neutro, se favorece la interacción iónica enzima-soporte.

5.5.4 Efecto del pH en el proceso de inmovilización

En este estudio se evaluó el efecto del pH en la inmovilización de CALB a 25°C (**Figura 38 y 39**); el soporte empleado fue magnetita recubierta con APTS y activada con Glu.

Figura 38. Inmovilización de CALB en Nanopartículas de magnetita activadas con glutaraldehído

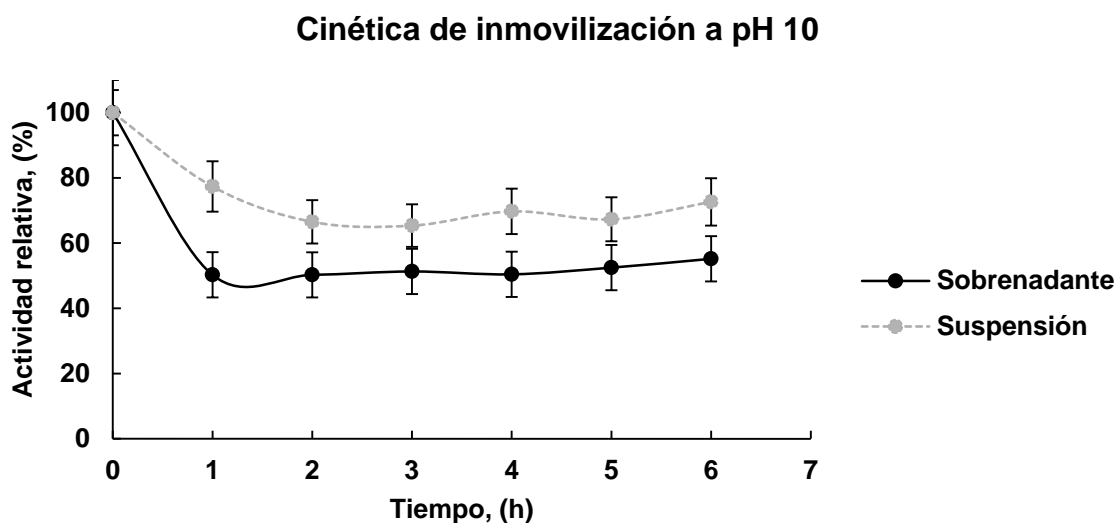


Fuente: Autor.

Aquí se muestran los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de la CALB a dos valores diferentes de pH, 8 y 10, respectivamente. Se observó que a

valores de pH 8 se obtiene un resultado similar al obtenido a pH 7 (**Figura 37**), alcanzando aproximadamente la misma actividad enzimática.

Figura 39. Inmovilización de CALB en Nanopartículas de magnetita activadas con glutaraldehído



Fuente: Autor.

Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de inmovilización sobre soportes de magnetita recubiertos con grupos amino y activados con glutaraldehído es dependiente del pH en el cual se encuentre. La baja reactividad del glutaraldehído a pH 10 favorece el proceso de inmovilización por interacciones iónicas parecido a la interacción entre la enzima y las nanopartículas de magnetita sin recubrir. Se estableció que a pH 10 el soporte con glutaraldehído pierde su reactividad y la cinética de inmovilización es similar a la mostrada en la **Figura 34**.

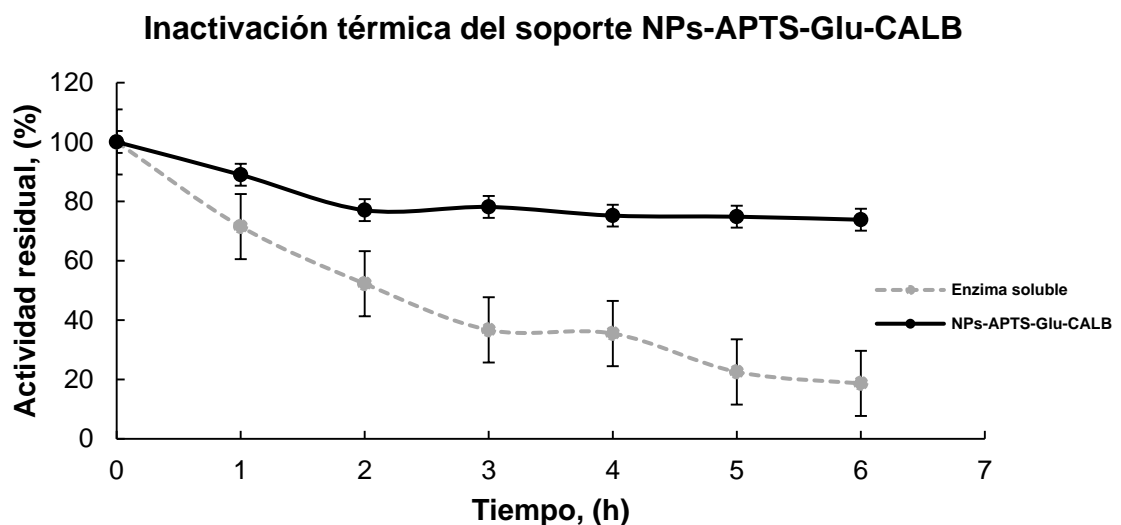
Cuando la inmovilización se lleva a pH 10, ocasiona que los residuos de lisina presentes en la superficie de la enzima se encuentren desprotonados y puedan atacar como nucleófilos al aldehído presente en la superficie de las nanopartículas,

favoreciendo una inmovilización covalente, pero debido a la inactivación del glutaraldehído este proceso de inmovilización se hace menos eficiente [4].

5.5.5 Estabilidad térmica del soporte activado con glutaraldehído

La determinación de la tasa de inmovilización, el rendimiento y la actividad expresada no es suficiente para seleccionar un protocolo óptimo de inmovilización. La estabilidad de las preparaciones finales es otra variable crítica para ser considerado. En la **Figura 40** se muestra la estabilidad del soporte a 50°C y pH 7.

Figura 40. Estabilidad térmica de la CALB inmovilizada en NPS recubierta con Glu



Fuente: Autor.

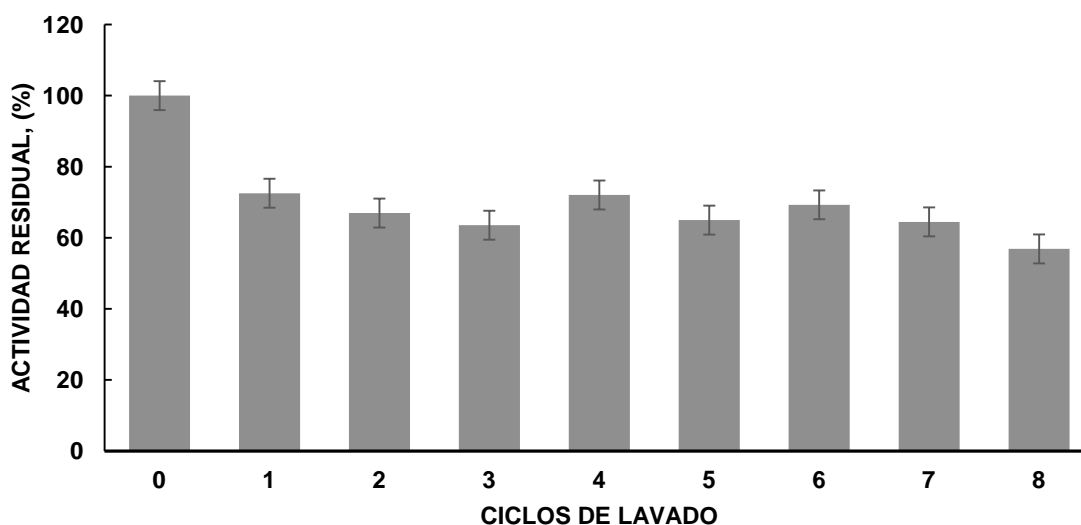
En el caso de la CALB inmovilizada en NPs activadas con glutaraldehído, dio lugar a un soporte que estabiliza significativamente a la enzima en comparación con la enzima soluble. Se mantuvo aproximadamente un 80% de la actividad inicial durante seis horas, en comparación con un soporte de agarosa cubierto con

glutaraldehído, el cual transcurridas 2 horas conserva una actividad del 60% y a las 6 horas del 50%, por lo tanto la actividad que mantiene el soporte de NPs-APTS-Glu-CALB es significativamente 5 veces más estable a las seis horas.

5.5.6 Reciclado del soporte de magnetita

Las nanopartículas fueron separadas del medio de reacción por un imán y luego fueron lavadas tres veces antes de medir su actividad residual (**Figura 41**).

Figura 41. Efecto de la reutilización de la enzima inmovilizada



Fuente: Autor.

En cada ciclo de lavado realizado se perdió una cantidad mínima de NPs. La actividad de la CALB inmovilizada se retuvo cerca del 70% de la actividad inicial y no muestra una disminución dramática de la actividad durante ocho ciclos de lavado. Esta excelente reutilización podría ser debido a la mejora de la resistencia a la

desnaturalización y cambios conformacionales causados por las condiciones del medio de reacción. Por lo tanto, se logró generar un biocatalizador con características reutilizables como resultado de una posible inmovilización covalente.

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron nanopartículas de magnetita empleando el método de co-precipitación a pH básico.
- Se evaluó el efecto de la agitación y temperatura sobre el tamaño de las nanopartículas, y se comprobó que el tamaño de estas nanoestructuras es controlado convenientemente en una región de 2 nm a 300 nm de diámetro cambiando la temperatura y la agitación durante la síntesis.
- La modificación de la superficie con APTS se comprobó con los análisis de IRFT-ATR, demostrándose que fue posible aminorar las nanopartículas y el mejor resultado obtenido fue con diclorometano a 40 °C.
- La modificación de la superficie de las nanopartículas magnéticas se llevó a cabo con APTS y Glu. Este soporte fue adecuado para la inmovilización de CALB por interacciones iónicas con el soporte aminado y sin aminorar. A su vez, se pudo inmovilizar la enzima mediante enlace covalente sobre las nanopartículas magnéticas activadas con glutaraldehído.
- En la superficie de las nanopartículas magnéticas se inmovilizaron 24,85 mg de proteína/g de NPs sin aminorar, mientras que en la superficie de las nanopartículas aminadas se inmovilizaron 27,75 mg de proteína/g de soporte. En las nanopartículas aminadas y activadas con glutaraldehído se inmovilizaron 47,10 mg de proteína/g de soporte.

- La enzima inmovilizada en soportes recubiertos con APTS y Glu conservó su actividad, en un rango más amplio de pH y temperatura, comparando con la enzima en su forma nativa.
- Las enzimas después de la inmovilización en superficies activadas con glutaraldehído mantienen su actividad y estabilidad a 50 °C, siendo más estables que la enzima soluble. Finalmente, el nanobiocatalizador puede ser reciclado, lo cual se verificó mediante la medición de su actividad durante ocho ciclos de lavado.

7. RECOMENDACIONES

Determinar la relación del tamaño de partícula con la concentración de hierro y determinar su tamaño por microscopía de transmisión electrónica.

Emplear el biocatalizador en un proceso industrial de hidrólisis, como una suspensión de leche, zumo, alguna síntesis de polímeros o similar.

Llevar a cabo estudios de inmovilización covalente con otras lipasas microbianas de diferentes fuentes de microorganismos.

Usar otros grupos de activación diferentes al glutaraldehído, tales como epóxidos, cianógenos, tioles, ésteres, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Ariza Villamil, *Desarrollo de nuevos soportes epóxido multifuncionales para la inmovilización de Candida antarctica B. Resolución cinética de (+/-) propranolol*. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander 2009, p. 121.
- [2] C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, and R. C. Rodrigues, "Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance," *Advanced Synthesis & Catalysis*, vol. 353, no. 16, pp. 2885–2904, Nov. 2011.
- [3] G. T. Hermanson, "Microparticles and Nanoparticles," in *Bioconjugate Techniques*, Second., New York: Academic Press, 2008, pp. 582–626.
- [4] O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, and R. Fernandez-Lafuente, "Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*," *Process Biochemistry*, vol. 47, no. 8, pp. 1220–1227, Aug. 2012.
- [5] J. E. Gallo Gualdrón, *Desarrollo de un método colorimétrico para determinar la hidrólisis enantioselectiva del mandelato de metilo utilizando derivados de lipasa de lipasa de Candida rugosa (CRL)*. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander, 2012, pp. 1–135.
- [6] P. A. Johnson, H. J. Park, and A. J. Driscoll, "Enzyme Stabilization and Immobilization," vol. 679, no. 1, pp. 183–191, 2011.
- [7] A. K. Johnson, A. M. Zawadzka, L. a. Deobald, R. L. Crawford, and A. J. Paszczyński, "Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 10, no. 6, pp. 1009–1025, Dec. 2007.
- [8] M. Gupta, "Enzyme function in organic solvents," in *EJB Reviews*, Springer Berlin Heidelberg, 1993, pp. 17–24.
- [9] M. Cao, Z. Li, J. Wang, W. Ge, T. Yue, R. Li, V. L. Colvin, and W. W. Yu, "Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis," *Trends in Food Science & Technology*, May 2012.
- [10] J. Hong, D. Xu, P. Gong, H. Ma, L. Dong, and S. Yao, "Conjugation of enzyme on superparamagnetic nanogels covered with carboxyl groups.," *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, vol. 850, no. 1–2, pp. 499–506, May 2007.

- [11] D. T. Mitchell, S. B. Lee, L. Trofin, N. Li, T. K. Nevanen, H. Söderlund, and C. R. Martin, "Smart nanotubes for bioseparations and biocatalysis.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 124, no. 40, pp. 11864–5, Oct. 2002.
- [12] S. A. Ansari and Q. Husain, "Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review.," *Biotechnology advances*, vol. 30, no. 3, pp. 512–23, 2012.
- [13] Y.-C. Cao, X.-F. Hua, X.-X. Zhu, Z. Wang, Z.-L. Huang, Y.-D. Zhao, H. Chen, and M.-X. Liu, "Preparation of Au coated polystyrene beads and their application in an immunoassay.," *Journal of immunological methods*, vol. 317, no. 1–2, pp. 163–70, Dec. 2006.
- [14] H. Jia, G. Zhu, and P. Wang, "Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility.," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 84, no. 4, pp. 406–14, Nov. 2003.
- [15] A. B. Moghaddam, T. Nazari, J. Badraghi, and M. Kazemzad, "Synthesis of ZnO Nanoparticles and Electrodeposition of Polypyrrole / ZnO Nanocomposite Film," vol. 4, pp. 247–257, 2009.
- [16] M. Ali and M. Winterer, "ZnO Nanocrystals: Surprisingly 'Alive'," *Chemistry of Materials*, vol. 22, no. 1, pp. 85–91, Jan. 2010.
- [17] K.-E. Jaeger and T. Eggert, "Lipases for biotechnology.," *Current opinion in biotechnology*, vol. 13, no. 4, pp. 390–7, Aug. 2002.
- [18] J. Vakhlu and A. Kour, "Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning," *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 1, pp. 69–85, Jan. 2006.
- [19] M. Palomo, G. Ferna, C. Mateo, and M. Fuentes, "Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (±) - α -hydroxy-phenylacetic acid derivatives," vol. 13, pp. 1337–1345, 2002.
- [20] L. O. Barbosa Jaimes, "Resolución cinética de (r/s)-propanolol y (r/s)-atenolol vía reacciones de acetilación mediante la utilización de lipasas inmovilizadas," Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander 2009, p. 120.
- [21] E. Wehtje and P. Adlercreutz, "Enantioselectivity of lipases : effects of water activity," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 1177, no. 97, pp. 3–9, 1997.

- [22] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente, "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, no. 6, pp. 1451–1463, May 2007.
- [23] C. P. J. POOLE and F. J. OWENS, *Introducción a la nanotecnología*. Barcelona, 2007, p. 14.
- [24] J. G. Castaño and C. Arroyave, "La funcionalidad de los óxidos de hierro," *Revista de Metalurgia*, vol. 34, no. 3, pp. 274–280, 1998.
- [25] P. K. Avti, S. C. Patel, and B. Sitharaman, "Nanobiomaterials: current Status and Future Prospects," in *Nanobiomaterials Handbook*, B. SITHARAMAN, Ed. CRC Press, 2011, pp. 1–24.
- [26] J. H. Wu, S. P. Ko, H. L. Liu, M.-H. Jung, J. H. Lee, J.-S. Ju, and Y. K. Kim, "Sub 5nm Fe₃O₄ nanocrystals via coprecipitation method," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 313–314, pp. 268–272, Feb. 2008.
- [27] D. J. Paredes Guerrero, *Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre Escherichia coli Y Staphylococcus aureus*. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. 2011, pp. 1–99.
- [28] K. J. Dussán Medina, *Inmovilización de enzimas nanoestructuradas magnéticas para aplicaciones industriales*. Manizales: Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, 2008, p. 124.
- [29] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.," *Analytical biochemistry*, vol. 72, pp. 248–54, May 1976.
- [30] G. J. Magaly, "Modulación de las propiedades biocatalíticas de lipasas microbianas mediante la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs)," 2012.
- [31] J.-P. Jolivet, C. Chanéac, and E. Tronc, "Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks.," *Chemical communications (Cambridge, England)*, no. 5, pp. 481–7, Mar. 2004.
- [32] C. Science and C. Stability, "Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes," vol. 2. pp. 1–6.

- [33] Y. Il Kim, H. Kang, D. Kim, and C. S. Lee, "Nanoparticle Ferrite Multilayers Prepared by New Self-Assembling Sequential Adsorption Method," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 24, no. 5, pp. 593–599, 2003.
- [34] C. a. Schlecht and J. a. Maurer, "Functionalization of glass substrates: mechanistic insights into the surface reaction of trialkoxysilanes," *RSC Advances*, vol. 1, no. 8, p. 1446, 2011.
- [35] B. Arkles, "Techniques for Silylation." CHEMTECH, pp. 56–61, 1977.
- [36] V. Sunkara and Y.-K. Cho, "Investigation on the mechanism of aminosilane-mediated bonding of thermoplastics and poly(dimethylsiloxane).," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 4, no. 12, pp. 6537–44, Dec. 2012.
- [37] N. Aissaoui, L. Bergaoui, J. Landoulsi, J.-F. Lambert, and S. Boujday, "Silane layers on silicon surfaces: mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption.," *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 28, no. 1, pp. 656–65, Jan. 2012.
- [38] F. A. Carey, "ALDEHÍDOS Y CETONAS: ADICIÓN NUCLEOFÍLICA AL GRUPO CARBONILO," in *Química organica*, Sexta edic., Mexico: McGraw-Hill Interamericana, 2006, pp. 712–750.
- [39] B. P. M. Hardy, A. C. Nicholls, and H. N. Rydon, "The Nature of Glutarafdehyde in Aqueous Solution," *J. Chem. Soc. D*, vol. 0, no. 111, pp. 565–566, 1969.
- [40] M. Marciello, M. Filice, J. M. Palomo, G. Editor, N. Turner, G. Tasnádi, C. K. Winkler, D. Clay, M. Hall, and K. Faber, "Different strategies to enhance the activity of lipase catalysts," *Catalysis Science & Technology*, vol. 2, no. 8, p. 1531, 2012.
- [41] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente, "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, no. 6, pp. 1451–1463, May 2007.
- [42] S.-J. Bae, J.-A. Park, J.-J. Lee, G.-H. Lee, T.-J. Kim, D.-S. Yoo, and Y. Chang, "Ultrasmlal iron oxide nanoparticles: Synthesis, physicochemical, and magnetic properties," *Current Applied Physics*, vol. 9, no. 1, pp. S19–S21, Jan. 2009.
- [43] L. Betancor, F. López-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. D.-O. C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, and J. M. Guisán, "Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support

activation and immobilization conditions,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, no. 4, pp. 877–882, Aug. 2006.

- [44] O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, and R. Fernandez-Lafuente, “Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*,” *Process Biochemistry*, vol. 47, no. 8, pp. 1220–1227, Aug. 2012.

Anexo A. Reportes de tamaño en la caracterización de las NPs

Size Distribution Report by Number v2.2



Sample Details

Sample Name: Magnetita 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes: 960 uL H2O + 20 uL PEG + 20 uL NPs

File Name: NPS solas.dts

Dispersant Name: Ethylene Glycol

Record Number: 4

Dispersant RI: 1,429

Material RI: 1,51

Viscosity (cP): 16,1118

Material Absorbtion: 0,000

Measurement Date and Time: martes, 16 de julio de 2013 0...

System

Temperature (°C): 25,0

Duration Used (s): 60

Count Rate (kcps): 270,3

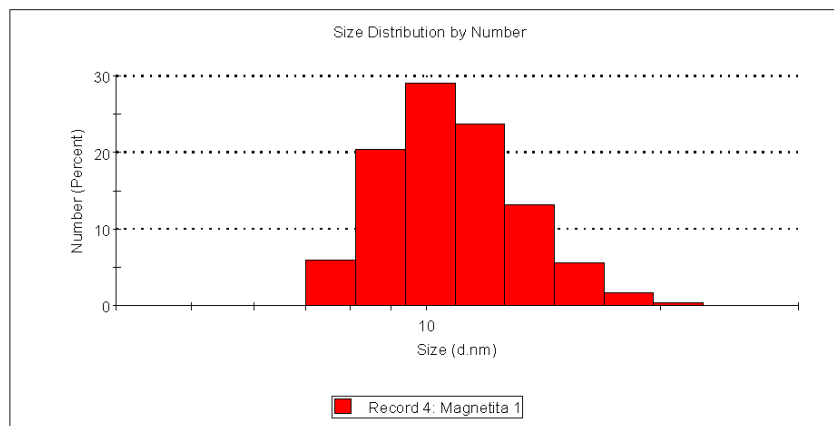
Measurement Position (mm): 4,65

Cell Description: Low volume disposable siz...

Attenuator: 9

Results

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.n...)
Z-Average (d.nm): 13,77	Peak 1: 11,00	100,0	2,364
Pdi: 0,194	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,941	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality: Good			



Size Distribution Report by Number

v2.2



Sample Details

Sample Name: NPs de magnetita 3
SOP Name: mansettings.nano
General Notes: 20 ul PEG + 20 ul NPs + 960 ul H2O

File Name: Magnetite 26 de junio.dts **Dispersant Name:** Ethylene Glycol
Record Number: 3 **Dispersant RI:** 1,429
Material RI: 1,51 **Viscosity (cP):** 16,118
Material Absorbtion: 0,000 **Measurement Date and Time:** jueves, 27 de junio de 2013 ...

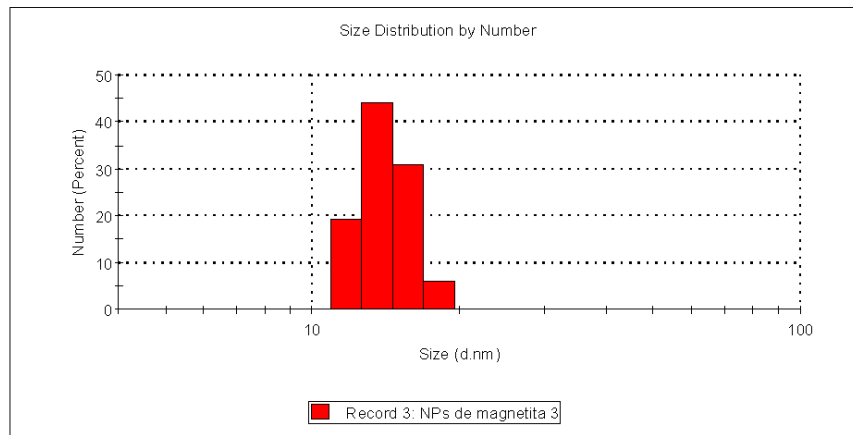
System

Temperature (°C): 25,0 **Duration Used (s):** 60
Count Rate (kcps): 399,0 **Measurement Position (mm):** 4,65
Cell Description: Low volume disposable siz... **Attenuator:** 10

Results

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 68,62	Peak 1: 68,51	0,1	12,22
Pdl: 0,370	Peak 2: 14,12	99,9	1,728
Intercept: 0,922	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality: **Good**



Anexo B. Reporte de Potencial Zeta

Zeta Potential Report

v2.3



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: NPs de magnetita 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes: 20 ul PEG + 20 ul NPs + 960 ul H2O

File Name: Magnetite 26 de junio.dts **Dispersant Name:** Ethylene Glycol
Record Number: 7 **Dispersant RI:** 1,429
Date and Time: jueves, 27 de junio de 2013 03:18... **Viscosity (cP):** 16,1118
Dispersant Dielectric Constant: 37,7

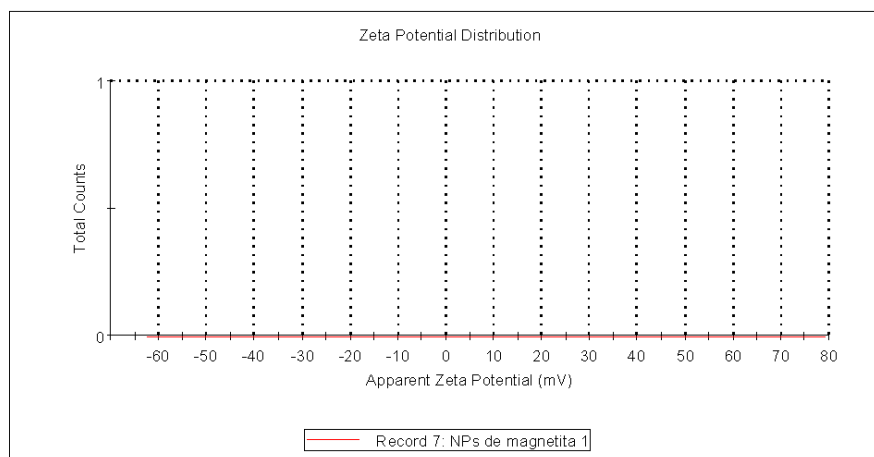
System

Temperature (°C): 25,0 **Zeta Runs:** 49
Count Rate (kcps): 188,0 **Measurement Position (mm):** 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta cell **Attenuator:** 7

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 711	Peak 1: 0,00	0,0	0,00
Zeta Deviation (mV): 140	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,141	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



Anexo C. Curva de calibración para la cuantificación de proteína

