



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

SÍNTESIS DE BIOMATERIALES MESOPOROSOS SBA-15 CON LIPASA CANDIDA RUGOSA
INMOVILIZADA

Tesis que presenta

Q. Julio Cesar Méndez Medina

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias Químicas

Asesora Dra. Dolores Silvia Solís Mendiola

Co-asesor Dr. Ulises Arellano Sánchez

Ciudad de México, enero de 2018



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00078

Matrícula: 2161801290

SINTESIS DE BIOMATERIALES
MESOPOROSOS SBA-15 CON
LIPASA CANDIDA RUGOSA
INMOVILIZADA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 8 del mes de enero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA ESTHELA RAMOS RAMIREZ
DR. JUAN MARCOS ESPARZA SCHULZ
DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

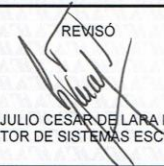
MAESTRO EN CIENCIAS (QUIMICA)
DE: JULIO CESAR MENDEZ MEDINA


y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.





REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTA

DRA ESTHELA RAMOS RAMIREZ

VOCAL

DR. JUAN MARCOS ESPARZA SCHULZ

SECRETARIA

DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana por haberme permitido pasar tan gratos momentos en sus aulas.

A los miembros de jurado integrado por:

Dra. Dolores Silvia Solís Mendiola

Dra. Esthela Ramos Ramírez

Dr. Juan Marcos Esparza Schulz

Al Dr. Ulises Arellano Sánchez, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de esta investigación.

A la Dra. Alberta Jaqueline Padilla Zúñiga por la valiosa ayuda en modelado molecular y ayuda en esta investigación.

Al M. en C. Víctor H. Lara por la ayuda técnica en rayos X.

A Patricia Castillo por la ayuda en microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.

A Dios por todo lo que me ha dado, A mis padres Rosalba Medina y Juan Méndez porque ustedes son el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, transmitiendo las bases de responsabilidad y deseos de superación, agradezco sus consejos, su apoyo, paciencia y amor, porque son lo mejor que Dios me ha dado.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

ÍNDICE

1. Resumen.....	7
2. Introducción	7
3. Antecedentes	8
3.1 Materiales porosos.....	8
3.2 MCM-41.....	9
3.3 SBA.....	11
3.4 Control del entorno local y la morfología	12
3.4.1 Preparación de materiales estrategias y propiedades	12
3.5 Inmovilización de enzimas.....	13
3.6 Lipasas	13
3.6.1 Masa molecular y punto isoeléctrico	14
3.6.2 Plegamiento y aminoácidos catalíticos	15
3.6.3 Centro activo	15
3.7 Lipasa Candida rugosa.....	16
3.7.1 Cubierta lipasa Candida rugosa	19
3.7.2 Sitio activo y túnel para el alojamiento de ácidos grasos	20
3.7.3 Puntos de glicosilación y su importancia	21
3.8 Inmovilización de enzimas.....	21
3.8.1 Clases de inmovilización.....	22
3.8.2 Efectos en la actividad enzimática	27
3.8.3 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas.....	28
4. Hipótesis.....	30
5. Objetivos.....	30
5.1. Objetivo general	30
5.2. Objetivos específicos.....	30
6. Materiales y metodología	31
6.1 Síntesis de los materiales	31
6.1.1 Síntesis de SBA-15	31
6.1.2 Síntesis de Ca/SBA-15.....	31
6.2 Adsorción de lipasa Candida rugosa al soporte Ca/SBA-15	31

6.3 Técnicas de caracterización.....	32
6.3.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR, Fourier)	32
6.3.2 Difracción de rayos X (DRX).....	33
6.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	35
6.3.4 Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	36
6.3.5 Espectroscopía de energía dispersiva (EDS).....	36
6.3.6 Fisorción de nitrógeno	37
6.3.7 Desorción de NH ₃ a temperatura programada (TPD-NH ₃)	39
6.4 Equipos utilizados.....	40
7. Discusión de resultados.....	44
7.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR, Fourier)	44
7.2 Difracción de rayos X (DRX).....	45
7.3 Microscopía electrónica	47
7.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	47
7.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	49
7.4 Fisorción de nitrógeno	51
7.5 Desorción de NH ₃ a temperatura programada (TPD- NH ₃)	53
7.6 Mapeo por microscopía electrónica para 0.5Ca/SBA-15	55
7.7 Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para 0.5Ca/SBA-15.....	55
7.8 Mapeo por microscopía electrónica para 1Ca/SBA-15	56
7.9 Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para 1Ca/SBA-15.....	56
7.10 Mapeo por microscopía electrónica para 3Ca/SBA-15	57
7.11 Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para 3Ca/SBA-15.....	57
8. Discusión de resultados de materiales SBA-15 dopados e inmovilizando lipasa Candida rugosa	58
8.1 Cinética de adsorción	58
8.2 Microscopía electrónica de transmisión con filtro de energía (EFTEM)	62
9. Conclusiones y perspectivas.....	63
10. Bibliografía.....	64
11. Anexos	66
11.1 Trabajos presentados en congresos nacionales.....	66

1. Resumen

En el presente trabajo de investigación, se preparó el material mesoporoso tipo SBA-15, posteriormente se dopó con Ca a diferentes porcentajes (0.5%, 1% y 3%), para lo cual se empleó el método de síntesis propuesta por U. Arrellano, col.¹. Los materiales obtenidos fueron caracterizados por difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojo, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, fisorción de nitrógeno (BET) y temperatura programada de desorción (TPD). La inmovilización de lipasa *Candida rugosa* se realizó mediante el proceso de adsorción en los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15, dicha inmovilización se siguió su cinética y se observó la enzima inmovilizada en la superficie de los materiales mediante la técnica de EFTEM observándose una densidad color verde que indican la presencia del N que compone a la lipasa *Candida rugosa* debido a que los materiales están formados por Si, O, Ca y un poco de C.

2. Introducción

Recientemente ha habido un considerable interés en el desarrollo de métodos para producir biomateriales en los que las enzimas están encapsuladas o inmovilizadas en soportes sólidos a través de su bioafinidad con el sólido. El desarrollo de biocatalizadores inmovilizados depende de la relación entre el material y la biomolécula, que debe mantener su actividad enzimática después de la inmovilización. La sílice se ensambla en muchas formas geométricas, lo que permite matrices para ser producidas con características estructurales, como diámetro de poro, área de superficie específica, tamaño de partícula y volumen de poro.²

La inmovilización de lipasas sobre soportes artificiales se remonta hacia los años 50's. Se han utilizado técnicas de inclusión de enzimas en matrices poliméricas, conexión por enlaces sobre materiales de soporte y la adsorción sobre materiales inertes. Muchos métodos han sido usados para inmovilizar lipasas, incluyendo la adsorción o la precipitación sobre materiales hidrofóbicos, enlace covalente con grupos funcionales, atrapamiento en geles de polímeros, adsorción en resinas de intercambio iónico, microencapsulación, y atrapamiento en sol-gel.

Las lipasas se utilizan en diversos campos que van desde la industria de detergentes, la de alimentos, la farmacéutica, la cosmética, la oleoquímica, la industria del papel, la síntesis orgánica, pesticidas, fungicidas y aplicaciones biomédicas, hasta la industria energética; participando en esta última en la producción de biodiesel por transesterificación para contrarrestar el hecho del agotamiento del petróleo a nivel mundial. Las lipasas pueden ser obtenidas comercialmente de diferentes microorganismos tales como levaduras, mohos y de bacterias; se pueden utilizar tanto libres como inmovilizadas.

3. Antecedentes

3.1 Materiales porosos

Los materiales porosos se han estudiado intensamente con respecto a aplicaciones técnicas como catalizadores y soportes de catalizadores. De acuerdo con la definición de IUPAC, los materiales porosos se dividen en tres clases; microporoso (tamaño de poro < 2 nm), mesoporoso (2-50 nm) y macroporoso (> 50 nm)³. Además, también se usa cada vez más el término "nanoporoso". Sin embargo, no está claramente definido y vagamente se refiere a los poros en el rango de tamaño del nanómetro. Muchos tipos de materiales porosos tales como arcillas (pílangos), alúmina anódica, nanotubos de carbono y carbonos porosos relacionados, etc., han sido ampliamente descritos en la literatura. Entre la familia de materiales microporosos, los miembros más conocidos son zeolitas que tienen una distribución de tamaño de microporos estrecha y uniforme debido a su sistema de poro definido cristalográficamente.⁴

En los últimos años, las consideraciones ambientales y económicas han despertado gran interés en el rediseño de procesos comercialmente importantes para evitar el uso de sustancias nocivas y la generación de desechos tóxicos. A este respecto, no hay duda de que la catálisis heterogénea puede desempeñar un papel clave en el desarrollo de procesos ambientalmente benignos en la química del petróleo y en la producción de productos químicos, por ejemplo, mediante la sustitución de catalizadores ácidos líquidos por materiales sólidos. Especialmente las zeolitas han atraído una gran atención como tales ácidos, pero también como catalizadores base y redox. Sin embargo, las zeolitas presentan severas limitaciones cuando se trata de moléculas reactantes grandes, especialmente en sistemas de fase líquida, como suele ser el caso en la síntesis de sustancias químicas finas, debido al hecho de que las limitaciones de transferencia de masa son muy severas para los sólidos microporosos. Los intentos de mejorar la difusión de los reactivos a los sitios catalíticos se han centrado hasta ahora en aumentar los tamaños de poros de zeolita (figura1), al disminuir el tamaño del cristal de zeolita⁵, o al proporcionar un sistema de mesoporos adicional dentro de los cristales microporosos.^{6,7} Una importante línea de investigación se ha centrado en la ampliación de los tamaños de poro en el rango mesoporo, permitiendo que las moléculas más grandes entren en el sistema de poros, que se procesen allí y que vuelvan a salir del sistema de poros.

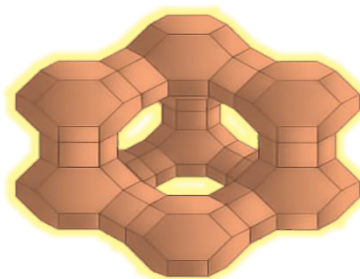


Figura 1. Representación de zeolita.

La primera síntesis de un material mesoporoso ordenado se describió en la literatura de patentes en 1969. Sin embargo, debido a la falta de análisis, las notables características de este producto no fueron reconocidas.⁸ En 1992, un material similar fue obtenido por un científico en Mobil Oil Corporation que descubrió las notables características de este nuevo tipo de sílice y abrió todo un campo de investigación.⁹

Aproximadamente al mismo tiempo, Yanagisawa et al describieron un enfoque alternativo, pero menos versátil para los materiales mesoporosos.¹⁰ Un silicato estratificado, sirve como una fuente de sílice, se cree que la vía que conduce al material mesoporoso ordenado se produce mediante la intercalación de tensioactivo en las láminas de silicato, el alabeo de las láminas y la transformación al material empaquetado hexagonalmente. La modificación y optimización de las condiciones de reacción produjeron silicatos mesoporosos altamente ordenados y aluminosilicatos también.¹¹ Los materiales obtenidos se designan como FSM-n, hoja plegada mesoporoso Materiales- n, aquí n es el número de átomos de carbono en el agente tensioactivo utilizado para sintetizar el material. Desde estos primeros descubrimientos, se ha invertido un gran esfuerzo de investigación en la síntesis y caracterización de una variedad de materiales diferentes, aunque relacionados. Se han publicado muchas revisiones que cubren diversos aspectos de los materiales mesoporosos ordenados, tales como su síntesis, modificación de la superficie, aplicación como materiales de acogida y en catálisis.

3.2 MCM-41

Las características del MCM-41 (Mobil Composition of Matter- 41) así como los demás miembros de la familia M41S que fueron sintetizados por primera vez en 1992. Pueden clasificarse como materiales ordenados o semicristalinos, intermedio en la clasificación de cristalinidad existente entre los geles porosos y los silicatos laminares.¹² Particularmente el MCM-41, posee canales unidimensionales en forma de panal de abeja y una composición química modificable (figura 2), mediante la adición de cationes metálicos o variaciones en las condiciones de síntesis. Una de las características más importante del MCM-41 es el tamaño de sus poros, los cuales pueden variarse, modificando el surfactante que se utilice en su síntesis. En general los MCM-41, pueden usarse para la adsorción de moléculas orgánicas grandes, en separaciones cromatográficas, como anfitrión para confinar moléculas huésped y arreglos atómicos, así como también en catálisis de selectividad de forma. Son variadas las técnicas de obtención del MCM-41, ya que su morfología, propiedades y uso son función de las condiciones experimentales de preparación.¹³

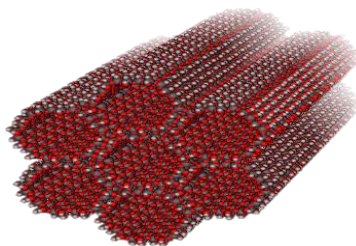


Figura 2. Representación de MCM-41.

La síntesis de MCM-41 (Mobil Composition of Matter) descrita por Kresge y col.¹⁴ y Beck y col.¹⁵ implica el uso de geles de aluminosilicatos en presencia del surfactante cloruro de hexadeciltrimetilamonio ($C_{16}H_{33}(CH_3)_3N^+Cl^-$) (CTACl). El mecanismo por el cual se forman estas mesoestructuras ordenadas se designa como mecanismo del “liquid-crystal templating”. Aquí, el ion de amonio cuaternario, el cual actúa como agente director de la estructura, forma micelas que se agregan en un cristal líquido. El término “template” se asocia con el cristal líquido porque éste determina la mesoestructura del material sólido. Dependiendo de las condiciones de síntesis, tales como temperatura de síntesis y relación molar de surfactante/aluminosilicato, la fase cristal líquido puede tener una estructura hexagonal (MCM-41), cúbica (MCM-48) o laminar (MCM-50), como se representa en la Figura 3.

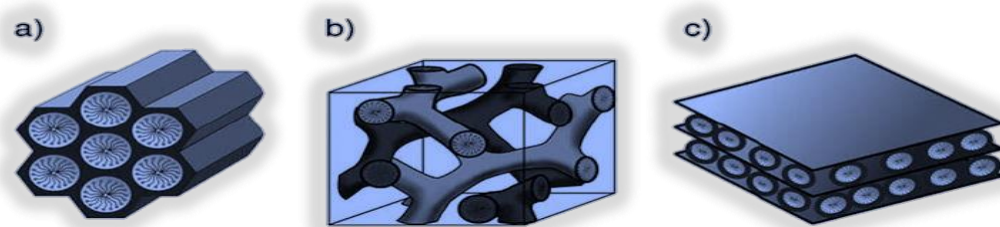


Figura 3. Representación esquemática de diferentes estructuras de la familia M41S a) hexagonal 2D (MCM-41 y SBA-15), b) cúbica (MCM-48) y c) laminar (MCM-50).

Por ejemplo, en el caso de la MCM-41, el “template” (cristal líquido) consiste en una formación hexagonal de micelas cilíndricas en las cuales las cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas se reúnen en el centro formando el corazón de la micela, mientras que los grupos polares se orientan hacia la superficie, en contacto con el medio acuoso. Tras la adición del precursor inorgánico, éste interacciona con la micela, creando paredes inorgánicas entre el ordenamiento hexagonal de las micelas cilíndricamente agregadas. Tras la calcinación, el surfactante se elimina fuera de los poros, dejando un material mesoporoso formado por cilindros huecos en un ordenamiento hexagonal (figura 4).



Figura 4. Proceso de formación de MCM-41.

3.3 SBA

El desarrollo de estos materiales por Zhao y col.¹⁶ en 1998 supuso un gran avance dentro de la familia de los sólidos mesoporosos ordenados. Estos autores, usando copolímeros de tres bloques no iónicos comerciales como surfactantes, lograron desarrollar materiales silícicos ordenados con mesoporos grandes, en el rango de 4.5-30 nm, y paredes más gruesas (3.0-7.0 nm).¹⁷ Estos nuevos sólidos mesoestructurados se designaron como materiales SBA, acrónimo de Santa Bárbara, la Universidad donde el grupo de Stucky los desarrolló por primera vez. Aunque ya Pinnavaia y col.¹⁸ usaron surfactantes oligoméricos de alquil-poli (óxido de etileno) para la síntesis de materiales con mayor grosor de pared, su modesto ordenamiento estructural hace que sean los estudios realizados por Zhao y col. las primeras contribuciones sobre esta nueva familia de materiales silícicos mesoestructurados altamente ordenados de poro grande, sintetizados usando copolímeros de tres bloques no iónicos (EO_nPO_mEO_n).

Dentro de esta familia, el material más ampliamente estudiado es la SBA-15 con estructura porosa hexagonal 2D (p6mm), siendo el material de poro grande equivalente a la MCM-41. Este material es sintetizado bajo condiciones fuertemente ácidas usando el copolímero comercial Pluronic P123 (figura 5) (EO₂₀PO₇₀EO₂₀) como agente director de la estructura. Otro material tipo SBA también de gran interés es la SBA-16, con estructura cúbica (Im3m).¹⁹ En este caso se sintetiza con el copolímero F127 (EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆). Otras, menos estudiadas, son la SBA-11 (cúbica, Pm3m) y SBA-12 (hexagonal 3D, P63mmc), sintetizados con los surfactantes Brij56 (C₁₆EO₁₀) y Brij76 (C₁₈EO₁₀) respectivamente.

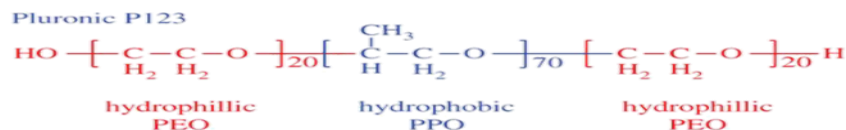


Figura 5. Pluronic 123.

De todos ellos, los copolímeros de tres bloques EO_nPO_mEO_n son considerados los surfactantes no iónicos más importantes para la formación de las mesoestructuras. Una ventaja importante de estos copolímeros frente a los surfactantes moleculares es la posibilidad de modificar el balance hidrofilia-hidrofobia (HLB, hydrophilic-lipophilic balance) modificando el grado de polimerización. Además, es posible modificar la química intrínseca de cada bloque, modulando las interacciones con las unidades inorgánicas que construyen la estructura. De esta manera, los copolímeros en bloque han conducido a una amplia variedad de nuevas mesoestructuras.

El diámetro mesoporoso de SBA-15 depende de las condiciones sintéticas: el aumento de la temperatura de envejecimiento del gel conduce a un diámetro de poro más grande. Una característica interesante de SBA-15 es la microporosidad que está presente en su pared mesoporo, por la cual los microporos conectan los mesoporos vecinos.²⁰

3.4 Control del entorno local y la morfología

Una de las características interesantes de los sólidos mesoporosos ordenados para la catálisis es la multitud de posibilidades para modificarlos. Las modificaciones se pueden usar para ajustar la funcionalidad de la superficie, para incorporar funciones catalíticas o para cambiar las propiedades de textura.

Recientemente, las estabildades térmicas, hidrotérmicas y mecánicas de varias sílices mesoporosas, por ejemplo, MCM-41, MCM-48, HMS, FSM-16, KIT-1, PCH (heteroestructura de arcilla porosa) y SBA-15, han sido estudiado por Galarneau et al.²¹, Cassiers et al.²² e Igarashi et al.²³. Se descubrió que la estabilidad térmica depende en gran medida del espesor de la pared de los materiales mesoporosos y del precursor de sílice utilizado en la síntesis. La estabilidad hidrotérmica también está influenciada por el espesor de la pared, pero el grado de polimerización de la sílice también tiene una influencia muy fuerte en la estabilidad hidrotérmal. La estabilidad mecánica, por otro lado, está poco influenciada por la naturaleza de los materiales mesoporosos y suele ser suficiente para la aplicación de sólidos mesoporosos ordenados en la mayoría de las aplicaciones catalíticas. Dado que la estabilidad hidrotérmal es esencial para la mayoría de las posibles aplicaciones de materiales mesoporosos en la catálisis, se desarrollaron varios enfoques para mejorar esta propiedad. Las estrategias que se han investigado incluyen la adición de sales durante la síntesis hidrotérmal, la modificación de la superficie mediante sililación o el injerto posterior a la síntesis de compuestos inorgánicos para aumentar el espesor de la pared o estabilizar químicamente la superficie de la pared.²⁴

3.4.1 Preparación de materiales estrategias y propiedades

Las sílices mesoporosas ordenadas no se usan a menudo como catalizadores como tales. Frecuentemente, se introducen funciones catalíticas adicionales, mediante la incorporación de sitios activos en las paredes de sílice o mediante la deposición de especies activas en la superficie interna del material. La ventaja de usar sólidos mesoporosos ordenados son los poros relativamente grandes que facilitan la transferencia de masa y el área superficial muy alta que permite una alta concentración de sitios activos por masa de material.

Los iones metálicos que sustituyen átomos de silicio en el marco, similares a las zeolitas, pueden actuar como sitios activos ácidos o redox y pueden usarse para diferentes clases de reacciones catalíticas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la estructura de la pared de la sílice mesoporosa ordenada se asemeja bastante a la sílice amorfa. La incorporación de otros centros metálicos, por lo tanto, no conduce a la formación de sitios definidos como en las zeolitas, sino a una amplia variedad de sitios diferentes con diferentes entornos locales. Por lo tanto, las propiedades catalíticas de dichos materiales son más cercanas a las de la sílice amorfa sustituida con metal que a las de zeolitas sustituidas con estructura. Posiblemente

más interesante es explotar el área superficial extremadamente alta de estos materiales en aplicaciones de soporte para partículas de metal o de óxido de metal o para depositar especies aisladas en la superficie de la pared. Curiosamente, estos sitios activos pueden construirse directamente o mediante procedimientos posteriores a la síntesis mediante una multitud de vías, lo que significa que las propiedades de estos sitios activos son variables y controlables, dependiendo del procedimiento sintético.

El número de combinaciones de diferentes modificaciones de materiales mesoporosos ordenados es alto, ya que muchas propiedades pueden cambiarse independientemente una de la otra. Se puede pensar en el recubrimiento superficial de materiales mesoporosos con especies orgánicas o inorgánicas, lo que cambia drásticamente el microambiente dentro de los mesoporos. Por otro lado, el sistema de poros con gran abertura permite la fijación de varios complejos regio y enantioselectivos; esto puede ser ventajoso en comparación con los soportes microporosos o macroporosos convencionales ya que el tamaño de los poros se puede adaptar exactamente a los requisitos de las especies ancladas. La estructura mesoporosa proporciona sitios activos altamente dispersos y espacialmente uniformes. Además, la composición del propio material de soporte mesoporoso podría cambiarse mediante la incorporación de diferentes componentes en la pared, que es otro parámetro ajustable de los materiales. Dado que la mayoría de estos factores podrían variar de forma independiente, se podrían crear diferentes materiales de forma casi combinatoria.

3.5 Inmovilización de enzimas

El procedimiento más simple para la inmovilización de especies moleculares es la impregnación o el intercambio iónico. Sin embargo, esto da como resultado una interacción bastante débil entre el soporte y el complejo metálico, lo que significa que el complejo activo se lixivia fácilmente. Aunque, en casos afortunados, la inmovilización es posible por simple impregnación, los complejos están mayoritariamente anclados covalentemente al soporte mesoporoso a través de la sililación de grupos silanol.²⁵

Lee et al²⁶ utilizan el método de adsorción para inmovilizar la lipasa pancreática de cerdo en las nanopartículas de magnetita y Salis et al²⁷ realizaron estudios sobre la influencia del sustrato sobre la carga enzimática y la actividad de la lipasa inmovilizada utilizando el SBA-15 y SBA-15 modificado, probando que la familia M41s son materiales porosos útiles para inmovilizar la lipasa *Candida rugosa*.

3.6 Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas abundantes distribuidas en la naturaleza, la poseen microorganismos hasta plantas y animales. La actividad más reconocida de las lipasas es la hidrólisis de triacilgliceroles (grasas y aceites) que produce ácidos grasos y glicerol. Además, estas enzimas catalizan reacciones in vitro, tales como esterificación, transesterificación e interesterificación en medios hidrofóbicos, son estables en solventes orgánicos, presentan amplia especificidad por sustrato y elevada regioselectividad o estereoselectividad en la catálisis.²⁸

Las lipasas, por sus diversas propiedades catalíticas, se usan en la elaboración de detergentes, en las industrias, farmacéutica, textil, cosmética, química, papelera, entre otras. En los últimos años, estas enzimas se emplean en la síntesis de biopolímeros y biodiesel, en la producción de medicamentos enantioselectivos, agroquímicos y aromatizantes.²⁹ Sin embargo, solo algunas lipasas microbianas son comercialmente explotadas, en consecuencia, se requiere el continuo estudio de lipasas nativas que presenten amplio rango de sustratos, elevada enantioselectividad y estabilidad.³⁰

3.6.1 Masa molecular y punto isoeléctrico

La mayoría de las lipasas presenta masas moleculares entre 27 y 60 kDa. Sin embargo, se conocen algunos ejemplos de lipasas con masas moleculares ubicadas fuera de este intervalo. Los puntos isoeléctricos que se han reportado para la mayor parte de las enzimas e isoenzimas de diversos orígenes se encuentran entre 3.8 y 7.3 ([tabla 1](#)).

Tabla 1. Masas moleculares y puntos isoeléctricos de lipasas procedentes de diversas fuentes.

Fuente	Masa molecular (kDa)	Punto isoeléctrico	Referencia
<i>Chromobacterium viscosum</i>	33	7.1	Taipa et al,1995
<i>Candida rugosa</i>	60	4.80-5.04 (isoenzimas)	Lotti y Alberghina,1996
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	32	7.3	Shuen-Fuh et al,1996
<i>Rhizomucor miehei</i>	31.6	3.8	Wu et al, 1996
Salvado de arroz	9.4	ND	Bhardwaj et al, 2001
<i>Acinetobacter</i> sp.	33	ND	Snellman et al, 2002
Escorpión (glándulas digestivas)	50	ND	Zouari et al,2005
Calamar <i>Todarodes pacificus</i> (hígado)	27	ND	Park et al,2008

ND: No determinado.

3.6.2 Plegamiento y aminoácidos catalíticos

Las lipasas presentan un dominio estructural canónico compuesto por ocho cadenas β que forman una hoja β . Estas cadenas están conectadas por hélices α , que quedan empaquetadas a ambos lados de la hoja β . Este núcleo central es el responsable directo de la actividad catalítica y define el plegamiento α/β -hidrolasa, común para muchas hidrolasas de orígenes filogenéticos y funciones catalíticas diferentes.

La actividad funcional de las lipasas se sustenta en la tríada de aminoácidos clásica: nucleófilo-ácido-histidina, dilucidada inicialmente para las proteasas serínicas. Los elementos de la tríada se ubican en lazos muy bien conservados del dominio catalítico. El nucleófilo, generalmente una serina, se localiza en un giro que conecta una cadena β con una hélice α en el contexto secuencial pequeño-x-nucleófilo-x-pequeño pequeño; donde x es cualquier aminoácido y pequeño se refiere a un aminoácido poco voluminoso. Solo la histidina está completamente conservada en la tríada de las lipasas, cuyo arreglo topológico y secuencial es la imagen especular de la tríada de las proteasas serínicas (figura 6).

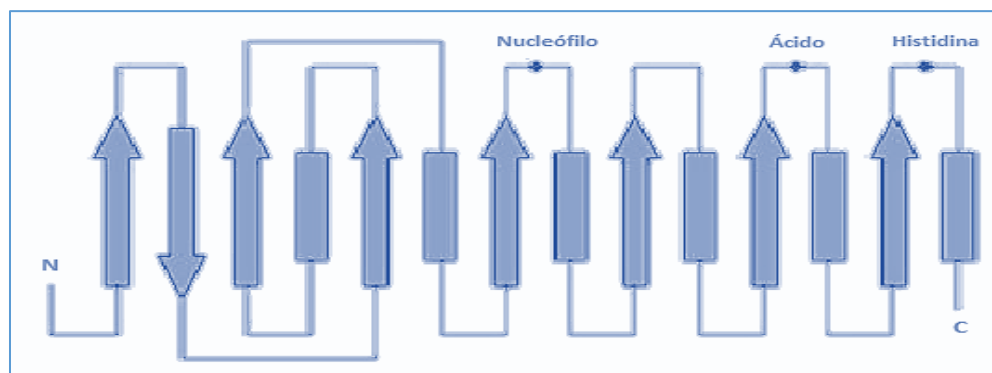


Figura 6. Diagrama esquemático del plegamiento α/β -hidrolasa, presente en las lipasas. Flechas: cadenas β . Rectángulos: hélices α . Conexiones: lazos. Puntos: residuos que componen la tríada catalítica (nucleófilo, ácido, histidina). N y C: extremos amino y carboxilo-terminal.

3.6.3 Centro activo

El centro activo de las lipasas permanece protegido por una cubierta que impide la entrada del sustrato. Este solo tiene acceso cuando la enzima se encuentra en su conformación activa y la cubierta se ha desplazado. Esta cubierta puede ser una hélice α anfifílica o un lazo. La estructura nativa de las lipasas es un sistema dinámico de interconversión entre la estructura cerrada, que predomina en ambientes homogéneos, y la estructura abierta, que se estabiliza en las interfaces lípido-agua. Las estructuras tridimensionales de algunas lipasas en sus conformaciones activas se han determinado por cristalografía y difracción de rayos X.

Además del centro activo principal, las lipasas pancreáticas humana y porcina, y otras de origen microbiano, presentan en su región C-terminal lo que parece ser un sitio catalítico mínimo. Este pudiera ser responsable de la actividad enzimática frente a sustratos hidrosolubles como los ésteres del p-nitrofenol. Por otra parte, esta actividad también pudiera explicarse por las transiciones conformacionales que experimentan estas enzimas, aun en ambientes homogéneos, dadas por la interconversión estructura cerrada-estructura abierta.

En su conformación activa, las lipasas presentan en su centro activo un grupo de residuos hidrofóbicos dispuestos alrededor de la serina catalítica que constituyen una región electrofílica conocida como cavidad oxianiónica. Además, aparece una superficie significativamente apolar alrededor de la entrada al centro activo que se conoce como zona de contacto lipídico. También están presentes algunas moléculas de agua que participan en interacciones importantes para mantener una conformación del sitio activo catalíticamente competente.

Cuando la enzima entra en contacto con una interface, el ambiente dieléctrico en la superficie proteica se modifica, en el sentido de potenciar las interacciones electrostáticas. Ello posibilita que la cubierta del centro activo se desplace y se produce una reestructuración en la conformación de la molécula. Como resultado, los aminoácidos catalíticos quedan expuestos al solvente en una orientación adecuada, y alrededor de éstos se conforma la cavidad oxianiónica, por exposición de determinados residuos hidrofóbicos e internalización de otros hidrofílicos. Todo esto incrementa la afinidad de la enzima por sus sustratos lipídicos y contribuye a la estabilización del estado de transición durante el ciclo catalítico.³¹

3.7 Lipasa *Candida rugosa*

Las lipasas de *Candida rugosa* se describieron por primera vez en los años sesenta, aislando la levadura de los suelos naturales debido a su potente capacidad de producción de lipasa. Posteriormente, se identificaron dos isoenzimas inicialmente llamadas LipA y LipB, purificada y caracterizadas genéticamente. En la actualidad está bien establecido que al menos siete genes están implicados en la maquinaria productora de lipasa de *Candida rugosa*, siendo cinco de ellos (Lip1-Lip5) completamente bioquímicamente caracterizados. Hoy en día la nomenclatura LipA y LipB ha sido prácticamente abandonada, y una nueva basada en números se utiliza a menudo: Lip1, Lip2, Lip3, hasta Lip7.

Todas las muestras comerciales de lipasa *Candida rugosa* están compuestas por una mezcla de varias isoenzimas en diferentes proporciones, y por lo tanto Lip1, Lip2 y Lip3 se han encontrado en tales polvos comerciales crudos en proporciones variables. Como ventaja adicional, se ha señalado la no patogenicidad de la levadura y sus lipasas de modo que no sorprende el gran número de revisiones reportadas sobre lipasa *Candida rugosa* que aparecieron en la última década, destacando diferentes

aspectos como las características bioquímicas, estructurales, la tecnología de fermentación o algunas aplicaciones biocatalíticas.

La lipasa *Candida rugosa* está conformada por 534 aminoácidos, presenta una masa molecular de 57095 Daltones y posee un diámetro aproximadamente de 67 Å (figura 7). Todas las isoformas de lipasa *Candida rugosa* están compuestas por el mismo número de aminoácidos (534) y comparten una alta homología entre ellas (> 70%), aunque con diferentes puntos de glicosilación y/o porcentajes de carbohidratos. Además, todas las isoenzimas muestran una estructura de α/β hidrolasa con una tríada catalítica y una cubierta que cubre el sitio activo cuando la enzima está en su forma inactiva.

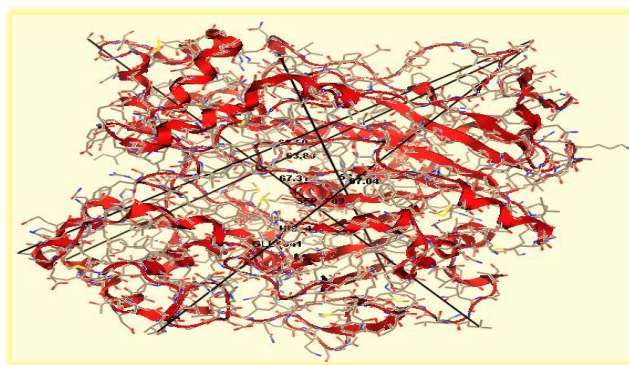


Figura 7. Dimensiones de lipasa *Candida rugosa*.

El sitio activo en las lipasas de *Candida rugosa* está cubierto por una estructura de hélice α (residuos 65-94), compuesta de aminoácidos con propiedades anfífilas, a saber, tapa o cubierta (figura 8). La composición aminoácida de dicha cubierta ha demostrado ser bastante variable entre isoenzimas (sólo se conservan 14 residuos en las estructuras de Lip1, Lip2 y Lip3), y es crucial para la llamada activación interfacial y por consiguiente para la actividad enzimática catalítica y/o enantioselectividad. Dado que esta región parece ser muy diversa entre las isoenzimas, no es una sorpresa que una correlación directa entre la variación de la composición de la cubierta y algunos aspectos de las diferentes actuaciones biocatalíticas entre isoenzimas se pueden encontrar.³²

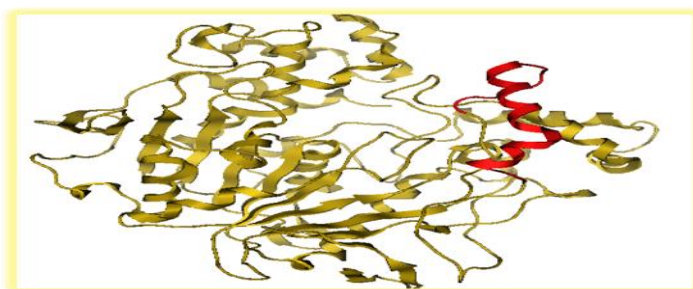


Figura 8. Representación de lipasa *Candida rugosa*, cubierta (color rojo) secuencia de residuos 65-94.

De hecho, toda la estructura de la cubierta se fija mediante un enlace disulfuro (Cys60-Cys97), y una interacción iónica entre Glu96 y Arg37. Cuando se abre la cubierta, se produce una rotación sobre dos residuos de aminoácidos, es decir, Glu-66 y Pro-92. Para este propósito, se requiere una isomerización cis-trans del enlace peptídico de Pro92. En relación con esto, debe observarse que la forma de tapa abierta es más favorecida termodinámicamente que la cerrada, ya que los aminoácidos hidrofóbicos de la cubierta interactúan más eficientemente con los medios lipófilos, Aunque las últimas razones para el movimiento de la cubierta, así como su influencia en el comportamiento biocatalítico, son todavía una cuestión de la especulación. En realidad, es bien sabido que parámetros tales como co-disolventes y/o modificaciones en el pH del microambiente o en la constante dieléctrica del sitio activo también podrían desempeñar un papel en ese movimiento de la tapa, y de manera concluyente en la actividad enzimática. En este sentido, recientemente se ha descrito una activación interfacial diferente entre las cubiertas de Lip1 y Lip3 por polietilenglicol.

Al abordar la importancia de la cubierta para el rendimiento biocatalítico, en los últimos años se han publicado algunas diferencias estructurales entre las cubiertas de las isoenzimas. Así, Pernas et al. informó que algunas posibles interacciones observadas en el caso de Lip1 no sería factible para Lip3. Por ejemplo, el enlace hidrofóbico entre Phe344 y Phe87, así como aquel entre Phe344 y Tyr69 (apilamiento de interacción), presente en el Lip1, no son posibles en el caso del Lip3. Por otra parte, la interacción entre Ser84 y Ser450 observada en Lip1 no puede existir en Lip3, ya que una alanina se encuentra en la posición 450. La consecuencia práctica de esos "pequeños" matices es que, cuando está abierta, la tapa del Lip1 resulta más estable, que el de Lip3, y por lo tanto el último presenta mayor flexibilidad. Este hecho se correlaciona fácilmente con la caracterización bioquímica de Lip3 descrita como colesterol esterasa y con los resultados biocatalíticos reportados en la literatura, en los que se describe una mayor actividad de esterasa para Lip3, así como una mejor afinidad por alcoholes de alto impedimento estérico. Además, estudios recientes con Lip4 sugieren que esta isoenzima no presenta activación interfacial, siendo la isoenzima de *Candida rugosa* más hidrofóbica en el dominio de la cubierta.

Curiosamente, la cubierta Lip2 es más hidrófoba que las de Lip1 y Lip3, pero menor que la de Lip4, con un mayor comportamiento de esterasa (afinidad por ésteres de cadena corta solubles en agua) que los datos reportados para Lip3 y Lip1. Otro aspecto en el caso de Lip2 es que el Phe87 aromático se mueve aproximadamente 3.7 Å hacia un parche de residuos hidrofóbicos situados cerca de la boca del túnel de sustrato; Tal movimiento sutil no sería posible en Lip1, debido a razones estéticas (el Phe296 voluminoso está presente). Por lo tanto, el sustrato interactúa más débilmente en el caso de Lip2 que en este de Lip1. Por otra parte, cuando Lip2 y Lip3 se compararon estructuralmente en la región de la solapa, se encontró una alta homología, lo que llevó a predecir bioquímicamente una actividad biocatalítica relacionada de esas isoenzimas, como se informó recientemente trabajando con celulosa. Así como en la biocatálisis heterogénea (transesterificación) en medios orgánicos. Sin embargo, la mayor afinidad de Lip2 vs. Lip3 hacia el oleato de colesterol no encaja con los resultados obtenidos, probablemente porque, más tarde, en una biocatálisis heterogénea en medios orgánicos ligeramente hidratados, también jugarían un papel importante otros factores (es decir, la actividad del agua, la elección del disolvente, la presencia de otras

"impurezas" que podrían retener moléculas de agua, aspectos de difusión, etc.). Además, al comparar algunos datos estructurales, se prevén actividades de esterasa similares para Lip2 y Lip4. Además, considerando su secuencia primaria, y basándose en los datos ya interpretados para otras isoenzimas, Lip5 debe mostrar un comportamiento biocatalítico similar al reportado para Lip3.

Se han reportado correlaciones entre el valor de pH y el movimiento de la cubierta y/o el comportamiento catalítico, así como la influencia que algunos compuestos orgánicos (es decir, 2-propanol) podrían tener en la estabilidad, actividad y/o la enantioselectividad de la enzima. Sin embargo, el hecho bien conocido de que otras hidrolasas sin tapa, y también sin activación interfacial (es decir, esterasa de hígado de cerdo, PLE), muestran una enantioselectividad mejorada en reacciones de hidrólisis con la adición de pequeñas cantidades de isopropanol o tert butanol, señala que se requiere investigación adicional en esta línea. En este sentido, una interesante tarea académica sería el uso de líquidos iónicos como co-disolventes, ya que su variabilidad y versatilidad podrían conducir a muchos cambios en el microambiente fisicoquímico del catalizador y, por tanto, en la actividad enzimática.

3.7.1 Cubierta lipasa *Candida rugosa*

Todas las hidrolasas comparten una estructura conservada, el denominado pliegue de α/β hidrolasa, que se define por la presencia de al menos cinco hebras beta paralelas, una tríada catalítica en un orden específico (nucleófilo -ácido-histidina), y un codo nucleofílico. Dentro de esta estructura común, todas las isoenzimas de *Candida rugosa* presentan la tríada catalítica Ser209, Glu341, His449 figura 9, estabilizada por una red de enlace de hidrógeno, ligeramente diferente en las isoenzimas cristalizadas, aunque para las tres isoenzimas existe un motivo altamente conservado de moléculas de agua cristalina en el área del sitio activo.

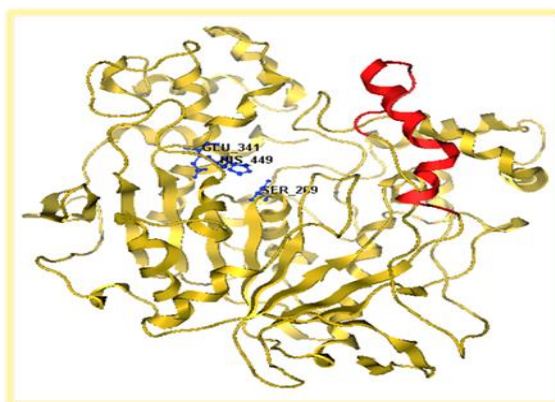


Figura 9. Representación del sitio activo conformada por histidina, serina y ácido glutámico (Ser 209, Glu 341, His 449), también se observa la cubierta formada por una hélice α (color rojo).

3.7.2 Sitio activo y túnel para el alojamiento de ácidos grasos

Se describió la existencia de un túnel para el reconocimiento de la cadena de sustrato, comenzando cerca de la Ser209 y extendiéndose hacia dentro por debajo de la tapa, terminando con Tyr361 y Ser365. Este túnel, que sólo se encuentra en lipasa de *Candida rugosa* y *Geotrichum Candidum*, tiene un tamaño total de aproximadamente 25 Å, y no es recta, mostrando más bien una forma en L que encaja muy bien con las exigencias estéricas del ácido oleico. Debido a este hecho, lipasa *Candida rugosa* es una lipasa inespecífica hacia una amplia gama de longitudes de cadena de ácidos grasos, y presenta una baja actividad cuando se convierten ácidos grasos poliinsaturados largos. Por lo tanto, se ha utilizado lipasa *Candida rugosa* para el enriquecimiento de estos valiosos ingredientes alimentarios, tales como los ácidos eicopentanoico, docosahexaenoico o gamma-linolénico.

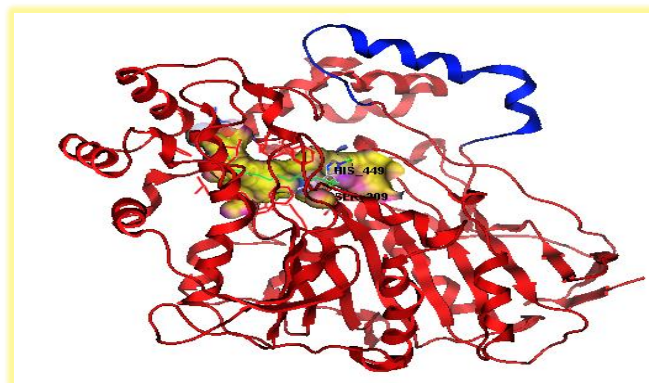


Figura 10. Representación de la cavidad oxioaniónica (color amarillo) y representación de la cubierta (color azul).

Además, varios ejemplos relativos a la modificación de aminoácidos en el túnel han sido ya reportados para Lip1. Se demostró que cuando los residuos Phe344 (entrada de la bolsa oxianiónica) y Phe345 (boca del túnel) fueron mutados a residuos de valina, se observó una disminución de la actividad y selectividad hacia ésteres de ketoprofeno. Además, Schmitt et al. mostraron que la inclusión de aminoácidos voluminosos (Phe o Trp) en diferentes etapas del túnel condujo a una restricción y/o modificación de la especificidad del sustrato de Lip1 hacia los ácidos grasos (corto-largo). Lógicamente, cuando la sustitución se realizó en la entrada del túnel, la actividad disminuyó totalmente, lo que apoya de manera definitiva las suposiciones teóricas. Esos resultados prometedores abren la posibilidad de obtener nuevos biocatalizadores útiles para una cierta aplicación, como, por ejemplo, una mejor selección y enriquecimiento hacia diferentes ácidos grasos. Tal vez, otro interesante y nuevo tema de investigación sería la mejora de la enantioselectividad de moléculas en las que el centro quiral está lejos del grupo carboxílico (por ejemplo, ácidos carboxílicos ϵ - o δ -quirales) mediante mutaciones selectivas en este estado del túnel.

3.7.3 Puntos de glicosilación y su importancia

Otro aspecto intrigante permanece en las posiciones aminoacídicas de glicosilación (Asn), descritas para las lipasas de *Candida rugosa* en diferentes grados entre isoenzimas, pero conservando aquella para Asn351 en todos los casos informaron el comportamiento de diferentes mutantes de Lip1 en los que los puntos de glicosilación se modificaron específicamente. Mientras que las mutaciones en el Asn-291 no condujo a cambios especiales en la actividad, un dependencia o temperatura, las variaciones en el Asn314 y en el Asn351 resultaron cruciales, y se observó una disminución de la actividad. En particular, el Asn-351 resulta en el punto más sensible, ya que interactúa directamente con el movimiento de la tapa. Tal como se ha indicado anteriormente, dicha posición de glucosilo es la única que se conserva entre todas las isoenzimas de *Candida rugosa*, y también está presente en el caso de las lipasas de *Geotrichum Candidum*, como Asn364. Naturalmente, este hecho no es fortuito, sino que revela una evolución natural "fina" y fascinante para adaptar el microorganismo a vivir en diversos entornos de nutrientes, extendiendo ampliamente la gama de sustratos de hidrolasa. Finalmente, Tang et al. Informaron los parámetros catalíticos y de estabilidad de un Lip4 mutado sin puntos de glicosilación, centrándose en el Asn351 conservado. Se indicó que la enzima glicosilada era más termoestable (frente a 52 ° C), y también algunos aspectos biocatalíticos variaron de un mutante a otro, por ejemplo, la especificidad hacia los lípidos de cadena larga.

Debe observarse que la variabilidad bioquímica de las isoenzimas de lipasa *Candida rugosa* no termina con las diferencias reportadas entre isoenzimas, sino también con variaciones producidas por heteroglicosilación u otras modificaciones postraduccionales, así como la influencia del tipo de microorganismo-huésped utilizado y además las condiciones de fermentación son cruciales para la comprensión de las actuaciones biocatalíticas de la lipasa *Candida rugosa*.³³

3.8 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que conservan su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. La definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte.³⁴

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas se destacan:

- ❖ El aumento de la estabilidad de la enzima;
- ❖ La reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costes del proceso.

- ❖ La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Los diferentes tipos de reactores enzimáticos aparecen en la Figura 1. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son:

- ❖ La alteración de la conformación de la enzima respecto de 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.
- ❖ Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la movilización.
- ❖ El biocatalizador es más caro que la enzima nativa

3.8.1 Clases de inmovilización

Inmovilización por retención física

Atrapamiento

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína.³⁵

Inclusión en membranas

1) Microencapsulación: En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 nm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.

2) Reactores de membrana: El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor.

Métodos de inmovilización de enzimas por unión química

Unión a soportes

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además, el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

Soportes inorgánicos

Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)

Polímeros naturales: a su vez divididos en:

- ❖ polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc.).
- ❖ proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc.).

Polímeros sintéticos: divididos en:

- ❖ Poliolefinas (como el poliestireno)
- ❖ Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.)
- ❖ Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.).

Adsorción

En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción son:

- ❖ El pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.
- ❖ La fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína.
- ❖ El diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima.
- ❖ La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Como principales ventajas de este método destacan:

- ❖ Su preparación sencilla.
- ❖ Su bajo coste.
- ❖ No hay cambios de especificidad enzimática.
- ❖ Los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua.

Los inconvenientes de la adsorción son principalmente:

- ❖ La optimización de las variables que controlan la adsorción.
- ❖ Los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico.
- ❖ La unión al soporte es débil.

Una variante dentro de la técnica de la adsorción consiste en emplear resinas de intercambio iónico, las cuales contienen grupos funcionales y contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin que se produzcan cambios en la matriz insoluble.

Unión covalente

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente. Este método presenta las siguientes ventajas:

- ❖ La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla.

- ❖ La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización.
- ❖ Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
- ❖ Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

La inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes:

- ❖ Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- ❖ El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
- ❖ La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.³⁶

Reticulado

También denominado entrecruzamiento o cross-linking, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas. El método del reticulado consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional.

Actualmente el método más novedoso de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La

estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50 Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas. Esta tecnología se ha aplicado a enzimas muy diferentes, las cuales se han utilizado en la obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos.

Efectos de la inmovilización

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar, se producen cambios en su estabilidad. En segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno.

Efectos en la estabilidad

Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones:

1. Una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte.

La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados. La inmovilización covalente multipuntual se puede combinar con la adición de reactivos bifuncionales que den mayor rigidez a la estructura de la enzima.

2. Una protección frente a las proteasas en el medio. Se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis.

3. Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.

4. Existe una alteración del microentorno de la enzima debida a la interacción de la enzima con el soporte. Si una enzima sensible al oxígeno (como las nitrogenasas, hidrogenasas, etc.) se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como

consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción. En otros casos el soporte tiene un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la “acuofilia” del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima. Cuanto mayor es la acuofilia del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

3.8.2 Efectos en la actividad enzimática

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que:

1. la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está Impedido.
2. los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.
3. la inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma Inactiva.
4. las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima. Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

1) Efectos difusionales: Como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno.

a) Resistencias difusionales externas: si el soporte es insoluble en el medio de reacción, el sustrato deberá atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte. En las proximidades de un soporte no cargado, la concentración de sustrato es menor que en el resto de la disolución, puesto que existe un gradiente de concentración a través de la zona de difusión. Por tanto, los valores de k_m para las enzimas inmovilizadas son siempre aparentes (k_m').

b) Resistencias difusionales internas: debida a que los sustratos tienen que atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada.

Existen diversas maneras de minimizar estos efectos difusionales entre los cuales podemos mencionar: disminuir el tamaño del biocatalizador, aumentar la concentración de sustrato, incrementar la agitación o el flujo en el reactor, etc. Con estas medidas se consigue reducir el grosor de la capa de Nernst, y como consecuencia, el valor de k_m' disminuye.³⁸

3.8.3 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en:

1. Aplicaciones analíticas: biosensores
2. Aplicaciones médicas: tratamientos con enzimas inmovilizadas

Aplicaciones industriales: en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos

Biosensores

Los biosensores se están convirtiendo en una herramienta imprescindible en medicina, en el control de calidad de los alimentos y en el control medioambiental. En principio, se puede diseñar un biosensor para cualquier tipo de compuesto que sea capaz de interactuar específicamente con un sistema biológico. Generalmente, el biosensor contiene una molécula biológica inmovilizada (enzimas, células, anticuerpos) próxima a un traductor que, en contacto con el analito, transformará la señal química producida en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, calorimétrica, acústica, etc.).

El empleo de los biosensores presenta las siguientes ventajas:

1. la instrumentación requerida es barata y sencilla.
2. el análisis es muy sensible.
3. permite el uso de muestras con color o turbias que no se podrían medir con métodos espectroscópicos.

Los métodos de inmovilización más utilizados en el diseño de biosensores son la inclusión en membranas semipermeables y la unión covalente a membranas. En ambos casos, las enzimas inmovilizadas van adheridas a la superficie sensible del electrodo.

Aplicaciones de los biosensores

Los biosensores son de gran utilidad en el campo del diagnóstico clínico. Los niveles séricos de glucosa, lactato y ácido úrico se pueden detectar mediante electrodos enzimáticos disponibles comercialmente. Actualmente, el desarrollo de nuevos biosensores va dirigido a la detección de fármacos, células y virus patógenos. En el caso del control de calidad en las industrias alimentarias, los biosensores pueden determinar el grado de contaminación microbiana, o, por ejemplo, cuantificar el azúcar presente en bebidas.

Finalmente, los biosensores pueden ser muy útiles en el control de la polución del medioambiente. Los analizadores de contaminantes en el agua se basan en el empleo de biosensores capaces de detectar la presencia de residuos tóxicos, pesticidas, herbicidas o microorganismos.

Aplicaciones médicas

Existen muchas enfermedades causadas por una alteración o carencia de una determinada enzima. También hay enzimas con actividad antitumoral, cicatrizante y con otras acciones terapéuticas. El tratamiento con estas enzimas inmovilizadas permitiría una acción más prolongada, ya que serían más resistente a la acción de las proteasas. Entre estas podemos mencionar, la L-asparaginasa se utiliza en el tratamiento de leucemias y cánceres diseminados que requieren asparagina para desarrollarse. En la actualidad se ha diseñado un hemodializador de fibra hueca que contiene asparaginasa inmovilizada. La tripsina o la colagenasa se utilizan para eliminar los tejidos muertos de heridas, quemaduras, úlceras, etc.; para acelerar el crecimiento de nuevos tejidos e injertos de piel, y también para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos contaminantes. Este tipo de enzimas se pueden inmovilizar en celulosas o fibras que formarán parte del tejido de apósitos y vendas.

Aplicaciones en la Industria Farmacéutica

La Industria Farmacéutica trabaja con moléculas lábiles, y en muchos casos con moléculas quirales. El empleo de enzimas inmovilizadas es una alternativa seria a la síntesis química en pasos clave, donde no conviene trabajar a temperaturas altas o se requiere una elevada especificidad de sustrato. Los enzimas son unos reactivos quirales estrictos, es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida que permiten la obtención de productos de gran pureza óptica. Se trata de una ventaja fundamental cuando las reglamentaciones exigen la síntesis de compuestos ópticamente puros, ya sean fármacos, hormonas o antibióticos.³⁹

4. Hipótesis

El material SBA-15 dopado a diferentes porcentajes de calcio tiene la capacidad de inmovilizar lipasa Candida Rugosa.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Sintetizar materiales SBA-15 dopados con Ca, ensamblados a lipasa Candida rugosa.

5.2. Objetivos específicos

- ❖ Sintetizar sólidos SBA-15.
- ❖ Sintetizar sólidos SBA-15 dopados a 0.5% de Ca.
- ❖ Sintetizar sólidos SBA-15 dopados a 1% de Ca.
- ❖ Sintetizar sólidos SBA-15 dopados a 3% de Ca.
- ❖ Inmovilizar lipasa Candida rugosa utilizando los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15, 3Ca/SBA-15.
- ❖ Caracterizar los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15, 3Ca/SBA-15 por medio de difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojo, análisis textural (adsorción de N₂), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- ❖ Identificar la lipasa Candida rugosa mediante la técnica EFTEM.
- ❖ Obtener la cinética de adsorción de los materiales a diferentes pH

6. Materiales y metodología

6.1 Síntesis de los materiales

Los materiales mesoporosos del tipo SBA-15 se sintetizaron utilizando tetraetoxisilano (TEOS) (Aldrich 99%) como fuente de silicio, Pluronic 123 (Aldrich, 98%) como agente plantilla, ácido clorhídrico (Baker 36.5-38%), etanol (Baker 99%).

6.1.1 Síntesis de SBA-15

Se sintetizó SBA-15 (sílice mesoporosa) a partir de TEOS de la siguiente manera: 4 g de Pluronic fueron agregados a 144 mL de una solución acuosa de 1.7 M de HCl y se agitaron por 1 h a 40 °C. Después 8.6 mL de TEOS fue agregado gota a gota, la mezcla se agitó por 2 h.

El gel sintetizado fue transferido a un contenedor de teflón sellado y se mantuvo a 40 °C por 28 h bajo condiciones estáticas. El producto final se filtró, se lavó con agua y se secó por 24 h a 80 °C. Las muestras sintetizadas se calcinaron a 550 °C durante 24 h en flujo de aire.

6.1.2 Síntesis de Ca/SBA-15

4 g de Pluronic fueron agregados a 144 mL de una solución acuosa de 1.7 M de etanol/HCl y se agita por 1 h a 40 °C. Después se agregan 8.6 mL de TEOS gota a gota, la mezcla se agitó por 2h. En el caso del 3 % p/p de Ca se prepara una mezcla de 0.27 g de acetato de calcio disueltos en 100mL de etanol, esta es vertida a la mezcla de Pluronic/TEOS, se agita durante 30 min, posteriormente se agregan 144 mL de agua desionizada gota a gota y se agita la solución 24 h a 70 °C. Pasando este tiempo se evaporan los solventes a 70 °C sin agitación el tiempo necesario hasta obtener un sólido blanco. Las muestras sintetizadas se calcinaron a 550 °C durante 24 h en flujo de aire.

Para la síntesis de 1 y 0.5 % p/p se usaron mezclas de 0.09 y 0.045 g de acetato de calcio disueltos en 100mL de etanol.

6.2 Adsorción de lipasa Candida rugosa al soporte Ca/SBA-15

Se disuelven 1.2 mg de lipasa Candida rugosa en 3 mL de buffer de fosfatos a pH 7.5, esta mezcla se pone a 4 °C posteriormente se agregan 0.5 g de SBA-15. la adsorción se monitorea cada 5 minutos durante 120 minutos en agitación tomando alícuotas de 20µL las muestras son analizadas por UV en un equipo NANODROP 2000.

6.3 Técnicas de caracterización

6.3.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR, Fourier)

Esta espectroscopía se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. En la figura 11 se representan los diferentes tipos de vibraciones moleculares.

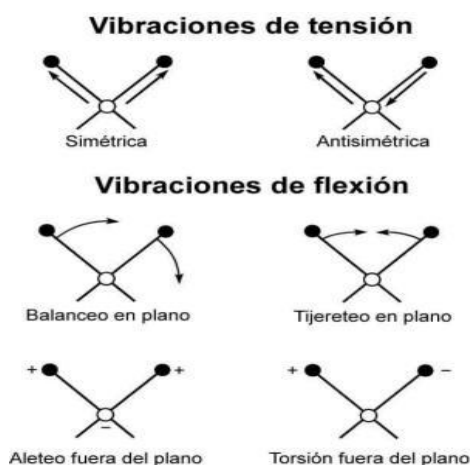


Figura 11. Tipos de vibraciones moleculares. Note que + indica un movimiento desde el plano de la página hacia el lector y - indica un movimiento desde el plano de la página alejándose del lector.

En principio, cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas (excepto las especies diatómicas homonucleares como O_2 y Br_2) tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo. De esta forma, analizando cuáles son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en la zona del infrarrojo, podemos obtener información acerca de las moléculas que componen dicha sustancia.

La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre $12800-10\text{ cm}^{-1}$. Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR):

12800-4000 cm^{-1} , IR medio: 4000-400 cm^{-1} ; IR lejano: 400-10 cm^{-1} , siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales.

En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda del infrarrojo medio (entre 4000 y 1300 cm^{-1}) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre únicamente dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados.

En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda comprendidas entre 1300 y 400 cm^{-1} (infrarrojo lejano), la asignación de las bandas de absorción a vibraciones moleculares es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas está generada por absorciones individuales sumadas (multiplicidad de las bandas). Es la denominada zona de la huella dactilar (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc..). En esta zona de longitudes de onda, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción.

La espectroscopía infrarroja tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo: detección de las moléculas presentes en el material y reside en la identificación de determinados grupos funcionales de una molécula para los que se observan bandas características en determinadas regiones del espectro (figura 12). Este hecho permite además la utilización de esta técnica en el seguimiento de una reacción en la que se tiene lugar una transformación de grupos funcionales observables en IR.⁴⁰

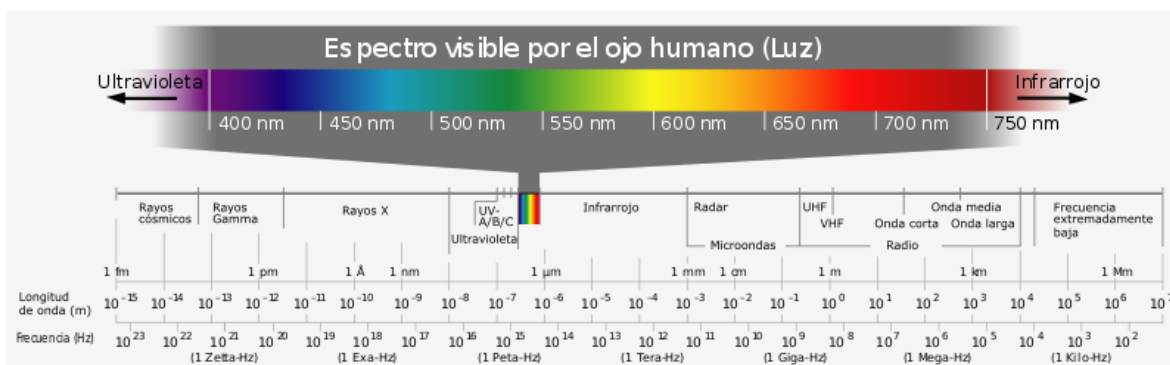


Figura 12. Espectro electromagnético.

6.3.2 Difracción de rayos X (DRX)

Los rayos X son radiación electromagnética de longitud de onda corta que se produce cuando se desaceleran los electrones de alta energía o por transiciones de electrones que están en los orbitales internos de los átomos. Los valores de las longitudes de onda de los rayos X están entre aproximadamente 105 Å a 100 Å; pero la espectroscopía de rayos X ordinaria se limita a la región de casi 0.1Å a 25Å ($1\text{Å} = 0.1\text{nm} = 0.1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$).

La difracción de rayos X es uno de los fenómenos físicos que se producen al interaccionar un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, con una sustancia cristalina. Se basa en la dispersión debida a la interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias (constructivas y destructivas) entre los rayos dispersados ya que la distancia entre los de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. El resultado es la difracción.

Los rayos X tienen longitudes de onda de Angstroms (Å), del mismo orden que las distancias interatómicas de los componentes de las redes cristalinas. Al ser irradiados sobre la muestra a analizar, los Rayos X se difractan con ángulos que dependen de las distancias interatómicas. El fenómeno de la difracción puede describirse con la Ley de Bragg, que predice la dirección en la que se da interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal.

En 1912, W. L. Bragg estudió la difracción de rayos X por medio de cristales, cuando un haz de rayos X choca con la superficie de un cristal formando un ángulo θ una porción del haz es dispersado por la capa de átomos de la superficie. La porción no dispersada del haz penetra en la segunda capa de átomos donde, de nuevo una fracción es dispersada y la que queda pasa a la tercera capa. El efecto acumulativo de esta dispersión producida por los centros regularmente espaciados del cristal es la difracción del haz. Los requisitos para la difracción de rayos X son que el espacio entre las capas de átomos sean aproximadamente el mismo que la longitud de onda de la radiación y que los centros de dispersión estén distribuidos en el espacio de una manera muy regular.

La Figura 13 muestra como Bragg trató la difracción de rayos X por cristales. En este caso, un haz estrecho de radiación choca con la superficie del cristal formando un ángulo θ ; la dispersión tiene lugar como consecuencia de la interacción de la radiación con los átomos localizados en O, P y R. Si la distancia:

$$AP + PC = n\lambda \dots \dots (1)$$

Donde n es un número entero, la radiación dispersada estará en fase en OCD y el cristal reflejará la radiación.

$$AP = PC = d \text{ sen } \theta \dots \dots (2)$$

Donde d es la distancia interplanar del cristal. Así, se puede escribir que las condiciones para que tenga lugar una interferencia constructiva (Figura 5-1) del haz que forma un ángulo θ con la superficie del cristal son:

$$n \lambda = 2 d \text{ sen } \theta \dots \dots (3) \text{ Ecuación de Bragg}$$

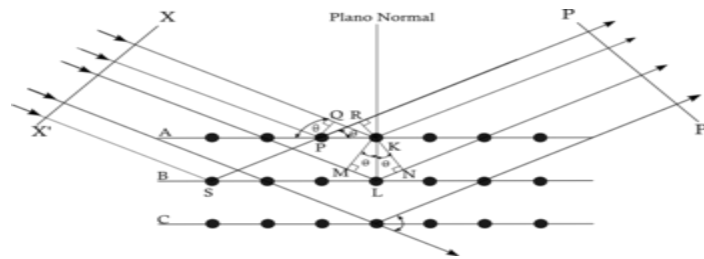


Figura 13. Difracción de rayos X producida por un cristal.

Hay que señalar que los rayos X son reflejados por el cristal sólo si el ángulo de incidencia satisface la condición: λ

Para todos los demás ángulos, tiene lugar la interferencia destructiva (Figura 14).⁴¹

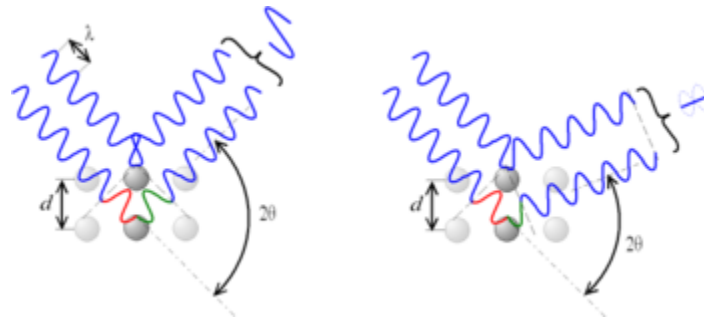


Figura 14. Derecha Interferencia constructiva e Izquierda Interferencia destructiva.

6.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales con los que trabajan los investigadores de la comunidad científica y las empresas privadas, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales utilidades del SEM son la alta resolución (~ 1 nm), la gran profundidad de campo que resuelve una imagen tridimensional de la muestra y la relativa sencillez de preparación de las muestras.

El microscopio electrónico de barrido está equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: el detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image), y un detector

de energía dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativo y de distribución de elementos en superficies.

La preparación de las muestras es relativamente sencilla las principales características son: muestra sólida, conductora. Caso contrario, la muestra es recubierta con una capa de carbón o una capa delgada de un metal como el oro para darle propiedades conductoras a la muestra. De lo contrario, las muestras no conductoras se trabajan en bajo vacío. Las aplicaciones del equipo son muy variadas, y van desde la industria petroquímica o la metalurgia hasta la medicina forense.

6.3.4 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) tiene un modo de operar similar al del microscopio óptico, ya que está basado en el hecho de que la manera de actuar un campo electromagnético sobre un haz de electrones es análoga a la acción de una lente de cristal sobre el haz de fotones. La imagen, sin embargo, se forma sobre una pantalla fluorescente como lo haría en una pantalla de televisor. El microscopio electrónico de barrido no tiene la resolución que se alcanza con el microscopio electrónico de transmisión, pero su ventaja es una excelente impresión tridimensional, derivada de la amplificación de señales que se generan al irradiar la superficie de las muestras con un haz muy estrecho de electrones.⁴²

6.3.5 Espectroscopía de energía dispersiva (EDS)

El detector de energía dispersiva EDS, permite coleccionar Rayos X generados por la muestra. De esta manera puede obtenerse información topográfica y composicional rápida, eficiente y simultáneamente de la misma área. La señal que se estudia es la correspondiente al espectro de emisión de rayos X. Los rayos X generados por bombardeo electrónico, pueden ser utilizados para identificar los elementos presentes en el espécimen. El análisis de los rayos X característicos emitidos por una muestra implica medir muy precisamente sus longitudes de onda o energías y las correspondientes intensidades. Cuando se usa el sistema dispersivo en energías, el detector de rayos X se coloca antes de dicho sistema dispersante a fin de coleccionar la mayor cantidad de radiación posible. Así la señal de rayos X proveniente del detector es analizada por un sistema de análisis de altura de pulsos donde esta altura está relacionada con la energía del fotón incidente.

Para que los procedimientos de corrección desarrollados para análisis cuantitativo sean válidos, la muestra debe ser de composición homogénea y tener una superficie plana, dentro del diámetro de la nube de difusión de electrones.⁴³

6.3.6 Fisorción de nitrógeno

La técnica de fisorción de gases es la más usual en la determinación de áreas superficiales y distribución de tamaños de poros de sólidos. Esta técnica se basa en la adsorción de nitrógeno a 77 K. Las isotermas obtenidas (representación del volumen de nitrógeno fisorbido en el sólido respecto a la presión relativa de nitrógeno) corresponden al proceso de adsorción y desorción del gas en el sólido, produciéndose histéresis cuando la isoterma de adsorción no coincide con la de desorción.

Tipos de Isotermas de Adsorción (Fisorción de gases).

Los sólidos se pueden clasificar en función del tipo de isotermas que presenten. Las isotermas de adsorción, mayoritariamente, se pueden agrupar en seis clases según la clasificación de la IUPAC (Figura 15).

Los primeros cinco tipos de la clasificación (I a V) fueron propuesto originalmente por Brunauer S., Deming L. S., Deming W. S. y Teller E. y es conocida como la clasificación BDDT3, también referenciada como clasificación de Brunauer. La isoterma del Tipo VI es más reciente y se la conoce como isoterma escalonada, es una clase poco común, pero es interesante desde el punto de vista teórico.

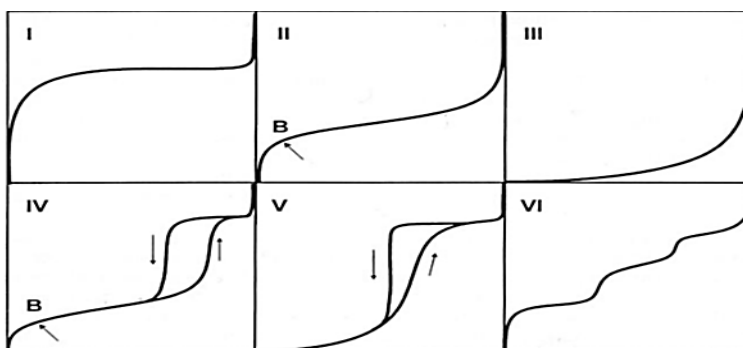


Figura 15. Los seis tipos de isotermas de adsorción (fisorción) según la clasificación de la IUPAC.

Tipos de Isotermas de Adsorción (Fisorción de gases)

Tipo I: La isoterma es cóncava respecto al eje de la presión relativa (p/p_0), aumenta rápidamente a baja presión ($p/p_0 < 1 \times 10^{-3}$) y posteriormente alcanza una meseta de saturación horizontal. Esta clase de isotermas es característica de materiales microporosos. La alta energía de adsorción de los microporos produce que el gas se adsorba a bajas presiones. Una vez que se ha completado todo el volumen de los microporos la isoterma permanece en un valor casi constante sobre un amplio rango de presiones, lo que produce la citada meseta.

Tipo II: A bajas presiones es cóncava respecto al eje de la presión relativa (p/p_0), luego aumenta lineal y finalmente se vuelve convexa. Puede ser interpretada como la formación de una capa adsorbida

cuyo espesor es incrementado progresivamente a medida que aumenta la presión. Si la rodilla de la isoterma es pronunciada, se asume que en el punto B (el punto donde comienza la sección cuasilineal de la isoterma) se ha completado la formación de la capa monomolecular (monocapa.) y empieza la formación de las capas multimoleculares (multicapas). La ordenada del punto B nos da una estimación de la cantidad de adsorbato requerido para cubrir por unidad de masa, la superficie del sólido con una capa monomolecular. (capacidad de monocapa). Esta clase de isoterma es característica de sólidos no-porosos o de adsorbentes macroporosos. La total reversibilidad de la isoterma de adsorción-desorción, es decir, la ausencia del lazo de histéresis es una condición que se cumple en este tipo de sistemas.

Tipo III: Es convexa respecto al eje de la presión relativa (p/p_0) en todo el rango de presión. Esta característica es indicativa de interacciones débiles entre el adsorbato y el adsorbente.

Tipo IV: A bajas presiones se comporta como la del Tipo II, siendo el rasgo distintivo de esta isoterma su lazo de histéresis. Es característica de los sólidos mesoporosos. La aparición del ciclo de histéresis se debe a que el proceso de llenado de los mesoporos está gobernado por el fenómeno de condensación capilar y por las propiedades percolativas del sólido.

Tipo V: Del mismo modo que las de Tipo III, esta clase de isotermas se obtiene cuando las interacciones entre el adsorbato y el adsorbente son débiles. La presencia del lazo histéresis está asociado con el mecanismo de llenado y vaciado de los poros.

Tipo VI: O isoterma escalonada es la menos común de todas las isoterma. Se la asocia con la adsorción capa por capa sobre superficies que son altamente homogéneas respecto del adsorbato. La forma del escalón depende de la temperatura y de los detalles del sistema.

Tipos de ciclo de histéresis

La mayoría de las isotermas de materiales mesoporosos con ciclo de histéresis pueden ser agrupadas según la clasificación de la IUPAC (Figura 16). El ciclo de histéresis H1 presenta un ciclo angosto, con sus ramas de adsorción y desorción paralelas entre sí. En contraste, la tipo H2 se caracteriza por un ciclo de histéresis ancho, lo que se traduce en un meseta pronunciada. Las tipo H3 y H 4 no presentan una meseta a presiones altas, por lo que a veces es dificultoso determinar la rama de desorción.

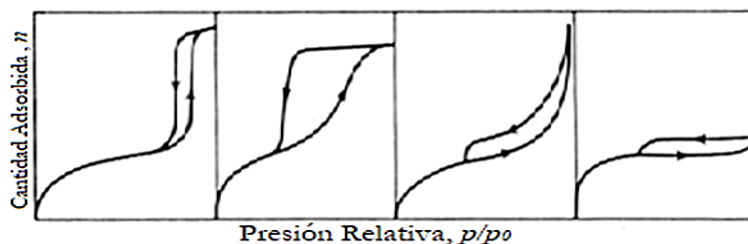


Figura 16. Clasificación de los distintos tipos ciclos de histéresis según la IUPAC.

Cada una de estas isotermas está asociada con una, o varias, estructuras porosas, por ejemplo, la isoterma H1 es obtenida de adsorbentes que tienen distribuciones de poros muy angostas, como por ejemplo los materiales MCM-41 (poros cilíndricos abiertos y cerrados) o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes. La mayoría de los óxidos inorgánicos (sílice) producen el tipo H2, que, por cierto, es la más común. Los lazos tipo H3 y H4 se obtienen al trabajar con aglomerados de poros de placa paralelas (slit-shaped), como lo son las arcillas pilareadas. La tipo H4 también es característica de los carbones activados, pero en este caso la distribución de tamaños de poros está en el rango de los microporos.⁴⁴

6.3.7 Desorción de NH_3 a temperatura programada (TPD- NH_3)

La desorción térmica puede efectuarse isotérmicamente o mediante la utilización de un programa de temperatura. Los experimentos de desorción isotérmica son más fáciles de analizar, debido a ello la mayoría de los investigadores han utilizado la técnica de desorción con temperatura programada (TPD) en la cual la temperatura de la muestra varía con el tiempo de una manera controlada. Si ocurren varios procesos de desorción, un experimento de desorción isotérmica simple en el cual la temperatura es suficientemente alta para que todos ellos tengan lugar simultáneamente, resulta imposible deducir las diferentes velocidades para cada proceso a partir de la velocidad global observada. Los procesos de desorción múltiple obligan al investigador a llevar a efecto varios experimentos isotérmicos a diferentes temperaturas.

La técnica de desorción a temperatura programada (TPD, de sus siglas en inglés) proporciona información acerca de la fuerza de adsorción con la que un adsorbato determinado, se adsorbe en la superficie de un sólido. En este caso el sólido es puesto en contacto con una corriente de gas que incluye a la molécula sonda. Posteriormente la muestra se pone en contacto con un gas inerte y se inicia el calentamiento con un programa determinado. La composición del gas es monitoreada continuamente utilizando un TCD. La temperatura necesaria para que el gas sea desorbido de la superficie de un sólido sometido a calentamiento, refleja la fuerza del enlace establecido con la superficie, a mayor temperatura de desorción, mayor fuerza de enlace.⁴⁵

6.4 Equipos utilizados

6.4.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR, Fourier)

Se determinó la presencia de grupos funcionales en la superficie de los materiales por medio de la técnica de espectroscopía infrarroja. Se utilizó un equipo Perkin Elmer modelo Spectrum GX. El intervalo de medición fue 220 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , los datos se registraron cada unidad de cm^{-1} . La medición se hizo con la ayuda del accesorio ATR (Attenuated Total Reflectance).



Figura 17. Equipo Perkin Elmer modelo Spectrum GX.

6.4.2 Difracción de rayos X (DRX)

Para determinar la cristalinidad del material sintetizado se utilizó la difracción de rayos X en polvo. Las mediciones se realizaron en un difractómetro Siemens D500 acoplado a un tubo con ánodo de cobre y radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con 35 kV y 20 mA. El intervalo de medición fue de 5 a 70° en 2θ los datos se tomaron cada 0.02° este para ángulo amplio y para ángulo bajo el intervalo de medición fue de 1° y 40° con un paso de 0.02° y un tiempo de medición de 2.67 segundos en cada punto.



Figura 18. Difractómetro de rayos X SIEMENS D500.

6.4.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para investigar el tamaño de partícula y morfología de los materiales porosos se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL 2010 operado a 200 kV de aceleración; posee una resolución de 1.86 Å, cuenta con un detector EDS (energy dispersive X-ray) para análisis elemental.



Figura 19. Microscopio JEOL 2010.

6.4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para determinar la morfología de los materiales porosos se empleó un microscopio JEOL con fuente de cañón de electrones operado a 5 kV. En una porta muestra metálico se adhirió cinta de carbono con pegamento en ambos lados y, finalmente la muestra se recubrió con una capa de oro (aprox. 10 nm).



Figura 20. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

6.4.5 Fisisorción de nitrógeno

El área específica fue determinada en un equipo Micrometrics, ASAP 2000, usando N_2 como adsorbente a 77 K empleando el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET). La distribución de tamaño de poro se calculó por el método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) a partir de las isothermas de adsorción-desorción. Las muestras fueron evacuadas con vacío a 100 °C por 2 horas y 300 °C durante 20 horas, previamente a los pasos de la adsorción-desorción.



Figura 21. Equipo ASAP 2000 Micrometrics para determinar áreas.

6.4.6 Temperatura programada de desorción (TPD)

La técnica TPD fue llevada a cabo con un equipo convencional TPD/TPR 2900 de Micrometrics provisto con un detector TCD. El procedimiento consiste en limpiar la muestra en flujo de N_2 como gas de acareo y aire desde temperatura ambiente hasta 300 °C manteniéndola 15 min, a continuación, se reanuda el calentamiento hasta 500 °C con flujo de NH_3 , posteriormente se enfría hasta 30 °C, y se estabiliza el detector por 1 hora. Ya estabilizado se inicia la desorción por calentamiento con una velocidad de 10 °C/min hasta 800 °C, registrándose la desorción del NH_3 por el detector de TCD.



Figura 22. Equipo TPD/TPR 2900 Para determinar sitios ácidos y básicos.

6.4.7 Determinación de absorbancia (cinética de adsorción de lipasa *Candida rugosa*)

Para obtener la absorbancia por UV se usó el espectrofotómetro de UV visible NanoDrop 2000 Thermo Scientific, se tomaron alícuotas de 4-7 μL donde se hicieron mediciones cada 5 minutos.



Figura 23. Equipo del NanoDrop 2000 Thermo Scientific.

7. Discusión de resultados

7.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR, Fourier)

La figura 24 muestra el espectro de infrarrojo del material SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 secos. Se observa una banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1} típica de una vibración de alargamiento del enlace OH de moléculas de agua ocluidos en el material. La banda en 1700 cm^{-1} corresponde a la vibración de flexión del enlace OH del agua. La banda a 1050 cm^{-1} se relaciona con la vibración de alargamiento de los enlaces Si-O. A 950 cm^{-1} la banda observada se atribuye a vibraciones simétricas y antisimétricas de los enlaces Si-OH y Si-O-H y las bandas observadas a 780 y 450 cm^{-1} corresponden a la vibración de flexión del enlace O-Si-O.

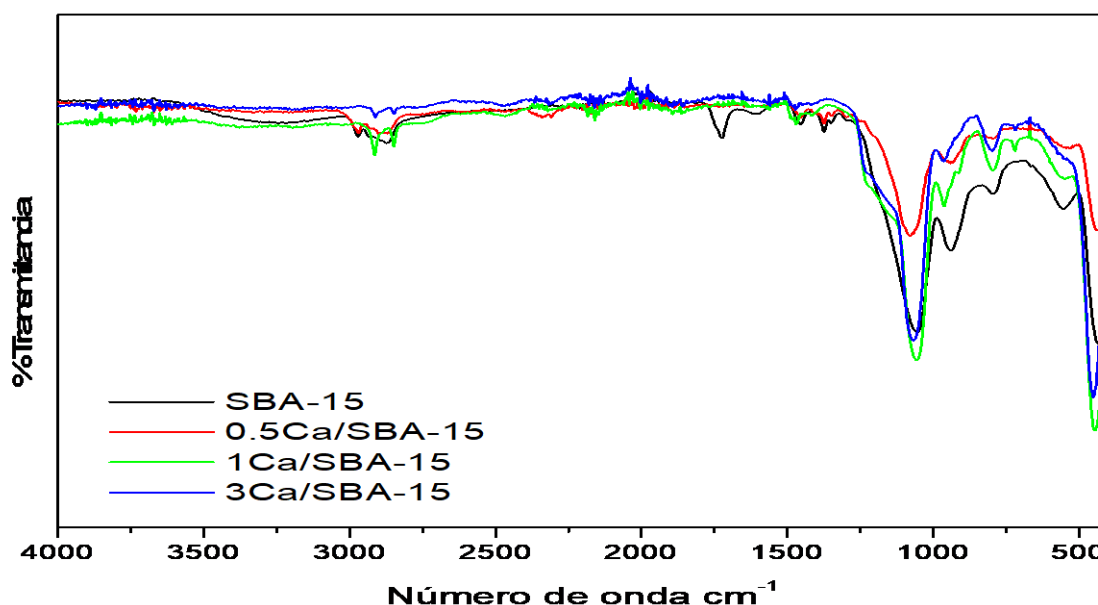


Figura 24. Espectro de infrarrojo del material SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 (secados a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

La figura 25 muestra el espectro de infrarrojo del material SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 calcinados. Se observa una banda ancha alrededor de 2900 cm^{-1} , típica de una vibración de alargamiento del enlace OH de las moléculas de agua ocluidas en el material. La banda a 1060 cm^{-1} se relaciona con la vibración de alargamiento de los enlaces Si-O. A 900 cm^{-1} la banda observada se atribuye a vibraciones simétricas y anti simétricas de los enlaces Si-OH y Si-O-H. Finalmente, la banda observadas a 450 cm^{-1} corresponden a la vibración de flexión del enlace O-Si-O. La banda más intensa de los enlaces Ca-O no se observan debido a que aparecen alrededor de 400 cm^{-1} y 290 cm^{-1} la banda con mediana intensidad.

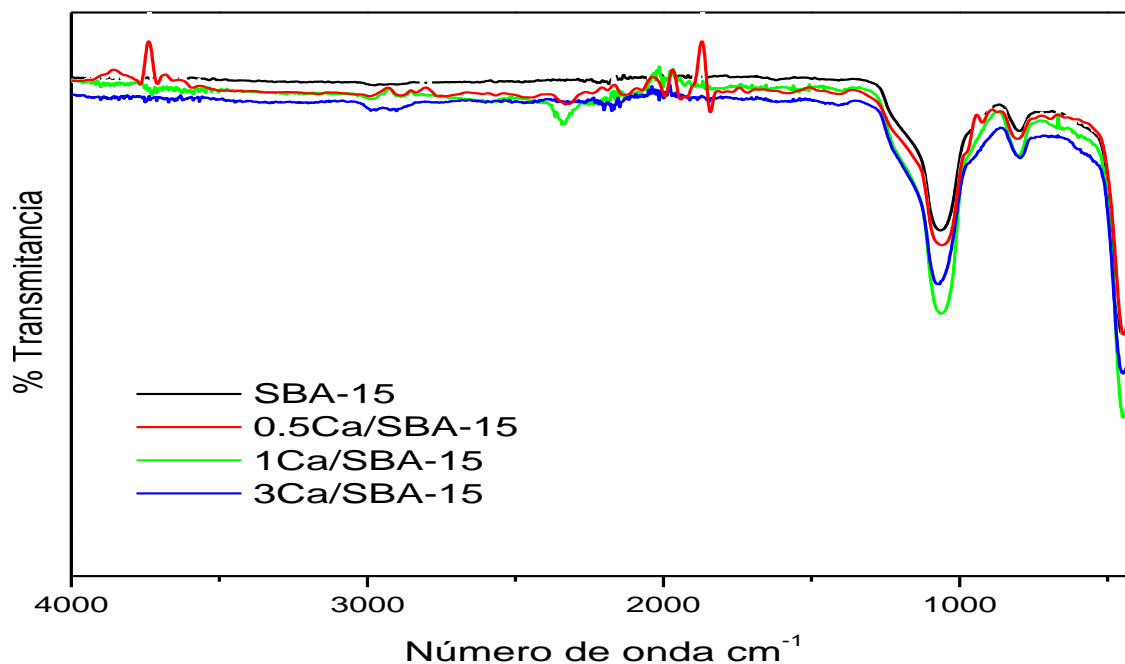


Figura 25. Espectro de infrarrojo del material SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 (calcinados a 550 °C).

7.2 Difracción de rayos X (DRX)

La figura 26 muestra los difractogramas de ángulo bajo y amplio de los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15. La figura 26 a) muestra el difractograma de ángulo bajo del SBA-15, la figura 26 b) muestra los difractogramas de 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15, el soporte SBA-15 presenta tres picos a 1.0, 1.5 y 2.4° que corresponden a las flexiones (100), (110) y (200) respectivamente, que están asociadas con la simetría P6mm, con poros ordenados hexagonalmente. Los difractogramas de ángulo bajo de a los materiales 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 presentan disminución de los picos característicos del ordenamiento hexagonal de los poros, esto se atribuye a la inclusión del Ca en la estructura del SBA-15.

La poca inclusión de Ca^{2+} en la red de SiO_2 que forma el SBA-15 se atribuye a que el radio iónico del Ca^{2+} es 0.99 Å, que es más del doble que el Si^{4+} , siendo este último de 0.41 Å

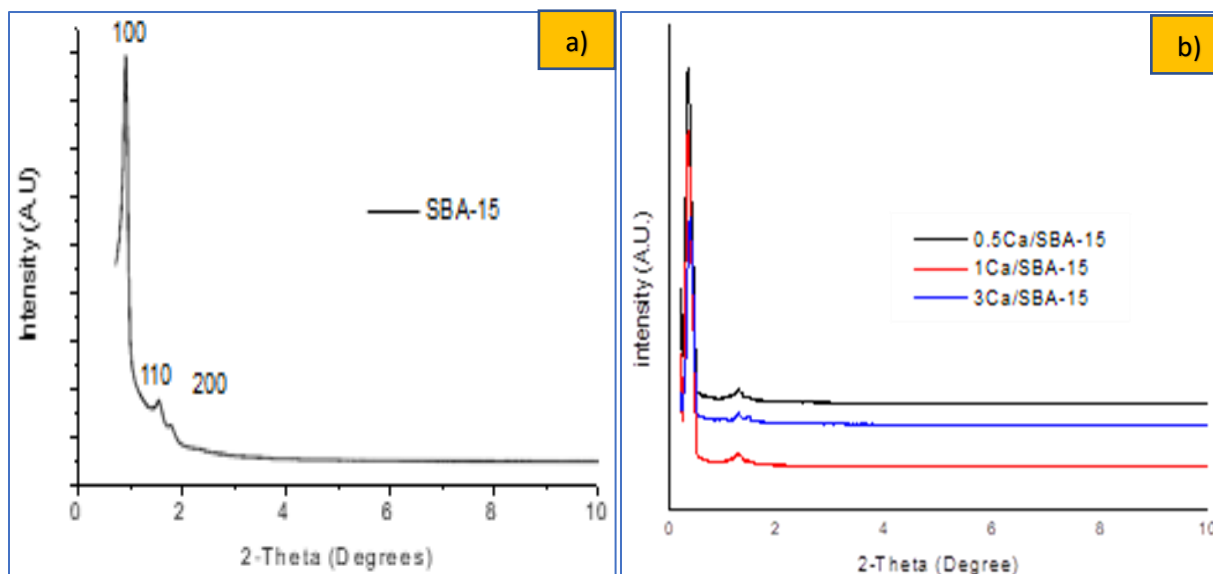


Figura 26. Difractogramas de ángulo bajo de los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15.

La figura 27 muestra los patrones de difracción de rayos X de ángulo amplio para los soportes SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15, se observan en los difractogramas a 25° en 2θ un pico intenso y ancho característico del SBA-15 correspondiente a la simetría hexagonal característico del SBA-15. En los difractogramas correspondientes a 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 se observan los picos en 2θ característicos del CaO a 31.1 , 36.2 , 54.5° que corresponden a los planos (100), (111) y (220) respectivamente. Las señales características del CaO incrementan con forma incrementa el contenido de CaO esto se atribuye a que Ca^{2+} que no entra en red sustituyendo SiO_2 quedando en superficie en forma de nanocristales de CaO formando aglomerados en la superficie del SBA-15.

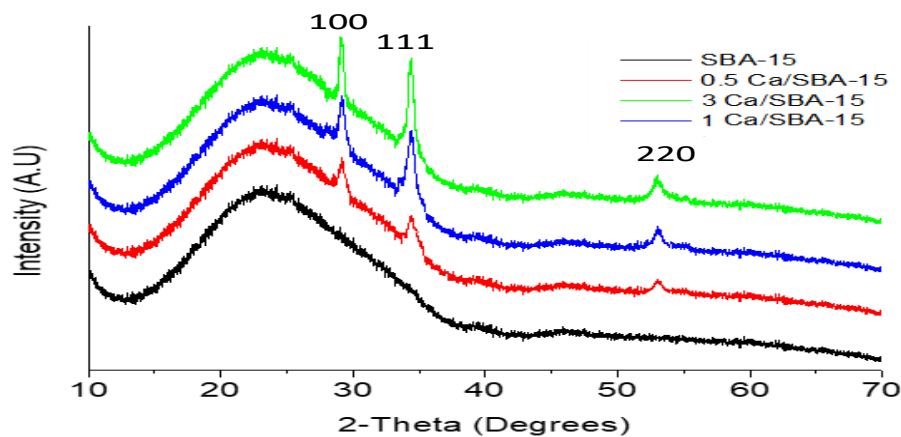


Figura 27. Difractogramas de ángulo amplio de los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15.

7.3 Microscopía electrónica

7.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La Figura 28 muestra las imágenes de SEM del SBA-15, se observa en ambas una morfología fibrosa, compuesta por fibras de SiO_2 compactada y entrelazadas con longitudes mayores a diez micrómetros. Esta morfología se atribuye al auto-ensamblaje de las micelas del P123 y TEOS formando fibras cortas.

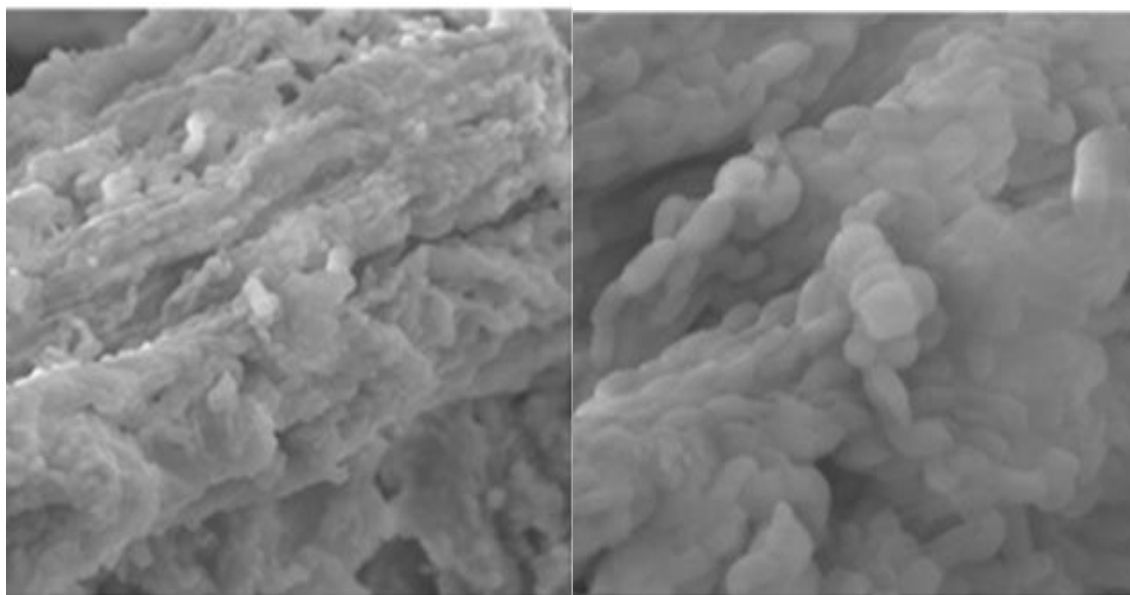


Figura 28. Imagen SEM de SBA-15.

Las figuras 29, 30 y 31 se muestran las imágenes de SEM de los materiales 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 respectivamente, se observan cúmulos de partículas aglomeradas de varios tamaños de morfología amorfa, además se observa la superficie fibrosa característica del SBA-15 que se encuentra cubiertas por CaO.

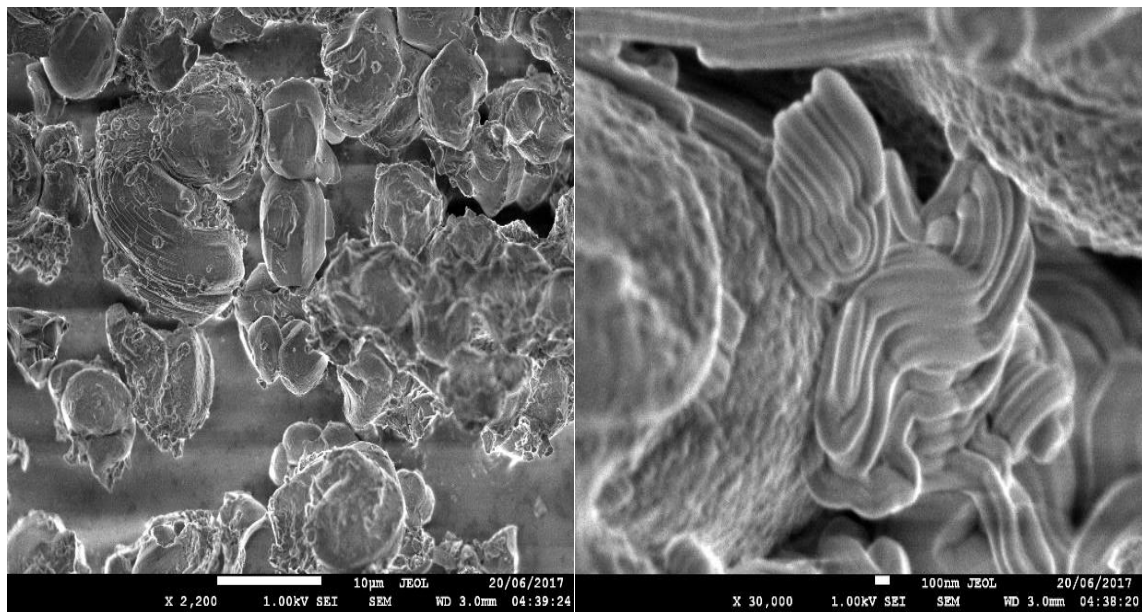


Figura 29. Imagen SEM de 0.5Ca/SBA-15.

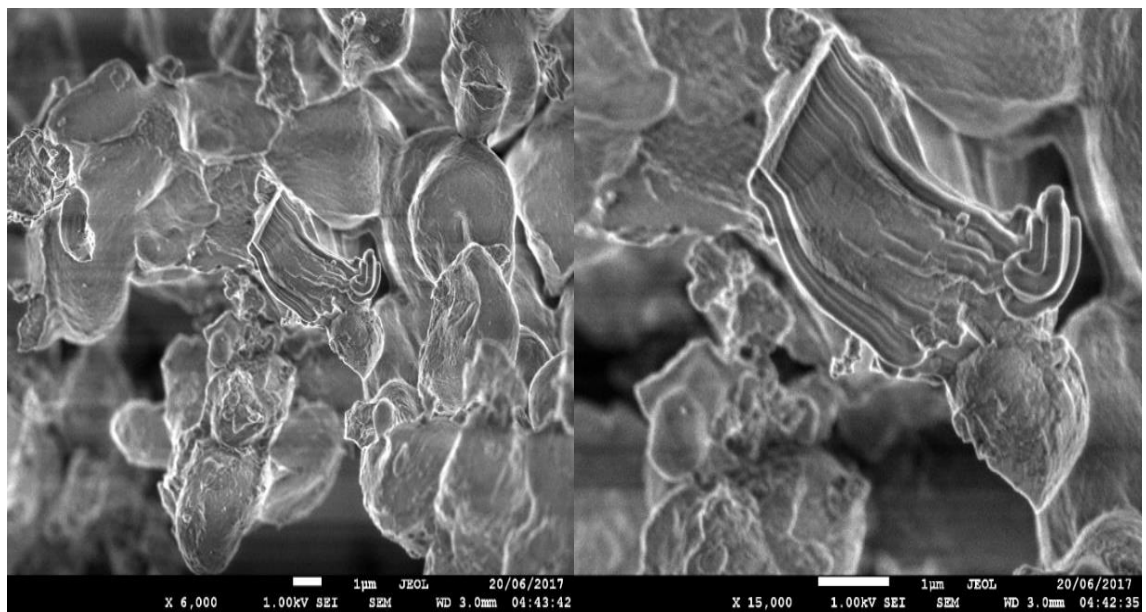


Figura 30. Imagen SEM de 1Ca/SBA-15.

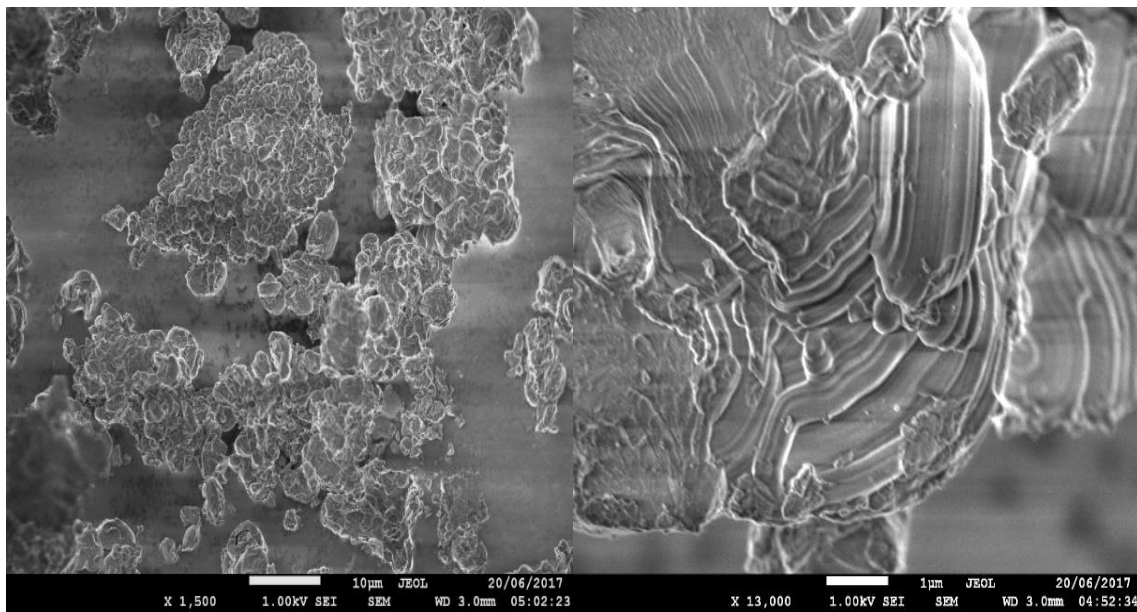


Figura 31. Imagen SEM de 3Ca/SBA-15.

7.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La figura 32 muestra las imágenes TEM del material SBA-15 se observa el típico arreglo mesoporoso hexagonal ordenado, la imagen muestra un diámetro de poro de 6 nm aproximadamente con un espesor de pared aproximado de 5.2 nm.

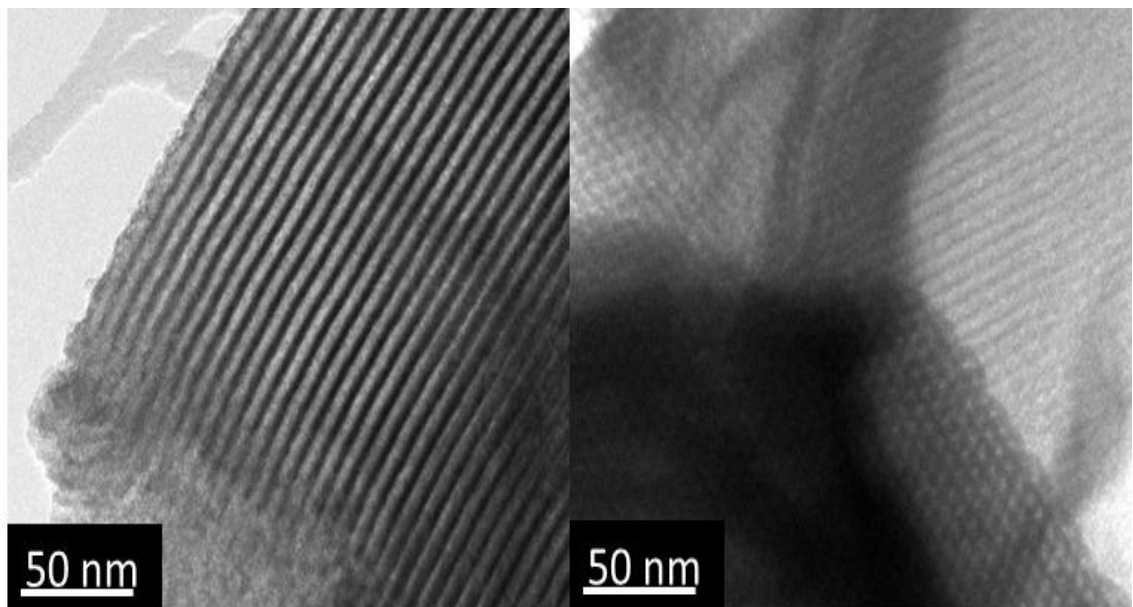


Figura 32. Imagen TEM del material SBA-15.

La figura 33 muestra las imágenes TEM del material 0.5Ca/SBA-15. Se observan regiones oscuras que se atribuyen a CaO homogéneamente disperso en la red del SiO₂ del SBA-15. Las manchas se atribuyen a la formación de aglomerados formados por nanocristales de CaO que no se incorporó a la red de SBA-15, esto por exceso de CaO.

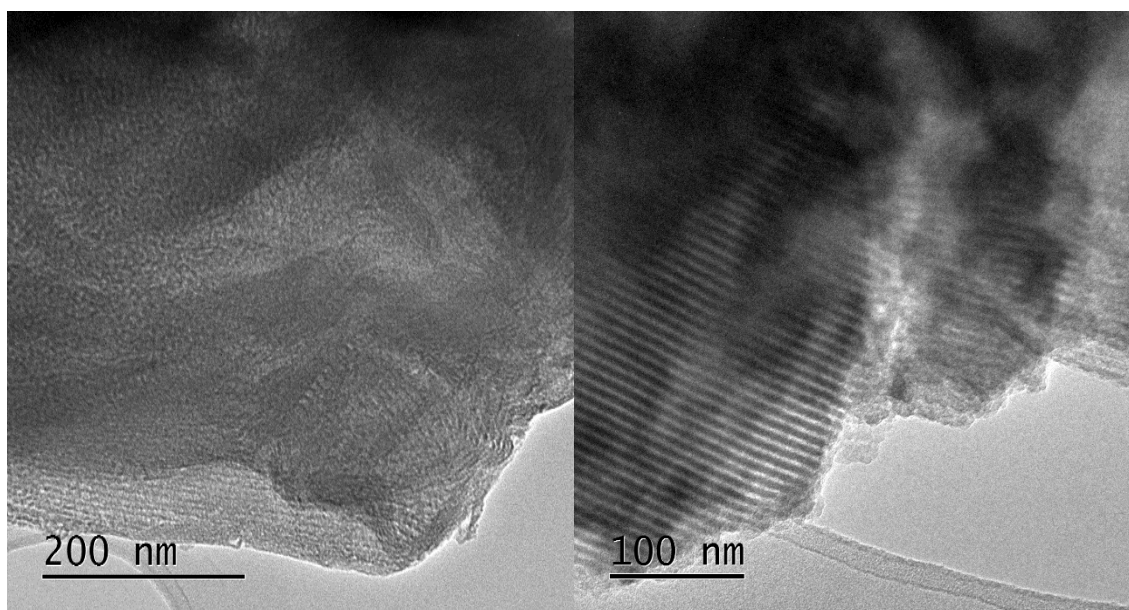


Figura 33. Imagen TEM de 0.5Ca/SBA-15.

La figura 34 muestra las imágenes TEM del material 1Ca/SBA-15 presenta mayor número de regiones oscuras, esto se atribuye al aumento del contenido de Ca quedando excesos en superficie en forma de CaO, por lo que disminuye la dispersión en la red del SiO₂ del SBA-15.

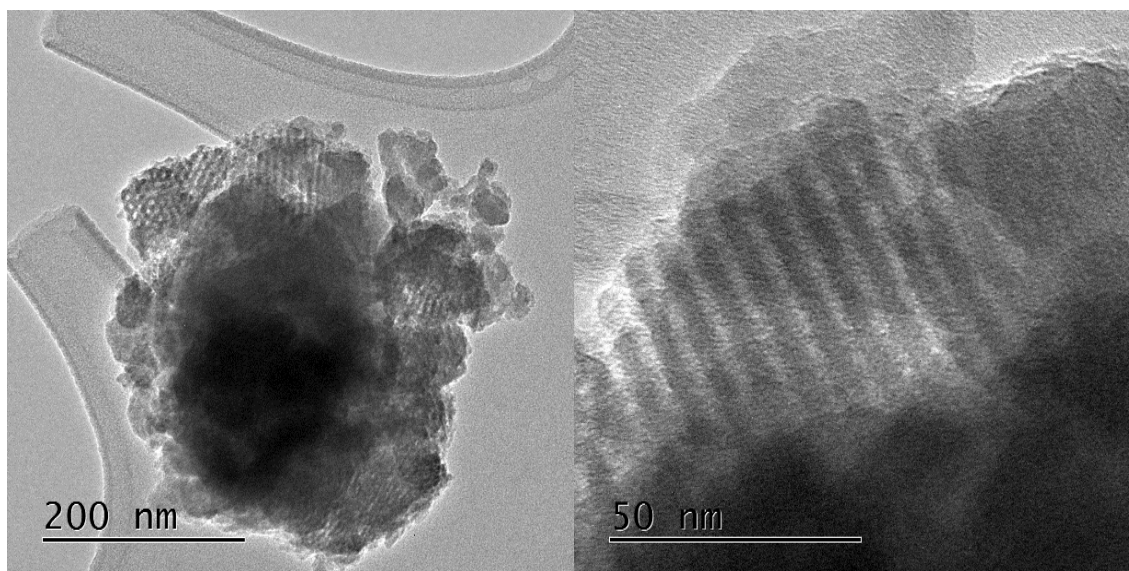


Figura 34. Imagen TEM de 1Ca/SBA-15.

La figura 35 muestran las imágenes TEM del material 3Ca/SBA-15. Se observan regiones oscuras que se atribuyen a Ca^{2+} homogéneamente disperso en la red del SiO_2 del SBA-15 en donde se observa el arreglo poroso hexagonal característico del material SBA-15. A mayor contenido de CaO se forman mayores cantidades de nanopartículas de CaO en superficie y disminuye la dispersión.

En todos los materiales se mantiene la estructura de arreglo mesoporoso hexagonal lo que indica que el Ca^{2+} altera poco el arreglo hexagonal debido a que la inclusión del Ca^{2+} es mínima en la red del SBA-15, dejando la mayor parte en la superficie en forma de CaO obstruyendo los poros. La poca inclusión de Ca^{2+} en la red de SiO_2 que forma el SBA-15 se atribuye a que el radio iónico del Ca^{2+} es 0.99 \AA , que es más del doble que el Si^{4+} , siendo este último de 0.41 \AA .

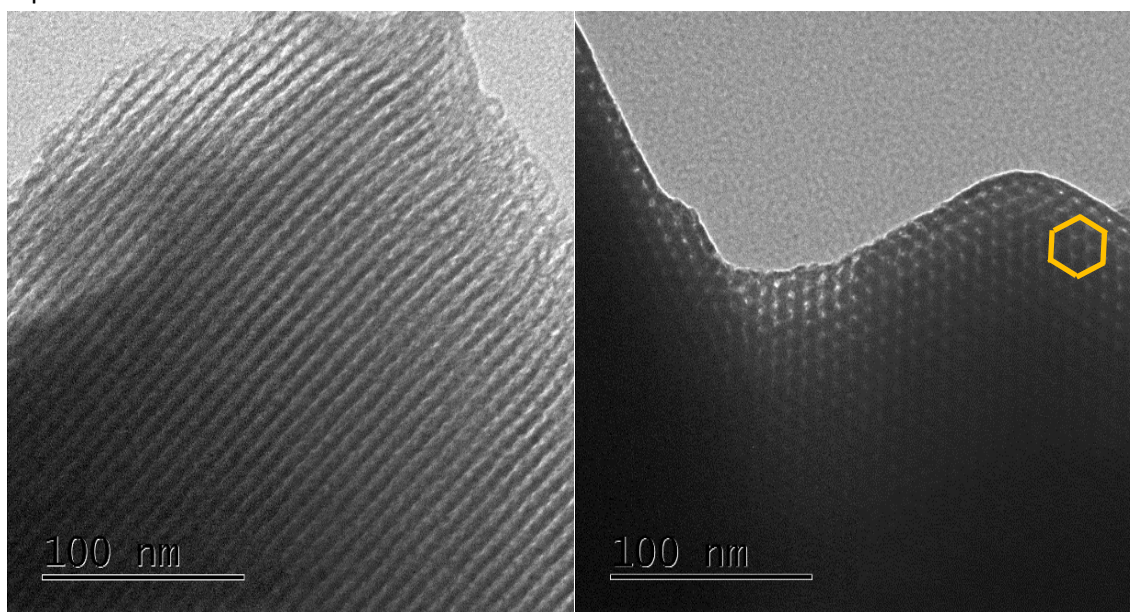


Figura 35. Imagen TEM de 3Ca/SBA-15.

7.4 Fisisorción de nitrógeno

La figura 36 muestra las isothermas de adsorción-desorción de N_2 del material SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 se observa que los materiales presentan isothermas de tipo IV con ciclos de histéresis H1 según la nomenclatura de la IUPAC. Los ciclos de histéresis es de Tipo H1; a menudo son asociados con materiales consistentes de poros que poseen canales cilíndricos bien definidos, en los cuales ocurren los fenómenos de condensación- evaporación capilar.

Las diferencias entre las formas de las isothermas se atribuyen al contenido de calcio ya que se encuentra bloqueando los poros por lo que disminuye el volumen adsorbido y por consiguiente el área específica.

Se pueden distinguir 3 regiones en las isotermas; región I ($0-0.09 p/p_0$), la adsorción a bajas presiones se lleva a cabo tanto en microporos anchos y mesoporos finos; si la cantidad de microporos es elevada, la pendiente de esta primera región es más alta. El llenado del poro con N_2 se realiza de manera paulatina, desde la monocapa y eventualmente hasta la multicapa. La rodilla de la isoterma se aprecia claramente en la figura 36 y por lo tanto la determinación del área superficial es precisa. Región II ($0.09-0.38 p/p_0$), la relación entre el espesor y el volumen adsorbido es aproximadamente lineal a partir del Punto Brunauer o Punto B; en este punto se visualiza la presión a la cual finaliza el llenado de la monocapa y se inicia la formación de multicapas. Región III ($0.38-0.79 p/p_0$), aquí el volumen adsorbido experimenta un gran incremento debido a que se lleva a cabo el fenómeno denominado condensación capilar dentro de los mesoporos a presiones relativas intermedias, iniciándose así el ciclo de histéresis. En esta zona, cuánta más marcada es su pendiente, más estrecha será la Distribución de Tamaños de Poros (DTP). Región IV ($0.79-1.1 p/p_0$), Se presenta un altiplano cuya pendiente está asociada con la rigidez del aglomerado de que se compone el sólido, lo que se traduce en un volumen total de poros bien definido y un llenado completo de éstos.

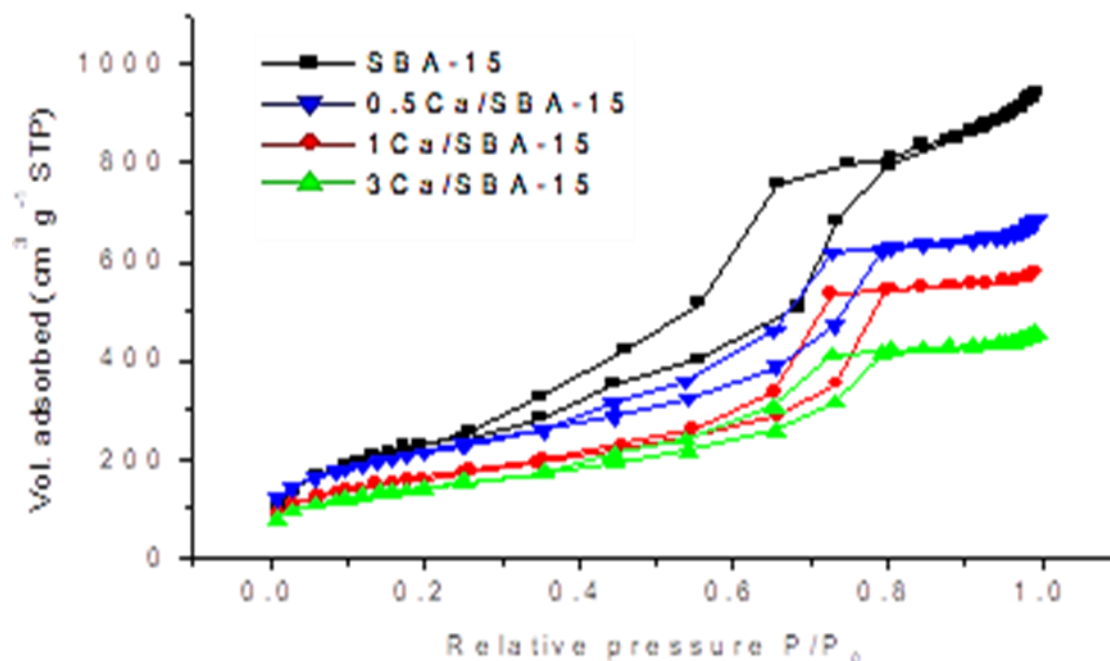


Figura 36. Isothermas de adsorción-desorción de material SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15.

La Tabla 2 muestra las propiedades físicas de los materiales SBA-15. Se observa que el SBA-15 presenta un área específica de $871 \text{ m}^2/\text{g}$ con un diámetro de poro de 3.1 nm , que se conserva después de la incorporación del calcio. El área específica del material 3Ca/SBA-15 disminuye, esto se atribuye a la obstrucción de los poros por presencia de calcio que no se incorporó a la red del SiO_2 que forma el SBA-15

quedando en formas de CaO disperso en la superficie. De manera similar se comportan los materiales 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15; el calcio obstruye los poros y disminuye el área específica. El diámetro de poro se mantiene constante en 3 nm aproximadamente (tabla 2) el cual está dentro del rango de los materiales mesoporosos según la IUPAC.

El volumen de desorción disminuye conforme aumenta el contenido de Ca esto es proporcional a la disminución del área específica. Estos resultados se atribuyen a que el CaO se encuentra en superficie obstruyendo los poros por lo que disminuye el volumen adsorbido de N₂ manteniendo el diámetro de poro constante.

Tabla 2. Propiedades texturales de materiales SBA-15, 0.5,1,3Ca/SBA-15.

Material	Área BET m ² /g	Volumen de desorción cm ³ /g	Diámetro de poro nm
SBA-15	871	2.80	3.1
0.5Ca/SBA-15	584	2.42	3.1
1Ca/SBA-15	514	1.83	3.1
3Ca/SBA-15	471	1.59	3.1

Tabla 3. Clasificación de tamaño de poro.

Microporo	<2 nm
Mesoporo	<2 nm y >50 nm
Macroporo	>50 nm

7.5 Desorción de NH₃ a temperatura programada (TPD- NH₃)

La figura 37 muestra los termogramas de desorción programada de NH₃ de los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15, se observa que el SBA-15 presenta dos máximos de desorción a 145 °C y 260 °C, correspondientes a acidez total débil y media respectivamente. La acidez total disminuye cuando se incrementa el contenido de Ca, esto se atribuye a que el CaO es un óxido metálico alcalino. Esto indica que la técnica de dopado modifica considerablemente la acidez del SBA-15.

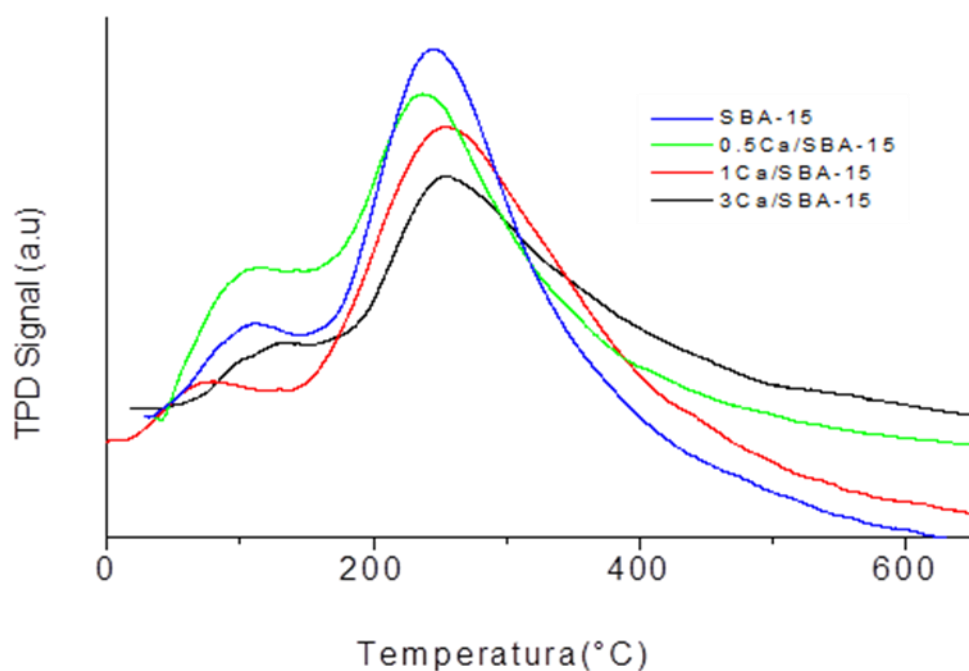


Figura 37. Desorción de NH_3 a temperatura programada (TPD) de SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15.

La tabla 4 muestra las temperaturas máximas de desorción de NH_3 y la acidez total en $\mu\text{moles NH}_3/\text{g}$, se observa que a medida que aumenta el contenido de CaO disminuye la acidez total. Las temperaturas máximas permanecen en intervalos correspondientes a la acidez baja y media.

Tabla 4. Temperaturas máximas de desorción de NH_3 y la acidez total en $\mu\text{moles NH}_3/\text{g}$.

Material	Máximo de desorción temperatura (°C)		Total de acidez $\mu\text{moles NH}_3/\text{g}$
	1	2	
SBA/15	112	248	9609.21
0.5Ca/SBA-15	108	236	6057.54
1Ca/SBA-15	78	250	5971.82
3Ca/SBA-15	122	256	3551.66

7.6 Mapeo por microscopía electrónica para 0.5Ca/SBA-15

En la figura 38 muestra el mapeo mediante microscopía electrónica donde se pueden observar los diferentes elementos químicos (Si, O y Ca) que están presentes en el material 0.5Ca/SBA-15 observándose el Ca está poco disperso en el material.

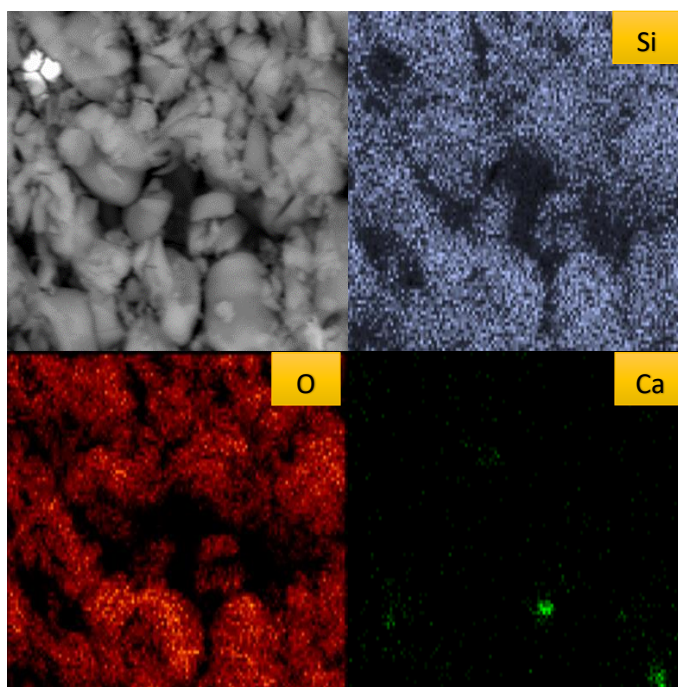


Figura 38. Imagen de la distribución de elementos químicos presentes en 0.5Ca/SBA-15.

7.7 Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para 0.5Ca/SBA-15

La figura 39 muestra los espectros de emisión, donde cuantitativamente se observa en mayor proporción oxígeno 56.46 %wt. y en un 0.44%wt. el calcio, lo cual indica que si hay presencia de Ca en el material 0.5Ca/SBA-15.

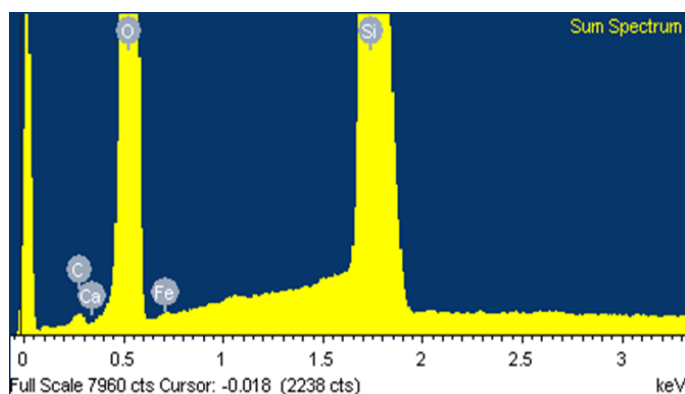


Figura 39. Espectro de emisión 0.5Ca/SBA-15.

Tabla 5. Porcentaje de elementos en 0.5Ca/SBA-15.

Elemento	Weight %	Atomic %
C	1.35	2.19
O	56.46	68.73
Si	41.52	28.79
Ca	0.44	0.21
Fe	0.24	0.08

7.8 Mapeo por microscopía electrónica para 1Ca/SBA-15

La figura 40 muestra el mapeo mediante microscopía electrónica, observándose el Ca disperso en el material, formando algunos aglomerados de CaO zonas verdes de amplia densidad.

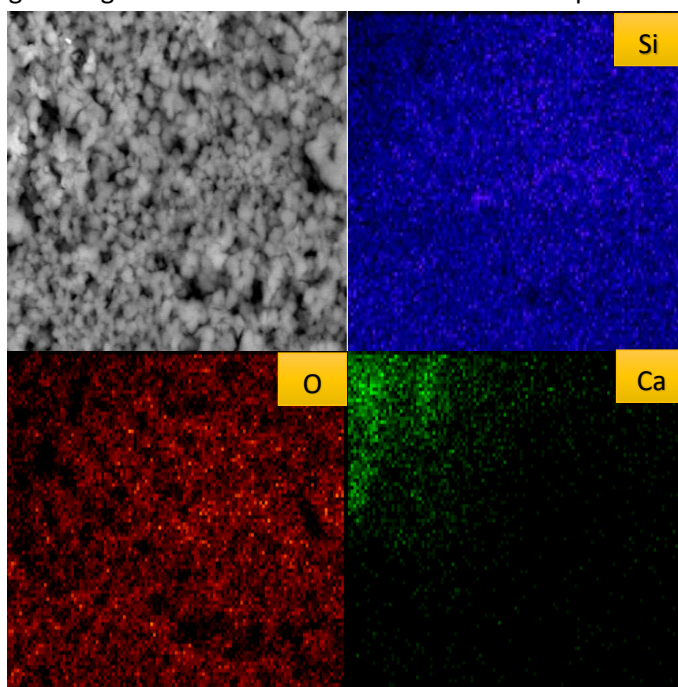


Figura 40. Imagen de la distribución de elementos químicos presentes en 1Ca/SBA-15.

7.9 Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para 1Ca/SBA-15

La figura 41 muestra el mapeo mediante microscopía electrónica donde se pueden observar los diferentes elementos químicos (Si, O y Ca) que están presentes en el material 1Ca/SBA-15, donde cuantitativamente se observa una proporción de Ca de 1.08 %wt. que se asemeja a lo agregado experimentalmente.

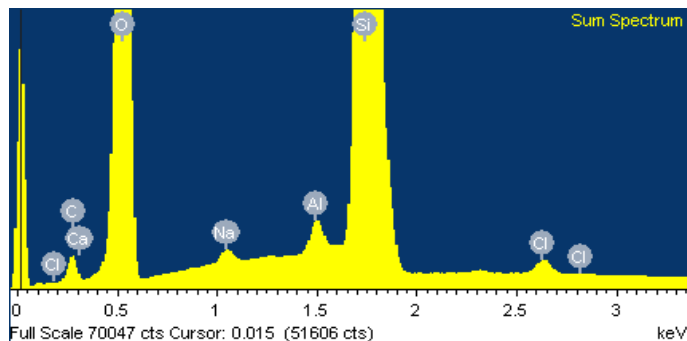


Figura 41. Espectro de emisión 1Ca/SBA-15.

Tabla 6. Porcentaje de elementos en 1Ca/SBA-15.

Elemento	Weight%	Atomic%
C	3.64	5.78
O	56.38	67.27
Si	38.08	25.88
Ca	1.08	0.51
Na	0.21	0.17
Al	0.29	0.21
Cl	0.32	0.17

7.10 Mapeo por microscopía electrónica para 3Ca/SBA-15

La figura 42 muestra el mapeo mediante microscopía electrónica donde se pueden observar los diferentes elementos químicos (Si, O y Ca) que están presentes en el material 3Ca/SBA-15 observándose el Ca muy disperso en el material formando aglomerados.

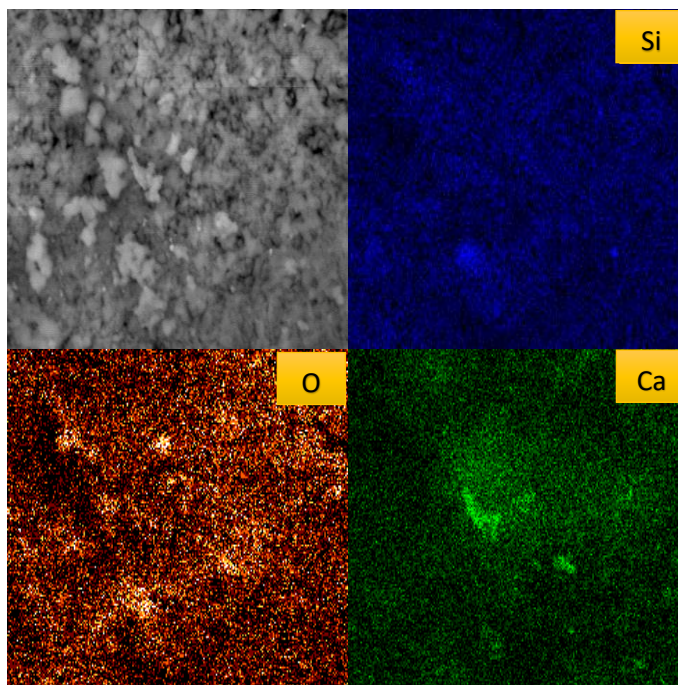


Figura 42. Imagen de la distribución de elementos químicos presentes en 3Ca/SBA-15.

7.11 Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para 3Ca/SBA-15

La figura 43 muestra los espectros de emisión, donde cuantitativamente se observa en mayor proporción oxígeno 56.63 %wt. y en un 2.63%wt. el calcio, lo cual indica que si hay presencia de Ca en el material 3Ca/SBA-15.

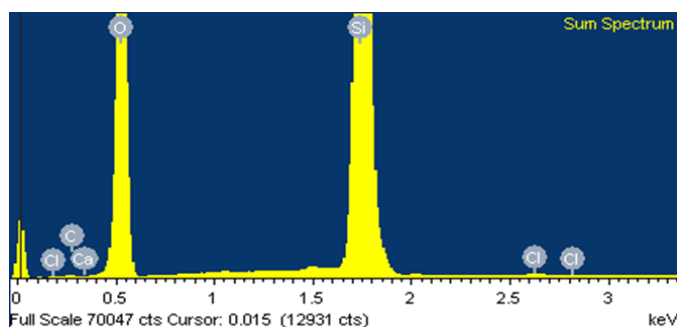


Figura 4. Espectro de emisión 3Ca/SBA-15.

Tabla 7. Porcentajes de elementos en 3Ca/SBA-15.

Elemento	Weight %	Atomic %
C	0.88	1.43
O	56.63	69.45
Si	39.73	0.07
Ca	2.63	1.29
Cl	0.13	0.07

8. Discusión de resultados de materiales SBA-15 dopados e inmovilizando lipasa *Candida rugosa*

8.1 Cinética de adsorción

La figura 43 muestra los porcentajes de adsorción de 0.4 mg/mL de lipasa con los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 3.5 en solución amortiguadora de glicina a los 120 minutos, se observa que los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 alcanzan el 34, 56, 58 y 66 % de adsorción de lipasa respectivamente. Este comportamiento se atribuye a la acidez de los materiales incrementando la adsorción al disminuir la acidez.

La disminución de acidez disminuye al incrementar el contenido de Ca, esto se atribuye a que el Ca en exceso forma en la superficie de los materiales aglomerados de CaO disminuyendo el área específica. Estos aglomerados funcionan como sitios de anclaje para la lipasa *Candida rugosa*. El tamaño de la lipasa *Candida rugosa* de 7 nm aproximadamente impide la adsorción en poro y esta solo se lleva a cabo en la superficie del material donde se encuentran los aglomerados de CaO. La lipasa interactúa solo en el área superficial donde se puede anclar gracias a la superficie irregular y a la presencia del CaO, que se encuentra en exceso y funciona como centros activos.

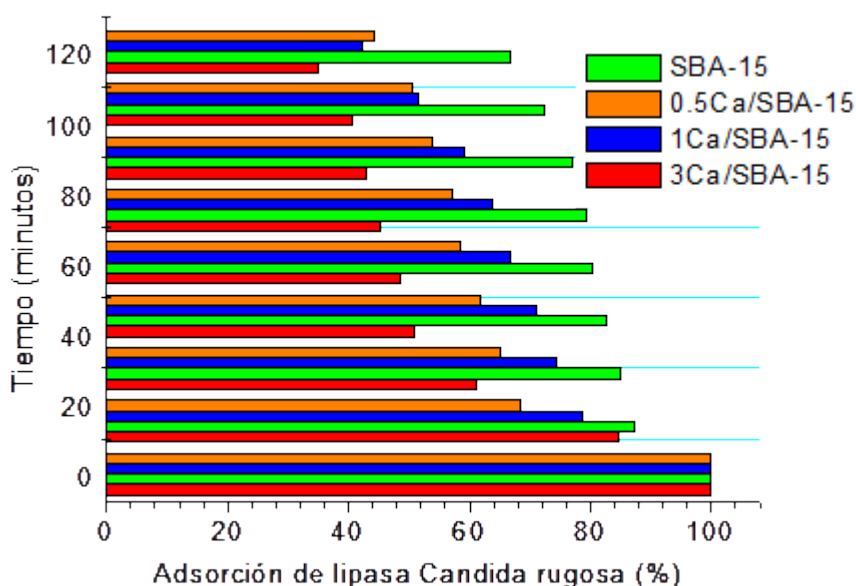


Figura 43. Adsorción de lipasa *Candida rugosa* en los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 3.5.

La figura 44 muestra el análisis cinético de la adsorción de lipasa *Candida rugosa* sobre los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 3.5, se observa que la adsorción sigue una cinética de pseudo primer orden. La afinidad de la lipasa incrementa con el contenido CaO, esto se atribuye a la disminución de la acidez que provoca el CaO por ser un óxido metálico alcalino.

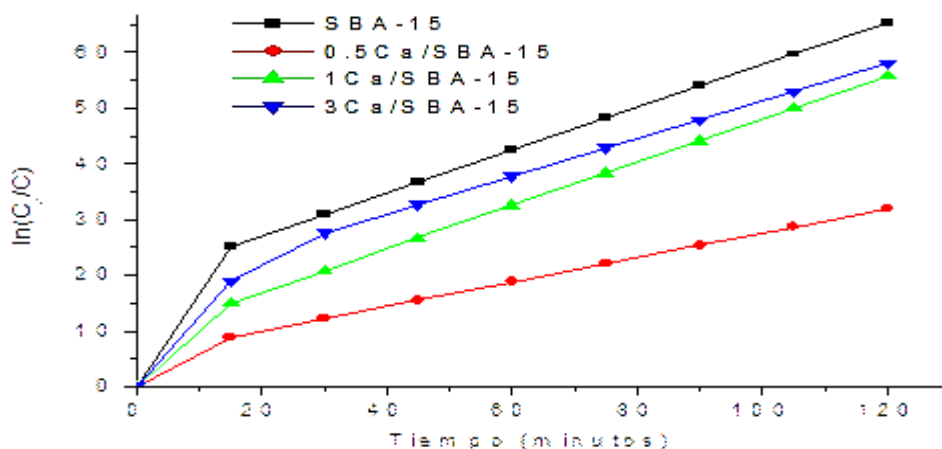


Figura 44. Análisis cinético de la adsorción de lipasa *Candida rugosa* en los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 3.5.

La tabla 7 muestra los parámetros cinéticos de la adsorción de lipasa sobre los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 3.5, calculadas por la linealización de la cinética $\ln(C/C_0)$ /tiempo, se observa que la adsorción de lipasa se ve favorecida con el material 3Ca/SBA-15 seguido de 1 Ca/SBA-15 y en menor proporción 0.5 Ca/SBA-15 y por último SBA-15. Los tiempos de vida media para la adsorción de la lipasa a pH 3.5 son 81, 69 y 60 minutos para SBA-15, 0.5Ca/SBA-15 y 1Ca/SBA-15 respectivamente estos tiempos disminuyen a 49 minutos con 3Ca/SBA-15, esto se atribuye a que la disminución de acidez de los materiales y al que se encuentra el CaO en forma de aglomerados en la superficie del material.

La constante de velocidad K es afectada por diversos factores destacando el pH, acidez del catalizador, contenido de CaO, diferencias morfológicas, dispersión del CaO en red y en superficie, tamaño de los aglomerados de nanocristales de CaO.

La constante de velocidad K se ve mayormente afectada con el contenido de CaO, las constantes de velocidad (K) disminuyen con los materiales 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15, esto se atribuye al grado de dispersión que presenta CaO. Hay una relación directa entre el porcentaje de adsorción de lipasa con la constante de velocidad a las condiciones de reacción estudiadas, por lo que a menor acidez las reacciones se llevaban más rápidamente logrando la adsorción de lipasa en menor tiempo.

Tabla 7. Constantes cinéticas de la adsorción de lipasa *Candida rugosa* en los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 3.5.

Material	$t_{1/2}$ (min)	K (min^{-1})
SBA-15	81	0.0086
0.5Ca/SBA-15	69	0.01
1Ca/SBA-15	60	0.0116
3Ca/SBA-15	49	0.0141

La figura 45 muestra los porcentajes de adsorción de 0.4 mg/mL de lipasa *Candida rugosa* con los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 7.5 en solución amortiguadora de glicina a los 120 minutos, se observa que los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 alcanzan el 26, 36, 38 y 54 % de adsorción de lipasa respectivamente. Estos resultados se atribuyen al pH del medio ya que en este la lipasa *Candida rugosa* se encuentra muy estable impidiendo la adsorción en el soporte.

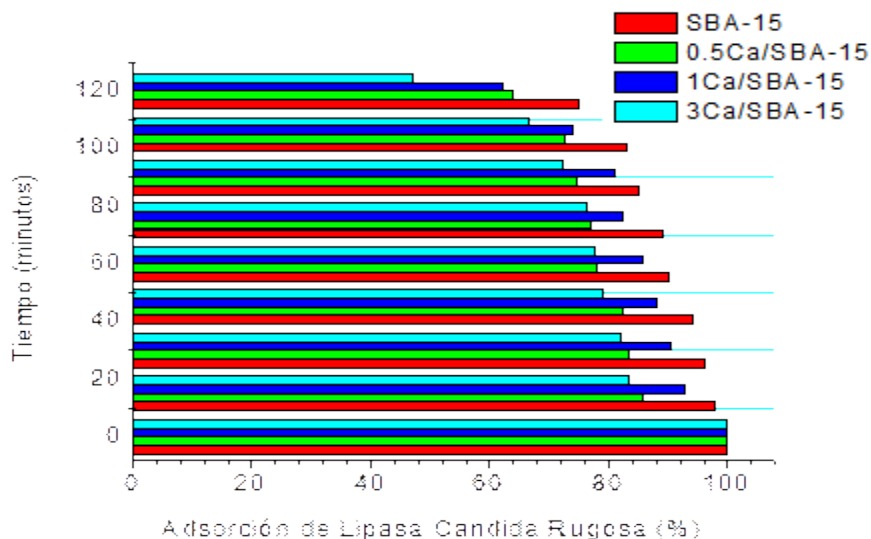


Figura 45. Adsorción de lipasa *Candida rugosa* en los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 7.5.

La figura 46 muestra el análisis cinético de la adsorción de lipasa *Candida rugosa* sobre los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 7.5, se observa que la adsorción sigue una cinética de pseudo primer orden. La afinidad de la lipasa *Candida rugosa* por el material incrementa poco con el contenido CaO, esto se atribuye a la disminución de la acidez que provoca el CaO por ser un óxido metálico alcalino y al medio compuesto por solución amortiguadora de glicina que hace que la lipasa

Candida rugosa pierda afinidad por el material ya que a este pH la lipasa es afín por materiales ácidos y no básicos.

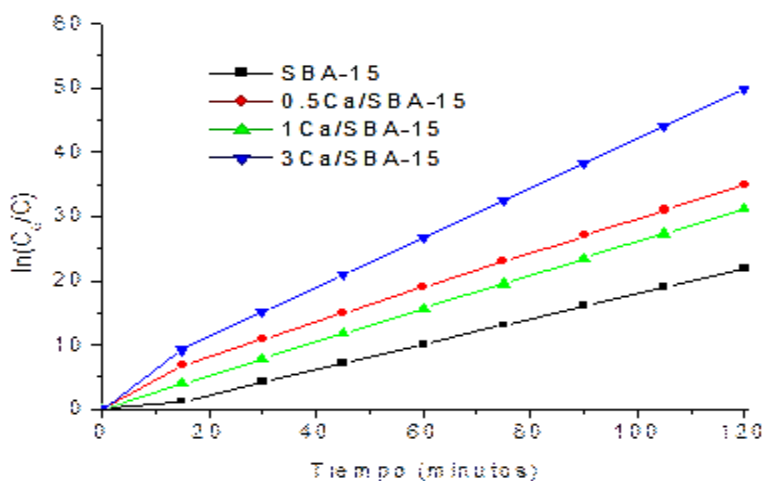


Figura 46. Análisis cinético de la adsorción de lipasa Candida rugosa en los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 7.5.

La tabla 8 muestra los parámetros cinéticos de la adsorción de lipasa sobre los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 7.5, calculadas por la linealización de la cinética $\ln(C/C_0)$ /tiempo, se observa que la adsorción de lipasa se ve favorecida con el material 3Ca/SBA-15 seguido de 1 Ca/SBA-15 y en menor proporción 0.5 Ca/SBA-15 y por último SBA-15. Los tiempos de vida media para la adsorción de la lipasa a pH 7.5 son 92, 87 y 80 minutos para SBA-15, 0.5Ca/SBA-15 y 1Ca/SBA-15 respectivamente estos tiempos disminuyen a 78 minutos con 3Ca/SBA-15, esto se atribuye a que la disminución de acidez de los materiales.

Tabla 8. Constantes cinéticas de la adsorción de lipasa Candida rugosa en los materiales SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 a pH 7.5.

Material	$t_{1/2}$ (min)	K (min ⁻¹)
SBA-15	92	0.0075
0.5Ca/SBA-15	87	0.0079
1Ca/SBA-15	80	0.0086
3Ca/SBA-15	78	0.0088

La solución amortiguadora de glicina juega un papel impetrante en la adsorción ya que esta hace que la lipasa Candida rugosa adquiera afinidad por catalizadores básicos cuando la solución es acida (pH 3.5) esto se atribuye a que la lipasa adquiere afinidad por sitios básicos y al incrementar el pH de la solución amortiguadora hace que esta afinidad disminuya, esto se atribuye que adquieren cargas no compatibles lipasa Candida rugosa material.

8.2 Microscopía electrónica de transmisión con filtro de energía (EFTEM)

La figura 42 muestra las imágenes de microscopía electrónica de transmisión con filtro de energía (EFTEM) del material 3Ca/SBA-15, se observa la migración de las especies químicas involucradas tanto en el material que funciona como soporte, así como los elementos que componen a la lipasa *Candida rugosa*. Para este análisis se monitorea el N que posee la lipasa *Candida rugosa*, esto es debido a que el soporte no contiene N en su estructura.

La figura 42 se ilustra la migración del N hacia las fronteras del grano del SiO₂ que forma el SBA-15 donde muestra un área verde con una alta densidad que indican la presencia de N que compone a la lipasa *Candida rugosa* elementos filtrados. También se observan densidades de C y Si (color rojo y azul respectivamente) las cuales pertenecen al material SBA/-15.

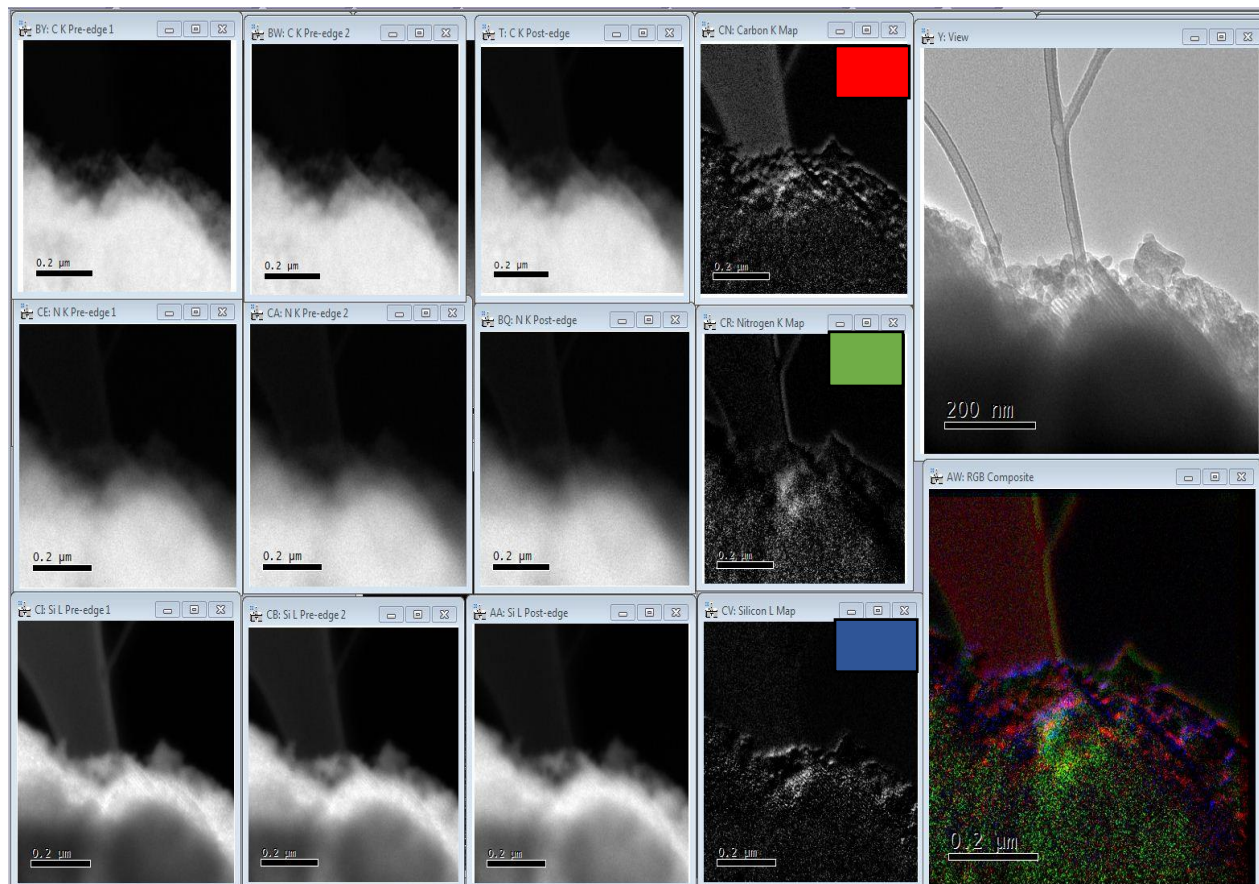


Figura 42. Microscopía electrónica de transmisión con filtro de energía (EFTEM) 3Ca/SBA-15.

9. Conclusiones y perspectivas

Los materiales mesoporosos dopados con calcio, sintetizados en este trabajo por método de incorporación directa del metal presentaron patrones de difracción de rayos X similares a los mesoporosos del tipo SBA-15, esto se atribuye a que CaO se encuentra en forma de microcristales muy dispersos. La espectroscopia de infrarrojo ayudo a identificar los grupos funcionales presentes en superficie de los materiales obtenidos. La microscopía electrónica de barrido permitió estudiar la morfología superficial de los materiales destacando el arreglo mesoporoso hexagonal que permanece en la SBA-15 dopada.

La microscopía de transmisión permite identificar el ordenamiento típico de los poros del SBA-15 y cuantificar el calcio soportado por medio de la técnica de EDS. el arreglo mesoporoso hexagonal permanece con los materiales dopados lo que indica que el Ca^{2+} altera muy poco el arreglo debido a que la inclusión del Ca^{2+} es mínima en la red del SBA -15 , esto se atribuye al tamaño del radio iónico del Ca^{2+} que es más del doble que el de Si^{4+} , dejando la mayor parte en la superficie en forma de CaO obstruyendo los poros.

La fisisorción de nitrógeno permite conocer el área específica, diámetro y volumen de poro, se observa que los materiales dopados conservan el diámetro de poro y solo disminuye el volumen de N_2 adsorbido lo que indica que Calcio que está en exceso y se encuentra en superficie en forma de CaO obstruyendo los poros por lo tanto disminuye el área específica.

La desorción de NH_3 a temperatura programada (TPD) permitió conocer la acidez total de los materiales, se obtuvo que disminuye la acidez total al incrementar el contenido de Ca, esto se atribuye a que el CaO un oxido metálico alcalino. Esto indica que la técnica de dopado modifica considerablemente la acidez del SBA-15.

Se logró sintetizar SBA-15, 0.5Ca/SBA-15, 1Ca/SBA-15 y 3Ca/SBA-15 con características adecuadas para soportar la lipasa, la presencia de Ca aumenta la adsorción de la lipasa, esto se atribuye a que el Ca actúa como sitio de anclaje de la lipasa esto se comprobó con la técnica de EFTEM donde se muestra un área verde con una alta densidad que indican la presencia del N que compone a la lipasa Candida rugosa. Este elemento se monitorio debido a que los materiales no presentan N solo están formados por Si, O, Ca y C.

Se pretende dar seguimiento al estudio de la inmovilización de lipasa Candida rugosa utilizando SBA-15 dopando con diferentes metales a diferentes porcentajes, así como utilizar diferentes materiales microporosos, mesoporosos y macroporosos con diferentes técnicas de adsorción de enzimas.

También se pretende estudiar la actividad enzimática de los biomateriales sintetizados en la transesterificación de ácidos grasos.

10. Bibliografía

1. U. Arellano, J.A. Wang, L.F. Chen, G.Z. Cao, M. Asomoza, S. Cipagauta, *J. Mol. Catal A: Chem.*, **2016**, 421, 66-75.
2. S. M.L. dos S. et, *Microporous and Mesoporous Materials*, **2013**, 180, 284–292.
3. Ryoo R., Jun S., *J. Phys. Chem. B.*, **1997**, 101, 317.
4. Schüth, K. Sing, J. Weitkamp, *Handbook of Porous Solids*, **2002**, I–V, Wiley-VCH.
5. B.J. Schoeman, J. Sterte, J.-E. Otterstedt, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 994.
6. A.H. Janssen, A.J. Koster, K.P. de Jong *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 1102.
7. I. Schmidt, A. Boisen, E. Gustavsson, K. Ståhl, S. Pehrson, S. Dahl, A. Carlsson, C.J.H. Jacobsen *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 4416.
8. Velu, S. Wang, I. Okazaki. Suzuki, k. Tomura, S., *Microporous and Mesoporous materials*, **2002**, 54, 113-126.
9. J.S. Beck, C.T.-W. Chu, I.D. Johnson, C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.W. Vartuli, *WO Patent*, **1991**, 91/11390.
10. T. Yanagisawa, T. Shimizu, K. Kuroda, C. Kato *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, 63, 988.
11. Betigeri S.S., Neau S.H., *Biomaterials*, **2002**, 23, 3627-3636.
12. R. Nava, B. Pawelec, J. Morales, R.A. Ortega, J.L.G. Fierro. *Microporous Mesoporous Mat.*, **2011**, 118, 189-201.
13. R. Huirache, B. Pawelec, E. Rivera, R. Nava, J. Espino and J.L.G. Fierro, *Appl. Catal. B- Environ*, **2009**, 92, 168-184.
14. A. Wingen, F. Kleitz, F. Schüth M. Baerns (Ed.), *Basic Principles in Applied Catalysis*, Springer, Berlin, **2003**, 281.
15. A.P. Wight, M.E. Davis, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 3589.
16. D. Y. Zhao, J. L. Feng, Q. S. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka y G. D. Stucky, *Science*, **1998**, 279, 548- 552.
17. P. D. Yang, D. Y. Zhao, B. F. Chmelka y G. D. Stucky, “, *Chem. Mater.*, **1998**, 10, 2033-2036.
18. P. T. Tanev y T. J. Pinnavaia, *Science*, **1995**, 267, 865-867.
19. P.R.A.F. Garcia, R.N. Bicev, C.L.P. Oliveira, O.A. Sant’Anna, M.C.A. Fantini, *Microporous Mesoporous Mat.*, **2016**, 235, 59-68.
20. D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *Science*, **279** **1998**, 548.
21. A. Galarneau, D. Desplandier-Giscard, F. di Renzo, F. Fajula, *Catal. Today*, **2001**, 68, 191.
22. K. Cassiers, T. Linssen, M. Mathieu, M. Benjelloun, K. Schrijnemakers, P. Van Der Voort, P. Cool, E.F. Vansant, *Chem. Mater.*, **2002**, 14, 2317.
23. N. Igarashi, K.A. Koyano, Y. Tanaka, S. Nakata, K. Hashimoto, T. Tatsumi. *Micropor. Mesopor. Mater.*, **2003**, 59, 43.
24. A.S. O’Neil, R. Mokaya, M. Poliakoff, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 10636.

25. R. Anwander, *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 4419.
26. Lee D.-G., et al., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, 57, 62-66.
27. Salis A., et al., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, 57, 262-269.
28. Steiner J., Wilson B., Williams D., *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, **2003**, 134, 151-159.
29. Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.H., *Biotechnol. Adv.*, **2001**, 19, 627-662.
30. Alam, M., Vance, D. E., Lehner, R., *Biochem*, **2002**, 41, 6679-6687.
31. J. G-Bacerio, J. R. Hernández et al, *Rev. Colomb. Biote.*, **2010**, 12, 124-140.
32. J.M. Mancheño, M. Pernas, M.J. Martínez, B. Ochoa, M.L. Rúa, J. Hermoso, *J Mol Biol*, **2003**, 332, 1059-1069.
33. Pablo Domínguez de María Jose M. Sánchez-Montero José V. Sinisterra Andrés R. Alcántara, *Biotechnology Advances*, **2006**, 24, 180-196.
34. A. Corma. *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 2373-2419.
35. P. Schacht, L. Noreña-Franco, J. Ancheyta, S. Ramírez, I. Hernández-Pérez, L.A. García. *Catalysis Today*, **2004**, 98, 115-121.
36. Wong, S.S.; Wong, L.J.C., *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14, 866-874.
37. Reslow, M. Adlercreutz, P.; Mattiasson, B., *J. Biochem.*, **2002**, 172, 573-578.
38. Abbot, B.J. *Adv. Appl. Microbiol.*, **1976**, 20: 203-257.
39. Miguel Arroyo, *Ars Pharmaceutica*, **1998**, 39: 2, 23-39.
40. *Analytical Methods in Fine Particle Technology*. Paul A. Webb, Clyde Orr. *Micromeritics Instrument Corporation*, **1997**, 325.
41. *Principios de análisis instrumental*, Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman, 5ª Edición, Ed. Mac Graw Hill. **2008**,
42. *Modern techniques of Surface science*, Cambridge University Press, **1986**, 329, 355.
43. H.L. Lee, N.T. Flynn - *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*, Springer, **2006**.
44. Rouquerol F., Rouquerol J. and Sing K. *Adsorption by Powders and Porous Solids*. Academic Press, **1999**.
45. *Modern techniques of Surface science*, Cambridge University Press, **1986**, 280-324.

11. Anexos

11.1 Trabajos presentados en congresos nacionales



SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.

“La química nos une”

otorga el presente

Reconocimiento

a

Julio Cesar Méndez Medina, Ulises Arellano Sánchez, Dolores Silvia Solís Mendiola, Maximiliano Asomoza Palacios

por su participación presentando el **Trabajo Profesional en Modalidad Cartel** titulado

Síntesis de biocatalizadores a base de SBA-15 y lipasa Candida Rugosa. QMAT-P2-C

en el marco de las actividades del

52° Congreso Mexicano de Química

36° Congreso Nacional de Educación Química

Puerto Vallarta, Jalisco, México

26 al 29 de septiembre de 2017



Dra. María del Jesús Rosales Hoz
Presidente de Congreso

Sociedad Química de México, A.C.



Dra. Ruth Padilla Muñoz
Presidente Local de Congresos, 2017

CUCEL, UdeG

OTORGAN EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

Julio Cesar Méndez Medina, Ulises Arellano Sánchez,
Dolores Silvia Solís Mendiola y Maximiliano Asomoza Palacios

POR SU DESTACADA PARTICIPACIÓN COMO PONENTES DEL CARTEL:

“Síntesis de biocatalizadores a base de SBA-15
y lipasa Candida Rugosa”

DENTRO DEL

XV CONGRESO MEXICANO DE CATALISIS
VI CONGRESO INTERNACIONAL

Desarrollo Sustentable impulsado por la Catalisis


LLEVADO A CABO EN LA CIUDAD DE MONTERREY, N.L., DEL 1 AL 6 DE OCTUBRE DE 2017

Alere Flammam Veritatis

Octubre, 2017



PRESIDENTE DEL COMITÉ CIENTÍFICO
Dr. Jose Antonio de los Reyes



PRESIDENTA DE LA ACADEMIA DE CATALISIS, A.C.
Dra. Julia Aguiar Pliego