

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS

00550
21

PREPARACION DE SENSORES
QUIMICOS Y BIOQUIMICOS
POR LA TECNICA DE SOL - GEL

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q. ENRIQUE MORALES ZAMUDIO

TUTORA: DRA. LUZ ELENA VERA AVILA

Ciencias
Quimicas

MEXICO D.F.

FEBRERO DE 2003

TESIS CON
VALIA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Fernando García Tamayo
Vocal: Dra. Josefina de Gyves Marciniak
Secretario: Dra. Martha Patricia García Camacho
Primer Suplente: Dra. Adriana Morales Pérez
Segundo Suplente: Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

Lugar donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Cromatografía de Líquidos, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, División de estudios de Posgrado, UNAM.

Tutora:

Dra. Luz Elena Vera Avila



Sustentante:

Q. Enrique Morales Zamudio

Enrique Morales Zamudio

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso
el contenido de mi trabajo recepcionado
NOMBRE: Enrique Morales Zamudio
FECHA: 17 Enero 2005
FIRMA: Morales Zamudio Enrique

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

PAGINACION DISCONTINUA

Agradecimientos

Agradezco a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DEGEP) por la beca que me otorgó durante los estudios de maestría.

Doy gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero recibido para la realización de este trabajo a través del proyecto CONACYT Clave 34827-E.

Mi gratitud para el mismo Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los estudios de maestría.

A la Dra. Luz Elena Vera Ávila, quien dirigió el presente trabajo con paciencia y enseñanza, mil gracias.

A la M en C. Rosario Covarrubias quien me brindó apoyo y supervisión técnica durante el desarrollo del trabajo experimental.

Al Dr. Michel Thibert por su apoyo incondicional en la escritura de este trabajo.

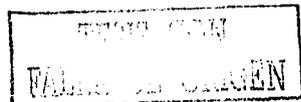
Agradezco a todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo:

Dra. Victoria Chagoya (I.F.C), Dr. Octavio Reyes,

Dra. Antonia Dosal, Dra. Araceli Peña, Dra. Evangelina Camacho,

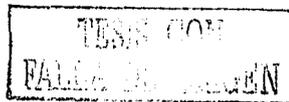
Armando Butanda, Juan Carlos Vázquez

y a todos los sinodales quienes realizaron valiosas observaciones a este trabajo.



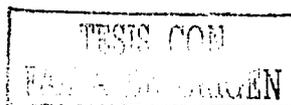
Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres, hermanos y a toda mi familia que siempre ha estado presente apoyándome, pero sobre todo lo dedico a *Ruth y a María Fernanda*.

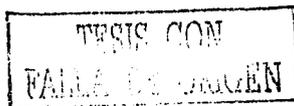


Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	4
Objetivos	8
Capítulo I Generalidades y antecedentes	9
1. Técnica del sol-gel	9
1.1. Conceptos básicos del proceso del sol-gel	9
1.2. Hidrólisis y condensación de óxidos de silicio	11
1.2.1. Hidrólisis y condensación del ácido silícico	12
1.2.2. Hidrólisis y condensación de alcóxidos de silicio	15
1.2.3. Moléculas precursoras en la técnica del sol-gel	17
1.2.4. Efectos de catálisis	18
1.2.5. Mecanismos de hidrólisis	19
1.3. Gelación	20
1.4. Maduración de geles	24
2. Características generales de las enzimas	28
2.1. Determinación de la actividad enzimática	29
2.1.1. Aproximación de equilibrio rápido (Michaelis-Menten)	30
2.2. Factores que afectan la actividad enzimática	33
2.3. Características de la α -Amilasa	37
2.4. Características de la Catalasa	38
3. Bibliografía	40
Capítulo II Desarrollo experimental	41
1. Soluciones y reactivos	41
1.1. Reactivos	41
1.2. Soluciones	42
2. Equipo y materiales	43
3. Metodología experimental	44
3.1. Obtención de las condiciones óptimas para la preparación de geles	44



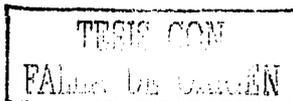
3.2. Preparación de geles dopados con indicadores de pH y metalocrómicos	47
3.2.1. Pruebas de reversibilidad o funcionamiento para geles dopados con indicadores	47
3.3. Técnica de preparación para geles dopados con albúmina	49
3.3.1. Cuantificación de la proteína no encapsulada en geles dopados con BSA	50
3.4. Preparación de geles dopados con α -Amilasa o Catalasa	53
3.4.1. Pruebas realizadas a geles dopados con α -Amilasa	54
3.4.2. Pruebas realizadas a geles dopados con Catalasa	57
3.4.3. Obtención de Km para la Catalasa libre y encapsulada	61
4. Bibliografía	62
Capítulo III Resultados y Discusión	63
1. Obtención de las condiciones óptimas para la preparación de geles	65
2. Evaluación de los geles dopados con indicadores	70
3. Encapsulamiento de una proteína en el sol-gel	76
4. Encapsulamiento de la α -Amilasa en el sol-gel	83
5. Encapsulamiento de la enzima Catalasa en el sol-gel	90
6. Determinación de la constante de Michaelis para la Catalasa libre y encapsulada	106
7. Bibliografía	112
Conclusiones	114



Índice de Figuras

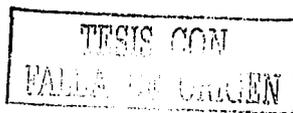
I.1	Formación de anillos y cadenas por un monómero bifuncional	11
I.2	Distribución de silicalos a 25 °C, a distintos valores de pH	13
I.3	Mecanismo de hidrólisis ácida de alcoxisilanos	19
I.4	Mecanismo de hidrólisis básica de alcoxisilanos	20
I.5	Esquema de la doble capa eléctrica	22
I.6	Esquema del potencial de la estabilización de coloides	24
I.7	Variación de la solubilidad de la sílica con el radio de curvatura de la superficie	26
I.8	Comportamiento típico de una curva de progreso	29
I.9	Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de la enzima	30
I.10	Determinación de la constante de Michaelis	33
I.11	El efecto de un inhibidor competitivo en la representación de Lineweaver-Burk	35
I.12	El efecto de un inhibidor no competitivo en la representación de Lineweaver-Burk	35
I.13	Determinación de la energía de activación de una reacción enzimática, según la ecuación de Arrhenius	36
I.14	Comportamiento de una enzima en un intervalo de pH	37
III.1	Representación gráfica de la cantidad de xerogel obtenido al variar la relación molar TEOS: HCl	66
III.2	Representación gráfica de la cantidad de xerogel obtenido al variar la relación molar TEOS: H ₂ O	67
III.3	Representación gráfica de la variación de la absorbancia con respecto a la concentración de albúmina a 700 nm	78
III.4	Representación gráfica de la variación de la absorbancia con respecto a la concentración del almidón a 595 nm	85
III.5	Patrón cinético de la degradación de almidón por α -Amilasa libre y encapsulada	86
III.6	Representación gráfica del porcentaje de sustrato degradado en cartuchos empacados con gel dopado con α -Amilasa durante los ciclos sucesivos de operación	89
III.7	Patrón cinético de la producción de O ₂ a partir de H ₂ O ₂ , catalizada por catalasa libre y encapsulada en sol-gel	93
III.8	Curvas cinéticas de 4 lotes de gel dopado con Catalasa, preparados independientemente	95

III.9	Curvas cinéticas de un gel dopado con Catalasa, obtenidas en ciclos de operación sucesivos	97
III.10	Curvas cinéticas obtenidas con geles dopados con Catalasa y secados por diferentes métodos	100
III.11	Curvas cinéticas obtenidas con gel dopado con Catalasa en un segundo y tercer ciclo de operación, intercalando entre ambos un tratamiento con Triton x-100	102
III.12	Representación gráfica del porcentaje de H ₂ O ₂ degradado en cartuchos empacados con gel dopado con Catalasa durante ciclos sucesivos de operación	104
III.13	Representación gráfica de la velocidad inicial ($\mu\text{mol de O}_2/\text{min}$) vs la concentración de sustrato (H ₂ O ₂ : μM) para la Catalasa libre	107
III.14	Representación gráfica de $1/V$ frente a $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ para la obtención de los parámetros cinéticos de la Catalasa libre	108
III.15	Representación gráfica de la velocidad inicial ($\mu\text{mol de O}_2/\text{min}$) vs la concentración (H ₂ O ₂ : μM) para la Catalasa encapsulada.	108
III.16	Representación gráfica de $1/V$ frente a $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ para la obtención de los parámetros cinéticos de la Catalasa encapsulada	109

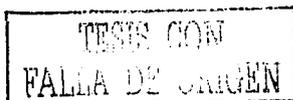


Índice de Tablas

I.1	Propiedades físicas de algunos tetraalcoxisilanos	17
I.2	Constates de velocidad de hidrólisis para varios tetraalcoxisilanos (RO) ₄ Si a 20 °C	18
I.3	Tiempos de gelificación de TEOS usando diferentes catalizadores y valores de pH	18
II.1	Relaciones molares tetraalcoxisilanos:HCl para la preparación de sol-gel	45
II.2	Cantidad de reactivos en la mezcla de reacción para la obtención de las mejores condiciones en la preparación de geles	45
II.3	Relaciones molares de TEOS:H ₂ O para la preparación de sol-gel	46
II.4	Cantidades de reactivos agregados para estudiar el efecto de la proporción de agua en la formación de sol-gel	46
II.5	Cantidad de reactivos utilizados para preparar la curva de calibración de BSA	51
II.6	Concentración de los estándares y cantidades de reactivos utilizados para construir la curva de calibración de almidón	55
II.7	Cantidades de reactivos utilizados en los ensayos para determinar la Km de la Catalasa libre y encapsulada	61
III.1	Cantidad de gel obtenido al variar la relación molar TEOS:HCl utilizada para la formación de estos geles	66
III.2	Cantidad de gel obtenido al variar la relación molar TEOS:H ₂ O	67
III.3	Comparación entre el pH de la fase acuosa y la cantidad de gel obtenido en los experimentos de variación de las relaciones molares TEOS:HCl y TEOS:H ₂ O	68
III.4	Funcionamiento y estabilidad de los geles dopados con indicadores de pH	71
III.4A	Resultados de experimentos con indicador en solución e inmovilizado en gel	74
III.4B	Resultado de experimentos con indicador en solución e inmovilizados en gel	74
III.5	Variación de la absorbancia en función de la concentración de albúmina determinada en un espectrofotómetro a 700 nm	77
III.6	Cantidad de proteína presente en el primer lavado, con agua, de los xerogeles dopados con albúmina	79
III.7	Cantidad de proteína presente en el segundo lavado, con metanol-agua 60:40 (v/v) de los xerogeles dopados con albúmina	79
III.8	Cantidad de proteína presente en el tercer lavado, con agua, de los xerogeles	79



	dopados con albúmina	
III.9	Cantidad de proteína presente en el cuarto lavado, con metanol-agua 60:40 (v/v) de los xerogeles dopados con albúmina	79
III.10	Prueba cualitativa de la presencia de albúmina en los xerogeles previamente lavados	81
III.11	Cantidad de proteína presente en el primer lavado, con agua, de los hidrogeles dopados con albúmina	82
III.12	Cantidad de proteína presente en el segundo lavado, con metanol-agua 60:40 (v/v) de los hidrogeles dopados con albúmina	82
III.13	Prueba cualitativa de la presencia de albúmina en los hidrogeles previamente lavados	83
III.14	Variación de la absorbancia en función de la concentración de almidón en los estándares, determinada en un espectrofotómetro a 595 nm	85
III.15	Valores de actividad inicial determinados para la misma cantidad de α -Amilasa libre y α -Amilasa encapsulada	86
III.16	Valores de actividad inicial determinadas para la misma cantidad de Catalasa libre y encapsulada en gel, bajo condiciones idénticas	93
III.17	Valores de actividad inicial de geles dopados con Catalasa que fueron preparadas en días distintos	96
III.18	Valores de actividad inicial de un gel dopado con Catalasa en ciclos de operación sucesivos	98
III.19	Valores de actividad inicial en geles dopados con Catalasa que fueron secados por diferentes métodos	99
III.20	Valores de actividad inicial de un gel antes y después de un tratamiento con Triton X-100	102
III.21	Datos de la concentración de sustrato y de la velocidad inicial para la Catalasa libre	106
III.22	Parámetros enzimáticos de la Catalasa libre	106
III.23	Datos de la concentración de sustrato y de la velocidad inicial para la Catalasa encapsulada	107
III.24	Parámetros enzimáticos de la Catalasa encapsulada	110



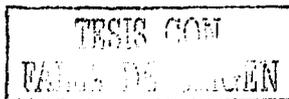
Resumen

Se desarrollaron metodologías basadas en la técnica de sol-gel para la inmovilización física de pequeñas moléculas orgánicas (indicadores) y de macromoléculas biológicas en un soporte sólido.

Utilizando como precursor al tetraetoxisilano (TEOS) y catálisis ácida para la preparación del gel de sílice, se buscó en una primera etapa optimizar las condiciones experimentales con el fin de obtener el máximo rendimiento de la reacción. Posteriormente, empleando las proporciones óptimas TEOS:H₂O:HCl encontradas, se introdujeron en la mezcla de reacción indicadores de pH o metalocrómicos disueltos en metanol. El gel obtenido, secado, molido y empacado en cartuchos, respondió reversiblemente a cambios en el pH o a la presencia del ion metálico, según el caso, en la solución percolada.

Para el encapsulamiento de biomoléculas se modificaron varias condiciones. Las reacciones de hidrólisis y policondensación se dejaron proceder hasta la obtención de un sol viscoso, al cual se le ajustó el pH por adición de un buffer de fosfatos previo a la introducción de la biomolécula. Asimismo, el secado del gel se realizó bajo condiciones controladas. Con estas modificaciones se encapsularon exitosamente una proteína y dos diferentes enzimas. Las pruebas realizadas a los geles dopados mostraron que, con un protocolo único, es posible inmovilizar permanentemente diferentes biomoléculas, preservando en buena medida su actividad. Adicionalmente se demostró que las enzimas encapsuladas se pueden trabajar en ciclos sucesivos de operación y regeneración con una mínima pérdida de actividad.

En conclusión, los materiales obtenidos presentaron buen potencial para ser utilizados como sensores químicos o bioquímicos ya que las moléculas de interés quedaron permanentemente atrapadas, reteniendo su reactividad característica y su funcionalidad química.



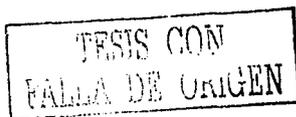
Abstract

Methodologies based on the sol-gel technique were developed for the physical immobilization of small organic molecules and biological macromolecules in a solid support.

Using tetraethoxysilane (TEOS) as precursor and acid catalysis for the preparation of the silica gel, the optimal experimental conditions to obtain the maximal yield of the reaction were first determined. Then using the best TEOS : H₂O : HCl ratio, some pH and metal ion indicators dissolved in methanol were added to the reaction mixture. The gels obtained by this procedure were finally dried, grounded and packed in cartridges to test their sensing capability. The gels doped with pH indicators reversibly responded to changes in the pH of the solution percolated through the cartridge; similarly, the glasses doped with metal ion indicators also responded to the presence of the target ion in the test solution.

For the encapsulation of the biomolecules it was necessary to modify some experimental conditions. The hydrolysis and condensation reactions were left to proceed until a viscous sol was formed and prior to the addition of the biomolecule, the pH of the mixture was adjusted with phosphate buffer; besides, the drying of the gel was performed under more delicate and controlled conditions. With these modifications, it was possible to accomplish the successful encapsulation of a protein and two different enzymes. The tests carried out on the doped gels showed that it was possible to use the same protocol for the permanent immobilization of different biomolecules preserving an interesting proportion of their activity. Additionally, it was shown that the encapsulated enzymes can be used in successive operation-regeneration cycles with minimal loss of activity.

In conclusion, the doped sol-gel glasses synthesized in this work showed a good potential to be used as chemical or biochemical sensors because the entrapped molecules were



permanently immobilized retaining their characteristic reactivity and chemical functionality.

Introducción

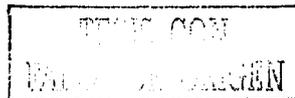
La tecnología sol-gel concebida y desarrollada en la primera mitad del siglo XX, está basada en la habilidad que tienen ciertos precursores hidrolíticamente lábiles para formar óxidos metálicos o semi-metálicos sólidos cuando se ponen en contacto con un medio acuoso. Los vidrios sol-gel obtenidos por este proceso simple, que se lleva a cabo a temperatura ambiente, presentan propiedades muy interesantes como: transparencia óptica, resistencia química y mecánica, porosidad ajustable (según las condiciones utilizadas en el proceso), baja toxicidad y mínimo hinchamiento en disolventes orgánicos, a diferencia de otros materiales poliméricos.

Durante mucho tiempo los materiales sol-gel fueron utilizados casi exclusivamente en el área de catálisis, pero en las últimas décadas del siglo pasado diversos investigadores empezaron a experimentar el dopado de la matriz con diferentes moléculas orgánicas. Los estudios y observaciones realizados permitieron corroborar que la adición de bajas concentraciones de moléculas orgánicas al sistema sol-gel tenía poco efecto en la formación de la red polimérica ya que las moléculas dopantes no se incorporaban a la red sino que quedaban confinadas en los poros del sólido formado. Además, se constató que las moléculas físicamente atrapadas durante la formación del polímero quedaban permanentemente encapsuladas una vez que el sólido se consolidaba; sin embargo, la reactividad de las moléculas no se alteraba con el encapsulamiento y eran capaces de responder a cambios en el medio externo, como lo harían si estuvieran en solución aunque con una cinética más lenta. Estos experimentos abrieron amplias perspectivas para la preparación de sensores químicos y bioquímicos basados en la técnica sol-gel.

En 1990 Avnir [1] y colaboradores reportaron por primera vez la aplicación de vidrios sol-gel dopados con indicadores ácido-base como sensores de pH. Este mismo grupo también reportó el encapsulamiento de reactivos metalocromicos como sensores químicos de metales [2].

Aunque se pensaba que el protocolo utilizado en la formación del sol-gel no era compatible con las condiciones requeridas para la sobrevivencia del material biológico, en 1984 Venton [3] mostró que anticuerpos contra la progesterona encapsulados en polímeros sol-gel, retenían sus propiedades de interacción y reconocimiento. Posteriormente, en 1985 Glad [4] reportó el encapsulamiento de varias enzimas y células vivas funcionales en este tipo de matrices. De esta manera quedó establecido que los métodos clásicos de sol-gel podían ser modificados para encapsular proteínas y células y que el material obtenido mostraba la actividad característica de las especies atrapadas, ya que la matriz polimérica era suficientemente permeable para permitir la difusión de pequeñas moléculas hacia el interior sin que hubiera pérdida de las biomoléculas.

El trabajo de estos pioneros no fue reconocido sino hasta la década de los 90's cuando la técnica fue aplicada independientemente por Braun [5], Yamanaka [6], Ellerby [7] y Wang [8] para el encapsulamiento de diversas enzimas, proteínas y anticuerpos. Desde entonces, una gran variedad de sustancias biológicas, entre las cuales se incluyen anticuerpos catalíticos, DNA, RNA, antígenos, bacterias vivas, hongos, células de plantas y animales e inclusive protozoarios, han sido encapsulados en sílica, óxidos metálicos, organosiloxanos y polímeros híbridos de sol-gel [9]. Estos "cerámicos vivos" pueden llegar a tener importantes aplicaciones como sensores ópticos o electroquímicos, materiales para el diagnóstico clínico, catalizadores y aún como órganos bioartificiales. El estado actual de las investigaciones al momento de iniciar este trabajo incluye trabajos en donde se han encapsulado indicadores de pH como la fenolfataleína, rojo de metilo, naranja de metilo, [1,2] así como indicadores metalocrómicos como son el negro de eriocromo T y la 1,10 orto fenantrolina. De la misma forma se encuentran una serie de trabajos en donde se han encapsulado enzimas como la superóxido dismutasa, mioglobina y el citocromo c [7,10], la Catalasa [10] aunque en ellos no se reportan datos numéricos de la actividad de estas enzimas reduciéndose solo a realizar una comparación semicuantitativa entre la enzima libre y la encapsulada. Con respecto a la α -Amilasa no se encuentra ningún trabajo acerca de su inmovilización por esta técnica.

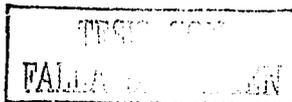


Sin embargo, aunque existen esta serie de artículos sobre el tema, hasta la fecha persisten varios problemas en la técnica del sol-gel que deben ser resueltos y algunas condiciones experimentales requieren ser optimizadas. Por ejemplo, se necesitan desarrollar protocolos más biocompatibles para reducir la pérdida de la actividad de las moléculas durante el encapsulamiento, se deben encontrar condiciones que permitan disminuir el encogimiento del material y el colapso de los poros durante el secado, se requiere mejorar la estabilidad mecánica y optimizar la porosidad del polímero para no afectar la eficiencia y el perfil de respuesta de la molécula huésped.

De hecho, la falta de una tecnología universalmente aplicable implica que sea necesario ensayar una gran cantidad de condiciones y realizar múltiples modificaciones al proceso cada vez que se desea encapsular una biomolécula diferente o realizar una aplicación novedosa del biomaterial.

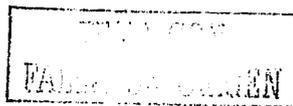
El presente trabajo pretende contribuir al desarrollo de materiales dopados basados en la técnica del sol-gel, con posible aplicación en el área de sensores o en procesos catalíticos. Para ello, se ha buscado optimizar las condiciones experimentales en las diferentes etapas de la técnica sol-gel tanto para el encapsulamiento de pequeñas moléculas orgánicas como el de macromoléculas biológicas. En este último caso, en el cual se han concentrado mayormente los esfuerzos realizados, se ha tratado de establecer un protocolo único de preparación de los geles aplicable al encapsulamiento de proteínas y enzimas de diferentes tamaños. La optimización de condiciones para la preparación de estos biomateriales se ha basado en tres diferentes ejes:

1. Preservar al máximo la actividad de la biomolécula
2. Obtener un material de porosidad adecuada, a través del cual puedan difundir sustratos de diversos tamaños, tanto pequeñas moléculas como grandes polímeros
3. Lograr que dicho material pueda ser regenerado y reutilizado



Bibliografía

1. R.Zusman, C. Rottman, M. Ottolenghi y D. Avnir, *Doped Sol-Gel Glasses as Chemical Sensors*, *J. Non-Cryst. Solids*, 122 (1990) 107-109.
2. O Lev, B.I. Kuyavskaya, I.Gigozin, M. Ottolenghi y D. Avnir, *A High Sensitivity Photometric Method Based On Doped Sol-Gel Glass Detectors: Determination of sub-ppb Divalent Iron*, *Fresenius J.Anal.Chem.*, 343 (1992) 370-372.
3. D.L.Venton, K.L. Cheesman, R.T. Chatterton y T.L. Anderson, *Entrapment of a Highly Specific Antiprogesteron Antiserium Using Polysiloxane Copolymers*, *Biochim. Biophys. Acta*, 797 (1984) 343-347.
4. M.Glad, O.Norrloew, B. Sellergren, N. Siegbann y K.H. Mosbach, *Use of Silane Monomers for Molecular Imprinting and Enzyme Entrapment in Polysiloxane-Coated Porus Silica*, *J. Chromatogr.*, 347 (1985) 11-23.
5. S.Braun, S. Rappoport, R.Zusman, D. Avnir y M. Ottolenghi, *Biochemically Active Sol-Gel Glasses: The Trapping of Enzymes*, *Mater. Lett.*, 10 (1990) 1-5.
6. S.A. Yamanaka, F. Nishida, L.M. Ellerby, C.R. Nishida, B.Dunn, J.S. Valentine y J.I. Zink, *Enzymatic Activity of Glucose Oxidase Encapsulated in Transparent Glass by the Sol-Gel Method*, *Chem Mater.*, 4 (1992) 495-497.
7. L.M.Ellerby, C.R. Nishida, F. Nishida, S.A. Yamanaka, B. Dunn, J.S. Valentine y J.I. Zink, *Encapsulation of Proteins in Transparent Porous Silicate Glasses Prepared by the Sol-Gel Method*, *Science*, 255 (1992) 1113-1115.
8. R.Wang, U. Narang, P.N. Prasad y F.V. Bright, *Affinity of Antifluorescein Antibodies Encapsulated Within a Transparent Sol-Gel Glass*, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2671-2675.
9. I.Gill y A. Ballesteros, *Bioencapsulation within Synthetic Polymers (Part I): Sol-Gel Encapsulated Biologicals*, *Trends Biotechnol.*, 18 (2000) 282-296.
10. I. Kuselman, B.I Kuyavskaya and O.Lev, *Disposable tube detectors for water analysis*, *Anal. Chim. Acta*, 256 (1992) 65-68
11. J.M. Miller, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink, *Synthesis Conditions for Encapsulating Cytochrome c and Catalase in SiO₂ Sol-Gel Materials*, *J.Non Cryst.Solids*, 202 (1996) 279-289



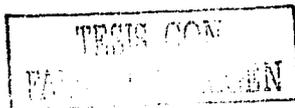
OBJETIVOS

Objetivo general

Aplicar la técnica del sol-gel, optimizando las condiciones experimentales en sus diversas etapas, para el encapsulamiento de pequeñas moléculas orgánicas y macromoléculas biológicas, con el fin de obtener materiales con posible aplicación como sensores químicos y bioquímicos.

Objetivos específicos

1. Establecer condiciones óptimas en las etapas de hidrólisis y condensación de la técnica sol-gel para obtener un rendimiento máximo de la reacción.
2. Encapsular moléculas orgánicas pequeñas en sol-gel.
 - 2.1 Delimitar el tiempo de reacción adecuado para la introducción de la sustancia a inmovilizar en el sol.
 - 2.2 Inmovilizar diferentes indicadores de pH y metalocrómicos
 - 2.3 Verificar la reactividad química de la sustancia inmovilizada y su comportamiento reversible.
3. Establecer un protocolo general de encapsulamiento de biomoléculas por la técnica del sol-gel.
 - 3.1 Inmovilizar biomoléculas de diferente tamaño con las condiciones establecidas.
 - 3.2 Comprobar cualitativamente el encapsulamiento de las sustancias inmovilizadas.
 - 3.3 Verificar la actividad de la biomolécula encapsulada con respecto a su equivalente molécula libre.
 - 3.4 Establecer condiciones para la regeneración del biomaterial y comprobar su funcionamiento en ciclos de operación repetidos.



Capítulo I

Generalidades y antecedentes

1. Técnica del sol-gel

1.1 Conceptos básicos del proceso sol-gel

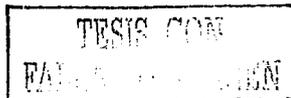
Un coloide es una suspensión en donde la fase dispersa es muy pequeña (entidades de 1-1000 nm) y en donde las interacciones son dominadas por fuerzas de corto alcance, por lo que la inercia de esta fase dispersa es muy pequeña, así que exhibe movimiento Browniano. Un sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido. Un aerosol es una suspensión de partículas sólidas o de gotas de un líquido en un gas, mientras que una emulsión es una suspensión de gotas de un líquido en otro líquido. Todos estos coloides pueden ser utilizados para generar polímeros de materiales cerámicos ya sea en forma de monolitos o partículas.

En el proceso del sol-gel, los precursores que se utilizan son metales o metaloides que se encuentran rodeados de ligantes. Por ejemplo, el aluminio rodeado por óxidos inorgánicos [Al(NO₃)₃] o bien con alcóxidos que son una clase de óxidos orgánicos [Al(OC₄H₉)₃]. Este último es uno de los precursores más utilizados para la preparación del sol-gel.

Los metal alcóxidos son miembros de la familia de los compuestos organometálicos que tienen un ligando orgánico enlazado a un metal o metaloide. Estos precursores reaccionan fácilmente con el agua, esta reacción es llamada hidrólisis debido a que un ión hidroxilo ataca al metal como en la siguiente reacción:



Dependiendo de la cantidad de agua y de la presencia de catalizadores, la hidrólisis se puede llevar a cabo de manera completa:





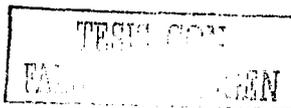
Cuando dos moléculas total o parcialmente hidrolizadas interaccionan, se produce una condensación:



Por definición la condensación libera una pequeña molécula que puede ser agua o un alcohol. Este tipo de reacción puede continuar tantas veces como ligandos hidrolizables contengan las moléculas del compuesto organometálico, formándose en primera instancia coloides o micelas (partículas elementales) los cuales continúan agregándose hasta formar una molécula muy grande de cientos o miles de unidades llamadas monómeros. Al número de enlaces que puede formar un monómero se le llama funcionalidad (f); los alcóxidos metálicos tienen funcionalidades entre 2 y 4. Si se considera una unidad con cuatro grupos funcionales, dos de los cuales son reactivos a la hidrólisis, sólo se tienen dos maneras de polimerizar que son en forma lineal o bien formando anillos, como se muestra en la figura 1.1. De acuerdo con esto, un compuesto polifuncional puede polimerizar formando una red entrecruzada en tres dimensiones.

Cuando se prepara una solución de monómeros y estos condensan en polímeros entrecruzados con un tamaño de partícula de algunos nanómetros, se dice que se tiene una solución o un sol.

Si un monómero puede formar más de dos enlaces, entonces no hay un tamaño límite de la molécula que se puede formar. Cuando esta molécula tiene dimensiones macroscópicas y se extiende a través de la solución, se puede decir que es un gel. El punto de gelificación corresponde al momento en que los últimos enlaces se forman para completar la macromolécula y la solución deja de fluir. Esta transición sol-gel es irreversible y en este punto la monofase líquida (el sol) se transforma en un sistema bifásico, constituido por un sólido poroso y el líquido intersticial atrapado en éste.



Una definición más concreta de lo que es un gel es aquella en la cual se le considera como una sustancia que contiene un esqueleto sólido continuo que encierra una fase líquida, y es esta continuidad en la fase sólida lo que da la elasticidad al gel [1].

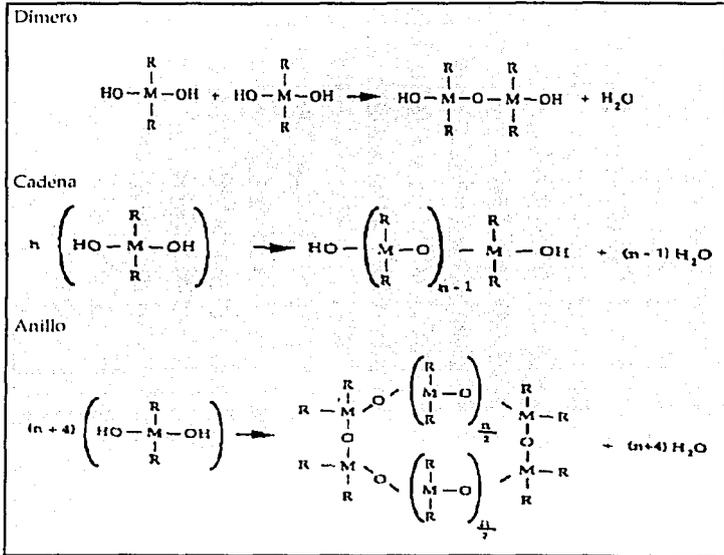
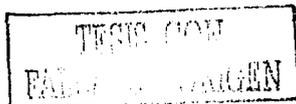


Figura 1.1. Formación de anillos y cadenas por un monómero bifuncional. En el primer caso se observa un dímero, en el segundo, una cadena y en el tercero se observa un anillo

1.2 Hidrólisis y condensación de óxidos de silicio

El silicio es uno de los metales más abundantes en la tierra. En la naturaleza, se lleva a cabo la hidrólisis de silicatos para formar polisilicatos, requiriendo únicamente de una fuente de silicatos solubles y agua. El proceso se realiza por medio de varios pasos de hidrólisis y condensaciones repetidas formándose macromoléculas de polisilicatos que, en condiciones químicas adecuadas, adquieren la forma de partículas esféricas.



En 1845 Ebelmen hizo reaccionar SiCl_4 con etanol formando el tetraetoxisilano (TEOS). Posteriormente se realizaron varias investigaciones sobre la hidrólisis de este compuesto que dieron como resultado una serie de fibras. También en 1845 Mendeleyev tuvo la idea de hidrolizar SiCl_4 para formar Si(OH)_4 el cual por repetidas condensaciones formó polisiloxanos de alto peso molecular. Estos experimentos despertaron el interés en el estudio de los compuestos organosilicio, encontrándose que éstos poseían propiedades excepcionales para la formación de polímeros siloxanos con grupos orgánicos en su estructura. Los estudios realizados en esta época condujeron a la comprensión de los procesos de hidrólisis y condensación de estos productos.

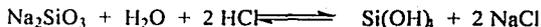
1.2.1 Hidrólisis y condensación del ácido silícico

Cuando el Si(OH)_4 se pone en contacto con ácido diluido, la solución resultante está constituida de especies mononucleares. Arriba de pH 7 la hidrólisis produce especies aniónicas:

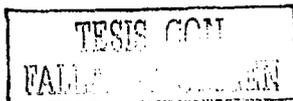


En donde SiO(OH)_3^- ($x=1$) se encuentra predominantemente como especie mononuclear. Debido a que SiO(OH)_3^- es un ácido muy débil, $\text{SiO}_2(\text{OH})_2^{2-}$ es observado en cantidades apreciables solo en pH cercano a doce. En la figura 1.2 se muestran las distintas especies que predominan en los diferentes intervalos de pH.

Freundlich y colaboradores obtuvieron ácido silícico por acidificación de silicatos solubles:



o bien hidrolizando el éster:



El ácido silícico lentamente formaba un gel, por lo cual estudiaron a fondo este proceso encontrando que el ácido silícico polimerizaba en partículas discretas o núcleos que se agregaban lentamente en cadenas para formar posteriormente una red tridimensional. Con base en sus observaciones dividieron la polimerización en tres etapas:

- Condensación de monómeros para obtener partículas elementales ó núcleos
- Crecimiento de las partículas
- Unión de partículas para formar cadenas y redes que se extienden a través del medio líquido, obteniendo finalmente un gel

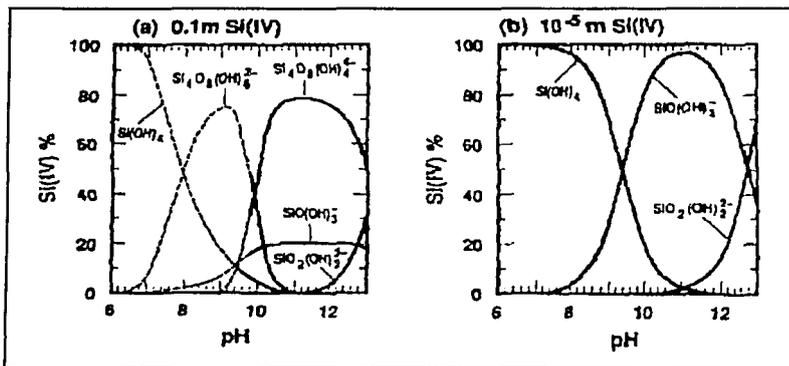


Figura 1.2 Distribución de silicatos a 25 °C, a distintos valores de pH

La cinética de polimerización y las reacciones mismas que entran en juego dependen en gran medida del pH del medio. De acuerdo con Iler y Brinker [1,2] se pueden distinguir tres regiones de pH:

$$2 \leq \text{pH} \leq 7$$

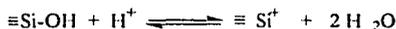
El valor de pH 2 es un límite dado que es el punto de carga cero, es decir el punto isoeléctrico en donde la movilidad de las partículas de sílica es cero. A pH 7 se tiene otro límite debido a que en este punto las velocidades de disolución y precipitación de las

partículas de sílica son iguales y por arriba de pH 7 las partículas de sílica están apreciablemente ionizadas y el crecimiento ocurre sin agregación o gelación.

A. Polimerización a $pH < 2$

Estas condiciones de pH representan una región metaestable en donde los tiempos de gelificación son muy largos. Por debajo de pH 2 la velocidad de polimerización es proporcional a $[H^+]$, pero se ha propuesto que en estas condiciones la polimerización involucra un intermediario que es la especie $\equiv Si^+$ [1,2]:

Rápido



Lento



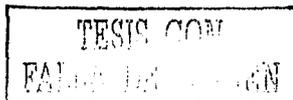
De acuerdo con otras hipótesis [1,2], la condensación en medio ácido involucra silanoles protonados. Esta protonación hace más electrofílico al silicio y por lo tanto más susceptible al ataque nucleofílico. Los monómeros y los oligómeros menos ramificados son los más propicios para ser protonados. De esta manera, la condensación se lleva a cabo entre especies neutras y silanoles protonados como lo muestran las siguientes reacciones:



Como este mecanismo involucra un estado de transición pentacoordinado, los efectos estéricos y los factores inductivos tienen una alta influencia en la reacción.

B. Polimerización $2 \leq pH \leq 7$

En esta región los tiempos de gelificación decrecen a medida que el pH aumenta y esto se debe a que arriba del punto isoeléctrico la velocidad de condensación es proporcional a



[OH⁻] [1,2]. Dependiendo de la acidez del medio, las reacciones que se llevan a cabo se pueden expresar como:

Rápido



Lento



o



Como puede observarse, en este caso el mecanismo involucra el ataque de un silanol nucleofílico desprotonado sobre un silicato neutro.

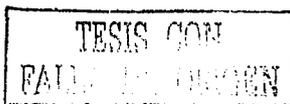
C. Polimerización pH > 7

Arriba de pH 7 la condensación ocurre a través del mismo mecanismo que en (B), sin embargo a estos valores de pH todas las especies condensadas son más susceptibles de estar ionizadas y por lo tanto hay efectos repulsivos entre ellas. El crecimiento ocurre por la adición de monómeros a partículas más altamente condensadas, más que por agregación de partículas.

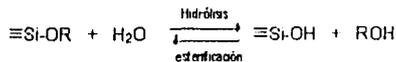
1.2.2 Hidrólisis y condensación de alcóxidos de silicio

Generalmente, para la obtención de geles de silicio se utilizan como precursores los monómeros tetraalcoxisilanos y como catalizador un ácido mineral como el HCl o bien una base como NH₃.

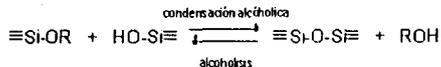
El proceso del sol-gel se puede describir por medio de tres reacciones:



1. Esterificación



2. Condensación alcohólica



3. Condensación de agua



en donde R es un grupo alquilo, C_nH_{2n+1}. En las reacciones de hidrólisis se reemplazan los grupos alcóxi (OR) por grupos hidróxi (OH). Las siguientes reacciones de condensación involucran a los grupos silanol produciendo enlaces siloxano (Si-O-Si) y más moléculas de alcohol.

La hidrólisis se facilita en presencia de agentes que ayuden a homogeneizar la mezcla inicial, ya que el agua y los alcoxisilanos son inmiscibles. Entre estos agentes se incluyen, el tetrahidrofurano (THF), el dioxano, la acetona y principalmente los alcoholes. Sin embargo, la presencia de estos disolventes puede promover la esterificación o la no polimerización, ya que las reacciones antes mostradas son parcialmente reversibles. En particular se debe subrayar que los alcoholes no son simples cosolventes sino que participan en las reacciones.

Por otra parte, aunque en la técnica original del sol-gel se utilizaban sistemáticamente a los alcoholes como cosolventes, actualmente se ha demostrado que la formación del gel se puede llevar a cabo sin la adición de éstos u otros disolventes. En efecto, el alcohol que se produce en las reacciones es suficiente para homogeneizar la mezcla de alcoxisilanos y agua.

Mediante el uso de moléculas de agua marcadas, se ha podido corroborar que la hidrólisis de alcoxisilanos se lleva a cabo por medio de un ataque nucleofílico del oxígeno de la molécula del agua sobre el átomo de silicio:



La reacción de hidrólisis se ve afectada por la cantidad de agua que se encuentra presente en la mezcla inicial. Uno de los efectos más obvios es que la reacción de hidrólisis se acelera al aumentar la cantidad de agua, pero también se ha observado que tiene un efecto en el número y tamaño de los núcleos que se forman al inicio del proceso y por lo tanto en las características del material final.

1.2.3 Moléculas precursoras en la técnica del sol-gel

Las compuestos que más se utilizan para la técnica del sol-gel son los tetraalcoxisilanos y entre ellos el tetraetoxisilano, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS), y el tetrametoxisilano, $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ (TMOS), son los más comunes. La preparación de éstos se lleva a cabo a partir de tetraclorosilano, que se hace reaccionar con el alcohol apropiado. También se pueden utilizar como precursores monoalquiltrialcoxisilanos ($\text{RSi}(\text{OR})_3$) o los dialquildialcoxisilanos ($\text{R}_2\text{Si}(\text{OR})_2$) para llevar a cabo la técnica del sol-gel. La tabla 1.1 muestra las propiedades de algunos organoalcoxisilanos empleados en la técnica del sol-gel.

Tabla 1.1. Propiedades físicas de algunos tetraalcoxisilanos [1]

Nombre	PM (g/mol)	p. e (°C)	Momento dipolar	ρ a 20 °C	Soluble en
Tetrametoxisilano	152.2	121	1.71	1.02	Alcoholes
Tetraetoxisilano	208.3	169	1.63	0.93	Alcoholes
Tetra-n-propoxisilano	264.4	224	1.48	0.916	Alcoholes
Tetra-n-butoxisilano	320.5	115	1.61	0.899	Alcoholes

La velocidad de hidrólisis de los alcoxisilanos está influenciada por efectos estéricos; mientras más voluminosos sean los grupos alcóxi (tamaño de la cadena y grado de ramificación) más se lenta será la hidrólisis. La tabla 1.2 muestra el valor de la constante de velocidad de la hidrólisis ácida de varios tetraalcoxisilanos.

Tabla 1.2. Constantes de velocidad de hidrólisis para varios tetraalcóxidosilanos (RO)₄Si, a 20 °C [1]

Grupo R	$K \cdot 10^{-2} (\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1} (\text{H}^+)^{-1})$
C ₂ H ₅	5.1
C ₄ H ₉	1.9
C ₆ H ₁₃	0.83
(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂ CH(CH ₃)CH ₂	0.30

1.2.4 Efectos de catálisis

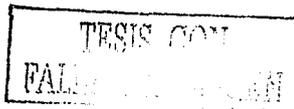
La hidrólisis de los alcóxidosilanos se lleva a cabo más rápidamente y de manera completa al utilizar un catalizador. En la técnica para la preparación del sol-gel se utilizan ácidos minerales como catalizadores o amoníaco, pero también se pueden utilizar otros como el ácido acético, KOH, aminas, KF y HF. En algunos trabajos se indica que, a concentraciones iguales, los ácidos son mucho mejores catalizadores que las bases, debido a que los silanoles ácidos pueden neutralizar a estas últimas.

En la tabla 1.3 se presentan los tiempos de gelificación para TEOS empleando distintos catalizadores.

Tabla 1.3. Tiempos de gelificación de TEOS usando diferentes catalizadores y valores de pH [1]

Catalizador	pH inicial de la solución	Tiempo de gelificación hrs
HF	1.90	12
HCl	0.05	92
HNO ₃	0.05	100
H ₂ SO ₄	0.05	106
HOAc	3.70	72
NH ₄ OH	9.95	107
Sin catálisis	5.0	1000

Es importante aclarar que aunque la hidrólisis de los alcóxidos es favorecida en medio ácido, las reacciones de condensación y polimerización son muy lentas en este medio. Por lo tanto, la formación del gel, que es el resultado de ambos procesos, puede requerir de un largo tiempo.



1.2.5 Mecanismo de hidrólisis

A. Hidrólisis ácida.

En general se ha argumentado que la hidrólisis ácida se lleva a cabo por un desplazamiento nucleofílico bimolecular (S_N2-Si) que involucra un intermediario pentacoordinado. Bajo condiciones ácidas un grupo alcóxido es protonado en un paso rápido. La densidad electrónica se aleja del silicio haciéndolo más susceptible al ataque del agua y presentándose una inversión en la configuración. La estructura que tiene el intermediario se muestra en la figura 1.3.

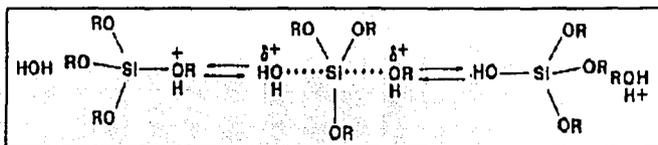


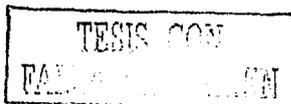
Figura 1.3. Mecanismo de hidrólisis ácida de alcóxidos de silicio

Lo anterior permite entender el hecho de que la velocidad de hidrólisis aumente cuando el átomo de silicio se encuentra rodeado por grupos alcóxidos pequeños (menor impedimento estérico).

Aunque este mecanismo explica los efectos estéricos de grupos voluminosos, existen otros mecanismos propuestos que no involucran inversión en la configuración.

B. Hidrólisis básica

De la misma forma que en la hidrólisis ácida se propone un mecanismo S_N2-Si en donde los grupos hidroxilo desplazan a los grupos OR presentándose una inversión en la configuración. Este mecanismo es afectado por factores estéricos e inductivos, sin embargo los factores estéricos son más importantes ya que el silicio adquiere una carga en el estado de transición (figura 1.4).



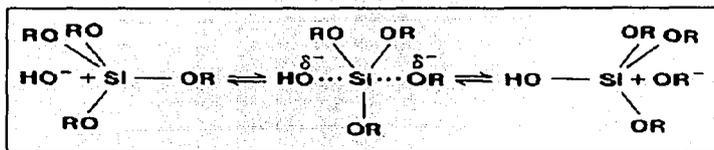


Figura 1.4. Mecanismo de hidrólisis básica de alcoxisilanos

Las moléculas de tetraalcoxisilanos parcialmente hidrolizados son sumamente reactivas y empiezan a condensar rápidamente. Por lo tanto ambos fenómenos, la hidrólisis y la condensación, coexisten prácticamente desde las etapas iniciales del proceso sol-gel.

La condensación de los alcoxisilanos se lleva a cabo principalmente a través de los grupos silanol que se van formando al hidrolizarse los sustituyentes alcoxi. Por ello los mecanismos y reacciones de condensación proceden según se indicó en la sección 1.2.1 para el ácido silícico.

1.3 Gelación

La gelación se presenta cuando por condensación de polímeros o agregación de partículas se forma un grupo de coloides que al enlazarse dan lugar a una estructura gigante, a la cual se le llama gel. En el momento de la gelación muchas agrupaciones de moléculas pueden encontrarse dispersas en la fase del sólido en desarrollo, pero no enlazadas al conglomerado principal, con el tiempo, estas agrupaciones se van enlazando a la red y el gel se va compactando. De acuerdo con esto, el gel aparece cuando el último enlace se forma entre los dos conglomerados más grandes para crear una estructura única. Este enlace no es diferente a los demás que se formaron anteriormente, pero sí es el responsable de la elasticidad de la red.

El cambio en las propiedades reológicas del material es utilizado para identificar el punto de gelación. Por ejemplo el tiempo de gelación es identificado cuando se llega a un cierto valor de viscosidad. En este punto la solución deja de fluir.

La coagulación de los geles se debe a tres tipos de interacciones atractivas:

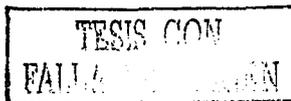
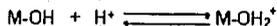
- 1) Interacciones dipolo-dipolo (Fuerzas de Keesom)
- 2) Interacciones dipolo-dipolo inducido (fuerzas de Debye)
- 3) Interacciones dipolo transitorio-dipolo transitorio. (Fuerzas de London)

Las fuerzas de London juegan un papel importante en la atracción entre partículas coloidales. Su origen es el siguiente: cuando dos átomos o moléculas se encuentran alejados, el movimiento de sus electrones no está correlacionado, pero cuando se encuentran cercanos, los electrones se reorganizan para minimizar la energía del sistema. Los dipolos transitorios generados por este arreglo producen una atracción neta entre átomos o moléculas, aun cuando el momento dipolar permanente de cada una de ellas sea cero.

Las fuerzas atractivas son aproximadamente aditivas y cuando pueden vencer a las fuerzas de repulsión que estabilizan a los coloides, se produce la gelificación de éstos.

La estabilización de los coloides en el sol es debida a la repulsión electrostática. En efecto, la fuerza neta a la que están sometidas las partículas en suspensión es la suma de las fuerzas de atracción y las de repulsión. La barrera de repulsión se forma por los iones que se encuentran en la vecindad de la partícula y que dan origen a la formación de una doble capa eléctrica. (figura 1.5). Estos iones son de dos tipos, los que llegan hasta la superficie de la partícula y provocan una carga neta en ésta (por adsorción o por reacción), y los iones de carga opuesta que son atraídos por la partícula cargada pero que permanecen en solución (contraiones).

Para las partículas formadas por la condensación de hidróxidos metálicos los iones que se encuentran en la superficie son en general H^+ u OH^- , que establecen la carga de la partícula por protonación o desprotonación de los enlaces M-OH en la superficie:





Es más o menos sencillo eliminar o añadir protones en estos enlaces dependiendo del metal que esté presente en el óxido. El pH en donde la partícula es globalmente neutra se llama punto de carga cero (PCC). A $\text{pH} > \text{PCC}$ predominan las partículas cargadas negativamente, mientras que a $\text{pH} < \text{PCC}$, las partículas tienen carga positiva.

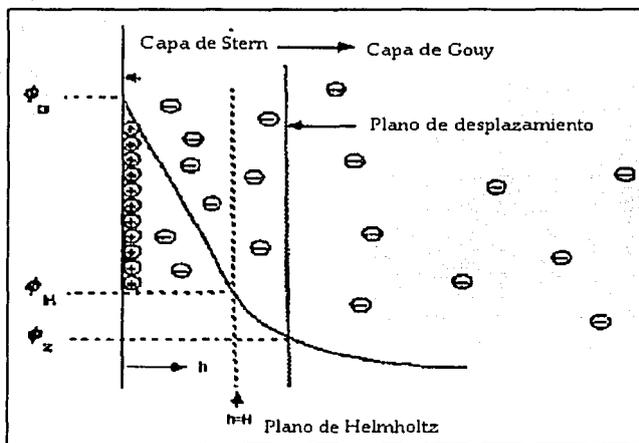


Figura 15. Esquema de la doble capa eléctrica ϕ_0 es el potencial en la superficie de la partícula cargada, ϕ_H es el potencial a una distancia característica de la superficie llamada plano de Helmholtz y ϕ_z es el potencial en el plano de desplazamiento de la partícula (potencial zeta)

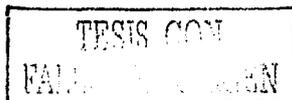
Si a un sol se le aplica un campo eléctrico, las partículas coloidales cargadas se moverán hacia el electrodo de carga opuesta. Junto con la partícula, también migrará una parte de la nube de iones de carga opuesta que la rodea, mientras que la porción más alejada de la doble capa se moverá hacia el electrodo contrario. La frontera que divide a la región del fluido que se mueve con la partícula de la región que se mueve libremente recibe el nombre de plano de desplazamiento. La velocidad de movimiento de la partícula depende del potencial en el plano de desplazamiento o potencial zeta, ϕ_z . Este potencial es menor que

el potencial en la superficie (φ_0) de la partícula debido a los iones de carga opuesta a la de la partícula que se encuentran entre la superficie y el plano de deslizamiento y que provocan que la carga neta al nivel de éste plano sea menor.

El pH en el cual φ_0 es igual a cero se le llama punto isoeléctrico (PIE) y en general no es igual al pH del punto de carga cero. La estabilidad de un coloide se relaciona muy estrechamente con el valor del potencial φ_0 . La estabilidad requiere de un potencial repulsivo $\varphi_0 \geq 30-50$ mV.

El efecto de la adición de las fuerzas de van der Waals y la doble capa de repulsión se puede observar en la figura 1.6. Cerca de la partícula existe un mínimo en la energía potencial producido por la atracción de van der Waals pero, rápidamente se llega a un máximo debido a la barrera repulsiva producida por la doble capa. Si la barrera es más grande que $10\kappa T/e$, en donde κ es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y e es la carga del electrón, las colisiones producidas por el movimiento Browniano generalmente no sobrepasan la barrera y no hay agregación. Sin embargo, si la concentración del contraión se incrementa (fuerza iónica mayor), la doble capa se comprime debido a que sigue siendo el mismo número de cargas requerido para balancear la superficie cargada de la partícula, pero ahora se encuentran dispuestas en un volumen más pequeño alrededor de la partícula. La compresión de la doble capa provoca una disminución del potencial zeta por lo que mientras mayor sea la concentración del contraión, la repulsión se reduce hasta el punto en que el potencial interpartícula es de forma atractiva y el coloide puede coagular inmediatamente.

De acuerdo con la discusión anterior, los tiempos de gelificación pueden reducirse si se adiciona una solución salina relativamente concentrada al sol. Sin embargo, esta adición debe hacerse después de un tiempo conveniente de modo que los procesos precedentes de la hidrólisis, condensación y agregación hayan progresado suficientemente.



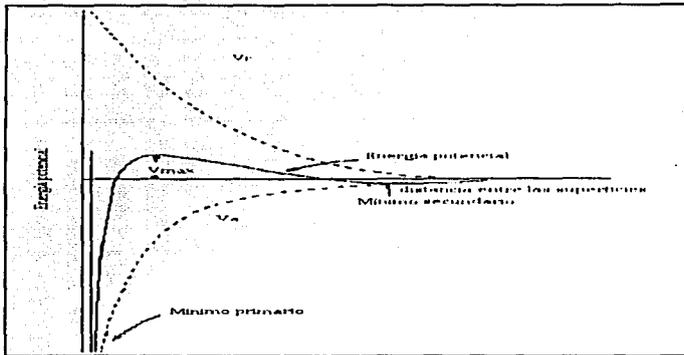


Figura 1.6. Esquema del potencial de la estabilización de coloides según la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek). V_a potencial atractivo de van der Waals, V_e potencial electrostático de repulsión.

1.4 Maduración de geles

La transición sol-gel es irreversible y, al producirse, la monofase líquida (el sol) se transforma en un sistema bifásico. El gel consiste de partículas primarias amorfas de tamaño variable (5-10 nm) con un líquido intersticial. En este estado los poros todavía no se comprimen y están llenos de fase líquida.

Es importante mencionar que las reacciones que producen la gelación no se detienen en este punto, ya que existe una buena fracción de oligómeros que se encuentran libres para difundir y reaccionar, además de que los conglomerados también tienen suficiente movilidad interna para que se lleven a cabo reacciones de condensación. De hecho las propiedades del gel continúan cambiando aún después del punto de gelación. A este proceso se le ha llamado maduración y no es más que la reorganización de la estructura de la red.

Los procesos que se llevan a cabo durante la maduración son clasificados como polimerización, endurecimiento y transformación de fase.

La polimerización es el incremento del número de enlaces en la red se produce por las reacciones de condensación, esta condensación continúa aún después del punto de gelación. En algunas ocasiones la polimerización llega a durar meses, ya que la velocidad de las reacciones de condensación depende de la temperatura y del pH de la solución.

Como resultado del proceso anterior, el grado de entrecruzamiento de la red polimérica aumenta, el gel se consolida, se desarrolla la estructura porosa y la parte sólida se densifica, todo lo cual conduce al endurecimiento del gel.

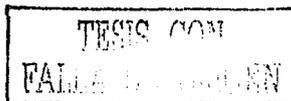
Estas modificaciones van acompañadas de encogimiento y sinéresis. La sinéresis es la contracción de la red del gel debida a la expulsión de líquido de los poros.

La maduración es un proceso de disolución o de precipitación debido a las diferencias de solubilidad entre superficies con diferentes radios de curvatura.

Greenberg [2] concluyó que la solubilidad teórica es una función del tamaño de partícula, aunque en este documento no se publicaron datos experimentales. Alexander [2] fue el primero en obtener datos que mostraban que para un tipo de sílica dado, la solubilidad se incrementa con el decremento del tamaño de las partículas tal como se muestra en la ecuación 1.1

$$S = S_0 \cdot \exp(2\gamma_{sl} V_m / R T r) \quad (1.1)$$

En esta ecuación S_0 es la solubilidad de la fase sólida, γ_{sl} es la energía interfacial sólido-líquido, V_m es el volumen molar del sólido, r es el radio promedio de las partículas, R es la constante de los gases ideales y T es la temperatura. Las partículas pequeñas (diámetro < 5 nm) tienden a disolverse, mientras que las partículas grandes (con diámetro > 5 nm) tienden a precipitar. El tamaño de las partículas se incrementa con el aumento de la presión y de la temperatura. En la figura 1.7 se observa la tendencia de la solubilidad de la sílica con el radio de curvatura de su superficie.



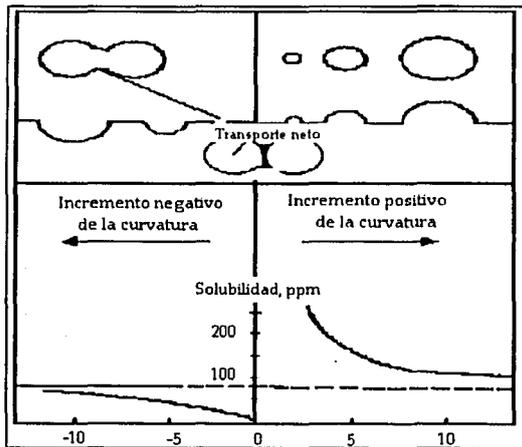


Figura 1.7. Variación de la solubilidad de la sílica con el radio de curvatura de la superficie. Los radios de curvatura se muestran como proyecciones en una superficie plana. El radio negativo, se muestra como depresiones en la superficie

La condición de equilibrio para la solubilidad de la partícula es

$$\mu^{sol} = \mu^s \quad (1.2)$$

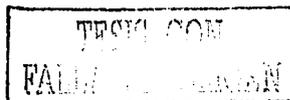
donde μ es el potencial químico y los superíndices indican sol=solución y s=sólido.

Si la solución es ideal

$$\mu^{sol} = \mu^{0l} + RT \ln \chi \quad (1.3)$$

donde χ es la solubilidad del sólido en fracción mol y μ^{0l} es el potencial estándar en la fase líquida.

$$\mu^s = \mu^{0s} + \gamma \Lambda \quad (1.4)$$



donde μ^b es el potencial estándar en la fase sólida y γ es la energía interfacial sólido-líquido y A es el área por mol de sólido. Si un mol de sólido consiste de n pequeños cubos de lado a , entonces el volumen molar del sólido, V^m es

$$V^m = na^3 \quad \text{o bien} \quad n = V^m / a^3 \quad (1.5)$$

El área molar A es

$$A = n(6a^2) = (V^m / a^3)(6a^2) = 6V^m / a \quad (1.6)$$

Utilizando este valor para A , la condición de equilibrio es

$$\mu^l + RT \ln \chi = \mu^b + V^m(6\gamma/a) \quad (1.7)$$

Cuando $a \rightarrow \infty$, $\chi \rightarrow \chi^0$, la solubilidad de cristales grandes. Por lo tanto,

$$\mu^l + RT \ln \chi^0 = \mu^b \quad (1.8)$$

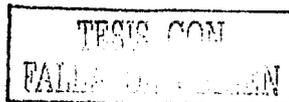
Restando esta ecuación de la anterior y dividiendo entre RT , se obtiene

$$\ln(\chi/\chi^0) = V^m / RT(6\gamma/a)$$

rearrreglando

$$\chi = \chi^0 \exp(6\gamma V^m / RTa) \quad (1.9)$$

la única diferencia entre esta ecuación y la ecuación 1.1 radica en el factor 6γ y 2γ que proviene de la suposición de que la partícula es un cubo. De esta manera el factor dependerá de la forma de las partículas.



El hidrogel maduro (gel con agua en su estructura) se somete finalmente a un proceso de secado controlado, durante el cual el líquido remanente en los poros se remueve. Como consecuencia de ello, los poros se colapsan, hay una mayor consolidación y densificación estructural y un fuerte encogimiento. El gel secado o xerogel se caracteriza por tener un volumen de aproximadamente 1/8 del volumen del hidrogel inicial y un peso alrededor del 20% cuando se encuentra completamente seco.

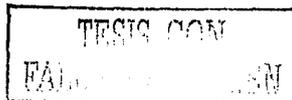
2 Características generales de las enzimas

Las enzimas son una parte importante de los seres vivos, ya que son estas macromoléculas las que les ayudan a obtener su energía de forma rápida. Las enzimas aceleran la velocidad de una reacción sin afectar el equilibrio final de ésta. Otra de las características de estas moléculas es su especificidad: pueden catalizar pocas reacciones y en algunas ocasiones sólo una reacción. Las enzimas funcionan en condiciones de pH, temperatura, concentraciones de sustrato o de cofactores muy definidas, por lo cual son bastante delicadas en su manejo [3].

Las enzimas son proteínas que dentro de su estructura contienen grupos no protéicos. La actividad catalítica depende de la conservación de su estructura nativa y cualquier variación da lugar a cambios significativos en su actividad.

Todas las enzimas presentan un "sitio activo" en su estructura, éste se encuentra formado por grupos de aminoácidos hidrofóbicos, en donde se fija el sustrato, y por medio de otros aminoácidos más reactivos se lleva a cabo la reacción enzimática; estos aminoácidos más reactivos pueden ser la histidina, lisina, cisteína o la serina, así como los ácidos glutámico y aspártico.

De acuerdo al tipo de reacción que catalizan, las enzimas se pueden clasificar en uno de los siguientes seis grupos [4,5]:



1. **Oxidoreductasas:** Catalizan la transferencia de átomos de hidrógeno, de oxígeno o de electrones
2. **Transferasas:** Catalizan la transferencia de grupos específicos
3. **Hidrolasas:** Catalizan reacciones hidrolíticas
4. **Liasas:** Catalizan la ruptura de enlaces mediante reacciones distintas de la hidrólisis
5. **Isomerasas:** Catalizan reordenaciones moleculares
6. **Ligasas o sintetasas:** Catalizan la formación de enlaces, requiriendo ATP

2.1 Determinación de la actividad enzimática

La forma más común de medir la actividad enzimática es a través de una curva de cambio en la concentración del sustrato vs tiempo, en donde la pendiente de la parte lineal de la curva representa la actividad (o velocidad) inicial de la enzima. Como ejemplo en la figura 1.8 se representa una curva de progreso.

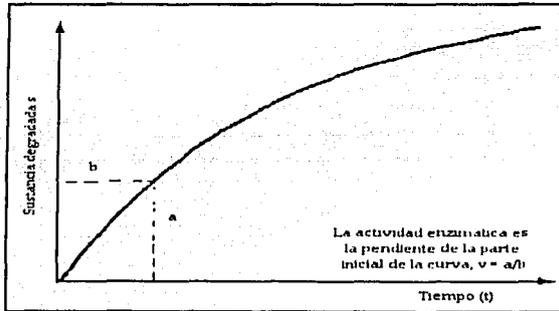


Figura 1.8. Comportamiento típico de una curva de progreso

La actividad enzimática se expresa en término de unidades (U), definiéndose una unidad como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto, bajo condiciones establecidas. En algunas ocasiones la unidad puede ser más convenientemente expresada en términos de nmol/min o pmol/min . La unidad SI de la

actividad enzimática es el *Katal*, que representa la transformación de 1 mol de sustrato por segundo.

$$1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$1 \text{ katal} = 1 \text{ mol}/\text{s}$$

$$1 \text{ U} = \mu\text{katal}/60 = 16.67 \text{ nkatal}$$

Como se mencionó anteriormente, el funcionamiento de las enzimas depende de condiciones experimentales como la temperatura, pH y concentración del sustrato, por lo que estas variables deben ser claramente estipuladas cuando se reporta la actividad de una enzima particular. En la figura 1.9 se muestra el efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de la enzima.

La pureza de un producto o fracción proteica que contiene las enzimas se expresa en términos de la actividad específica que es el número de unidades enzimáticas (U) por miligramo de proteína. La actividad específica en unidades SI esta dada como Katal por kilogramo de proteína [5].

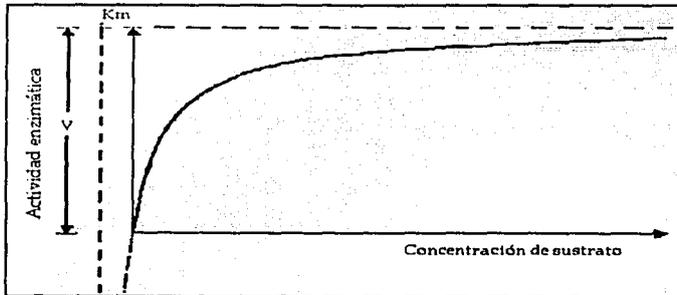


Figura 1.9. Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de la enzima

2.1.1 Aproximación de equilibrio rápido (Michaelis- Menten)

La actividad o velocidad inicial (v) de transformación del sustrato por la enzima varía de manera hiperbólica con la concentración de dicho sustrato como lo muestra la figura 1.9.

A bajas concentraciones de sustrato v varía linealmente con este parámetro respondiendo a una cinética de primer orden

$$v = -\delta s / \delta t = (k) \cdot (s) \quad (I.10)$$

en donde s representa la concentración del sustrato, t es el tiempo y k es la constante de velocidad.

A altas concentraciones de sustrato v es independiente de s , lo que corresponde a una cinética de orden cero:

$$v = -\delta s / \delta t = \text{constante} = V_{\text{max}} \quad (I.11)$$

donde V_{max} es la velocidad máxima de transformación del sustrato por la enzima.

A concentraciones intermedias de sustrato, la cinética corresponde a una mezcla de los dos órdenes.

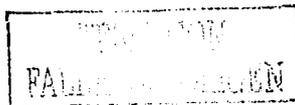
Una ecuación que relaciona a v y s es la ecuación de Michaelis-Menten que se expresa como sigue:

$$v = V_{\text{max}} \cdot s / (s + K_m) \quad (I.12)$$

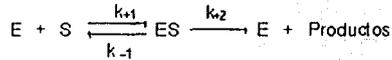
donde K_m es llamada la constante de Michaelis. Otra forma en la que se conoce esta ecuación es la siguiente:

$$(V_{\text{max}} - v) (K_m + s) = V_{\text{max}} \cdot K_m \quad (I.13)$$

K_m y V_{max} son las constantes cinéticas de la enzima. Considerando la ecuación I.12, se observa que si $s = K_m$ entonces $v = V_{\text{max}} / 2$, así que la constante de Michaelis representa la concentración de sustrato en la cual la enzima trabaja a la mitad de su velocidad máxima. Entre mayor es K_m menor es la eficiencia de transformación del sustrato.



El mecanismo de acción de la enzima está basado en la formación de un complejo enzima-sustrato mediante el cual disminuye la energía de activación necesaria para la transformación del sustrato en sus correspondientes productos. El proceso puede ser representado por la siguiente ecuación:



donde E representa a la enzima, S es el sustrato, ES es el complejo enzima-sustrato y k_{+1} , k_{-1} y k_{+2} son constantes de velocidad.

El tratamiento cinético de Michaelis-Menten está basado en los siguientes postulados:

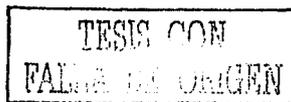
- 1) Existe una población homogénea de moléculas de enzima en el medio de reacción
- 2) Los productos formados en la reacción no interaccionan con la enzima
- 3) La concentración relativa de sustrato es muy elevada (≥ 1000 veces la concentración de la enzima)

Si las condiciones de equilibrio son las sugeridas por Michaelis - Menten entonces k_{+2} es muy grande comparada con k_{-1} , así que $K_m = k_{-1}/k_{+1}$ que es la constante de disociación del complejo enzima-sustrato. Una K_m grande significa una constante de disociación grande o una pequeña constante de asociación ($1/K_m$). De esta manera la constante de Michaelis da una medida de la afinidad enzima-sustrato [5].

Las constantes cinéticas K_m y V_{max} se determinan mejor por la transformación lineal de la ecuación de Michaelis, que se obtiene tomando su recíproco.

$$1/v = 1/V_{max} + (K_m/V_{max}) \times 1/s \dots (1.14)$$

Así una gráfica $1/v$ contra $1/s$ da una recta con pendiente K_m/V_{max} y los recíprocos de las constantes están dados por las intersecciones de la recta en los ejes.



$$1/s = 0, 1/v = 1/V_{\max}$$

$$1/v = 0, 1/s = -1/K_m$$

Otra gráfica alternativa es s/v contra s (figura 1.10), la cual se obtiene multiplicando la ecuación recíproca por s

$$s/v = s/V_{\max} + K_m/V_{\max} \quad (1.15)$$

Cuando

$$s=0, s/v = K_m/V_{\max}$$

y

$$s/v=0, s = -K_m$$

Al gráfico $(1/v)$ contra $(1/s)$ se le llama gráfico de Lineweaver-Burk y es el más utilizado para la determinación de la constante de Michaelis.

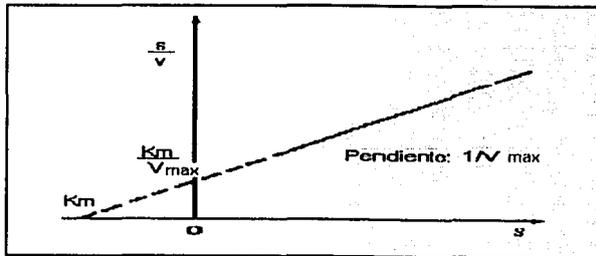


Figura 1.10. Determinación de la constante de Michaelis

2.2 Factores que afectan la actividad enzimática

En algunos casos, si una enzima es mezclada con su sustrato bajo condiciones apropiadas, la catálisis no ocurre o existe una actividad muy baja, esto es debido a la ausencia de una coenzima o activador.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Coenzima

Existen compuestos con bajos pesos moleculares que se encuentran muy involucrados en la catálisis. Estos actúan como aceptores o donadores de grupos químicos específicos. Por ejemplo el NAD, que acepta y dona protones, actúa como una coenzima para muchas deshidrogenasas.

Activadores

Su naturaleza química es muy sencilla, pero no son tan específicos como las coenzimas, su papel primordial es activar a los complejos enzima-sustrato. Un ejemplo de este tipo de activadores son los iones metálicos como el Mg^{2+} . La teoría comúnmente aceptada para las propiedades activadoras de la mayoría de los iones metálicos es que forman compuestos de coordinación y actúan como puentes entre el sustrato y la enzima [6].

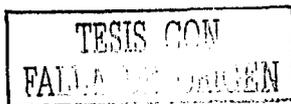
Inhibidores

Los inhibidores son compuestos que reaccionan con las enzimas y reducen así la actividad de las mismas. Este tipo de compuestos son utilizados para diseñar drogas o insecticidas que afecten el funcionamiento de las enzimas en insectos o bacterias, pero no en animales y plantas. Existen dos tipos de inhibidores, los competitivos y los no competitivos.

Inhibidores competitivos

Estos tienen como característica que son muy similares en su estructura química al sustrato utilizado y el inhibidor reacciona con la enzima compitiendo con el sustrato por el sitio activo de ésta.

Ejemplo: En el caso de la enzima succinato deshidrogenasa que cataliza la conversión de succinato a fumarato y también la conversión de malonato a maleato, ambos sustratos actúan como inhibidores competitivos uno del otro. En la figura I.11 se muestra el efecto que tiene la presencia de un inhibidor competitivo sobre los parámetros cinéticos de la reacción enzimática. Se puede observar que $1/K_m$ se ve afectado al igual que la pendiente de la recta que se obtiene.



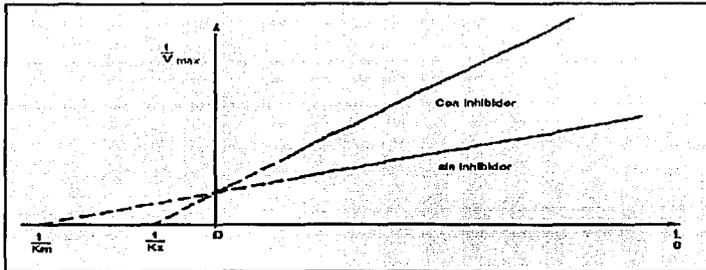


Figura 1.11. El efecto de un inhibidor competitivo en la representación de Lineweaver-Burk

Inhibidores no competitivos

En este caso el inhibidor se une a la enzima pero no en su sitio activo, así que la enzima puede enlazar al sustrato y al inhibidor al mismo tiempo. El sitio de enlace del inhibidor se encuentra relativamente lejano del sitio activo de la enzima por lo cual el enlace enzima-sustrato no se ve afectado. El complejo enzima-sustrato-inhibidor es muy estable y muy difícil de romperse, por lo cual la actividad de la enzima se ve afectada por la disminución de la cantidad de enzima disponible. El efecto que tiene la presencia de inhibidores no competitivos sobre los parámetros cinéticos de la reacción de interés se muestran en la figura 1.12. En este caso el parámetro que se ve afectado es $1/V_{max}$ mientras $-1/K_m$ permanece constante, también la pendiente de la recta se ve afectado por la presencia de un inhibidor no competitivo.

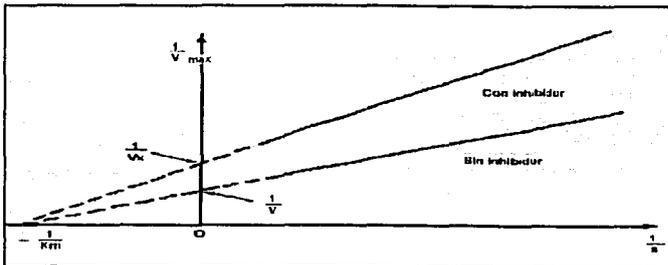


Figura 1.12. El efecto de un inhibidor no competitivo en la representación de Lineweaver-Burk.

Temperatura

En general la velocidad de una reacción química aumenta al aumentar la temperatura. Este efecto suele representarse en función de la variación de la constante de velocidad. La energía de activación de una reacción catalizada por una enzima puede ser determinada por la medición de la velocidad máxima a distintas temperaturas.

De acuerdo con la ecuación empírica de Arrhenius:

$$d \ln k / dT = E / (RT^2) \quad (1.16)$$

donde T es la temperatura absoluta, E es la energía de activación de la reacción, R es la constante de los gases y k es la constante de velocidad de la reacción.

La integración de la ecuación 1.16 entre T=0 y T=T_d da como resultado:

$$\log_{10} k = C - E / (2.303RT) \quad (1.17)$$

donde C es una constante.

De esta ecuación se deduce que una gráfica de $\log V_{\max}$ contra $1/T$ dará una recta cuya pendiente es $-E/(2.303R)$. La figura 1.13 muestra la representación gráfica de la ecuación de Arrhenius para la determinación de la energía de activación de una reacción.

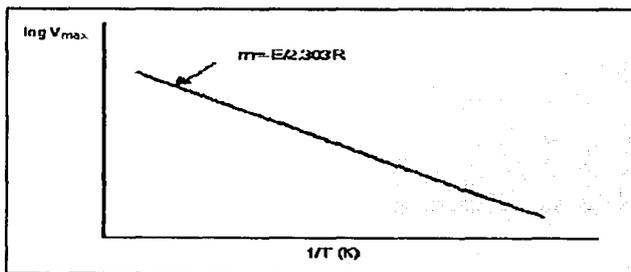


Figura 1.13. Determinación de la energía de activación de una reacción enzimática según la ecuación de Arrhenius

La temperatura juega un papel importante en la desnaturalización de las enzimas. Cuando a una enzima se le expone a temperaturas altas en diferentes periodos de tiempo, la actividad de la enzima disminuye por alteración irreversible de su estructura terciaria.

pH

Las enzimas son activas en ciertos intervalos de pH. Una gráfica de actividad contra pH generalmente conduce a una curva como la que se observa en la figura 1.14. El valor de pH de máxima actividad se le conoce como el pH óptimo y es una característica de cada enzima. La variación de la actividad de la enzima con el pH se debe a que se modifica el grado de ionización de la proteína y/o de algunos otros de los componentes de la mezcla de reacción (sustrato, coenzimas, etc.). Evidentemente, un cambio de pH afecta a V_{max} y K_m e incluso puede afectar la estabilidad de la enzima.

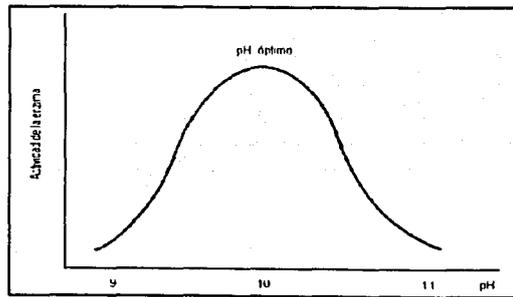


Figura 1.14. Comportamiento de una enzima en un intervalo de pH

2.3 Características de la α -Amilasa

Las amilasas son enzimas que se encuentra en casi todas las plantas, animales y microorganismos. En grandes cantidades, se le puede encontrar en el páncreas de los grandes animales, en la saliva del hombre, del cerdo, de la rata y en otros mamíferos. Se encuentran en pequeñas cantidades en el suero, en la orina, en el hígado y en el músculo.

Las amilasas catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1 \rightarrow 4 de los polisacáridos (por ejemplo almidón). Se clasifican en dos grandes grupos: las endoAmilasas, a las que pertenece la α -Amilasa, y las exoAmilasas, entre las que se incluyen la β y la γ -Amilasa. Las primeras se encuentran en tejidos animales y bacterias, mientras que las exoAmilasas son exclusivamente de origen vegetal o microbial. Las endoAmilasas se caracterizan por atacar los enlaces α -1 \rightarrow 4 al azar mientras que las exoAmilasas atacan los enlaces glucosídicos exclusivamente a partir de las terminales no reducidas de las cadenas más externas del polisacárido.

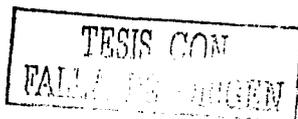
Así, la α -Amilasa ataca al almidón liberando una mezcla de dextrinas y de azúcares reductores como la α -maltosa. La γ -Amilasa va rompiendo cada enlace glucosídico para producir solamente α -glucosa. La β -Amilasa rompe enlaces alternados produciendo β -maltosas; además ataca los enlaces α -1 \rightarrow 6 del almidón formando dextrinas.

El almidón $(C_6H_{10}O_5)_n$ es una mezcla de dos polímeros: la amilosa que es un glucón lineal (1 \rightarrow 4)- α -D y la amilopectina que es un D-glucon ramificado con ligaduras principalmente α -D-(1 \rightarrow 4) y aproximadamente 4% de enlaces α -D-(1 \rightarrow 6).

La α -Amilasa es llamada así porque el grupo reductor hemiacetal liberado por la hidrólisis tiene una configuración óptica α y produce una rotación de la luz hacia abajo. Generalmente es aislada de bacterias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, etc. El pH óptimo de actividad de la α -Amilasa se encuentra entre pH 6.9 y 7.1. Dependiendo de su origen, el tamaño de la molécula de esta enzima varía entre 50 y 55 Kdaltons.

2.4 Características de la Catalasa

La Catalasa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en microorganismos aerobios, en células de plantas y en animales. La actividad de la Catalasa en tejidos animales varía grandemente, es muy alta en hígado y muy baja en tejido conectivo. En eritrocitos de humano se encuentran altas cantidades de Catalasa, mientras que los eritrocitos de pato están prácticamente libres de Catalasa.



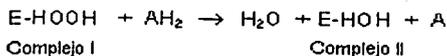
La Catalasa es una enzima tetramérica que consiste de cuatro subunidades idénticas de 60000 g/mol. La Catalasa lleva a cabo varias funciones, por una parte se localiza en organelos y actúa como regulador de los niveles de H₂O₂ que producen otras enzimas como la uricasa, y por otro lado en eritrocitos la Catalasa junto con la glutatión peroxidasa ejerce una función de protección para la hemoglobina.

La Catalasa es una enzima que muestra un comportamiento inusual, ya que ejerce una doble función:

- a) La descomposición del H₂O₂ para dar H₂O y O₂:



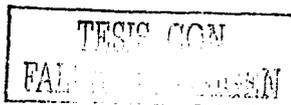
- b) La oxidación de donadores de protones (representados por AH₂) como por ejemplo metanol, etanol ácido fórmico etc.



En ambos casos la Catalasa forma un complejo Catalasa-H₂O₂ que es activo. La descomposición de una segunda molécula (AH₂ o H₂O₂) sirve como un donador de H al complejo I formándose un complejo II que es inactivo [3].

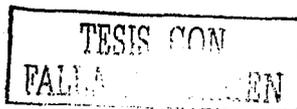
Existen muchos métodos para medir la actividad de la Catalasa. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran las siguientes:

1. La medición del oxígeno liberado por la descomposición del peróxido de hidrógeno.
2. La determinación del peróxido de hidrógeno por su absorbancia a 240 nm
3. Medición electroquímica del peróxido de hidrógeno.
4. Titulación del peróxido de hidrógeno residual.



3. Bibliografía

1. C.J.Brinker y G.W. Scherer *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press, New York, 1990.
2. R.K. Iler, *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry*, Wiley, New York, 1979
3. H.V.Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, Tomo V, Cap.(III), 3rd ed., Verlag Chemie, Florida, 1986
4. D.T.Plummer, *An Introduction to Practical Biochemistry*, 3^{ra}. ed., Mc Graw Hill, London, 1987.
5. D.J.Holme y Hazel, *Bioquímica Analítica*, Editorial Acribia, Zaragoza España, 1987.
6. E.T.Mertz , *Bioquímica*, 6^a ed., Publicaciones Cultural, México, 1983



Capítulo II

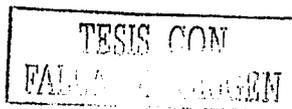
Desarrollo experimental

En este capítulo se describen los procedimientos para la preparación de los geles solos y de los geles dopados, así como las técnicas y métodos utilizados para su evaluación.

1. Soluciones y reactivos

1.1. Reactivos

- α -Amilasa de *Bacillus licheniformis* 2.4 U / mg (Fluka)
- Catalasa 2800 U/mg de sólido 4000 U/mg de proteína (Sigma)
- Albúmina de suero de bovino (BSA), 1 mg/ml en NaCl 0.15 M y 0.05% de azida de sodio (Sigma)
- Tetraetoxisilano (TEOS) 99% (Fluka)
- Peróxido de hidrógeno 30%, reactivo analítico (Mallinckrodt)
- Reactivo de Folin 2 N (Sigma)
- Almidón de papa (soluble tratado con glicerol a 190° C) (Fluka)
- Fosfato monobásico de potasio, reactivo analítico, (Fluka)
- Hidróxido de sodio en perlas, reactivo analítico (Fluka)
- Ácido clorhídrico concentrado (Reactivos Monterrey)
- Ácido sulfúrico concentrado (Reactivos Monterrey)
- Dodecilsulfonato de sodio (Fluka)
- Tritón X-100 (para biología molecular) (Fluka)
- Agua desionizada grado reactivo, tipo I
- Fenolftaleína, reactivo indicador (Aldrich)
- Rojo de bromofenol, reactivo indicador (Fluka)
- 1,10-Fenantrolina, monohidratado, reactivo ACS (Sigma)
- Negro de eriocromo T, reactivo grado indicador (Aldrich)
- Yodo, grado reactivo 99.8 % (Aldrich)



- Sulfato de cobre(II) pentahidratado 98 % (Aldrich)
- Carbonato de sodio, reactivo analítico (Mallinckrodt)
- Ácido oxálico, reactivo analítico (Mallinckrodt)
- Permanganato de potasio 99 +% (Aldrich)
- L-Tartrato de sodio dihidratado 99 % (Aldrich)
- Sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético 99 % (Fluka)
- Nitrógeno gas (Praxair)

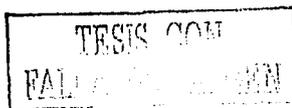
1.2. Soluciones

- Ácido clorhídrico 0.04 M
- Ácido clorhídrico 0.1 M
- Ácido sulfúrico 3.5 N
- Fenoltaleína al 1% p/v solución etanólica
- Rojo de bromofenol al 1% p/v solución etanólica
- 1,10-Fenantrolina al 0.1% p/v solución etanólica
- Negro de eriocromo T al 0.1% p/v solución etanólica
- Solución de almidón 4 mg/ml. 0.5 g de almidón y se disolvieron en buffer en fosfatos 0.4 M y se llevó a un volumen final de 25 ml. De esta solución se tomaron 10 ml y se aforaron a 50 ml con el mismo buffer de fosfatos 0.4 M
- Solución de peróxido de hidrógeno 0.06 M. 0.6 ml de peróxido de hidrógeno se diluyeron con buffer de fosfatos 0.4 M a 100 ml (la solución se prepara en el momento del uso)
- Reactivo de Folin. 10 ml de reactivo de Folin 2 N se diluyeron en 50 ml de agua
- Reactivo de Yodo. 5 g de yodo y 10 g de yoduro de potasio se disolvieron en 10 ml de agua, y se aforó a 100 ml. Se almacenó en un frasco ámbar
- Solución A. Se pesaron 0.05 g de sulfato de cobre ,previamente secado a 105 °C durante 2 horas, 0.1 g de tartrato de sodio y 5 g de carbonato de sodio. El carbonato de sodio se disolvió en 200 ml de agua y se adicionó a 200 ml de agua que contenía al tartrato y al sulfato de cobre. Finalmente esta mezcla se llevó a 500 ml

- Solución B. 0.1 g de dodecilsulfonato de sodio se disolvieron con agua llevando a un volumen final de 20 ml
- Solución C. 0.4 g de hidróxido de sodio se disolvieron en agua, y se aforó a 10 ml
- Mezcla de A+B+C. 10 ml de la solución A con 20 ml de la solución B y 10 ml de la solución C
- Solución de Catalasa 168 U/ml. 0.0120 g de Catalasa comercial se disolvieron en buffer de fosfatos llevando a un volumen final de 200 ml. Se guardó en refrigeración a 4°C (utilizar por no más de 3 semanas)
- Solución de α -Amilasa 18 U/ml. 0.0375 g de α -Amilasa 2.4 U/mg se disolvieron en buffer de fosfatos llevando a un volumen de 5 ml (utilizar por no más de 3 semanas)
- Buffer de fosfatos 0.4 M pH=7. 13.610 g de fosfato monobásico de potasio se disolvieron en 200 ml de agua y se ajustó el pH a 7 con solución de hidróxido de sodio 1 M; se aforó a 250 ml (no usar por más de tres semanas o si se observa precipitado)
- Buffer de fosfatos 0.1M pH=7. 13.610 g de fosfato monobásico de potasio, se disolvieron en 900 ml de agua y se ajustó el pH a 7 con solución de hidróxido de sodio 1 M; se aforó a 1000 ml (no usar por más de tres semanas o si se observa precipitado)
- Solución de permanganato de potasio 0.005 M. 0.79 g de permanganato de potasio se disolvieron en agua llevando a un volumen final de 1000 ml
- Solución de Tritón X al 0.6% v/v. 0.6 ml de Tritón X-100 se colocaron en un matraz aforado de 100 ml y se llevó al aforo con buffer fosfatos 0.1 M

2. Equipo y materiales

- Espectrofotómetro (Ω Metrohm modelo 662)
- Estufa de laboratorio marca FELISA
- Baño ultrasónico (Sonicor, modelo SC100)
- Liofilizador (Heto, modelo DW 1.0-110)
- pH metro (Corning, modelo 220)
- Electrodo combinado de vidrio calomel (Cole-palmer, modelo 60648)
- Purificador y desionizador de agua NANOpure (Barnstead Thermolyne, modelo 04747)



- Micropipetas de 5 a 50 μ l, de 50 a 200 y de 200 a 1000 μ l
- Sistema de filtración de vidrio (Millipore, modelo OM027)
- Frascos de vidrio de 25 ml
- Jeringa para HPLC 250 μ l Hamilton 1700
- Matraz bola de 100 ml con boca esmerilada 24/40
- Mortero de porcelana con pistilo
- Jeringas de 1 ml marca Plastipak
- Jeringas de 5 ml marca Nipro
- Filtros para columna HPLC con centro de acero inoxidable y anillo de PEEK de 0.25 pulgadas de diámetro y tamaño de poro 2 μ m (Upchurch)
- Filtros para columna HPLC de acero inoxidable de 8 mm de diámetro y 2 μ m de tamaño de poro (Phenomenex)
- Monitor de oxígeno YSI Modelo 5300 (biological oxygen meter)
- Electrodo tipo Clark

3. Metodología experimental

3.1. Obtención de las condiciones óptimas para la preparación de geles

Todos los geles se prepararon a partir de tetraetoxisilano (TEOS) como precursor, utilizando catálisis ácida (HCl). Inicialmente se realizaron pruebas para obtener las relaciones molares óptimas de los reactivos para la formación del sol-gel.

a) Variación de la relación tetraetoxisilano : ácido clorhídrico manteniendo constante la cantidad de agua

La relación molar entre tetraetoxisilano y agua se mantuvo constante (1:2), se eligió esta relación por ser la que se encontró reportada en los diversos trabajos que se revisaron en la bibliografía [1,2]. La relación molar entre tetraetoxisilano y ácido clorhídrico se varió entre $1:1.6 \times 10^{-5}$ y $1:4.0 \times 10^{-4}$. Las relaciones molares tetraetoxisilano:ácido clorhídrico que se probaron y las cantidades correspondientes de cada reactivo utilizado se muestran en las tablas II.1 y II.2 .

Tabla II.1. Relaciones molares tetractoxisilano:ácido clorhídrico para la preparación de sol-gel

Ensayo	Relación molar TEOS/HCl
1	1: 1.6×10^{-5}
2	1: 3.2×10^{-5}
3	1: 8.0×10^{-5}
4	1: 1.6×10^{-4}
5	1: 2.5×10^{-4}
6	1: 4.0×10^{-4}

Tabla II.2. Cantidad de reactivos en la mezcla de reacción para la obtención de las mejores condiciones en la preparación de geles

TEOS (ml)	Agua (ml)	HCl 0.04 M (μ l)	Relación molar TEOS/H ₂ O/HCl
2.5	0.4	4.0	1: 2.2: 1.6×10^{-5}
2.5	0.4	8.0	1: 2.2: 3.2×10^{-5}
2.5	0.4	20.0	1: 2.3: 8.0×10^{-5}
2.5	0.4	40.0	1: 2.4: 1.6×10^{-4}
2.5	0.4	62.5	1: 2.5: 2.5×10^{-4}
2.5	0.4	100.0	1: 2.8: 4.0×10^{-4}

El procedimiento utilizado para la preparación de los geles fue el siguiente:

1. Se mezclaron los reactivos de acuerdo con las proporciones indicadas en la Tabla II.2
 2. El recipiente con la mezcla homogeneizada se tapó y se introdujo en un baño ultrasónico por 30 minutos
 3. La mezcla se sacó del baño y se dejó gelificar y secar a temperatura ambiente hasta peso constante (hasta que no se observe variación después de la tercera cifra, esto se obtiene en \approx 15 días secando a temperatura ambiente), manteniendo el recipiente destapado
 4. El producto obtenido se molió en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo
- b) **Variación de la relación tetractoxisilano: agua manteniendo constante la cantidad de ácido clorhídrico**

Después de realizar los primeros ensayos variando la cantidad de catalizador presente, se efectuaron nuevos ensayos variando ahora la cantidad de agua en la mezcla de reacción. Las relaciones molares y las cantidades de reactivos que se manejaron en estas pruebas se indican en las tablas II.3 Y II.4.

Tabla II.3. Relaciones molares de TEOS:H₂O para la preparación de sol-gel

Ensayo	Relación molar
1	1: 2.8
2	1: 3.8
3	1: 4.6
4	1: 7.2
5	1: 9.4

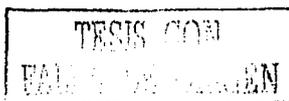
El procedimiento utilizado fue el mismo que en los ensayos anteriores sólo que ahora la cantidad del catalizador se mantuvo constante. La relación molar de TEOS:HCl utilizada fue de $1: 4 \times 10^{-4}$, mientras que la relación molar TEOS:H₂O se varió entre 1:2.8 y 1:9.4 como se indica en la tabla II.3.

Tabla II.4. Cantidades de reactivos agregados para estudiar el efecto de la proporción de agua en la formación del sol-gel

TEOS (ml)	Agua (ml)	HCl 0.04 M (μ l)	Relación molar TEOS: H ₂ O: HCl
2.5	0.4	100	1: 2.8: 4×10^{-4}
2.5	0.6	100	1: 3.8: 4×10^{-4}
2.5	0.8	100	1: 4.6: 4×10^{-4}
2.5	1.2	100	1: 7.2: 4×10^{-4}
2.5	1.6	100	1: 9.4: 4×10^{-4}

c) Empacado del gel en cartucho

En una jeringa de 1 ml se introdujo un filtro de acero poroso al centro y con anillo de PCTFE de 0.25 pulgadas de diámetro, que previamente se adaptó al diámetro de la jeringa desgastando el anillo de PCTFE y procurando que quedara bien ajustado a las paredes internas. Posteriormente se procedió a empacar el polvo del gel por medio de una espátula, golpeando levemente el extremo inferior de la jeringa contra una superficie plana en cada adición para que el material quedara perfectamente asentado. Una vez que se empacó todo el polvo, se introdujo otro filtro de las mismas características que el primero en la parte superior del cartucho, quedando listo para utilizarlo.



De la misma forma se empacaron geles que no se secaron hasta obtener peso constante (solo se secaron hasta perder un 50% de su peso inicial), pero en este caso se utilizaron jeringas de 5 ml y filtros de acero inoxidable de 8 mm de diámetro y 2 μ m de tamaño de poro.

3.2. Preparación de geles dopados con indicadores de pH y metalocrómicos

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la preparación del gel (con base en criterios que se especifican en el capítulo de resultados y discusión), se procedió a dopar el material con moléculas orgánicas pequeñas. Se eligieron para ello diversos indicadores de pH e indicadores metalocrómicos con el fin de que el producto obtenido pudiera ser eventualmente utilizado como un sensor químico.

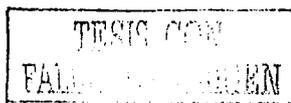
El procedimiento empleado para la preparación del gel dopado fue similar al descrito en la sección II.3.1, sólo se añadió un paso extra para la adición de la molécula orgánica. El procedimiento general de preparación de geles dopados con moléculas orgánicas pequeñas se resume en los siguientes pasos:

1. En un frasco de vidrio se mezclan TEOS, H₂O y la solución de HCl en las proporciones molares óptimas, deducidas de los ensayos anteriores
2. Se añaden 3 ml de la solución etanólica del indicador
3. El recipiente con la mezcla se tapa y se somete a sonicado por 30 minutos
4. El sol se deja gelificar (hasta que se observa la formación de un coloide en todo el fondo del recipiente) y se seca a temperatura ambiente hasta peso constante, manteniendo destapado el frasco
5. El producto se empaca en cartuchos

3.2.1. Pruebas de reversibilidad o funcionamiento para geles dopados con indicadores

a) Reversibilidad en geles dopados con indicadores de pH

Se evaluó el funcionamiento de dos indicadores de pH, la fenoltaleína y el rojo de bromofenol, atrapados en los poros de un gel de sílice. Los experimentos se realizaron



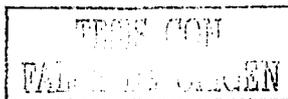
con el material dopado empacado en los cartuchos con el objeto de observar su comportamiento en un sistema dinámico (en flujo). La evaluación fue exclusivamente de tipo cualitativo y consistió en observar los cambios de color del gel y la rapidez a la cual éstos se efectuaban.

El experimento se llevó a cabo a un flujo de 0.5 ml/min. Inicialmente se pasaron 5 ml de HCl 0.01 M por el cartucho y se observó el cambio de color del indicador, al cabo de 5 minutos para el desarrollo del color, posteriormente se lavó con agua para desalojar el ácido, a continuación se pasaron 5 ml de NaOH 0.01 M a la misma velocidad y finalmente se enjuagó de nuevo con agua. El cartucho con el gel embebido en agua se almacenó en refrigeración y cada dos semanas se repitió la prueba de evaluación durante un periodo de tres meses.

b) Pruebas de reversibilidad o funcionamiento para los geles dopados con Indicadores metalocrómicos

Se prepararon dos geles uno dopado con Eriocromo Negro T (ENT) y el otro dopado con o-fenantrolina (O-Fen). Las pruebas se realizaron en tubos de ensayo, colocando en ellos una porción del gel molido y añadiendo soluciones acuosas de diversos reactivos.

El gel seco dopado con ENT tenía una coloración ligeramente violeta y una vez sumergido en agua adquirió un color rojo-vino. Para este gel se hicieron primeramente pruebas de cambio de color en presencia de ácidos y bases. A la fase acuosa en contacto con el gel se le añadieron unas gotas de amoníaco, se agitó el tubo y después de un cierto tiempo se decantó el líquido y se añadió al gel una nueva porción de la fase acuosa con unas gotas de HClO₄ 1 M. Estos ensayos alternados se repitieron varias veces observando los cambios de color. Posteriormente, se realizaron las pruebas de formación de complejos utilizando como catión metálico al Mg²⁺. A una porción de gel dopado se le agregó agua, unas gotas de amoníaco y una pequeña cantidad de MgCl₂. Después de algunas horas (requeridas para observar un cambio de color neto) se añadió a la solución un poco de sal disódica del EDTA y unas gotas más de amoníaco.



El gel se tuvo en observación durante 24 horas, agitando al tubo de ensayo esporádicamente.

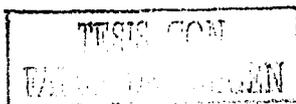
Al gel dopado con O-Fen (el cual no mostraba ninguna coloración) se le añadió una solución de una sal ferrosa en buffer acético (pH = 4). Después de un tiempo se decantó el líquido y se agregó una nueva porción de la solución de Fe^{2+} al gel, dejándose en observación durante dos días. En otro ensayo, a una porción no usada del gel dopado se le añadió la solución de Fe^{2+} y unas gotas de amoníaco. Después de un tiempo se decantó el líquido y se lavó varias veces el gel con agua, finalmente se dejó sumergido en agua y se mantuvo en observación durante un día. Posteriormente se agregó EDTA y unas gotas de amoníaco a la fase acuosa en contacto con el gel y se mantuvo en observación durante varios días.

3.3. Técnica de preparación para geles dopados con albúmina (BSA)

Para la preparación de geles dopados con moléculas biológicas se ensayaron dos procedimientos. Uno de ellos fue similar al utilizado para encapsular los indicadores, con lo cual se obtuvo un material seco. En el segundo se modificaron significativamente las condiciones experimentales y el producto obtenido no se dejó secar. Estos procedimientos se describen a continuación:

a) Xerogeles (geles secados)

1. Mezclar TEOS, H₂O y HCl en las proporciones molares óptimas
2. Tapar el frasco con la mezcla y sonicar durante 30 minutos
3. Retirar del baño ultrasónico y agregar 0.5 ml de buffer fosfatos
4. Inmediatamente añadir el volumen adecuado del estándar de BSA de 1 mg/ml, según la cantidad de proteína que se desea encapsular
5. Homogeneizar perfectamente la mezcla y luego dejar gelificar y secar hasta peso constante con el frasco destapado
6. Moler finalmente el producto
7. Empacar en cartuchos



b) Hidrogeles (geles no secados)

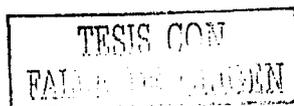
1. Igual que en el procedimiento anterior
2. Igual que en el procedimiento anterior
3. Dejar proceder la reacción
4. Añadir 2 ml de buffer fosfatos
5. Agregar el volumen conveniente del estándar de BSA de 1 mg/ml, según la cantidad de proteína a encapsular
6. Homogeneizar la mezcla y dejar gelificar (a los 2 minutos de agregar el buffer, se gelifica la gran mayoría de la mezcla de reacción)
7. Eliminar la capa superior del líquido que no gelificó (en su mayoría es tetraetoxisilano sin reaccionar)
8. Fragmentar el material con una espátula lo más finamente posible

3.3.1. Cuantificación de la proteína no encapsulada en geles dopados con BSA

Para realizar la cuantificación de la cantidad de proteína no encapsulada en el gel, se preparó previamente una curva de calibración de albúmina que abarcó desde 1 $\mu\text{g/ml}$ a 30 $\mu\text{g/ml}$.

a) Curva de calibración de albúmina

1. En una serie de tubos de ensayo colocar 3 ml de cada uno de los estándares de albúmina en PBS, según se indica en la Tabla II 5
2. Agregar a cada tubo 1 ml de la mezcla de reactivos ABC (descrita en la sección II.1.2).
3. Añadir a cada tubo 0.5 ml de la solución preparada de reactivo de Folín [3-5] y en este instante iniciar el conteo del tiempo de incubación
4. Homogeneizar la mezcla
5. Dejar incubar durante 30 minutos cada tubo
6. Fijar la longitud de onda del espectrofotómetro a 700 nm y ajustar a cero con el tubo blanco
7. Leer la absorbancia para cada tubo al final del tiempo de incubación



b) Cuantificación de proteína no encapsulada en xerogeles

1. Se realiza un lavado al cartucho empacado con el gel haciendo pasar a través de éste 3 ml de agua y se recolecta el efluente en un tubo de ensayo
2. Se realiza un segundo lavado al cartucho con 3 ml de metanol-agua a 60:40 (v/v) y se recolecta el efluente en un tubo de ensayo limpio
3. Se repiten los lavados del paso 1 y 2, recolectando en cada caso el efluente en un nuevo tubo de ensayo
4. Se agrega a cada tubo 1 ml de la mezcla de reactivos ABC
5. Se añaden 0.5 ml de la solución preparada de reactivo de Folin y se inicia el conteo del tiempo de incubación de cada tubo [9]
6. Se deja incubar cada tubo durante 30 minutos
7. Se ajusta a cero la absorbancia en el espectrofotómetro con un blanco (700 nm)
8. Se lee la absorbancia de cada tubo al final del tiempo de incubación

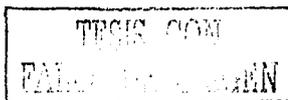
TABLA II.5 Cantidades de reactivos utilizados para preparar la curva de calibración de BSA

Estándar de BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Cantidad del estándar (ml)	Mezcla A+B+C (ml)	Reactivo de Folin (ml)
0	3	1	0.5
1	3	1	0.5
2	3	1	0.5
5	3	1	0.5
10	3	1	0.5
15	3	1	0.5
20	3	1	0.5
23	3	1	0.5
25	3	1	0.5
30	3	1	0.5

c) Cuantificación de la proteína no encapsulada en hidrogeles

La cuantificación de la proteína se llevó a cabo utilizando la misma curva de calibración ya descrita en la tabla II.5. El procedimiento efectuado fue el siguiente:

1. Agregar 2 ml de agua al frasco que contiene al gel fragmentado
2. Agitar el material con una varilla de vidrio para lavarlo



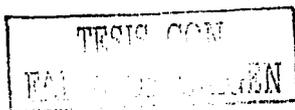
3. Filtrar a través de una membrana de nylon de 0.46 μm recuperando el filtrado en un tubo de ensayo
4. Añadir 1 ml de agua al frasco y enjuagar sus paredes para arrastrar al material que quedó pegado
5. Filtrar este líquido y recuperar junto con los otros 2 ml anteriores
6. Lavar ahora el frasco con 3 ml de la mezcla metanol-agua 60:40 (v/v) y filtrar el líquido a través de la membrana que contiene al gel procurando que todo el material sólido sea bien mojado por este líquido
7. Recuperar el filtrado en un tubo de ensayo limpio
8. Repetir el procedimiento de los pasos 6 y 7 ahora con 3 ml de agua
9. Agregar 1 ml de la mezcla de reactivos ABC a cada tubo
10. Añadir 0.5 ml de la solución preparada del reactivo de Folín iniciando el conteo del tiempo de incubación para cada tubo
11. Dejar incubar durante 30 minutos
12. Ajustar a cero con el blanco apropiado
13. Leer la absorbancia a 700 nm

La cuantificación de BSA se trató de realizar también en la capa de líquido que no gelificó pero resultó ser muy difícil ya que gelificaba en la celda del fotómetro impidiendo las lecturas.

d) Pruebas cualitativas de la presencia de la proteína en los geles

También se realizaron pruebas cualitativas para asegurar que la proteína se encontrara presente en los geles dopados y el método utilizado para ello se describe a continuación:

Una vez que se realizaron los lavados como se indicó en las secciones II.3.3.1 b y c, se procedió a empacar también los geles fragmentados en cartuchos plásticos. Se hizo pasar a través de cada cartucho una mezcla compuesta de 1 ml del reactivo ABC y 0.5 ml de la solución del reactivo de Folín a una velocidad de 0.2 ml/min, después de lo cual se dejaron reposar los cartuchos 30 minutos y se observó si había desarrollo de color.



3.4. Preparación de geles dopados con α -Amilasa o Catalasa

a) Técnica general de preparación

La preparación de estos geles se lleva a cabo igual que en II.3.3.b sustituyendo el paso 5 por el siguiente:

- 5 Añadir 50 μ l de la solución de α -Amilasa 18 U/ml o 200 μ l de una solución 168 U/ml de Catalasa según sea el caso

El material fragmentado (después del paso 8, sección II.3.3.b) se lavó con diferentes disoluciones y se dejó finalmente embebido en buffer fosfatos. A este material se le puede utilizar para mediciones oximétricas o bien secarlo como se describe a continuación para obtener polvos que presenten actividad enzimática.

b) Técnicas de secado para obtener geles parcialmente secos que presenten actividad enzimática

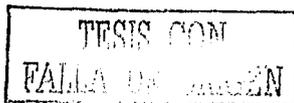
Para el secado de los geles dopados con enzimas se ensayaron tres condiciones distintas:

1. Secado a temperatura ambiente

Una vez que se obtiene al gel ya lavado como se describe en II.3.4.a, se le coloca en un frasco de 25 ml que tenga boca ancha sin tapa y simplemente se deja en un lugar seco y sin contacto directo con la luz solar. De esta manera el gel tarda aproximadamente 2 días en perder el 50% de su peso inicial. Una vez seco se puede moler en mortero hasta obtener un polvo lo más fino posible.

2. Secado a 4 °C

Este secado se realizó de la misma forma que el secado a temperatura ambiente, sólo que el frasco que contenía al gel se introdujo en un refrigerador a 4 °C, tardando entre 3 y 4 días en perder el 50% de su peso inicial. Una vez seco se procedió a molerlo en un mortero.



3. Secado por liofilización

Una vez obtenido el gel ya lavado como se indica en 11.3.4.a el procedimiento que se siguió se describe a continuación:

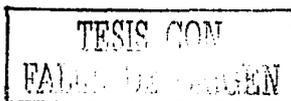
1. Se coloca al gel en un matraz bola de 100 ml con boca esmerilada 24/40
2. Se sumerge el matraz en una mezcla de hielo seco-acetona por 40 minutos
3. Se cierran todas las válvulas de salida del liofilizador y se enciende la bomba de vacío
4. Después se coloca el matraz en una de las entradas esmeriladas del liofilizador
5. Se abre la válvula para eliminar el aire en el matraz y se continúa así durante 20 minutos
6. Se pone la válvula en posición de entrada de aire para romper el vacío en el sistema
7. Se separa el matraz y se deja alcanzar la temperatura ambiente antes de sacar al gel
8. Finalmente se muele el material en un mortero con pistilo hasta la obtención de un polvo lo más fino posible
9. Se empaqueta el material en cartuchos como se describe en 11.3.1.c o bien se puede utilizar directamente el polvo no empacado para mediciones de actividad

3.4.1. Pruebas realizadas a geles dopados con α -Amilasa

En algunos ensayos preliminares con la enzima libre se observó que una cantidad de ésta, idéntica a la empleada para dopar los geles, trabaja a saturación cuando se pone en contacto con soluciones de almidón (4 ml) a concentración superior a 150 $\mu\text{g/ml}$ (es decir, cantidades de almidón mayores a 600 μg). De aquí se dedujo el intervalo de concentraciones que debería de abarcar la curva de calibración de almidón y la cantidad de sustrato a utilizar en las pruebas de determinación de actividad de la enzima encapsulada.

a) Curva de calibración de almidón

Para realizar la medición de la actividad de la α -Amilasa se preparó una curva de calibración de almidón [5] con soluciones de concentración entre 2 $\mu\text{g/ml}$ y 150 $\mu\text{g/ml}$, como



se indica en la tabla II.6 (cantidad de almidón entre 8 y 600 μg). El procedimiento para obtener la curva de calibración se describe a continuación:

1. En una serie de tubos de ensayo se colocan 4 ml de soluciones de almidón a diferentes concentraciones conocidas
2. Se añaden 2 ml de ácido sulfúrico 3.5 N
3. Finalmente se agrega una gota del reactivo de yodo, iniciando el conteo del tiempo de reacción
4. Se deja desarrollar el color durante 5 minutos para cada tubo
5. Se lee la absorbancia a 595 nm al término de los 5 minutos

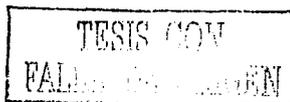
Tabla II.6 Concentraciones de los estándares y cantidad de reactivos utilizados para construir la curva de calibración de almidón

Estándar de almidón ($\mu\text{g/ml}$)	Estándar de almidón (ml)	H_2SO_4 (3.5 N) (ml)	Reactivo de yodo
0	4	2	1gota
2.0	4	2	1gota
5.0	4	2	1gota
10.0	4	2	1gota
20.0	4	2	1gota
30.0	4	2	1gota
50.0	4	2	1gota
75.0	4	2	1gota
100.0	4	2	1gota
150.0	4	2	1gota

b) Comparación entre la actividad de la α -Amilasa libre y la encapsulada.

La técnica para la medición de la actividad de la α -Amilasa fue la siguiente:

1. Se etiqueta una serie de tubos de ensayo con tiempos que van desde 0 hasta 40 minutos
2. En cada tubo se colocan 3.8 ml de buffer fosfatos 0.1 M
3. Se añaden 50 μl de una solución de α -Amilasa 18 U/ml o bien los geles. dopados con esta misma cantidad de α -Amilasa
4. Se introducen los tubos a un baño de agua a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos



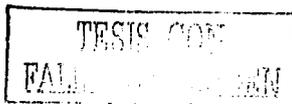
5. Se agregan 150 μ l de una solución de almidón 4 mg/ml iniciando el conteo del tiempo de reacción para cada tubo en este momento
6. Se agita la mezcla
7. Se introducen de nuevo los tubos en el baño de agua a 25 °C
8. La reacción se detiene añadiendo 2 ml de ácido sulfúrico 3.5 N en el tubo al cumplirse el tiempo asignado a cada uno
9. Se añade una gota de indicador de yodo agitando la mezcla
10. La absorbancia se lee a 595 nm, cinco minutos después de la adición del yodo

c) Comparación de la actividad entre geles dopados con α -Amilasa empacados en cartucho antes y después de tratamiento con Tritón X-100

Para probar el funcionamiento de cartuchos empacados con gel dopado con α -Amilasa y secados a 4 °C, se efectuó el experimento siguiente:

1. A los cartuchos se les hacen pasar 4 ml de una solución de almidón 0.15 mg/ml (600 μ g) a una velocidad de 0.5 ml/min
2. Se recupera el efluente en un tubo de ensayo
3. A este líquido se le añaden 2 ml de ácido sulfúrico 3.5 N homogeneizando perfectamente
4. Se añade una gota de reactivo de yodo homogeneizando nuevamente
5. Se lee la absorbancia a 595 nm

Con la lectura de la absorbancia y la curva de calibración de almidón se obtiene la concentración de almidón presente en la solución e indirectamente se puede deducir la cantidad de almidón degradado por la enzima. Al terminar la primera evaluación de actividad, los cartuchos se lavaron con 10 ml de buffer fosfatos 0.1 M a un flujo de 0.5 ml/min y se dejaron reposar una hora. El ensayo de evaluación de actividad se volvió a repetir tres veces más en los mismos cartuchos. Después del cuarto uso, una vez lavados los geles con buffer fosfatos, se pasaron 2 ml de una solución de Tritón X-100 al 0.6% v/v a través de los cartuchos, a una velocidad de 0.5 ml/min. Posteriormente se enjuagaron de



nuevo con buffer fosfatos y se dejaron en reposo por una hora. Finalmente se volvió a realizar dos veces más la medición de la actividad en los geles, intercalando entre ambas el tratamiento con Tritón X-100.

Los resultados obtenidos de las cinco mediciones de la actividad se reportan en el siguiente capítulo como % de sustrato degradado vs número de ensayo.

3.4.2. Pruebas realizadas a geles dopados con Catalasa

a) Técnica general de medición de la actividad de la Catalasa por oximetría

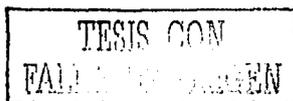
La determinación de la actividad de la Catalasa se realizó midiendo la concentración del oxígeno, con respecto al tiempo, que se produce durante la degradación del sustrato utilizado (peróxido de hidrógeno) y que se puede resumir en la siguiente reacción.



El seguimiento de la evolución del oxígeno con respecto al tiempo se realizó utilizando un monitor de oxígeno y un electrodo tipo Clark [6, 7].

Calibración del oxímetro

1. Agregar 7 ml de buffer fosfatos 0.4 M, previamente burbujeados con nitrógeno durante 6 horas, a la celda del oxímetro
2. Introducir el electrodo tipo Clark a la celda procurando evacuar todo el aire entre la solución y el electrodo por medio del canal que se encuentra en un extremo del electrodo
3. Encender la agitación del sistema e iniciar la circulación del baño de agua a 25 °C
4. Poner la perilla de funciones del oxímetro en la posición "aire"
5. Ajustar con la perilla de calibración la escala del oxímetro a cero
6. Añadir a otra celda 6 ml de buffer saturado de oxígeno
7. Se introduce el electrodo en la celda eliminando al aire que se encuentra entre la solución y el electrodo



8. Se ajusta al 10% de la escala con la perilla de calibración (una solución acuosa saturada de oxígeno a 25°C contiene una concentración de oxígeno de 0.250 $\mu\text{mol/ml}$ [6,8])

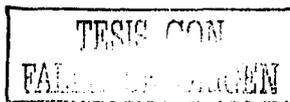
Muestras

1. Se agregan 6.6 ml de buffer fosfatos 0.4 M previamente burbujeados con N_2 durante 6 horas, a una celda de reacción
2. Se añaden 0.2 ml de Catalasa 168 U/ml (33.6 U) o bien geles dopados con la misma cantidad de enzima
3. Se introduce el electrodo de Clark eliminando el aire entre la solución y el electrodo.
4. Se enciende la agitación
5. Se inicia la circulación del baño de agua a 25°C
6. Se deja agitando 5 minutos la mezcla para alcanzar el equilibrio térmico
7. Se inyectan 200 μl de peróxido de hidrógeno 0.06 M, al mismo tiempo se inicia el registro de la evolución del oxígeno que se obtiene en unidades de % de oxígeno disuelto
8. Los datos en % de O_2 se transforman a $\mu\text{mol/ml}$ utilizando el factor de conversión indicado en el punto 8 del procedimiento de calibración y finalmente se reportan como μmol de O_2 considerando el volumen total (7 ml) de la muestra analizada. La medición de la actividad se realiza en la parte lineal de la gráfica μmol de O_2 vs tiempo (entre 0 y 1 minutos aprox.)

b) Comparación de la actividad entre Catalasa libre y encapsulada

Utilizando el procedimiento antes descrito, se determinó la actividad de los geles dopados con 33.6 U de Catalasa y secados a 4°C; también se determinó la actividad de una cantidad idéntica de enzima libre.

En ambos casos, los valores de actividad enzimática se obtuvieron a partir de la pendiente de la parte lineal ascendente de la curva de μmol de O_2 Vs tiempo [7-10]. La comparación de los resultados obtenidos permite evaluar la pérdida de actividad de la enzima inmovilizada.



c) Pruebas de repetibilidad en la actividad enzimática para geles preparados en fechas distintas

Se prepararon geles dopados con 33.6 U de Catalasa en fechas distintas y se secaron a 4 °C.

Una vez secos y molidos, se realizó la determinación de la actividad enzimática para los cuatro geles el mismo día, conjuntamente con la determinación de la actividad para una cantidad idéntica de la enzima libre.

La comparación de resultados de los diferentes geles permite establecer la reproducibilidad del material obtenido mediante la técnica de inmovilización de biomoléculas desarrollada.

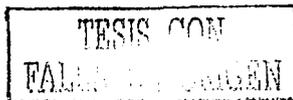
d) Pruebas para determinar el comportamiento de la actividad de la enzima encapsulada con el reuso de los geles

Las pruebas se realizaron en un gel dopado con Catalasa, secado a 25 ° C y molido.

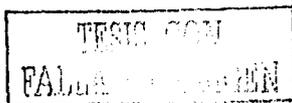
1. Se determinó la actividad del gel y de una cantidad idéntica de la enzima libre por oximetría
2. Después de utilizar al gel se le reacondicionó lavándolo con 10 ml de buffer de fosfatos 0.1 M pH=7, 10 ml de solución de metanol-agua 60:40 (v/v) y 10 ml de buffer de fosfatos 0.1 M
3. Nuevamente se realizó la determinación oximétrica
4. Se repitieron los pasos 2 y 3 dos veces más para observar las variaciones en la actividad de la enzima encapsulada a lo largo de cuatro usos consecutivos

e) Medición de la actividad enzimática de la Catalasa por oximetría en geles reutilizados y tratados con solución de Tritón X-100 al 0.6%

El método que se utilizó en este caso es el mismo que se describe en la sección anterior (inciso d) hasta el paso 3. Se lavó el gel con buffer y mezcla metanol-agua y después se llevo a cabo lo siguiente:



- 4 Se trató el gel con 2 ml de una solución de Tritón X-100 0.6% v/v dejándola en contacto 5 minutos y retirándola posteriormente con ayuda de una jeringa
 - 5 Se lavó de nuevo el material con 10 ml de buffer de fosfatos 0.1 M, 10 ml de metanol-agua 60:40 (v/v) y al último con 10 ml de buffer fosfatos 0.1 M
 - 6 Finalmente, se realizó la medición de actividad por oximetría en el gel tratado
- f) **Comparación del funcionamiento de los geles dopados y empacados en cartuchos antes y después de tratarlos con solución de Tritón X-100 0.6%**
1. Se prepararon geles dopados con 33.6 U de Catalasa se secaron a 4 °C, se molieron y se empacaron en cartuchos
 2. Se pasaron 5 ml de peróxido de hidrógeno 0.014 M (70 μ mol) a una velocidad de 0.5 ml/min a través de los cartuchos, recolectando el efluente en un tubo de ensayo
 3. Los cartuchos se lavaron con 5 ml de buffer fosfatos 0.1 M a una velocidad de 0.5 ml/min y este lavado se colectó en el mismo tubo de ensayo que el líquido anterior
 4. Finalmente los cartuchos se acondicionaron con 10 ml de buffer fosfatos 0.1 M a una velocidad de 0.5 ml/min, dejándolos reposar una hora antes de utilizarlos nuevamente
 5. Al líquido colectado en el tubo de ensayo se le añadieron 2 ml de ácido sulfúrico 3.5 N y se tituló con permanganato de potasio 0.018 M hasta la aparición de coloración rosa tenue [11]. De esta manera se determinó la cantidad de peróxido presente en la solución y por diferencia se calculó el % de sustrato degradado por la enzima
 6. Los cartuchos se utilizaron dos veces más y después de realizar el acondicionamiento del paso 4 se les trató con 2 ml de Tritón X-100 0.6% v/v haciéndolo pasar a una velocidad de 0.5 ml/min
 7. Se lavaron nuevamente los geles con 10 ml de buffer fosfatos 0.1 M a una velocidad de 0.5 ml/min para eliminar el exceso de Tritón X-100 y se dejaron reposar los cartuchos durante una hora antes de pasar nuevamente la solución de peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos en esta prueba se reportan como % de peróxido de hidrógeno degradado vs número de ensayo



La solución de permanganato de potasio empleada para titular el peróxido no degradado se estandarizó previamente utilizando como patrón primario ácido oxálico [12].

3.4.3. Obtención de K_m para la Catalasa libre y encapsulada

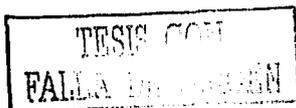
Se prepararon 5 geles dopados con 33.6 U de Catalasa cada uno, como se indica en la sección 3.4. El material obtenido se guardó en viales y se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Con cada uno de los geles se hizo una medición oximétrica (según se describe en la sección 3.4.2) agregando un volumen adecuado de buffer de fosfatos 0.4 M (previamente burbujeadado con N_2) a la celda del oxímetro e inyectando diferentes cantidades de H_2O_2 . La concentración de sustrato en los 7 ml de líquido en la celda se hizo variar entre 20 μM y 1700 μM . La evolución de oxígeno se siguió durante 20 min. En La tabla II.7 se detallan las cantidades de reactivos añadidos en cada medición.

Para obtener las curvas de la enzima libre, se realizaron mediciones idénticas a las descritas en el inciso anterior, pero los geles fueron reemplazados por 200 μl de una solución de 168 U/ml de Catalasa. El volumen de buffer añadido a la celda para estas mediciones fue por lo tanto 200 μl menor que en el caso de los geles (Tabla II.7).

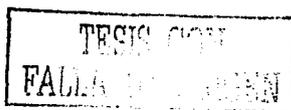
Tabla II.7 Cantidades de reactivos utilizados en los ensayos para determinar la K_m de la Catalasa libre y encapsulada

H_2O_2 : (mM)	(μl) estándar	(ml) de buffer (geles)	(ml) de buffer (enzima libre)	Concentración de H_2O_2 (μM)
0.7	200	6.80	6.60	20
0.7	1000	6.00	5.80	100
700	5	7.00	6.80	500
700	10	6.99	6.79	1000
700	17	6.98	6.78	1700



4. Bibliografía

1. M.Cichna, D.Knopp y R. Niessner, *Immunoaffinity Chromatography of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Columns Prepared by the Sol-Gel Method*, Anal. Chim.Acta, 339 (1997) 241-250.
2. U. Narang, M.H. Rahman, J.H. Wang, P.N. Prasad y F.V. Bright, *Removal of Ribonucleases from Solution Using an Inhibitor-Based Sol-Gel Derived Biogel*, Anal. Chem., 67 (1995) 1935-1939.
3. R.L. Dreyer y G.F.Lata, *Experimental Biochemistry*. Oxford Univ. Press, Nueva York, 1989
4. < WWW.bio.mtu.edu/campbell/ b14820/lectures/lcc1/proteins2.htm> 2 jul. 2002.
5. R.W. Cowgill y A.B. Pardee, *Experiments in Biochemical Research Techniques*, John Wiley & Sons, New York, 1957.
6. YSI Model 5300 *Biological Oxygen Monitor Instrucción Manual*, Scientific Division, Yellow Springs Instruments Co. Inc.
7. L.A.Del Rio, O.M. Gómez, L.A. Leal y G.J. López, *A More Sensitive Modification of the Catalase Assay with the Clark Oxygen Electrode*, Analytical Biochemistry, 80 (1977) 409-415.
8. G.Cohen. y D. Dembiec, *Measurement of Catalase Activity in Tissue Extracts.*, Anal. Biochem., 34 (1970) 30-38.
9. I.H. Segel, *Cálculos de Bioquímica*, Editorial Acribia, España, 1982.
10. D.T. Plummer, *An Introducción to Practical Biochemistry*, 3ª Ed., Mc Graw Hill, Londres, 1987.
11. A.I.Vogel, *Textbook of Quantitative Inorganic Analysis Including Elementary Instrumental Analysis*, 4ª Ed., Longman, London, 1978.
12. J.S. Fritz, *Química Analítica Cuantitativa*, 3ª ed., Limusa, México, 1979



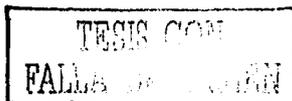
Capítulo III

Resultados y discusión

Los procesos Sol-Gel representan actualmente uno de los campos de mayor auge en la química de los materiales y consisten básicamente en la preparación de un material a partir de una reacción de precursores orgánicos a temperatura ambiente. La sílica preparada por Sol-Gel es una matriz porosa que contiene cavidades o poros en forma de cuello de botella interconectados, dando lugar a una red tridimensional de SiO_2 . El proceso de Sol-Gel puede dividirse en cuatro etapas: 1) mezclado y formación del sol, 2) Gelación, 3) maduración y 4) secado.

En la técnica convencional, el precursor (alcóxido metálico de bajo peso molecular, usualmente tetrametoxisilano, TMOS, o tetraetoxisilano, TEOS) se hidroliza primero en presencia de agua, un catalizador ácido (o básico) y un cosolvente como etanol. La hidrólisis da como resultado la formación de grupos silanol (Si-OH) los cuales condensan para formar polímeros siloxano (Si-O-Si) conduciendo a la formación de una suspensión coloidal viscosa (el sol). A medida que la policondensación continúa, el grado de entrecruzamiento entre las partículas aumenta y la viscosidad también se incrementa, hasta llegar al punto de transición sol-gel en el cual el material viscoso solidifica dando lugar a la formación del gel poroso (gelificación). El gel (hidrogel) es un sistema de dos fases: el sólido poroso inorgánico y la fase disolvente atrapada en los poros. Aun después de la gelación, la estructura y propiedades del material continúan cambiando debido a la policondensación entre fragmentos con Si-OH terminal. Durante la maduración, la formación de nuevas ligaduras Si-O-Si da como resultado la contracción del gel; el tamaño de los poros disminuye y parte del disolvente es expulsado de los poros.

En esta etapa, que puede durar desde horas a días, el gel se refuerza. Finalmente, el disolvente es removido de la red porosa durante el secado, dando lugar a una fuerte



contracción del gel y al colapso de los poros. Los geles completamente secos (xerogeles) tienen un volumen aproximadamente 1/8 respecto al gel inicial y un peso de alrededor del 20 % [1-5].

El procedimiento convencional del sol-gel no es adecuado para el encapsulamiento de moléculas biológicas porque las condiciones de pH extremo (ácido o básico) y las altas concentraciones de alcohol añadido y/o formado durante el proceso conducen a la desnaturalización y pérdida de actividad del huésped. Este problema es además agravado durante el secado del material que en algunas técnicas reportadas (6) se realiza en la estufa a 41 °C. Entre las múltiples modificaciones propuestas para inmovilizar moléculas biológicas delicadas en sol-gel se encuentran las siguientes [2,7].

- Adición de buffer después de la hidrólisis catalizada por HCl y antes de añadir la biomolécula
- Suprimir la adición de cosolvente (etanol). Se encontró que este reactivo no era necesario si la mezcla inicial se sonicaba durante la etapa de hidrólisis
- Concentrar el sol, por evaporación, para disminuir el contenido de etanol
- Realizar prehidrólisis recuperar los oligómeros formados por evaporación y someterlos a transesterificación con glicerol. Disolver este producto en agua o ácido diluido y continuar con el proceso normal de hidrólisis
- Lavar el gel con buffer de fosfatos dos veces al día durante la etapa de maduración, para remover el alcohol producido por las reacciones de policondensación que continúan llevándose a cabo en esta etapa
- Realizar un secado lento y controlado (a temperatura ambiente, en refrigeración o por liofilización) para evitar un colapso exagerado de los poros

Dadas la gran diversidad de condiciones, proporciones de reactivos y sugerencias encontradas en la literatura para el encapsulamiento de moléculas orgánicas y biomoléculas por la técnica del sol-gel [7-9] y después de haber probado algunas de ellas sin obtener resultados que concordaran con lo descrito en el trabajo respectivo, se decidió llevar a cabo

un estudio sistemático para encontrar las condiciones más adecuadas de preparación de los geles.

1. Obtención de las condiciones óptimas para la preparación de geles

a) Variación de la relación tetraetoxisilano:ácido clorhídrico manteniendo constante la cantidad de agua

En las primeras condiciones probadas para preparación del gel no dopado, la relación TEOS: H₂O se conservó en ~1:2, que fue la proporción que se proponía en varios artículos [3,8], y se varió la cantidad del catalizador HCl en la mezcla de reacción.

La tabla III.1 muestra las cantidades de gel obtenidas para cada proporción TEOS: HCl ensayada. La variación de la masa de gel en función de la proporción molar del catalizador se aprecia más claramente en la figura III.1. Como puede observarse, la cantidad de gel seco (Xerogel) formada aumenta al incrementarse la proporción de catalizador, aunque la masa de gel tiende a estabilizarse a partir de una relación TEOS :HCl de aproximadamente 1:1x10⁻⁴ (en este caso, el criterio de gelificación es dejar la mezcla de reacción durante dos días en contacto antes de iniciar el secado de la misma para asegurar que la reacción se llevó a cabo hasta el equilibrio, en todos los casos se utilizó este mismo tiempo para iniciar el secado de la misma).

La masa de gel formado es un indicativo del grado al cual se lleva a cabo la hidrólisis del precursor antes de que se produzca la transición sol-gel. Si la gelificación se produce cuando aun no se ha hidrolizado completamente el alcóxido, éste quedará atrapado en los poros del gel. Aunque podría suponerse que el precursor remanente es capaz de seguir reaccionando e incorporarse a la red polimérica durante las etapas de maduración y secado, los resultados obtenidos muestran claramente que una buena parte del TEOS se pierde a bajas concentraciones de catalizador. De hecho, durante el tiempo de secado de los geles con menor proporción de catalizador, se detectó un persistente olor a TEOS. Por lo tanto, se presume que después de la gelificación el precursor remanente no continúa hidrolizándose

sino que se evapora lentamente junto con los otros líquidos presentes en los poros (para observar si la reacción había llegado a su equilibrio, se dejó la mezcla de reacción 48 hrs más en un frasco tapado sin que hubiese formación de nuevo material). Alternativamente, se puede suponer que a muy bajas concentraciones de HCl, la velocidad de evaporación del precursor remanente es mayor que su velocidad de hidrólisis, lo que provoca una pérdida neta de éste.

Considerando que en experimentos posteriores los gels serán dopados con moléculas delicadas, cuya estructura y propiedades podrían ser afectadas por la presencia de TEOS no reaccionando, se optó por escoger la más alta relación molar TEOS-HCl ($1:4 \times 10^{-4}$) para los experimentos subsiguientes.

Tabla III.1 Cantidad de gel obtenido al variar la relación molar TEOS: HCl utilizada para la formación de estos gels

Relación molar TEOS: HCl	Ensayo 1 gel obtenido (mg)	Ensayo 2 gel obtenido (mg)	Ensayo 3 gel obtenido (mg)	Media
$1: 1.6 \times 10^{-5}$	250	235	243	243
$1: 2.0 \times 10^{-5}$	400	390	397	396
$1: 8.0 \times 10^{-5}$	650	608	624	627
$1: 1.6 \times 10^{-4}$	730	717	720	722
$1: 2.5 \times 10^{-4}$	810	795	746	784
$1: 4.0 \times 10^{-4}$	830	822	825	826

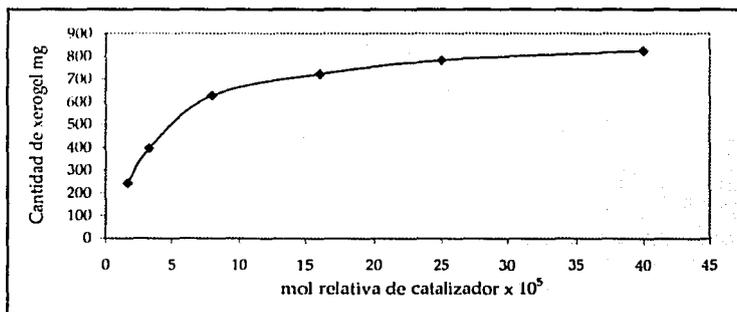


Figura III.1 Representación gráfica de la cantidad de xerogel obtenido al variar la relación molar TEOS: HCl

b) Variación de la relación Tetraetoxisilano:agua manteniendo constante la cantidad de catalizador

En el siguiente conjunto de experimentos se fijó la relación molar TEOS-HCl en $1: 4 \times 10^{-4}$ y se hizo variar la cantidad de agua agregada a la mezcla de reacción. La Tabla III.2 y la figura III.2 muestran la variación en la cantidad de gel obtenido al cambiar la relación TEOS - H₂O desde 1: 2.8 hasta 1: 9.4. Se observa que al aumentar la proporción de agua se obtiene una menor masa de gel y que este efecto es más pronunciado a partir de una relación molar TEOS-H₂O de aproximadamente 1:4.

Tabla III.2 Cantidad de gel obtenido al variar la relación molar TEOS: H₂O

Relación molar TEOS:H ₂ O	Ensayo 1 gel obtenido (mg)	Ensayo 2 gel obtenido (mg)	Ensayo 3 gel obtenido (mg)	Media
1: 2.8	830	812	815	819
1: 3.8	815	819	812	815
1: 4.6	800	791	793	795
1: 7.2	720	716	725	720
1: 9.4	680	687	680	682

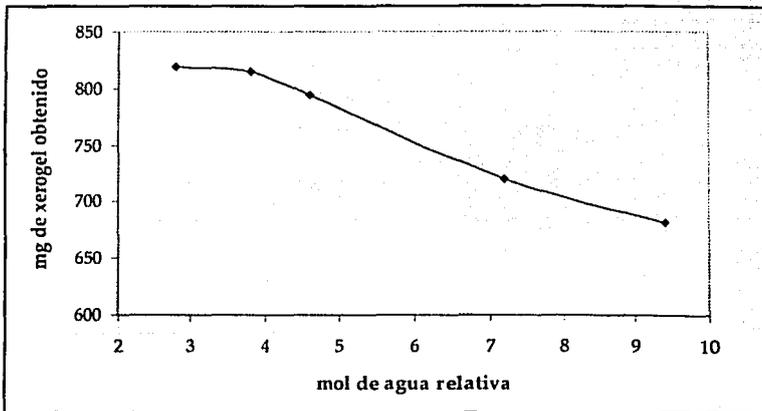
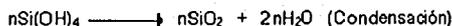
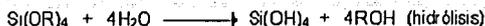


Figura III.2 Representación gráfica de la cantidad de xerogel obtenido al variar la relación molar TEOS: H₂O

Considerando las reacciones que se llevan a cabo durante la etapa de formación del sol:



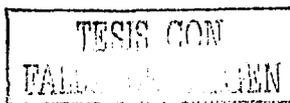
se observa que hay un consumo neto de 2 moléculas de agua por cada átomo de silicio que queda incluido en la red polimérica a través de puentes siloxano.

De acuerdo con este esquema podría esperarse un efecto favorable al aumentar la proporción de agua a valores ligeramente superiores a la relación molar H₂O-TEOS de 2:1. Incluso, algunos reportes de la literatura [9] proponen usar una alta proporción de agua (8:1 agua –alóxido) en la formación de geles dopados.

Sin embargo, los resultados obtenidos experimentalmente indican un efecto desfavorable del agua cuando ésta supera ampliamente la relación estequiométrica 2:1 (H₂O-TEOS). La explicación de este fenómeno se obtuvo al comparar cuidadosamente los resultados de las tablas III.1 y III.2, tomando en cuenta las variaciones en la concentración de HCl (y por lo tanto en el pH de la fase acuosa) en ambos conjuntos de experimentos. En la tabla III.3 se presentan los valores de pH calculados para la fase acuosa en las dos series de experimentos y la correspondiente masa de gel obtenido (en promedio).

Tabla III.3 Comparación entre el pH de la fase acuosa y la cantidad de gel obtenido en los experimentos de variación de las relaciones molares TEOS-HCl y TEOS-H₂O.

TEOS : HCl			TEOS : H ₂ O		
Relación molar	pH	Masa de gel (mg)	Relación molar	pH	Masa de gel (mg)
1: 4.0x10 ⁻⁴	2.10	826	1:2.8	2.10	819
1: 2.5x10 ⁻⁴	2.27	783	1:3.8	2.24	815
1: 1.6x10 ⁻⁴	2.44	722	1:4.6	2.35	795
1:8.0x10 ⁻⁴	2.72	627	1:7.2	2.51	720
1: 2.0x10 ⁻⁵	3.11	396	1:9.4	2.63	682
1:1.6x10 ⁻⁵	3.40	243	-----	---	---



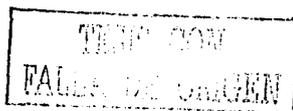
Es evidente de la tabla III.3 que existe una relación estrecha entre el pH de la fase acuosa y la cantidad de gel formado. Para ambos grupo de experimentos, a medida que el pH aumenta la masa de gel disminuye y el paralelismo entre los dos grupos es tal que los once pares de datos podrían integrarse en un solo conjunto.

De esta comparación puede concluirse que la disminución en la cantidad de gel obtenido al aumentar la proporción de agua es debida a la dilución de HCl en la fase acuosa y por tanto al aumento de pH en esta fase. Es decir, el aumento en la relación molar H₂O-TEOS no es por sí mismo responsable de la disminución en la cantidad de gel formado; una vez que esta relación satisface los requisitos estequiométricos de las etapas de hidrólisis y condensación del precursor (que de hecho son ligeramente mayores a la proporción 2:1 H₂O-alcóxido, debido a la gran cantidad de grupos Si-OH que quedan en la superficie del material formado), el exceso de agua parece no tener una influencia apreciable en el proceso.

Por otra parte, desde el punto de vista práctico, los geles preparados con una relación molar TEOS: H₂O 1:2.8 además de dar un mejor rendimiento presentaron la ventaja de que el tiempo de secado del gel fue menor y la dureza del material obtenido mayor que en los experimentos en los que se usó una proporción de agua más alta (esto se observó cualitativamente al realizar la molienda del material).

Respecto a la relación molar TEOS-HCl y/o al pH de la fase acuosa, que de acuerdo con los experimentos realizados tienen un gran impacto sobre el rendimiento de la reacción, inexplicablemente no se encontró en la literatura un estudio detallado del efecto de estos parámetros.

En los diferentes trabajos consultados, la relación molar alcóxido - HCl usada es muy variable e incluso se reportan [8] proporciones molares TEOS:H₂O:HCl de 1: 2: 1.6x10⁻⁵. Esta última relación es 25 veces menor en HCl a la que finalmente se seleccionó en este



trabajo y de acuerdo con los experimentos realizados (tabla III.2) sólo produce una cantidad de gel de alrededor del 33% de la obtenida con la proporción TEOS-HCl $1:4 \times 10^{-4}$ escogida.

Finalmente cabe hacer notar que en los experimentos de la tabla III.2, la relación molar TEOS-HCl se mantuvo constante y lo que varió fue el volumen de fase acuosa en la que estaba disuelto el ácido. Por lo tanto, es obvio que no es directamente la relación molar TEOS: HCl la que influye en el rendimiento de la reacción, sino el pH de la fase acuosa. Así, el efecto catalítico es debido al pH (o concentración de HCl) en la mezcla de reacción y no a la cantidad relativa de ácido añadido.

Se ha reportado [10] que la velocidad de hidrólisis de los alcóxidos, aumenta al disminuir el pH del medio mientras que la condensación es más lenta a menor pH. Una mayor velocidad de hidrólisis conduce a una menor pérdida de TEOS por evaporación en las fases iniciales del proceso. Asimismo, una condensación más lenta permite que la tasa de hidrólisis del precursor sea mayor al momento de producirse la transición sol-gel. Estos efectos conjugados dan como resultado la obtención de una mayor cantidad de gel cuando se trabaja a pH más ácido.

Con base en los resultados obtenidos en la preparación de geles no dopados se decidió utilizar una relación molar TEOS-H₂O-HCl de $1: 2.8: 4 \times 10^{-4}$ en los experimentos siguientes para la preparación de geles dopados.

2. Evaluación de los geles dopados con indicadores

Para la preparación de los geles dopados con indicadores, la única variación en el procedimiento fue la adición de 3 ml de una solución etanólica del indicador a la mezcla TEOS-H₂O-HCl. Esta modificación tuvo como efecto un aumento en el tiempo de gelificación y en el secado del material; este fenómeno que se observó muy probablemente se deba al aumento de volumen en la mezcla de reacción, lo que provoca que las moléculas se encuentren más alejadas y por lo tanto requieran un mayor tiempo para que se forme la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

red que finalmente forma al gel. Además, este material mostró una mayor dureza que se observó al molerse el material.

a) Geles dopados con indicadores de pH

En las pruebas realizadas a geles dopados con indicadores de pH se observó que cuando se hacían pasar soluciones alcalinas a través del cartucho, el gel adquiría la tonalidad propia de la forma básica del indicador mientras que al pasar soluciones ácidas se producía el vire característico al color de la forma ácida del indicador, cambio de color en ≈ 5 min, (tabla III.4). Este comportamiento se siguió por 3 meses durante los cuales se observó un correcto funcionamiento reversible del indicador encapsulado. Sin embargo a diferencia de lo que sucede en solución, los cambios de color en los geles no fueron inmediatos. Se observó que hasta después de pasar aproximadamente 2.5 ml de la solución de prueba a través del cartucho a un flujo de 0.5 ml/min, lo que equivale a 5 minutos de contacto entre la solución y el gel, este último adquiría la tonalidad final correspondiente a la forma ácida o básica del indicador, según el caso.

Tabla III.4 Funcionamiento y estabilidad de los geles dopados con indicadores de pH

Gel dopado con	Cambio de color al pasar una solución de		Meses de preparación del gel al realizar la prueba
	NaOH 0.01 M	HCl 0.01 M	
Fenolftaleína	Rosa	Incoloro	1
Fenolftaleína	Rosa	Incoloro	2
Fenolftaleína	Rosa	Incoloro	3
Rojo de bromofenol	Amarillo	Púrpura	1
Rojo de bromofenol	Amarillo	Púrpura	2
Rojo de bromofenol	Amarillo	Púrpura	3

Esta cinética más lenta en el viraje de los indicadores encapsulados podría ser debida a uno o varios de los fenómenos siguientes:

- Las partículas (H^+ u OH^-) deben difundir a través de la red de canales interconectados en la matriz de sílica hasta los poros en donde se encuentran atrapadas las moléculas de indicador para interactuar con ellas. Aunque se ha estipulado que el transporte de protones en el gel se produce a una velocidad similar a la que se tiene en solución [11],

el camino recorrido en la matriz polimérica es sin duda más largo (los poros superficiales son de aproximadamente 4-7 micras)

- Experimentos con indicadores atrapados en sol-gel muestran que estas moléculas dan indicación de un pH en el poro que parece ser hasta una unidad menor que en el buffer externo. Esto se atribuye a que las interacciones del dopante con la superficie interna del poro pueden modificar sus propiedades espectrales [11]
- Los silanoles de superficie del soporte, tanto al exterior de las partículas como en las paredes internas de los canales y poros, son grupos con propiedades ácido-base. Por tanto es de esperarse que estos grupos consuman parte del H^+ (u OH^-) presente en la solución que se pasa a través del gel. Así las moléculas del indicador atrapadas en poros aislados, recibirán el impacto del cambio de pH hasta después de haber percolado un cierto volumen de solución a través del cartucho empacado

Finalmente, con respecto a las pruebas realizadas en este trabajo con indicadores de pH, cabe mencionar que al pasar la solución de sosa por el gel se observó la presencia de indicador en el efluente del cartucho (solución colorida). Esta fuga fue pequeña y resulta normal en el caso de soportes de sílice ya que este material se disuelve en medio alcalino por hidrólisis de los puentes siloxano. Sin embargo, el gel estuvo en contacto con la sosa un tiempo muy corto y se enjuagó rápidamente por lo que el cartucho pudo seguirse utilizando durante los 3 meses en que se realizaron las pruebas cualitativas de reversibilidad.

b) Geles dopados con indicadores metalocrómicos

En este caso se trabajó con los geles no empacados ya que la reacción que se lleva a cabo dentro del material es muy lenta. Pequeñas porciones de los geles preparados se colocaron en tubos de ensayo y se les fueron agregando las diferentes soluciones de prueba. Como se describe a continuación, los resultados con estos geles fueron menos alentadores que los de los geles dopados con indicadores de pH.

En los dos geles preparados, uno con eriocromo negro T (ENT) y el otro con o-fenantrolina (O-Fen), se observó fuga de indicador durante los primeros ensayos. Esta fuga se evidenció

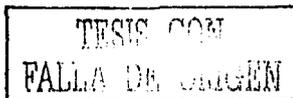
por la coloración que adquirió la solución en contacto con el gel. Así, el gel dopado con ENT en contacto con una solución amoniacal se tornó azul intenso al igual que la solución. El gel dopado con O-Fen en contacto con una solución de Fe (II) en buffer de acetatos permaneció blanco pero la solución adquirió un color naranja intenso. Otra porción del mismo gel en contacto con la solución de Fe (II) a la que se le añadieron unas gotas de amoniacó adquirió una coloración café-naranja y la solución quedó naranja. Sin embargo, en los tres casos, después de cambiar la solución un par de veces ésta permaneció incolora.

Lo anterior indica que una parte del indicador no quedó encapsulada en los poros del gel sino que permaneció simplemente adsorbida sobre la superficie de éste. Al poner el gel en contacto con la solución, el indicador adsorbido pasó fácilmente a ésta impartándole el color observado. En cambio el resto del indicador quedó permanentemente atrapado en el gel.

En el gel dopado con ENT se observaron los cambios de color característicos de este indicador al alternar las soluciones que contenían unas gotas de ácido perclórico 1 M (gel rojo-vino) y unas gotas de amoniacó (gel azul).

Cabe mencionar que los cambios de color no se produjeron inmediatamente al cambiar la solución, sino que requirieron algunos minutos de contacto entre el gel y la solución ensayada. En este sentido, los efectos del cambio de pH resultaron similares a lo que se observó previamente en los geles dopados con indicadores de pH.

Cuando a la solución amoniacal en contacto con el gel dopado con ENT (gel azul) se le agregó una sal de Mg(II), se requirieron 12 horas para observar un vire neto del color del gel a rojo-vino. Posteriormente a esta solución se le agregó una cantidad apreciable de sal disódica del EDTA y unas gotas más de amoniacó, esperando con ellos destruir el complejo Mg(II)-Indicador. Después de 24 h no se observó ningún cambio de color en el gel, por lo que resultó evidente que el EDTA no logró secuestrar al Mg(II) y que éste permaneció asociado al indicador en el gel.



Las observaciones hechas en los experimentos realizados con el gel dopado con O-Fen se resumen en las tablas III.4A y III.4B.

Tabla III.4A Resultados de experimentos con indicador y gel dopado

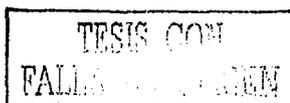
Indicador	Se agregó	Resultados observados con el indicador en solución	Resultados observados con el indicador en gel
ENT	Sol. Amoniacaal.	Azul intenso inmediato	Azul intenso 15 min
ENT	Sol ácido perclórico	Rojo-Vino inmediato	Rojo-Vino 15 min
ENT	Sol. Amoniacaal Sol. Mg(II)	Rojo-Vino inmediato	Rojo-Vino después de 12 hr
O-FEN	Fe (II) en acetatos pH =4	Rojo-Naranja inmediato	Anaranjado tenue 2 días
O-FEN	Fe (II) en amoniaco	Rojo-Naranja (turbiedad) inmediato	Naranja intenso 30 min

Tabla III.4B Resultados de experimentos con indicador y gel dopado

Indicador complejo	Se agregó	Resultados observados con el indicador en solución	Resultados observados con el indicador en gel
ENT-Mg(II) (Rojo-vino)	EDTA en sol. Amoniacaal	Azul intenso	Rojo-vino
ENT-Mg(II) (Rojo-vino)	EDTA en sol. de ácido perclórico	Sin cambio	Sin cambio en 1 día
O-FEN-Fe(II) (Naranja)	agua	-----	Rojo-Vino
O-FEN-Fe(II) (Naranja)	EDTA en sol. Amoniacaal	Roja-naranja (Sin turbiedad), sin cambio	Anaranjado Sin cambio en 1 día
			Anaranjado Sin cambio durante 3 días

De los resultados presentados en la tablas anteriores se tiene que:

- En contacto con una solución de Fe (II) en buffer acetatos de pH 4, el gel tardó dos días para adquirir una tenue coloración naranja
- En contacto con la solución de Fe (II) a la que se añadieron unas gotas de amoniaco, el gel se tornó naranja intenso en menos de 30 minutos
- El gel naranja del experimento anterior lavado y dejado en contacto con agua durante un día no varió de color



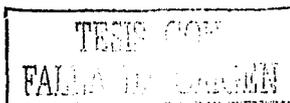
- El mismo gel naranja en contacto con una solución de EDTA en medio amoniacal no varió de color durante los 3 días que se mantuvo en observación
- El indicador libre en solución vira inmediatamente a color naranja-rojizo en presencia de Fe (II), ya sea en medio acetatos o en medio amoniacal (se presenta turbiedad en este último caso)

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores muestran claramente que la difusión de los cationes metálicos a través de los poros del gel de sílice, para alcanzar los sitios en donde se encuentra atrapado el indicador, es en general muy lenta. De hecho, el transporte de los cationes metálicos en el gel es significativamente más lento que el transporte del protón.

En el caso de Fe (II) se observó que la presencia de amoniacal en la solución (o el pH) impulsó fuertemente la velocidad de transporte del catión en el gel, comparado con la cinética lentísima observada cuando el gel se puso en contacto con la solución de Fe (II) en buffer acetato. Sabiendo que en el medio amoniacal ensayado el Fe (II) tiende a precipitar (como hidróxido), se especula que el efecto observado pudo ser debido a una "expulsión" del catión de la solución que facilitó su entrada en el gel. Este efecto no fue observado con el Mg (II) (en los experimentos con el gel dopado con ENT) ya que este catión no precipita en medio amoniacal.

Por otra parte, también se hizo patente que la presencia de agentes complejantes competidores en la solución, como el EDTA, no fue suficiente para disociar al complejo catión-indicador una vez que éste se formó en el interior del gel. Se presume que esto es también debido a un problema de difusión ya que, en el medio empleado, el EDTA es aniónico y la superficie de la sílica también está cargada negativamente, por lo que debe generarse una repulsión que impide la entrada del EDTA en los poros de la matriz.

El conjunto de resultados y observaciones lleva a la conclusión de que no es posible proponer el uso de los geles dopados con indicadores metalocromicos como sensores



químicos (al menos por ahora). En efecto, se requiere de demasiado tiempo para que el indicador cambie de color cuando el catión metálico está presente en la solución. Adicionalmente, las reacciones de intercambio de ligante entre el complejo metal-indicador y un ligante competidor en solución, no se producen en absoluto cuando este último es aniónico en las condiciones del ensayo.

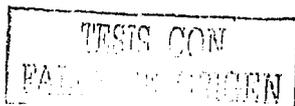
Con respecto a la discusión anterior es interesante mencionar los experimentos realizados por Wellington et al. [12] con geles dopados con los indicadores Morin y Eriocromo Cianin R. Estos investigadores observaron que al sumergir el gel dopado con Morin en una solución de Al^{3+} , se requerían 490 min de contacto para que la fluorescencia del gel, debida a la formación del complejo Morin- Al^{3+} , fuera constante. Por otra parte el gel dopado con Eriocromo Cianin R requirió de una inmersión de 2 días en una solución de Cu^{2+} para obtener una absorbancia del gel (Complejo: Indicador- Cu^{2+}) constante.

En este último caso el aumento de la absorbancia fue lineal con $t^{1/2}$, indicando una cinética limitada por difusión. De hecho, la absorbancia final fue independiente de la concentración de Cu^{2+} (estos investigadores trabajaron en condiciones de exceso de Cu^{2+} respecto del indicador), sin embargo la velocidad de difusión sí dependió fuertemente de la concentración del ión metálico.

Es indudable de este reporte que la difusión juega un papel muy importante en la cinética de las reacciones entre especies en solución e indicadores (sensores) atrapados en sol-gel, aun cuando dichas especies sean relativamente pequeñas como es el caso de los iones inorgánicos.

3. Encapsulamiento de una proteína en el sol-gel

Para evaluar la eficiencia de los procedimientos ensayados para el encapsulamiento de albúmina en sol-gel fue necesario disponer de un método analítico que permitiera cuantificar pequeñas cantidades (μg) o concentraciones $\mu g/ml$ de esta proteína. El método del reactivo de Folin (método de Lowry) [13] es una combinación entre los complejos que se



forman con el reactivo de Biuret y con el reactivo de Folin Ciocalteu, dando un producto azul con absorción a 700 nm. La formación de los complejos con molibdeno y tungsteno es atribuida a la presencia de aminoácidos como la tirosina, el triptófano y la cisteína en la proteína. En primera instancia se forma un complejo cúprico-péptido, el cual después reacciona con el complejo de fosfomolibdato, aunque el mecanismo aun permanece sin elucidación completa. Este método es 10 veces más sensible que el método del reactivo de Biuret [14].

a) Resultados de la curva de calibración de albúmina

En la tabla III.5 se muestran los datos de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de albúmina en las soluciones de calibración. Cada solución fue preparada por duplicado y sometida al procedimiento descrito en la sección experimental (II.3.3.1). Las diferencias de absorbancia entre réplicas fueron al máximo de 0.5 %.

Tabla III.5 Variación de la Absorbancia vs Concentración de albúmina determinada en un espectrofotómetro a 700 nm

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia promedio	Réplicas
1	0.003	2
2	0.035	2
5	0.095	2
10	0.215	2
15	0.324	2
20	0.421	2
23	0.483	2
25	0.510	2
30	0.587	2

En la figura III.3 se presenta la curva de calibración obtenida y los datos estadísticos de ésta. De acuerdo con estos resultados, se observa una relación lineal entre absorbancia y concentración de proteína en el intervalo de 1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ estudiado.

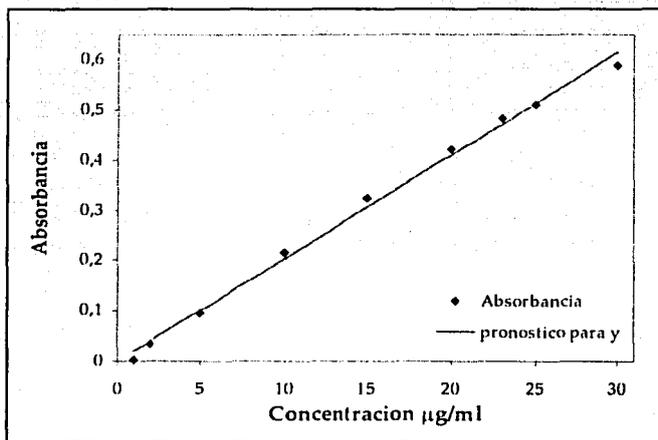


Figura III.3 Representación gráfica de la variación de la absorbancia con respecto a la concentración de albúmina a 700 nm

El intervalo de concentraciones en la curva de calibración corresponde a un intervalo en cantidad de albúmina de 3 a 90 µg. Por otra parte, los geles preparados fueron dopados con 18, 30 y 60 µg de albúmina. Por lo tanto, la curva de calibración está prevista para poder ser utilizada aun en el caso más desfavorable en que la proteína no quedara encapsulada en el gel.

b) Cuantificación de proteína no encapsulada en xerogeles

Los geles dopados con la albúmina que fueron secados hasta peso constante, molidos y empacados en cartuchos se lavaron alternadamente con porciones de 3 ml de agua y de mezcla metanol-agua 60:40 (v/v). Esto fue con el objeto de eluir la proteína que hubiera quedado adsorbida superficialmente en el gel y de esta manera determinar la efectividad real del proceso de encapsulamiento.

Tabla III.6 Cantidad de proteína presente en el primer lavado, con agua, de los xerogeles dopados con albúmina¹

Albúmina agregada (μg)	Réplicas	Absorbancia promedio	Cantidad albúmina perdida (μg)	% albúmina perdida	% Acumulado de albúmina perdida
18	2	0.066	9.92	55.1	55.1
30	2	0.040	6.12	20.4	20.4
60	2	0.056	8.467	14.1	14.1

Tabla III.7 Cantidad de proteína presente en el segundo lavado, con metanol-agua 60:40 (v/v), de los xerogeles dopados con albúmina.

XEROGELES
SEGUNDO LAVADO CON METANOL AL 60%

Albúmina agregada (μg)	Réplicas	Absorbancia promedio	Cantidad albúmina Perdida (μg)	% albúmina perdida	% Acumulado de albúmina perdida
18	2	0.0515	7.80	43.3	98.4
30	2	0.0370	5.68	18.9	39.3
60	2	0.0305	4.74	7.9	22.0

Tabla III.8 Cantidad de proteína presente en el tercer lavado, con agua, de los xerogeles dopados con albúmina

XEROGELES
TERCER LAVADO CON AGUA

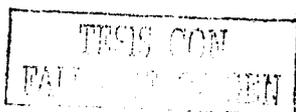
Albúmina agregada (μg)	Réplicas	Absorbancia promedio	Cantidad albúmina Perdida (μg)	% albúmina perdida	% Acumulado de albúmina perdida
18	2	N.D	N.D	N.D	98.4
30	2	N.D	N.D	N.D	39.3
60	2	N.D	N.D	N.D	22.0

Tabla III.9 Cantidad de proteína presente en el lavado, con metanol-agua 60:40 (v/v) de los xerogeles dopados con albúmina

XEROGELES
CUARTO LAVADO CON METANOL 60 %

Albúmina agregada (μg)	Réplicas	Absorbancia promedio	Cantidad albúmina Perdida (μg)	% albúmina perdida	% Acumulado de albúmina perdida
18	2	N.D	N.D	N.D	98.4
30	2	N.D	N.D	N.D	39.3
60	2	N.D	N.D	N.D	22.0

En las tablas III.6 a III.9 se reporta la cantidad de albúmina detectada en los diferentes lavados de xerogeles dopados con 18, 30 y 60 μg de albúmina. Cada gel fue preparado por duplicado y sometido al mismo tratamiento de lavado, el volumen de lavado en todo los



TESIS NO SALE
A BIBLIOTECA

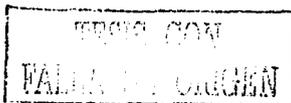
casos fue de 3 ml. La cantidad reportada de la albúmina no encapsulada, o perdida, corresponde al promedio de las dos réplicas.

Los resultados obtenidos muestran que la proteína no encapsulada es eluida del cartucho en los dos primeros lavados. En total, para cada gel preparado hay una pérdida de albúmina que oscila entre 12 y 18 μg aproximadamente. Esta pérdida no guarda una relación directa con la cantidad de albúmina utilizada para dopar el gel sino que, contrariamente, el encapsulamiento parece ser menos efectivo en el gel con menor cantidad de proteína agregada. Esto se traduce en una pérdida relativa del 98 % para el gel dopado con 18 μg de albúmina y de 22 % para el gel dopado con 60 μg de la misma. De acuerdo con lo observado, se puede suponer que durante el proceso de preparación del gel, las moléculas de proteína agregada tienden a ser expulsadas del interior del sol hacia la superficie, posiblemente por algún fenómeno de incompatibilidad entre las cadenas de polímero (Si-O-Si) en formación y las grandes moléculas dopantes. Cuando la cantidad de proteína añadida aumenta, una porción de ésta no alcanza a ser expulsada y queda atrapada en la red polimérica. Al producirse la transición sol-gel, las moléculas de proteína expulsadas permanecen adheridas en la superficie del sólido por adsorción, mientras que la proteína atrapada en la red queda perfectamente encapsulada en los poros del material formado. La proteína superficial es fácilmente desorbida del gel de sílica por los lavados con agua y mezclas metanol-agua.

Así este método de encapsulamiento de biomoléculas en sol-gel no resultó ser suficientemente satisfactorio por la pérdida implícita de una porción no despreciable de la molécula dopante durante el proceso.

Pruebas cualitativas de la presencia de albúmina en xerogeles

En la sección precedente se estimó la cantidad de proteína encapsulada en forma indirecta, cuantificando la proteína no atrapada en el gel y desorbida por los lavados de éste. Dado que no se encontró algún método que permitiera cuantificar directamente la proteína



atrapada en el sólido, se optó por realizar únicamente una prueba cualitativa en los geles empleando el reactivo de Folin.

En la tabla III.10 se reportan los resultados de la prueba realizada en los geles previamente lavados, para confirmar que la proteína se encontrara efectivamente atrapada dentro del gel.

Tabla III.10 Prueba cualitativa de la presencia de albúmina en los xerogeles previamente lavados

Cantidad de proteína agregada al gel (μg)	Prueba con reactivo de Folin	Comentarios
18	Negativo	No se observa color después de 30 min
30	Positivo	Coloración del gel después de 30 min
60	Positivo	Coloración más intensa del gel después de 30 min

Los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado según los ensayos realizados previamente. El gel dopado con la menor cantidad de proteína, para el cual se había determinado una pérdida del 98 % de albúmina en los lavados, dio un resultado negativo en la prueba con el reactivo de Folin. Los geles dopados con mayor cantidad de albúmina, que de acuerdo con los ensayos anteriores contenían todavía cierta cantidad de proteína encapsulada, desarrollaron un color café-azul después de percolar el reactivo de Folin a través de los cartuchos. Esta coloración fue más intensa en los geles dopados con 60 μg de albúmina.

c) Cuantificación de la proteína no encapsulada en hidrogeles

Considerando los resultados obtenidos en el primer proceso de encapsulamiento de macromoléculas ensayado, se decidió dejar proceder la reacción de policondensación en el sol por un tiempo más largo antes de añadir la molécula dopante. De esta manera, con un sol más viscoso, se esperaba que el proceso de expulsión o rechazo de la proteína fuera más lento quedando una mayor cantidad de ésta atrapada en la red polimérica. Por otra parte, para evitar el fuerte colapso de los poros que se produce durante la etapa de maduración y

secado del gel, se optó por suprimir estas etapas y trabajar con el hidrogel. Al igual que en el caso de los xerogeles, los hidrogeles dopados con 18, 30 y 60 µg de albúmina y preparados por duplicado se lavaron alternadamente con porciones de 3 ml de agua y de mezcla metanol-agua 60:40 (v/v).

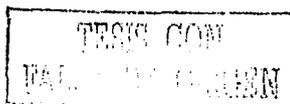
Tabla III.11 Cantidad de proteína presente en el primer lavado, con agua, de los hidrogeles dopados con albúmina

HIDROGELES						
PRIMER LAVADO CON AGUA						
Albúmina agregada (µg)	Réplicas	Absorbancia promedio	Volumen del lavado (ml)	Cantidad albúmina Perdida (µg)	% albúmina perdida	
18	2	0.070	3	10.57	58.73	
30	2	0.036	3	5.53	18.46	
60	2	0.060	3	9.04	15.06	

Tabla III.12 Cantidad de proteína presente en el segundo lavado con metanol-agua 60:40 (v/v) de los hidrogeles dopados con albúmina.

HIDROGELES						
SEGUNDO LAVADO CON METANOL AL 60 %						
Albúmina agregada (µg)	Réplicas	Absorbancia promedio	Volumen del lavado (ml)	Cantidad albúmina Perdida (µg)	% albúmina perdida	
18	2	N.D.	3	N.D.	N.D.	
30	2	N.D.	3	N.D.	N.D.	
60	2	N.D.	3	N.D.	N.D.	

En la tabla III.11 se observa que la cantidad de albúmina no encapsulada que se pierde en el primer lavado con agua es muy similar a la obtenida en el primer lavado de los xerogeles, lo que confirma que una parte de la proteína no queda atrapada en el material. Sin embargo, en la tabla III.12 se muestra que la modificación realizada en el procedimiento de preparación de los geles (capítulo II 3.3 b) dio resultados positivos pues ya no se detectó presencia de proteína en el segundo lavado, ni en lavados ulteriores. La pérdida relativa fue de 58.7 % para el gel dopado con la menor cantidad de albúmina y de menos de un 20 % para los geles dopados con mayor cantidad de proteína. Estos resultados confirman que el encapsulamiento de macromoléculas es más eficiente cuando el material se dopa con mayor cantidad de éstas.



Pruebas cualitativas de la presencia de albúmina en hidrogeles

De la misma forma que en el caso de los xerogeles, se realizó la prueba cualitativa para confirmar la presencia de proteína en los hidrogeles. En la tabla III.13 se muestran los resultados de la prueba realizada a estos geles que fueron previamente lavados. En este caso, todos los geles desarrollaron una coloración café-azul después de percolar el reactivo de Folin a través de los cartuchos.

Tabla III.13 Prueba cualitativa de la presencia de albúmina en los hidrogeles previamente lavados

Cantidad de proteína agregada al gel (μg)	Prueba con reactivo de Folin
18	Positivo
30	Positivo
60	Positivo

4. Encapsulamiento de la enzima α -Amilasa en sol-gel

La enzima α -Amilasa obtenida de bacterias tiene un peso molecular de aproximadamente 50,000 g/mol. El producto comercial adquirido aislado de *Bacillus Licheniformis*, tiene una actividad de 2.4 U/mg (datos del proveedor). Esta actividad está definida por el propio proveedor de la siguiente manera [15].

“Una unidad U corresponde a la cantidad de producto que libera 1 mg de maltosa del almidón en 3 min a pH=6.9 y temperatura de 20 °C”

Se prepararon geles dopados con 375 μg de α -Amilasa comercial, lo que de acuerdo con los datos anteriores corresponde a 0.90 unidades de actividad. Por otra parte si se considera al producto utilizado como enzima pura, la cantidad agregada a los geles corresponde a 7.5 nanomoles de α -Amilasa (en 2.6 g de hidrogel).

Estos geles se prepararon utilizando el mismo procedimiento que para los hidrogeles dopados con BSA. Dado que la albúmina de suero de bovino (BSA) tiene un peso molecular de aproximadamente 67,000 g/mol, se puede establecer que tanto la masa como el número de moles de α -Amilasa agregadas a los geles fueron muy superiores a la cantidad

de BSA que se añadió a los geles descritos en la sección precedente. Por lo tanto, de acuerdo a las observaciones hechas anteriormente respecto a la pérdida de BSA durante la preparación de los geles (del orden de 10 μ g), se puede esperar que en el caso de la α -Amilasa la pérdida relativa sea despreciable asumiendo un comportamiento similar.

Cabe mencionar que para los geles dopados con enzimas (Catalasa o α -Amilasa) no se repitieron los experimentos de determinación de pérdida de proteína en los lavados. Debido a que en estos casos el aspecto más delicado es la preservación de la actividad de la enzima encapsulada, los esfuerzos se concentraron en evaluar esta actividad y compararla con la actividad determinada paralelamente para una cantidad idéntica, a la agregada a los geles, de la enzima libre en solución.

Para evaluar la actividad de la α -Amilasa libre y encapsulada se optó por seguir la degradación del sustrato (almidón) en el tiempo. En efecto, la determinación cuantitativa de almidón puede realizarse por un sencillo método espectrofotométrico. Por otra parte, en este trabajo no interesa tener una medida muy exacta de la actividad enzimática sino comparar la actividad de la enzima libre y encapsulada.

El método utilizado para cuantificar el almidón se basa en la formación de un complejo entre el yodo y la amilosa del almidón que puede detectarse a 595 nm. La intensidad del color azul del complejo es medida y de esta manera se puede relacionar con la concentración del almidón presente.

En presencia de almidón y I₂, las moléculas de I₂ forman una larga cadena de I₃⁻, (I-I-I-I) que puede ocupar el centro de la hélice de amilosa del almidón. La banda de absorción visible de la cadena I₃⁻ en la hélice da el color característico del complejo almidón-yodo [16].

a) Resultados de la curva de calibración de almidón

En la tabla III.14 se presentan los valores de absorbancia de los estándares a diferentes concentraciones de almidón, utilizados para trazar la curva de calibración. Cada estándar se preparó por duplicado y la diferencia de absorbancia entre réplicas fue menor al 3.5 %. La

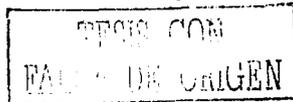


figura III.4 muestra la curva de calibración y sus correspondientes parámetros estadísticos. De acuerdo con éstos, se observa una relación lineal entre la absorbancia a 595 nm y la concentración del almidón en el intervalo de 2 a 150 µg/ml estudiado.

Tabla III.14 Variación de la Absorbancia vs Concentración de almidón en los estándares, determinada en un espectrofotómetro a 595 nm

Concentración (µg/ml)	Absorbancia promedio	Réplicas
2	0.014	2
5	0.060	2
10	0.128	2
20	0.250	2
30	0.366	2
50	0.648	2
75	1.014	2
100	1.326	2
150	1.930	2

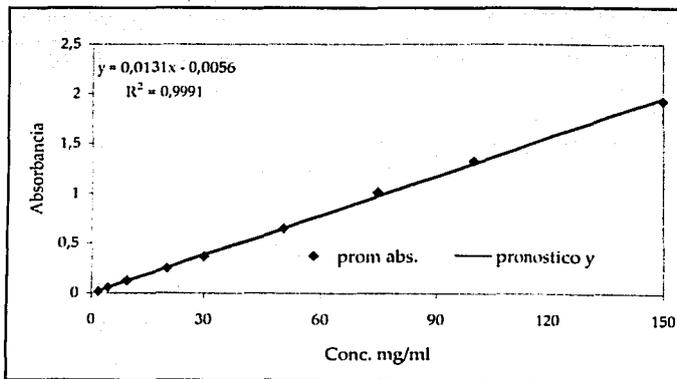


Figura III.4 Representación gráfica de la variación de la absorbancia con respecto a la concentración del almidón a 595nm

b) Comparación entre la actividad de la Amilasa libre y la encapsulada

En la figura III.5 se representa la variación de la cantidad de almidón degradado con respecto al tiempo por la enzima libre en solución y la enzima encapsulada en sol-gel

(hidrogel). En ambos casos se utilizó la misma cantidad de enzima (375 μg) en contacto con 4 ml de buffer fosfatos conteniendo 600 μg de almidón inicial.

Como puede apreciarse, la cinética de transformación del almidón es más lenta para la enzima encapsulada. La velocidad o actividad inicial de la enzima fue determinada de la pendiente de la región lineal de las curvas [17], en el intervalo de tiempo de 0 a 1 minuto para la enzima libre y entre 0 y 2.5 min para la enzima encapsulada. Los valores se reportan en la tabla III.15 como μg de sustrato degradado por minuto. Tomando como referencia la actividad inicial de la enzima libre, se establece que la actividad relativa de la enzima atrapada en el gel es cercana al 20 %.

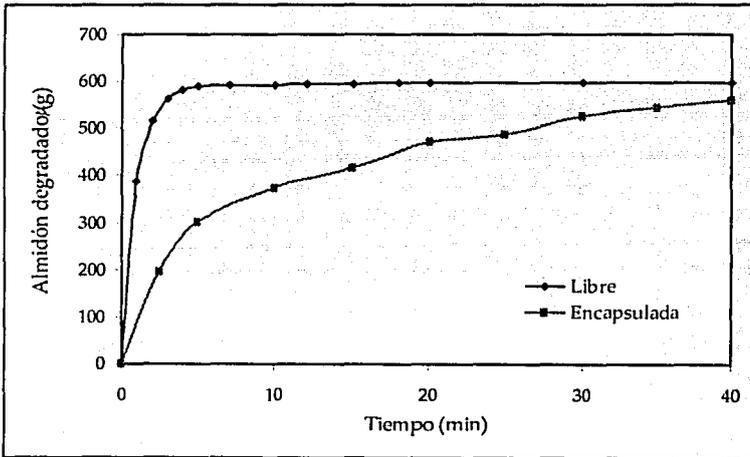


Figura III.5 Patrón cinético de la degradación de almidón por α -Amilasa libre y encapsulada en sol-gel (hidrogel)

Tabla III.15 Valores de actividad inicial determinados para la misma cantidad de α -Amilasa libre y α -Amilasa encapsulada

	α -Amilasa libre	α -Amilasa encapsulada
Actividad ($\mu\text{g}/\text{min}$)	379.7	74.5
Actividad relativa (%)	100	19.4

La disminución de actividad de la enzima en el gel puede ser debida a varios factores. Uno de los más importantes es sin duda la difusión del soluto a través de la red de micro y mesoporos interconectados en el gel, hasta alcanzar los poros mayores en donde se encuentran atrapadas las moléculas de enzima. Considerando que el almidón está constituido por dos cadenas poliméricas, la amilosa (cadena lineal de glucon(1-4)- α -D) y la amilopectina (cadena ramificada de D-glucon con ligaduras principalmente α -D-(1-4) y 4 % de ligaduras (α -D-(1-6)), es de esperarse que la velocidad de difusión de este soluto en el gel sea mucho más lenta que en solución. Por otra parte, el confinamiento de la enzima dentro de las cavidades en la matriz de sílice puede producir ligeras alteraciones en su estructura conformacional y en sus funciones biológicas; además, al estar restringida la movilidad de la biomolécula encapsulada, su respuesta frente al sustrato puede ser más lenta. Finalmente, no se puede descartar la posibilidad de desnaturalización o inactivación de algunas moléculas de enzima durante el proceso de encapsulamiento, debido al contacto con residuos del precursor (TEOS) no hidrolizado o con el etanol formado en la etapa de hidrólisis [5,6].

Sin embargo, cabe mencionar que el proceso desarrollado en este trabajo para el encapsulamiento de biomoléculas fue diseñado de manera a minimizar el contacto de éstas con agentes dañinos. Por una parte, después de muchos experimentos infructuosos, se llegó a la conclusión de que el TEOS era particularmente nocivo para las enzimas y provocaba su desnaturalización. Por ello se buscó llevar la hidrólisis del precursor a un grado lo más completo posible antes de añadir las biomoléculas en el sol. Por otra parte, al agregar buffer fosfatos al sol antes del dopaje con las biomoléculas, no solo se logra tener un medio de pH adecuado para éstas, sino que se promueve una fuerte aceleración de la reacción de policondensación. Así, al añadir la enzima, la gelificación se produce en un par de minutos dejando aisladas a las moléculas dopantes en cavidades separadas. En estas condiciones, el etanol presente en el medio no puede provocar la agregación y consecuentemente la desactivación de las moléculas de enzima, como lo haría si éstas estuvieran en solución.

Liu y Chen [18] hacen notar en su trabajo sobre el encapsulamiento de proteínas en sol-gel que, una vez que la gelación ocurre, la velocidad de desnaturalización de las biomoléculas disminuye drásticamente puesto que se cancelan los grados de libertad translacional de estas entidades, impidiendo que ocurran colisiones o agregación entre ellas.

Aunque la cinética de transformación del almidón por la α -Amilasa encapsulada fue significativamente más lenta que la de la enzima libre, los resultados obtenidos son bastante alentadores considerando el tipo de sustrato tratado y comparando con resultados reportados en la literatura. Por ejemplo, Dosoretz et. al [19] observaron una cinética dos ordenes de magnitud más lenta para la paratiión hidrolasa encapsulada en sol-gel en comparación con la enzima libre. Por su parte Avnir [20], uno de los pioneros del encapsulamiento de moléculas diversas en sol-gel, reporta actividades relativas para la fosfatasa ácida encapsulada que varían entre 1.9% y 56% dependiendo de las condiciones y aditivos agregados durante el proceso.

c) Comportamiento de geles dopados con α -Amilasa en sistemas en flujo

Para la aplicación práctica de los geles dopados con enzimas, por ejemplo como biosensores, es deseable que el material pueda ser utilizado en sistemas en flujo. Además, dado el alto costo o la dificultad para aislar y purificar algunas enzimas, también resulta de sumo interés desarrollar biomateriales reutilizables.

Aunque la α -Amilasa es una enzima fácilmente accesible y de costo relativamente bajo, se consideró importante probar el funcionamiento de los geles dopados empacados en cartuchos, percolando a través de ellos una solución del sustrato en ciclos de operación sucesivos.

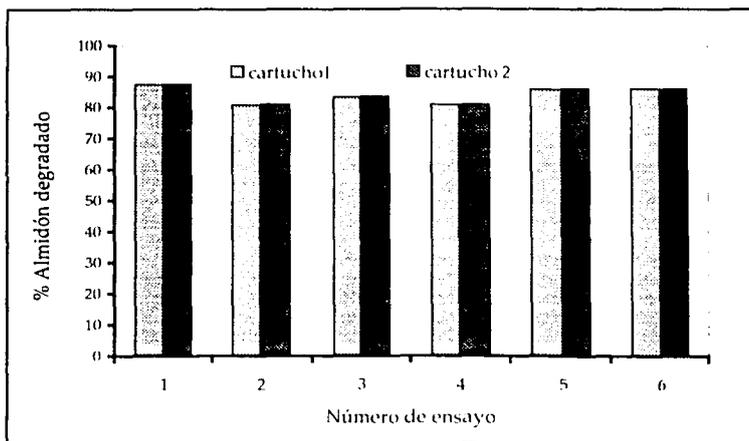


Figura III.6 Representación gráfica del % de sustrato degradado en cartuchos empacados con gel dopado con α -Amilasa durante ciclos sucesivos de operación. Antes de los ciclos 5 y 6 el cartucho fue tratado con 2 ml de Irtón 0.6 % (v/v)

Dos cartuchos empacados con geles (\approx 2.6 g de hidrogel) preparados independientemente, se cargaron con 520 μ g de almidón disuelto en 4 ml de buffer fosfatos a una velocidad de 0.5 ml/min. El almidón no degradado se cuantificó en el efluente. En la figura III.6 se muestran los resultados del primer ensayo realizado. Como puede observarse, más del 87 % del almidón percolado ($>$ 452 μ g) fue degradado en los 8 minutos que duró el proceso de carga, lo que corresponde a una velocidad promedio de transformación del almidón de aproximadamente 57 μ g/min. Aunque esta velocidad es menor que la actividad inicial de la enzima encapsulada (74.5 μ g/min) reportada en la tabla III.15, la cantidad de sustrato degradado es mayor que lo que muestra la curva de la figura III.5 para el mismo tiempo de 8 minutos ($<$ 350 μ g) en un sistema estático.

Así, este experimento demuestra que la enzima encapsulada trabaja más eficientemente en un proceso en flujo, debido probablemente a que su actividad en el tiempo decae en forma menos pronunciada que en los procesos en bulto. Por otra parte, los resultados obtenidos en este experimento fueron prácticamente idénticos para los dos cartuchos lo que indica que

el procedimiento desarrollado para la preparación de los geles dopados permite obtener materiales con características reproducibles.

Después del primer ensayo, los cartuchos se regeneraron con buffer fosfato y se dejaron en reposo embebidos en dicho buffer antes de volverlos a usar. Se realizaron tres ciclos más en los mismos cartuchos, (Figura III.6) observándose una ligera disminución en la actividad de la enzima después del primer ciclo. De acuerdo con los reportes de la literatura [21] la pérdida de actividad de una enzima después de un ciclo de operación puede ser debida a la formación de complejos enzima-sustrato o enzima-producto que bloquean el acceso de nuevas moléculas de sustrato a los sitios activos de la enzima. Para romper estos complejos y dejar la enzima libre para interactuar nuevamente con el sustrato se recomienda un tratamiento con tensoactivos.

De acuerdo con lo anterior, se decidió incluir un tratamiento con Tritón X-100 durante la etapa de regeneración de los geles. Este tratamiento resultó efectivo pues, como se observa en la figura III.6 para el quinto ciclo de operación de los cartuchos, la actividad de la enzima se recuperó, acercándose a la actividad inicialmente observada en el primer ensayo. El lavado con Tritón se volvió a repetir y en el sexto ciclo de operación se obtuvieron resultados idénticos a los del ensayo precedente, es decir, la actividad de la enzima encapsulada se mantuvo constante.

En resumen los resultados reportados en este inciso muestran que los geles dopados con α -Amilasa operan eficientemente en sistemas en flujo y pueden ser sometidos a múltiples ciclos de operación-regeneración conservándose prácticamente constante la actividad de la enzima.

5. Encapsulamiento de la enzima Catalasa en el sol-gel

La enzima Catalasa, obtenida de hígado de bovino, tiene un peso molecular de aproximadamente 240,000 g/mol. El producto comercial adquirido tiene una actividad de

2,800 U/mg de sólido o 4000 U/mg de proteína (dato del proveedor) [22]. Esta actividad es definida por el proveedor como sigue:

“Una unidad U corresponde a la cantidad de producto que descompone 1 μ mol de H₂O₂ por minuto a pH=7 y 25 °C en condiciones en las cuales la concentración de H₂O₂ disminuye de 10.3 a 9.2 mM”

Se prepararon geles dopados con 12 μ g del producto comercial, lo que corresponde a 8.4 μ g de proteína y a 33.6 unidades de actividad. Considerando esta cantidad de proteína como Catalasa pura, los datos anteriores corresponden a un dopaje con 0.035 nmol de enzima.

El procedimiento empleado para preparar estos geles fue idéntico al utilizado para los geles dopados con BSA y con α -Amilasa.

Aunque en el presente caso la cantidad de proteína añadida al sol durante la preparación del gel fue considerablemente menor, los resultados obtenidos (mostrados posteriormente) permiten suponer que una buena parte de la enzima agregada quedó encapsulada. En efecto, a diferencia de la BSA para la cual se detectó una pérdida sistemática de alrededor de 10 μ g de proteína no encapsulada, en el caso de la Catalasa esta pérdida (si la hubo) debió ser mas pequeña ya que el producto obtenido mostró una actividad aceptable. Probablemente, el tamaño más grande de la molécula de Catalasa (cuyo peso molecular es de 4 veces el de la molécula de BSA) promovió o facilitó un mejor y más completo encapsulamiento. Cabe señalar que en otro trabajo de investigación que se realizó en el laboratorio encapsulando anticuerpos (P.M. 150000 g/mol), no se detectó presencia de proteína en los lavados del gel recién formado, indicando con ello el encapsulamiento total del anticuerpo añadido [23].

La actividad de la Catalasa libre y encapsulada se evaluó siguiendo la concentración de oxígeno disuelto, producto de la descomposición del H₂O₂ catalizada por la enzima, en el tiempo.

El % de O₂ disuelto, reportado por el aparato utilizado, se transformó a μmol de O₂ producido para el trazo de las curvas cinéticas.

Es importante hacer notar que de acuerdo con la reacción de catálisis enzimática, un μmol de O₂ es formado a partir de la degradación de 2 μmol de H₂O₂. Por lo tanto la actividad reportada como "μmol de O₂/min" corresponde a la mitad de la actividad expresada como "μmol de H₂O₂/min".

Por otra parte, en algunos experimentos para los cuales no se pudo contar con el monitor de oxígeno, o en aquellos donde su uso no resultaba factible (sistema en flujo), la actividad de la enzima se evaluó con base en el sustrato no transformado. La determinación de H₂O₂ se llevó a cabo por medio de una titulación redox con permanganato, de acuerdo con la siguiente reacción:



a) Comparación de la actividad entre la Catalasa libre y encapsulada

En la figura III.7 se muestra la variación de la cantidad de oxígeno producido, con respecto al tiempo, por la descomposición de H₂O₂ catalizada por la enzima libre en solución y la enzima encapsulada en el sol-gel (gel secado a 4 °C hasta el 50 % de su peso inicial).

Se utilizó la misma cantidad de enzima libre que la que fue añadida a los geles (12 μg). En ambos casos la enzima se puso en contacto con 7 ml de buffer fosfatos conteniendo 12 μmol iniciales de H₂O₂ (concentración inicial de H₂O₂ de 1.71 mM).

La actividad inicial de la enzima se obtuvo de la pendiente de la parte lineal de las curvas cinéticas, entre 0 y 1 min aproximadamente. Los valores determinados se presentan en la tabla III.16 expresados como μmol de O₂ (producido) /min. Además tomando como base la actividad inicial de la enzima libre, se calculó la actividad relativa de la enzima encapsulada.

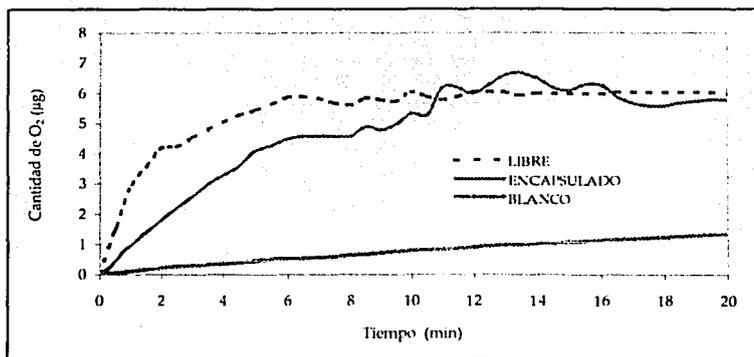
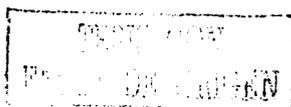


Figura III.7 Patrón cinético de la producción de O_2 a partir de H_2O_2 , catalizada por Catalasa libre y encapsulada en sol-gel.

Tabla III.16 Valores de actividad inicial determinados para la misma cantidad de Catalasa libre y encapsulada en gel, bajo condiciones similares

Enzima	Actividad ($\mu\text{mol de } O_2/\text{min}$)	Actividad relativa %
Libre	2.98	100
Encapsulada	1.03	34.7

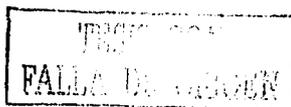
Como puede observarse, el encapsulamiento de la Catalasa reduce su actividad en alrededor del 65% con respecto a la de la enzima libre. Esta pérdida de actividad es menor que en el caso antes presentado de la α -Amilasa (~80% de reducción de actividad). El mejor funcionamiento del gel dopado con Catalasa podría atribuirse a que, en este caso, el sustrato H_2O_2 es una molécula pequeña que puede migrar más rápidamente por difusión a través de los poros del gel, hasta alcanzar las cavidades donde se encuentran atrapadas las moléculas de enzima. Sin embargo, la reducción de actividad de la enzima en el gel es todavía muy significativa, por lo que no puede descartarse la posibilidad de inactivación o desnaturalización de algunas moléculas de enzima durante la preparación del gel. También hay una fuerte probabilidad de que la enzima confinada en las cavidades estrechas no pueda orientarse rápida y adecuadamente para recibir al sustrato en su sitio activo, o bien que este sitio se encuentre bloqueado por las propias paredes del poro. De acuerdo con



algunas hipótesis presentadas en la literatura [3,11,18], cuando la macromolécula es añadida al sol, se producen un gran número de interacciones entre los grupos polares de aquella y el polímero en formación. La molécula dopante actúa como un núcleo o template estructural que acelera las reacciones de condensación y polimerización y alrededor de la cual se desarrolla la red formando una jaula o cavidad cuando el solvente es expulsado de los poros (durante la maduración y secado). Las cavidades que contienen biomoléculas dopantes se contraen conformándose a las dimensiones del huésped, al mismo tiempo la proteína sufre ligeros cambios conformacionales adaptándose al nuevo microambiente que la rodea. Aunque se conoce poco sobre la evolución estructural del sol-gel o las interacciones biomolécula-matriz, algunas investigaciones indican que las proteínas quedan atrapadas en su conformación nativa dentro de jaulas rígidas, con restricción global de movimiento pero sin que se afecte totalmente su moción segmental (p.ej. para interactuar con solutos). Se supone: [3] que el interior de la cavidad polimérica está templado para conformarse física y químicamente a las características superficiales de la biomolécula, [7] que hay penetración substancial de segmentos expuestos de la biomolécula en la estructura polimérica del sol-gel, resultando en diversos grados de inmersión y, [4] que una capa restringida de disolvente queda atrapada en el poro, entre la proteína y el polímero. Dependiendo de lo anterior, las transiciones conformacionales y la rotación estarán más o menos restringidas. Sin embargo, la persistencia de la actividad en las moléculas encapsuladas indica que, al menos para algunas de ellas, hay suficiente accesibilidad al sitio activo y suficiente libertad para transiciones conformacionales locales, lo que permite la entrada, reconocimiento y procesamiento de los sustratos.

b) Pruebas de repetibilidad en la actividad enzimática para geles preparados en forma independiente

En la figura III.8 y la tabla III.17 se muestran los resultados obtenidos con 4 geles dopados con Catalasa (12 µg) y se comparan con los de una cantidad idéntica de la enzima libre. Los cuatro lotes del gel fueron preparados en forma independiente, en diferentes días. En todos los casos el gel se secó en refrigeración a 4 °C hasta pérdida del 50 % de su peso inicial.



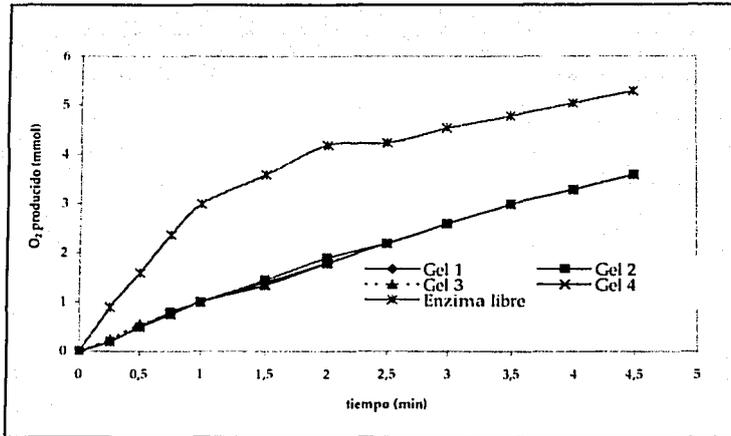


Figura III.8 Curvas cinéticas de 4 lotes de gel dopado con Catalasa, preparados independientemente

Como se puede observar, las curvas cinéticas de los 4 geles están traslapadas y la actividad inicial determinada para la Catalasa encapsulada es prácticamente idéntica.

Estos resultados indican que el procedimiento desarrollado para la preparación de los geles, incluyendo en este caso la etapa del secado, conduce a la obtención de materiales con características muy similares en cuanto a su funcionamiento. Esta cualidad es de suma importancia para la aplicabilidad de los geles con enzimas encapsuladas como sensores bioquímicos. En efecto, la excelente repetibilidad en la preparación de los geles dopados implica que no sería necesario reajustar protocolos de trabajo cada que se cambia de lote.

Sin embargo, es necesario precisar que todos los experimentos y estudios realizados en este trabajo de investigación se llevaron a cabo con materia prima (enzimas, TEOS, etc.) de un solo lote. Por lo tanto, los resultados obtenidos sólo avalan la repetibilidad del proceso de encapsulamiento.

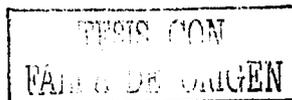


Tabla III.17 Valores de actividad inicial de geles dopados con Catalasa que fueron preparados en días distintos

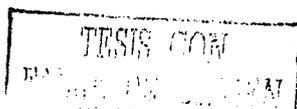
Número de gel	Actividad ($\mu\text{mol de O}_2/\text{min}$)	Fecha de preparación
1	1.04	07/03/2001
2	1.04	08/03/2001
3	1.00	09/03/2001
4	1.01	09/03/2001
Enzima libre	2.98	09/03/2001

Un aspecto importante, que también ponen de manifiesto estos resultados, es la superioridad de los métodos sol-gel para la inmovilización de biomoléculas y en general de moléculas delicadas. Hasta ahora, el método más conocido y utilizado para este fin ha sido la inmovilización química por formación de ligaduras covalentes entre la molécula de interés y un soporte sólido (generalmente sílice). Incluso los biomateriales que ya han sido comercializados en los últimos años, están basados en la inmovilización química. Sin embargo, este método es mucho más delicado, ya que se requieren una serie de reacciones y condiciones en las cuales el riesgo de inactivación de las biomoléculas es muy grande. Por ello es frecuente observar grandes diferencias en el comportamiento del biomaterial producido de lote a lote.

A medida que las investigaciones sobre la inmovilización física de biomoléculas en sol-gel progresen se pondrán en evidencia, cada vez más, las grandes ventajas de este método. Por ello es de esperarse que en un futuro cercano reemplazará a los métodos de inmovilización química.

c) Comportamiento de la enzima encapsulada en ciclos de operación sucesivos

La Catalasa es una enzima con un grupo central hemo ligado a un átomo de Fe, al igual que la mioglobina y la hemoglobina. Estas enzimas se consideran relativamente frágiles pues presentan una alta susceptibilidad a cambios conformacionales o desnaturalización. Algunos reportes de la literatura [7,18] indican que las enzimas una vez encapsuladas se estabilizan debido a las restricciones en su movimiento.



Con el objeto de probar la estabilidad de la Catalasa encapsulada y al mismo tiempo examinar la posibilidad de reuso de los geles, se preparó un gel dopado con esta enzima (12 μg), el cual se secó a 25 °C hasta pérdida del 50 % de su peso inicial. Este gel fue utilizado en cuatro ciclos de operación sucesivos intercalando entre cada ciclo lavados con buffer fosfatos y con mezcla metanol-agua 60:40 (v/v).

Las curvas cinéticas obtenidas en cada ciclo de operación del gel se muestran en la figura III.9 y la actividad inicial de la Catalasa encapsulada determinada a partir de las curvas se reporta en la tabla III.18. Como referencia se presentan también los datos de la enzima libre y el blanco obtenidos conjuntamente. El experimento blanco se hizo con un gel no dopado al cual se le realizó la determinación oximétrica de manera idéntica a la empleada para los geles dopados.

Como puede observarse la actividad de la Catalasa encapsulada disminuye al ser reutilizado el gel. Sin embargo, esta disminución no es progresiva, entre el primero y el segundo ciclos de operación la actividad inicial relativa decrece ligeramente, luego cae drásticamente en el tercer ciclo y se vuelve prácticamente nula en el cuarto ciclo.

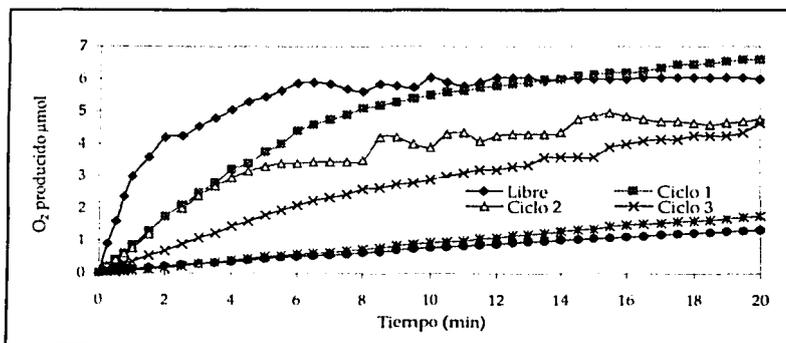


Figura III.9 Curvas cinéticas de un gel dopado con Catalasa, obtenidas en ciclos de operación sucesivos.

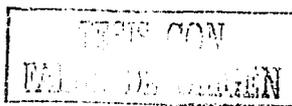


Tabla III.18 Valores de actividad inicial de un gel dopado con Catalasa en ciclos de operación sucesivos.

Ciclos de operación	Actividad ($\mu\text{mol de O}_2/\text{min}$)	Actividad relativa %
Enzima libre	2.98	100
1º	0.83	28.1
2º	0.78	26.0
3º	0.36	12.0
4º	0.07	2.5
Blanco	0.12	4.0

Estos resultados pueden ser debidos a una de las siguientes causas:

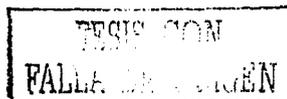
- 1) La Catalasa se desnaturaliza, probablemente durante los lavados, por el contacto con la mezcla rica en metanol
- 2) Después de un ciclo de operación el sitio activo de la Catalasa queda inhibido, posiblemente por formación de complejos enzima-sustrato que no se disocian al lavar el gel con buffer fosfatos y mezclas metanol-agua

Por otra parte, es interesante notar que la actividad relativa en el primer ensayo es de sólo 28.1 %, es decir significativamente más baja que la obtenida en los incisos anteriores (III.5 (a) y (b)). Esto solo puede explicarse por el diferente método de secado del gel utilizado en este experimento.

Para resolver las incógnitas planteadas por los resultados obtenidos se realizaron otras series de experimentos que se discuten en los siguientes incisos.

d) Estudio del comportamiento de la Catalasa encapsulada en geles secados por diferentes métodos

Con el objeto de conocer la influencia del tipo de secado del material sobre la actividad y funcionamiento de la enzima encapsulada se prepararon 5 geles dopados con Catalasa (12 μg cada uno). Dos geles se secaron hasta pérdida del 50 % de su peso inicial, uno a temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$) y otro en refrigeración ($4\text{ }^\circ\text{C}$). Los otros tres geles se



secaron en un liofilizador hasta obtener un sólido con un peso correspondiente al 23 %, al 12 % o al 10 % del peso inicial, respectivamente.

Cabe mencionar que en un ensayo inicial se secó un gel por liofilización hasta 50 % de su peso original; sin embargo, al retirar el material del liofilizador, éste se rehidrató rápidamente formando una pasta semilíquida difícil de manejar. Por ello se optó por realizar un secado más intenso de los geles en este aparato.

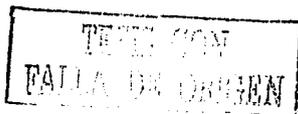
Las curvas cinéticas y valores de actividad inicial de los cinco geles secados a diferentes grados y por diferentes técnicas se presentan en la figura III.10 y la tabla III.19 También se incluyen como referencia los datos obtenidos para la enzima libre y el blanco de reactivos.

Tabla III.19 Valores de actividad inicial en geles dopados con Catalasa que fueron secados por diferentes métodos

Tipo de secado	Actividad ($\mu\text{mol de O}_2/\text{min}$)	Actividad relativa (%)
E. libre	2.84	100.00
25	0.83	29.2
4	1.02	35.9
A (23 %)	0.10	3.50
B (12 %)	0.12	4.20
C (10 %)	0.15	5.20
Blanco	0	0.00

Los resultados obtenidos muestran que la técnica y condiciones de secado tienen una influencia fundamental en la preservación de la actividad de la enzima encapsulada. La mayor actividad se presenta en los dos geles que fueron secados sólo hasta pérdida del 50 % de su peso original. En los geles que fueron secados por liofilización se perdió casi totalmente la actividad enzimática.

Se podría entonces concluir que la liofilización no es una técnica adecuada para el secado de geles dopados con biomoléculas. Sin embargo, es necesario analizar con más detalle los resultados y condiciones de los experimentos. El gel con mayor actividad, secado a 4 °C, tardó en perder el 50 % de su peso entre 3 y 4 días. El gel secado a temperatura ambiente



duró 2 días para llegar al 50 % de su peso. Los gels secados por liofilización perdieron entre el 77 % y el 90 % de su peso en solo 20 min.

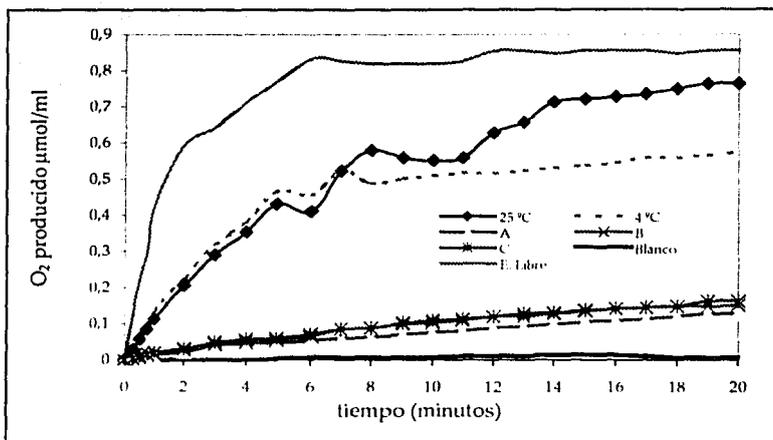
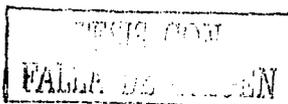


Figura III 10 Curvas cinéticas obtenidas con gels dopados con Catalasa y secados por diferentes métodos. 25 °C indica que el secado del material se llevó a cabo a esta temperatura. 4 °C secado en refrigeración. A secado en un liofilizador hasta la obtención de un 12% del peso inicial del material. B secado en liofilizador hasta obtener un 10% del peso inicial del material. C secado en el liofilizador hasta obtener el 23% del peso inicial del material

Considerando lo anterior podría proponerse lo siguiente:

- 1) Para un grado de secado idéntico, se obtienen mejores resultados, en cuanto a la preservación de actividad de la enzima, a medida que la pérdida de líquido se efectúa de manera más lenta. Esto concuerda con lo reportado por Gill y Ballesteros [7] en su revisión sobre el encapsulamiento de biomoléculas en sol-gel. Ellos mencionan que para los gels derivados de alcoxisilanos es necesario realizar un secado lento para evitar un colapso de los poros demasiado rápido y extremo, que podría dañar a las biomoléculas.
- 2) Un grado de secado del gel mayor al 50 % en peso, conduce a una pérdida importante de actividad de la enzima. En contraparte, las propiedades físicas del material, como su



resistencia mecánica y química, son mejores cuando éste es secado al estado de xerogel [7]. Por ejemplo los geles secados por liofilización dieron como resultado un material de alta dureza que al ser molido permitía obtener un polvo fino y homogéneo, fácil de empacar pero con muy baja actividad enzimática.

Por lo tanto es claro que no es la técnica de secado la responsable del menor o mayor grado de actividad de la enzima sino la extensión y la rapidez del secado.

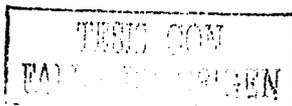
En la literatura se reportan condiciones de secado muy diversas. Algunos autores secan los biogeles hasta peso constante (xerogeles) ya sea a temperatura ambiente o en refrigeración. Muchos otros sólo secan hasta el 50 % de pérdida de peso. Otros trabajan con hidrogeles, cuidando de mantener el material obtenido después de la gelificación siempre sumergido en buffer.

El problema de no secar el material completamente radica en que se dificulta su manejo físico. Esto al nivel actual en que se encuentran las investigaciones sobre sol-gel bioactivo no es importante, pero sí se convertirá en una limitante cuando se pretendan ampliar los campos de aplicación de estos materiales y hacer un uso más extensivo de ellos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, no será fácil encontrar una solución al problema planteado. Sistemáticamente se observó una pérdida notable de actividad de las biomoléculas cuando los geles fueron secados a más del 50 %, incluso a temperatura ambiente o en refrigeración.

e) Medición de la actividad enzimática de la Catalasa en un gel usado antes y después de tratarlo con Tritón X-100

Como se ha comentado en secciones anteriores, la posibilidad de reuso de los geles es un punto clave para que estos puedan tener mayores perspectivas de aplicación y que su uso se popularice.



Los geles dopados con Catalasa, a diferencia de los dopados con α -Amilasa, mostraron una fuerte pérdida de actividad en ciclos sucesivos de operación. En la literatura [21] se reporta que la Catalasa forma complejos enzima-sustrato muy fuertes, en particular una especie conocida como complejo II que es relativamente estable pero inactivo. Para romper este complejo se decidió someter a un gel, previamente usado, a un tratamiento con una solución del tensoactivo Tritón X-100. Se utilizó un gel dopado con 12 μg de Catalasa y secado a 4 $^{\circ}\text{C}$. Después de un primer uso, el gel se lavó sólo con buffer y mezcla metanol-agua 60:40 (v/v) y se realizó un segundo ciclo de operación. Posteriormente, se trató con una solución de Tritón al 0.6 % (v/v) y se realizó un tercer ciclo de operación. Los resultados obtenidos antes (segundo ciclo) y después (tercer ciclo) del tratamiento con Tritón se muestran en la figura III.11 y la tabla III.20.

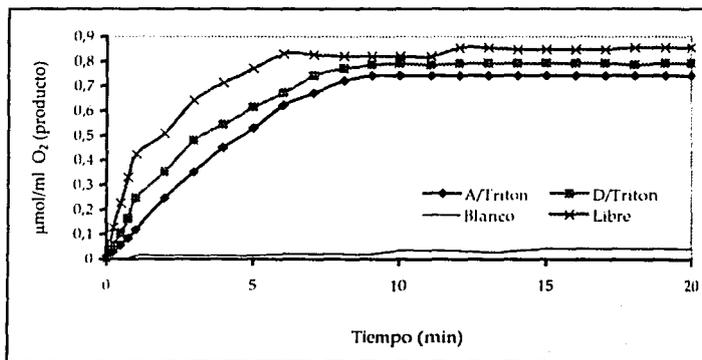
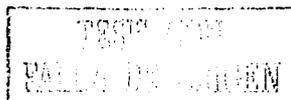


Figura III.11 Curvas cinéticas obtenidas con un gel dopado con Catalasa en un segundo y un tercer ciclo de operación, intercalando entre ambos un tratamiento con Tritón X-100

Tabla III.20 Valores de actividad inicial de un gel antes y después de un tratamiento con Tritón X-100

Muestra	Actividad (μmol de O_2/min)	Actividad relativa %
E. libre	2.94	100.00
Gel sin tritón	0.830	28.2
Gel con tritón	1.68	57.1
blanco	0.079	2.68



Como se puede observar, el tratamiento del gel con Tritón tuvo un efecto notable. La actividad de la Catalasa encapsulada no solo se recuperó sino que se incrementó significativamente.

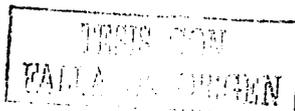
En efecto para los geles secados a 4 °C la actividad relativa (respecto a la enzima libre) oscila entre 33-35 % en el primer uso del gel; en un segundo ciclo de operación, la actividad relativa determinada (tabla III.20) cayó hasta 28.2 %. Después del tratamiento con tensoactivo, la actividad relativa subió a 57 % lo que significa un incremento de aproximadamente 70 %, respecto a lo obtenido en el primer ciclo.

De este resultado se pueden deducir varias conclusiones. Primero, es obvio que la Catalasa encapsulada no se desnaturaliza ni por el uso en ciclos de operación repetidos, ni por los lavados con mezclas ricas en alcohol. En segundo lugar, se comprueba que durante su funcionamiento catalítico la enzima tiende a formar complejos con el sustrato que la inactivan temporalmente; sin embargo, los complejos logran ser disociados y la enzima liberada por medio de un tratamiento con tensoactivo. Finalmente, el aumento de actividad solo puede explicarse considerando que, durante el proceso de encapsulamiento, algunas moléculas de enzima quedan fuertemente ligadas a la pared del poro por interacciones con los silanoles de superficie; esto puede bloquear su sitio activo y/o su moción local impidiendo o restringiendo el acceso del soluto. Al parecer, el Tritón también puede romper estas interacciones y liberar la enzima dejándola funcionalmente activa.

Es importante hacer notar que una actividad relativa del 57 % en una enzima inmovilizada se puede considerar como un resultado excelente. Así mismo, la posibilidad de reuso de geles dopados con una enzima frágil, como la Catalasa, es un logro notable.

f) Comportamiento de geles dopados con Catalasa en sistemas en flujo

Para estudiar el comportamiento de los geles dopados con Catalasa (12 µg) en sistemas en flujo se empacaron dos geles, preparados independientemente, en cartuchos. En este caso, los geles se trabajaron con una cantidad de peróxido de hidrógeno más alta (70 µmol) que la



que se usó en los ensayos previos en operaciones en bulto (12 μ mol). El H_2O_2 disuelto en 5 ml de buffer fosfatos se percoló a través de los cartuchos a un flujo de 0.5 ml/min, es decir en 10 min totales.

Se efectuaron primero tres ensayos, regenerando los cartuchos entre cada operación únicamente con buffer fosfatos. En la figura III.12 se muestra que el % de sustrato degradado disminuye progresivamente en cada ciclo de operación, pasando desde aproximadamente 90 % hasta 47 %. El comportamiento observado es prácticamente idéntico en los dos cartuchos. Posteriormente se realizaron tres ensayos más pero intercalando un lavado del cartucho con solución de Tritón durante la etapa de regeneración.

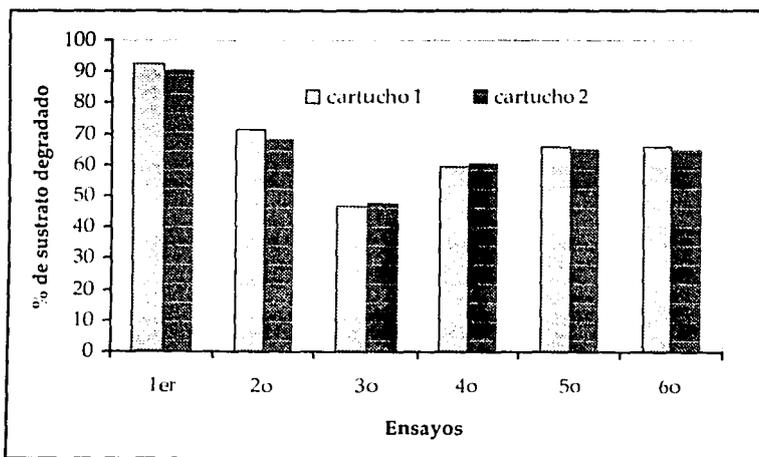
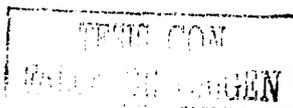


Figura III.12 Representación gráfica del % de H_2O_2 degradado en cartuchos empacados con gel dopado con Catalasa durante ciclos sucesivos de operación. Después del tercer ciclo se incluyó un tratamiento con Tritón X-100 durante la etapa de regeneración

Como puede observarse en la figura III.12, el tratamiento con Tritón permitió recuperar una parte de la actividad perdida, incrementándose el % de sustrato degradado hasta ~65



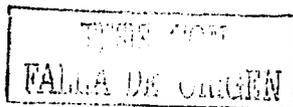
%. Además, en estas condiciones, la actividad de los geles se mantuvo prácticamente constante durante los ciclos de operación consecutivos.

Con estos resultados se comprueba que los geles dopados con Catalasa pueden ser reutilizados en múltiples ciclos de operación, manteniendo una actividad casi constante si entre cada ciclo se lava el gel con una solución de un tensoactivo. Estos geles se pueden emplear tanto en sistemas estáticos como en sistemas en flujo.

Por otra parte, considerando los resultados de los últimos ensayos en la figura III.12 (65 % de sustrato transformado), se determina una tasa de reacción de $45.5 \mu\text{mol}$ de H_2O_2 en 10 minutos, o sea $4.55 \mu\text{mol}/\text{min}$ en promedio, o bien $2.275 \mu\text{mol O}_2$ (producido)/min Esta actividad es mayor que la de la enzima encapsulada en un gel idéntico (secado a 4°C) trabajado en sistema estático (Tabla III.16), lo cual podría parecer lógico ya que en el caso de los cartuchos la concentración del sustrato en la solución percolada fue 5 veces mayor.

Sin embargo, como se discutió en el capítulo 1 sección 2.1.1, la velocidad inicial o actividad de la enzima aumenta con la concentración de sustrato hasta alcanzar un valor constante (V_{max}) característico de la enzima y probablemente de su entorno. El valor de actividad reportado en la Tabla III.16 para la enzima encapsulada corresponde de hecho a V_{max} (como se demostrará en la siguiente sección), por lo que el resultado obtenido en los cartuchos no puede explicarse con base en la mayor concentración del sustrato en la solución utilizada en estos experimentos.

De hecho, no se tiene ninguna explicación satisfactoria para el fenómeno observado y tan solo se puede confirmar que las enzimas encapsuladas trabajan más eficazmente en sistemas en flujo que en sistemas estáticos, como lo demuestran claramente los resultados obtenidos. Cabe mencionar que en la literatura no se han reportado experimentos similares a los aquí realizados, en particular la comparación de la capacidad enzimática de biogeles trabajados en sistemas estáticos y dinámicos.



6. Determinación de las constantes de Michaelis para la Catalasa libre y encapsulada

Para este estudio se asumieron como válidos los postulados establecidos para aplicar el tratamiento cinético de Michaelis -Menten a los resultados obtenidos con la Catalasa libre y la encapsulada. En efecto, se consideró que tanto en la solución como en el gel existía una población homogéneamente repartidas de moléculas activas. Además, dadas las concentraciones de enzima ($3.5 \times 10^{-5} \mu\text{mol}$ en $7 \text{ ml} = 5 \times 10^{-3} \mu\text{M}$) y de sustrato ($20\text{-}1700 \mu\text{M}$) usadas en los experimentos se cumple con una relación sustrato: enzima > 1000 . El único punto débil fue el de asumir que los productos formados no interaccionan con la enzima, lo cual probablemente no es del todo cierto en el caso de la Catalasa puesto que se requirió el tratamiento con Tritón para reactivar los geles usados.

De las curvas oximétricas obtenidas para cada concentración de sustrato se determinó la velocidad inicial y se calcularon los recíprocos, tanto para los experimentos con la enzima libre (Tabla III.21) como con la enzima encapsulada (Tabla III.23). Las correspondientes gráficas (v) vs (concentración) y $(1/v)$ vs $(1/\text{concentración})$ se muestran en las figuras III.13 a III.16.

Tabla III.21 Datos de la concentración de sustrato y de la velocidad inicial para la Catalasa libre

[H ₂ O ₂] (μM)	v^* ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	$1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM) ⁻¹	$1/v$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$) ⁻¹
20	1.2	0.05	0.833
100	2.1	0.01	0.476
500	2.7	0.002	0.370
1000	2.8	0.001	0.357
1700	2.98	0.0005	0.335

*velocidad inicial de producción de oxígeno

Tabla III.22 Parámetros enzimáticos de la Catalasa libre.

$$\text{Pendiente} = K_m/V_{\text{max}} = 9.768 \mu\text{M} (\mu\text{mol}/\text{min})^{-1}$$

$$K_m = \text{pendiente} \times V_{\text{max}} = 27.89 \mu\text{M}$$

$$\text{Intersección} = 0.350 (\mu\text{mol}/\text{min})^{-1}$$

$$V_{\text{max}} = 1/\text{intersección} = 2.855 \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$\text{Cantidad de Catalasa}^* = 3.5 \times 10^{-5} \mu\text{mol}$$

$$K_{\text{cat}} = (V_{\text{max}}/\mu\text{mol de Catalasa}^*) = 81,564 (\text{min})^{-1}$$

* Considerando datos del proveedor de la enzima.

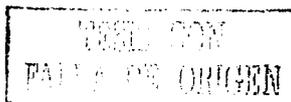


Tabla III.23 Datos de la concentración de sustrato y de la velocidad inicial para la Catalasa encapsulada

[H ₂ O ₂] (μM)	v^* ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	$1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM^{-1})	$1/v$ ($\mu\text{mol}/\text{min})^{-1}$
20	0.35	0.05	2.85
100	0.80	0.01	1.25
500	0.90	0.002	1.11
1000	0.97	0.001	1.03
1700	1.03	0.0006	0.97

* velocidad inicial de la producción de oxígeno

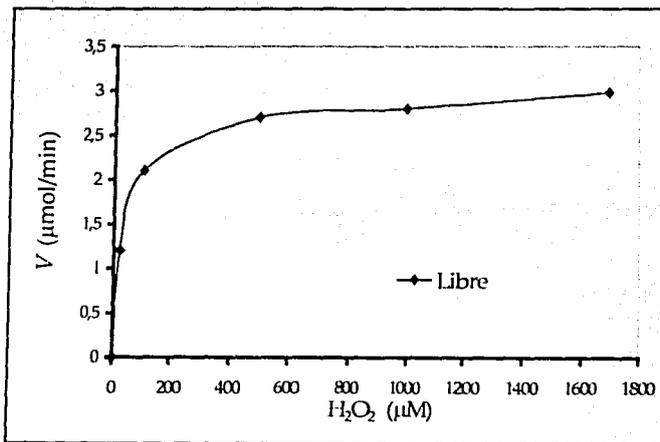


Figura III.13 Representación gráfica de la velocidad inicial (μmol de O₂ / min) vs la concentración de sustrato (H₂O₂ μM) para la Catalasa libre

TRINIDAD
FALLA DE ORIGEN

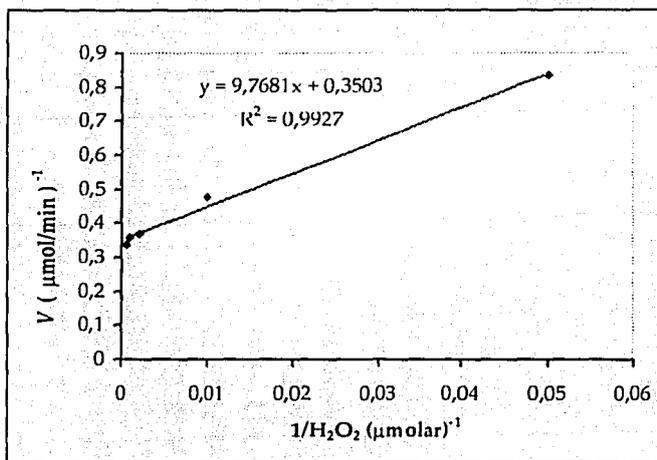


Figura III.14 Representación gráfica de 1/V frente a 1/[H₂O₂] para la obtención de los parámetros cinéticos de la Catalasa libre

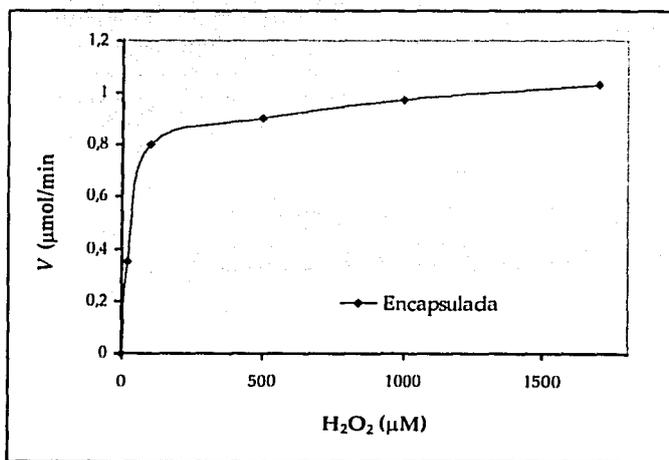


Figura III.15 Representación gráfica de la velocidad inicial (μmol de O₂/min) vs la concentración de sustrato (H₂O₂: μM) para la Catalasa encapsulada

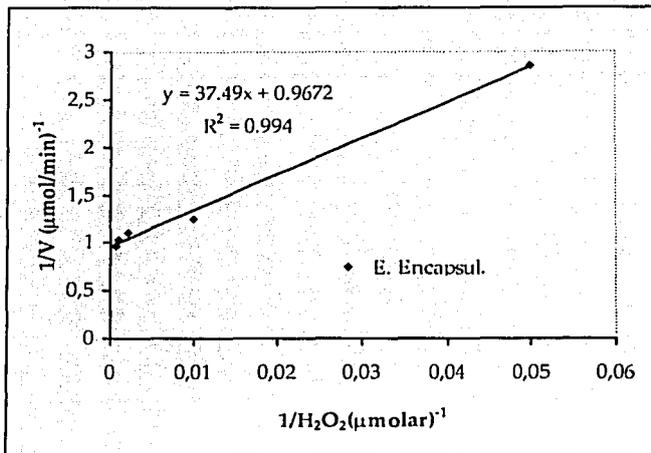


Figura III.16 Representación gráfica de $1/v$ frente a $1/[H_2O_2]$ para la obtención de los parámetros cinéticos de la Catalasa encapsulada

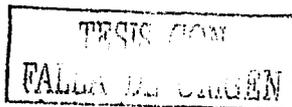
De acuerdo con el método de Lineweaver-Burk:

$$1/v = 1/V_{max} + (K_m/V_{max}) \times (1/s)$$

las gráficas $(1/v)$ vs $(1/s)$ corresponden a una recta, si el comportamiento de la enzima es Michaeliano. La ordenada al origen y la pendiente de esta recta permiten calcular las constantes cinéticas de la enzima. Por otra parte, si la concentración o cantidad de la enzima utilizada en la reacción catalítica es conocida, es posible calcular un importante parámetro cinético conocido como constante catalítica (κ_{cat}) o actividad específica de la enzima:

$$\kappa_{cat} (\text{min})^{-1} = (V_{max} / E)$$

donde E es la concentración o cantidad de enzima y V_{max} está expresada como concentración de sustrato (o producto) por minuto respectivamente.



Las figuras III.14 Y III.16 muestran que en las condiciones experimentales empleadas, el comportamiento de la Catalasa libre y encapsulada es Michaeliano por lo que es posible estimar los parámetros cinéticos de la enzima (Tablas III.22 y III.24). La constante catalítica se calculó de acuerdo con los datos del proveedor de la enzima y considerando que toda la proteína contenida en el producto corresponde a Catalasa. Además se asumió que en el proceso de encapsulamiento no hubo pérdida de proteína.

Tabla III.24 Parámetros enzimáticos de la Catalasa encapsulada

$\text{Pendiente} = K_m/V_{max} = 34.49 \mu\text{M} (\mu\text{mol}/\text{min})^{-1}$ $K_m = \text{pendiente} \times V_{max} = 38.76 \mu\text{M}$ $\text{Intersección} = 0.967 (\mu\text{mol}/\text{min})^{-1}$ $V_{max} = 1/\text{intersección} = 1.034 \mu\text{mol}/\text{min}$ $\text{Cantidad Catalasa} = 3.5 \times 10^5 \mu\text{mol}$ $K_{cat} = (V_{max} / \mu\text{mol de Catalasa}) = 29,540 (\text{min})^{-1}$

*Considerando datos del proveedor de la enzima y encapsulamiento total de ésta

Comparación de los parámetros de la enzima libre y encapsulada

La comparación de los parámetros de la enzima libre y la enzima encapsulada muestra lo siguiente, tablas III.22 y III.24:

$$K_m (\text{libre}) < K_m (\text{encapsulada})$$

$$V_{max} (\text{libre}) > V_{max} (\text{encapsulada})$$

$$K_{cat} (\text{libre}) > K_{cat} (\text{encapsulada})$$

Esto indica que la enzima libre requiere una concentración menor de sustrato que la enzima encapsulada para llegar en cada caso a la mitad de su respectiva velocidad máxima de operación. Se considera que esto es debido a restricciones difusionales de sustratos y productos en el gel. La presencia de pequeños poros e incluso de "cuellos de botella" en los grandes poros del gel puede reducir significativamente los coeficientes de difusión de sustratos y productos en la matriz de la sílica. Sin embargo cabe hacer notar que el K_m de la enzima encapsulada es sólo 1.38 veces el K_m de la enzima libre. En la literatura [19,24,25] se han encontrado diferencias mucho más grandes entre los K_m de enzimas encapsuladas y libres (2.1 a 6 veces mayor el K_m de la enzima encapsulada respecto a la libre). Lo anterior permite concluir que el proceso desarrollado en este trabajo para el encapsulamiento de

biomoléculas permite obtener un gel con mejores propiedades para el transporte de sustratos y productos a través de la matriz polimérica.

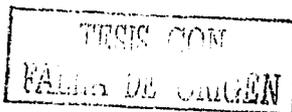
Por otra parte, V_{max} y K_{cat} están relacionados con la actividad de la enzima por lo que los resultados obtenidos corroboran la pérdida de actividad de la Catalasa encapsulada con respecto a la Catalasa libre. La relación entre K_{cat} de la enzima encapsulada y la K_{cat} de la enzima libre es de 36.2 % lo que corresponde bastante bien con los valores reportados en secciones anteriores para geles secados hasta el 50 % de su peso a 4 °C (actividad relativa 32-36 %).

En la literatura se reportan muy diversos valores en cuanto al % de actividad relativa de las enzimas encapsuladas respecto a las enzimas libres. Al parecer [24] algunas enzimas son más resistentes que otras y preservan mejor su actividad durante el proceso de encapsulamiento. Desafortunadamente no se encontraron reportes sobre la actividad relativa de la Catalasa encapsulada en sol-gel.

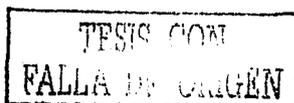
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7 Bibliografía

1. J.Wang, *Sol-Gel Materials for Electrochemical Biosensors*, Anal. Chim. Acta, 399 (1999) 21-27.
2. J.Lin y C.W. Brown, *Sol-Gel Glass as a Matrix for Chemical and Biochemical Sensing*, Trends Anal. Chem., 16 (1997) 200-211.
3. B. Dunn, J.M. Miller, B.C. Dave, J.S. Valentine y J.I. Zink, *Strategies for Encapsulating Biomolecules in Sol-Gel Matrices*, Acta Mater, 46 (1998) 737-741.
4. B.C. Dave, B.Dunn, J.S. Valentine y J.I. Zink, *Sol-Gel Encapsulation Methods for Biosensors*, Anal. Chem., 66, No 22 (1994) 1120 A- 1126 A.
5. O.Lev, M. Tsionsky, L. Rabinovich, V. Glezer, S. Sampath, I. Pankratov y J. Gun, *Organically Modified Sol-Gel Sensors*, Anal. Chem, 67, No 1 (1995) 22 A- 30 A.
6. O.Lev, *Diagnostic Applications of Organically-Doped Sol-Gel Porus Glass*, Analisis 20 (1992) 543-553.
7. I. Gill y A.Ballesteros, *Bioencapsulation within Synthetic Polymers (Part 1): Sol-Gel Encapsulated Biologicals*, Trends Biotechnol., 18 (2000) 282-296.
8. U. Narang, M.H.Rahman, J.H.Wang y P.N. Prasad y F.V. Bright, *Removal of Ribonucleases from Solution Using an Inhibitor-Based Sol-Gel Derived Biogel*, Anal. Chem., 67 (1995) 1935-1939.
9. A. Bronshtein, N. Aharonson, D. Avnir, A.Turniansky y M. Altstein, *Sol-Gel Matrixes Doped with Atrazine Antibodies: Atrazine Binding Properties*, Chem. Mater, 9 (1997) 2632-2639.
10. S.A. Rodríguez y L.A. Colon, *Investigations of a Sol-Gel Derived Stationary Phase for Open Tubular Capillary Electrochromatography*, Anal. Chim. Acta, 397 (1999) 207-215.
11. B. Dunn y J.I. Zink, *Probes of Pore Environment and Molecule-Matrix Interactions in Sol-Gel Materials*, Chem. Mater, 9 (1997) 2280-2291.
12. S.A. Wallington, T. Labayen, A. Poppe, N.A.J.M. Sommerdijk y J.D. Wrigth, *Sol-Gel Entrapped Materials For Optical Sensing of Solvents and Metal Ions*, Sensors and Actuators B, 38-39 (1997) 48-52.



13. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*, J. Biol. Chem., 193 (1951) 265-275.
14. <www.bio.mtu.edu/campbell/b14820/lectures/lec1/proteins2.htm> 2 jul. 2002.
15. Productos Químicos para Laboratorio y Reactivos Analíticos, Catalogo Fluka, México, 1995/1996, p. 133-134.
16. R.W. Cowgill, y A.B. Pardee, *Experiments in Biochemical Research Techniques*, John Wiley & Sons, New York, 1957, pp 176-177.
17. D.T. Plummer, *An introduction to Practical Biochemistry*, 3rd ed., Mc Graw Hill, London, 1987.
18. D.M.Liu, y L.W.Chen, *Encapsulation of Protein Molecules in Transparent Porous Silica Matrices via an Aqueous Colloidal Sol-Gel Process*, Acta mater., 47 (1999) 4535-4544.
19. C. Dosoretz, R. Armon, J. Starosvetsky y N. Rothschild, *Entrapment of Parathion Hydrolase From Pseudomonas spp. in Sol-Gel Glass*, J.Sol-Gel Sci. Technol., 7 (1996) 7-11.
20. D. Avnir, M. Ottolenghi, S. Braun and R. Zusman, U.S. Patent 5,292,801, Marzo 1994.
21. H.U.Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., TomoV, Cap. III, Verlag Chemic, Florida, 1986.
22. Reactivos y Productos Químicos para la Investigación en Ciencias de la Vida, Catalogo Sigma, St. Louis Missouri, 2000/2001, p.216 .
23. J. C. Vázquez-Lira, E. Camacho-Frías, A. Peña-Alvarez y L.E.Vera-Avila, *Preparation and Characterization of a Sol-Gel Immunosorbent Doped with 2,4-D Antibodies*, (artículo en prensa Chem.Mater., 2002).
24. R.B. Bhatia, C.J. Brinker, A.K. Gupta y A.K. Singh, *Aqueous Sol-Gel Process for Protein Encapsulation*, Chem. Mater., 12 (2000) 2434-2441.
25. D. Shabat, F. Grynszpan, S. Saphier, A. Turniansky, D. Avnir and E. Keinan, *An Efficient Sol-Gel Reactor for Antibody-Catalyzed Transformations*, Chem. Mater., 9 (1997) 2258-2260.

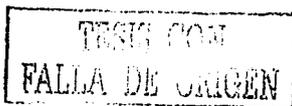


Conclusiones

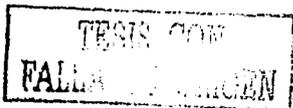
1. Se implementó y optimizó la técnica de preparación de materiales dopados por el proceso del sol-gel, para la inmovilización de pequeñas moléculas orgánicas y de biomoléculas, mediante su encapsulamiento en los poros de una matriz de sílica.
2. El rendimiento de la reacción para la obtención del sol-gel, medido por la cantidad de material obtenido, depende fuertemente del pH en la mezcla reaccionante.

Bajo condiciones estequiométricas del precursor (Tetraetoxisilano) y el agua, el rendimiento se incrementó a medida que aumentó la concentración de HCl (catalizador) en la mezcla. La rápida hidrólisis del precursor acompañada de una lenta condensación en medios muy ácidos favoreció una alta tasa de hidrólisis y una máxima incorporación de las especies hidrolizadas al polímero en formación.

3. Los vidrios sol-gel dopados con indicadores ácido-base (fenolftaleína y negro de eriocromo T) respondieron reversiblemente a cambios de pH en la solución externa, aunque con una cinética más lenta que la que presentan los mismos indicadores cuando se encuentran en solución. El material dopado, una vez seco y molido puede ser guardado por largo tiempo y utilizado posteriormente (ya sea a granel o empacado en cartuchos) sin que se altere su capacidad de respuesta. Esto pone en evidencia que:
 - a. Una fracción importante de la sustancia dopante quedó permanentemente atrapada en los poros del vidrio preparado.
 - b. Las moléculas encapsuladas conservan su reactividad química. Por lo tanto, los vidrios sol-gel dopados con indicadores, desarrollados en este trabajo presentaron una buena potencialidad par ser utilizados como sensores de pH en sistemas en flujo.



4. Los vidrios sol-gel dopados con indicadores metalocrómicos (o-fenantrolina y negro de eriocromo T) presentaron una cinética de respuesta excesivamente lenta por lo cual no es factible su uso como sensores de cationes metálicos en el estado actual. En efecto aunque los indicadores quedaron encapsulados sin perder su funcionalidad química, el transporte de los cationes metálicos a través de la matriz de sílice fue sumamente lento. Este problema requiere de un estudio más profundo para poder proponer condiciones que permitan a futuro dar un uso práctico a este tipo de materiales.
5. El fruto más relevante de este trabajo es sin duda la metodología desarrollada para el encapsulamiento de biomoléculas en sol-gel, la cual ha demostrado ser de aplicación general, no solo para enzimas sino también para otras macromoléculas biológicas.
6. Se demostró que los geles dopados con enzimas pueden ser utilizados en ciclos de reacción sucesivos con una mínima pérdida de actividad. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la enzima puede ser necesario un lavado del biogel con una solución de surfactante no iónico después de cada ciclo, para reactivar la enzima.
7. También se demostró la reproducibilidad de lote a lote en las propiedades (actividad) de los biogeles preparados.
8. Por todas las características mencionadas, es evidente que los biogeles desarrollados en este trabajo pueden ser propuestos para su aplicación como biosensores. Así, esta aportación contribuye al progreso en el interesante campo de la inmovilización de biomoléculas y sus posibles múltiples aplicaciones.



9. Por otra parte, en otro trabajo que se realizó en el mismo laboratorio, se pudo caracterizar el material obtenido en las mismas condiciones en las cuales se desarrollo en este trabajo. La técnica utilizada para este propósito fue la de microscopia óptica, la cual dio la siguiente información: las partículas tienen un tamaño de 10 a 20 μm tanto para el dgel seco coma para el hidrogel. esféricas con tamaños de poros superficiales de 4 a 7 micras. Por la técnica de termoporometría se obtuvieron los siguiente datos: un volumen poroso que tiene 2 intervalos, el primero va de 4.1 a 8 nm ocupando un 20% de todo el volumen de una partícula, mientras que el segundo tiene un intervalo de volumen poroso que va de 9.1 a 49 nm y que ocupan un 79.80 del volumen total de la partícula.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN