



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
INGENIERIA

FACULTAD DE QUIMICA

PREPARACION DE MICROESFERAS
POLIMERICAS MAGNETICAS PARA
LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERIA

INGENIERIA QUIMICA – BIOCATALISIS

P R E S E N T A :

FRANCISCO VAZQUEZ RAMIREZ

TUTOR:

DR. EDUARDO BARZANA GARCIA

2008





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. MARTIN HERNANDEZ LUNA
Secretario: DR. PEDRO ROQUERO TEJEDA
Vocal: MC. MARCO ANTONIO URESTI MALDONADO
1er. Suplente: DR. ALBERTO TECANTE CORONEL
2do. Suplente: DR. MARIA TERESA ORTA LEDEZMA

Lugar donde se realizó la tesis:

LABORATORIO 314, CONJUNTO E FACULTAD DE QUIMICA UNAM

TUTOR DE TESIS:

DR. EDUARDO BARZANA GARCIA

AGRADECIMIENTOS:

Al Doctor Eduardo Bárzana García por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por su valiosa asesoría para la realización de este trabajo, el tiempo, la confianza, el apoyo y la amistad que me brindó.

A los miembros del H. Jurado por sus aportaciones a este trabajo de investigación.

Al CONACYT y a la Facultad de Química de la UNAM por el soporte brindado para la elaboración de este proyecto.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM así como a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química, especialmente al Doctor Raúl Alejandro Valenzuela Monjarás y al IQ Rafael Iván Puente Lee por su valiosa colaboración durante la etapa de caracterización de los materiales.

Muy especialmente al Maestro Alberto Bremauntz por todas las valiosas enseñanzas que me transmitió además de la Ingeniería Química.

A mis compañeros de laboratorio: Brenda, Sandra, Mauricio, Alberto, Iris, Anel, Oscar, Ioscani, Miriam, Leonardo, Miquel y Roeb por sus consejos, su ayuda y sobretodo por su amistad.

A mis papás Lilia y Francisco y a mi hermano Roberto gracias por todo su apoyo, su cariño y comprensión, han sido una parte muy importante para que pueda culminar este ciclo.

Ale gracias por todo tu amor y por hacerme sentir alguien especial, por estar conmigo en todo momento e impulsarme para alcanzar todos mis sueños.

A mi abuelito Francisco Vázquez Miranda, donde quiera que te encuentres gracias por creer en mí.

Al Ingeniero Roberto Uribe Afif y al Ingeniero Homero Jesús Montaña Román por la confianza y la oportunidad que me brindaron de iniciar en el ámbito profesional al conocer este trabajo de investigación.

A Arturo, Antonio, Rosa Elba, Bernardo, José Juan, Enrique, Salvador, Ángel Elizabeth, Karla, Grethel, Esmeralda, Paco, Rafael, Daniel y todos mis compañeros del CTCC por la amistad que hemos forjado.



ÍNDICE

1.1 Introducción	4
1.2 Abstract	6
2 Objetivos	8
2.1 Objetivo general	8
2.2 Objetivos particulares	9
3 Hipótesis	10
4 Antecedentes	11
4.1 Ferrofluidos	11
4.1.1 Definición	11
4.1.2 Concepción y empleo de ferrofluidos	12
4.1.3 Estabilización de los ferrofluidos	13
4.1.4 Partículas magnéticas	15
4.1.5 Magnetita	16
4.1.6 Química de superficie de la magnetita	17
4.1.7 Síntesis de magnetita	18
4.1.8 Perspectivas	20
4.2 Microesferas poliméricas magnéticas	22
4.2.1 Inmovilización de biocatalizadores	22
4.2.2 Microesferas poliméricas magnéticas	22
4.2.3 Síntesis de microesferas poliméricas magnéticas	24
4.2.4 Polímeros	25
4.2.5 Clasificación de polímeros	27
4.2.6 Clasificación de las reacciones de polimerización	28
4.2.7 Polimerización por radicales libres	31
4.2.8 Inhibición y retardación	36
4.2.9 Polimerización en “bulk” o masa	38
4.2.10 Polimerización en solución	39
4.2.11 Polimerización en emulsión	39
4.2.12 Polimerización en suspensión	40
4.2.13 Surfactantes	42



4.3 Lipasas	44
4.3.1 Enzimas	44
4.3.2 Lipasas	45
4.3.3 Activación de las lipasas	49
4.3.4 Actividad acuosa (A_w)	49
4.3.5 Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	51
4.4 Métodos de caracterización	53
4.4.1 Magnetometría de muestra vibrante	53
4.4.2 Microscopía electrónica de transmisión	55
4.4.3 Microscopía electrónica de barrido	56
4.4.4 Difracción de rayos X	58
4.4.5 Espectrofotometría	59
4.4.6 Difracción Láser	61
5 Metodologías	63
5.1.1 Reactivos, materiales y equipos	63
5.2.1 Síntesis de magnetita	65
5.2.2 Caracterización de magnetita por XRD	66
5.2.3 Caracterización de magnetita por TEM	67
5.2.4 Caracterización de magnetita por magnetometría de muestra vibrante	68
5.3.1 Microesferas poliméricas magnéticas	69
5.3.2 Pre-tratamiento de monómeros	69
5.3.3 Polimerización de microesferas magnéticas	70
5.3.4 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por SEM	72
5.3.5 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por difracción láser	72
5.3.6 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por magnetometría de muestra vibrante	72
5.4.1 Pre-tratamiento de la lipasa de <i>Candida rugosa</i>	73
5.4.2 Inmovilización	74
5.4.3 Actividad catalítica	75



6 Resultados y análisis	77
6.1.1 Obtención del ferrofluido de magnetita	77
6.1.2 Caracterización de magnetita por XRD	77
6.1.3 Caracterización de magnetita por TEM	79
6.1.4 Caracterización de magnetita por magnetometría de muestra vibrante	81
6.2.1 Obtención de microesferas poliméricas magnéticas	82
6.2.2 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por SEM	83
6.2.3 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por láser	84
6.2.4 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por magnetometría de muestra vibrante	85
6.3.1 Pre-tratamiento de la lipasa de <i>Candida rugosa</i>	86
6.3.2 Inmovilización de CRL sobre microesferas poliméricas magnéticas	87
6.3.3 Actividad catalítica de la lipasa libre e inmovilizada	88
7 Conclusiones	92
8 Bibliografía	94
Apéndice I Identificación y clasificación de residuos peligrosos	101
Apéndice II Curva patrón de concentración de proteína Curva patrón de concentración de acetato de butilo	109
Apéndice III Estándar de magnetita por XRD	110
Apéndice IV Tamaño de partícula por difracción láser	111
Apéndice IV Presentación del trabajo en el congreso “Environmental Biocatalysis: From remediation with enzymes to novel green processes”, Córdoba, España, 2006	112



1.1 INTRODUCCIÓN

Las microesferas magnéticas han sido ampliamente utilizadas para la inmovilización de enzimas pues permiten su re-utilización, proveen reducciones significativas en los costos de operación, facilitan la separación del soporte empleando un campo magnético y le confieren estabilidad a la enzima.

Se sintetizó un ferrofluido de magnetita mediante la co-precipitación de sales de hierro (II) y hierro (III) en presencia de hidróxido de amonio. La reacción se llevó a cabo empleando un reactor batch con agitación mecánica¹. Las nanopartículas de magnetita fueron estabilizadas con ácido oleico para prevenir su aglomeración. Se empleó la técnica de difracción de rayos X para comparar los patrones entre la magnetita pura y la magnetita sintetizada. El tamaño de partícula de la magnetita se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y se obtuvo un tamaño promedio de partícula de 8.4 nm. Se obtuvo la curva de magnetización de la magnetita así como su magnetización de saturación (62.3 emu/g) empleando magnetometría de muestra vibrante.

La magnetita recubierta se obtuvo mediante una polimerización en suspensión por radicales libres de acetato de vinilo y divinil benceno empleando AIBN como iniciador. La reacción se llevó a cabo en el mismo reactor batch con agitación mecánica. La morfología de las microesferas se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y por difracción de rayo láser se obtuvo un diámetro promedio de partícula de 15 μm . De igual manera, se obtuvo la curva de magnetización de las microesferas así como su magnetización de saturación (2.48 emu/g) mediante magnetometría de muestra vibrante.



Para la inmovilización se empleó lipasa comercial de *Candida rugosa* la cual fue purificada mediante centrifugación y ultra-filtración para remover otras proteínas y excipientes presentes. El mecanismo de inmovilización fue la adsorción física de la lipasa sobre las microesferas. La proteína inmovilizada se determinó mediante el método de Bradford y balance de materia. La cantidad de proteína inmovilizada en este trabajo fue de hasta 25 mg de proteína/g de microesferas.

La actividad de la lipasa inmovilizada sobre las microesferas fue monitoreada mediante la reacción de transesterificación del acetato de vinilo con 1-butanol en hexano cuantificada por cromatografía de gases (GC). Se definió la unidad de actividad enzimática como la cantidad de lipasa que cataliza la producción de 1 μmol de acetato de butilo por minuto bajo las condiciones experimentales empleadas. El biocatalizador obtenido puede ser utilizado en la síntesis de productos comerciales atractivos empleando como medio de reacción disolventes orgánicos, líquidos iónicos o fluidos supercríticos.



1.2 ABSTRACT

Magnetic microspheres have been widely used for enzyme immobilization because they enable repeated use, provide significant reduction in operation cost, facilitate separation with a magnetic field, and provide enzyme stability.

A ferrofluid containing magnetite was synthesized by co-precipitation of iron (II) and iron (III) salts in presence of ammonium hydroxide. This reaction was performed in a batch reactor with mechanical stirring¹. Magnetite nanoparticles were stabilized with oleic acid to prevent aggregation by steric mechanisms. X-ray diffraction was used to compare patterns between pure magnetite and synthesized magnetite. Magnetite particle size was determined by Transmission Electron Microscopy (TEM) and the average particle size was 8.4 nm. Magnetization curves and saturation magnetization (62.3 emu/g) were analyzed with Vibrating Sample Magnetometer (VSM).

Coated magnetite was obtained by radical suspension polymerization of vinyl acetate and divinyl benzene using AIBN as initiator. The reaction was carried out in the same batch reactor with mechanical stirring. Morphology of microspheres was analyzed with Scanning Electron Microscopy (SEM), microsphere particle size was obtained by Light Scattering, the average particle size was 15 μm . Magnetization curves and saturation magnetization (2.48 emu/g) were analyzed with Vibrating Sample Magnetometer (VSM).



Commercial *Candida rugosa* lipase was purified by centrifugation and ultrafiltration to remove other proteins and excipients. *Candida rugosa* lipase was immobilized by physical adsorption on the microspheres and the amount of protein adsorbed was determined using mass balance by Bradford method in the supernatant. Protein loading in this work was up to 25 mg protein/g microsphere.

The activity of lipase immobilized on the microspheres was monitored by vinyl acetate transesterification with 1-butanol in hexane using Gas Chromatography (GC). One unit of lipase activity was defined as the amount of lipase which catalyzed the production of 1 μmol of butyl acetate per minute under experimental conditions. The obtained biocatalyst may be used for the synthesis of attractive commercial products in organic solvents, ionic liquids or supercritical fluids.



2.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar microesferas magnéticas mediante la co-polimerización de divinil-benceno y acetato de vinilo para la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* sobre las mismas.



2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar nanopartículas de magnetita.
- Polimerizar acetato de vinilo con divinil benceno encapsulando magnetita nanométrica para obtener microesferas magnéticas.
- Obtener un biocatalizador mediante la adsorción de la lipasa de *Candida rugosa* sobre las microesferas poliméricas magnéticas.
- Evaluar el biocatalizador en medio orgánico, empleando la reacción de transesterificación del acetato de vinilo con 1-butanol en hexano como medio de reacción.



3. HIPÓTESIS

Mediante la síntesis de partículas de magnetita, su posterior recubrimiento con un polímero y la adsorción de la lipasa de *Candida rugosa* es posible obtener un biocatalizador mejorado con propiedades magnéticas que pueda ser empleado en medio orgánico.



4. ANTECEDENTES

4.1 FERROFLUIDOS

4.1.1 Definición

Los ferrofluidos son suspensiones coloidales estables que consisten en nanopartículas con dominios magnéticos simples contenidas en un medio líquido. En la Figura 1 se puede observar la fotografía de un ferrofluido sometido a un campo magnético. Este tipo de materiales además de presentar propiedades de fluido también responden a campos magnéticos externos por lo que son de gran importancia tecnológica.¹⁻⁴



Figura 1. Fotografía de un ferrofluido sometido a un campo magnético.

Debido al pequeño tamaño de partícula, generalmente a escala nanométrica, y a su comportamiento superparamagnético, estas nanopartículas magnéticas presentan propiedades diferentes a los magnetos sólidos convencionales. En ausencia de un campo magnético externo, el movimiento browniano orienta las partículas al azar y el ferrofluido no presenta una magnetización neta. Sin embargo al aplicar un campo magnético externo las partículas bipolares se alinean con el campo resultando en una magnetización del fluido. Finalmente una vez retirado el campo magnético las partículas no presentan magnetización residual.⁵



La creación de un ferrofluido es generalmente mas compleja que fundir un sólido fuertemente magnético, dado que los materiales sólidos pierden mucho de su magnetismo por encima de lo que se denomina temperatura de Curie, que es la temperatura a la cual pierden sus propiedades magnéticas.³

4.1.2 Concepción y empleo de los ferrofluidos

La síntesis de ferrofluidos y partículas capaces de responder a la acción de un campo magnético es una técnica que ha recibido gran atención en los últimos años por tratarse de sistemas que incursionan en diversos campos de actividad.¹⁻⁴

Los ferrofluidos fueron desarrollados y clasificados por primera vez en los años 60's por Stephen Papell para la *National Aeronautics and Space Administration* (NASA), como un método para poder controlar los fluidos en el espacio.⁶ La NASA inicialmente los empleó como sellos para ejes rotatorios y en nuestros días se emplean en una gran variedad de aparatos que van desde centrífugas hasta discos duros de computadoras. También se emplean para eliminar vibraciones no deseadas así como para disipar calor en bocinas y tweeters (transductor electroacústico diseñado para la reproducción específica de sonidos correspondientes a las más altas frecuencias).³⁻⁵

Los ferrofluidos también son de utilidad en la construcción de juntas herméticas, las cuales permiten lograr el aislamiento absoluto de elementos mecánicos de rotación en condiciones de vacío, así como en medios químicos y/o biológicos agresivos.¹



Por otro lado éstos se emplean exitosamente en numerosos acoplamientos de piezas móviles de reactores y fermentadores de la industria farmacéutica y biotecnológica, así como en unidades de refrigeración magnética, en juntas de naves espaciales y satélites artificiales de la industria aeroespacial y militar.¹

Las partículas con respuesta magnética también encuentran numerosas aplicaciones en biomedicina,⁷ en la separación de células,⁸ en sistemas de liberación controlada de medicamentos, los cuales son dirigidos mediante un imán hacia órganos específicos de aplicación,⁵ en separación de proteínas,⁹ para restringir el flujo sanguíneo en determinadas partes del organismo,⁴ en terapias de separación retinal,¹⁰ en el tratamiento de tumores,¹¹ como material opaco para el diagnóstico de imágenes empleando rayos X o resonancia magnética nuclear, así como en la identificación y conteo de poblaciones celulares, entre otros.^{1,4}

4.1.3 Estabilización de los ferrofluidos

Una dificultad asociada con la preparación de fluidos magnéticos es que las partículas presentan una gran área superficial en comparación con sus volúmenes y por tanto tienden a agregarse para reducir su energía de superficie. Las superficies de óxidos metálicos magnéticos presentan energías de superficie extremadamente altas (>100 dinas/cm).⁵ Además, las atracciones magnéticas dipolo-dipolo entre las partículas aumenta la dificultad en la preparación de los ferrofluidos en comparación con nanopartículas no magnéticas. Por tanto, prevenir la aglomeración de las partículas es un factor crítico en la producción de ferrofluidos estables.⁵

Para estabilizar el ferrofluido se aplica un tratamiento en la superficie de las partículas para adaptarlas al líquido portador, ya sea medio acuoso o líquidos no polares como aceites o solventes orgánicos.¹²



Una manera de estabilizar las partículas magnéticas en disolución es recubriendo la superficie de la partícula con surfactantes, los cuales crean una repulsión estérica cuando las partículas se aproximan una a otra como se ilustra en la Figura 2.^{1-5,13}

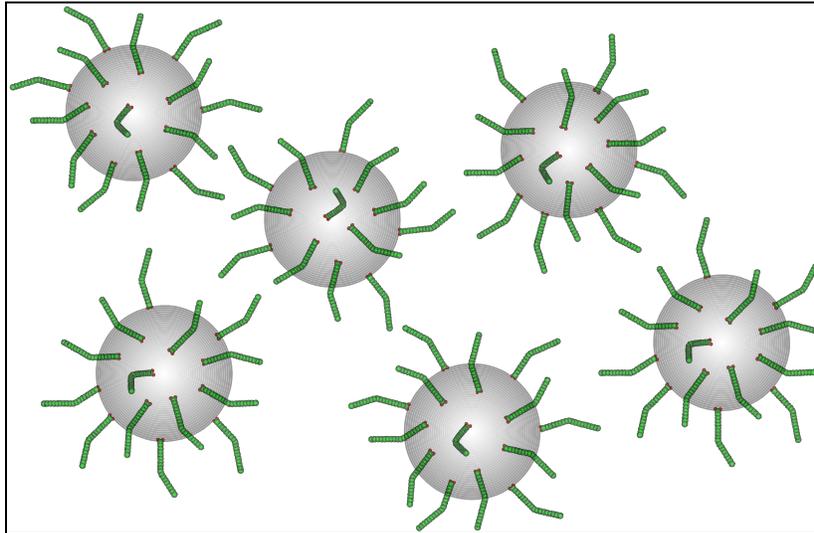


Figura 2. Estabilización de partículas magnéticas empleando un surfactante sobre la superficie.

El ácido oleico, un ácido graso insaturado de 18 carbonos, es un ejemplo de surfactante el cual se une covalentemente a la superficie de óxidos de hierro (Figura 3) extendiendo la cadena alifática hacia el medio; de esta forma se permite una adecuada dispersión de la magnetita en disolventes no polares.¹³

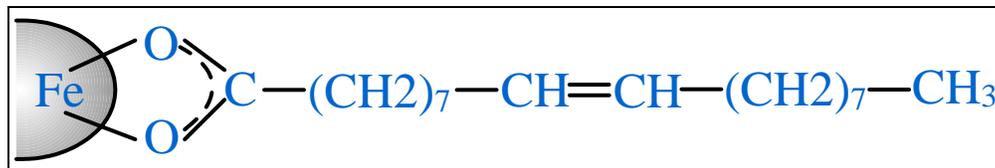


Figura 3. Estabilización de la magnetita mediante la reacción con ácido oleico.¹³



4.1.4 Partículas Magnéticas

Entre los materiales capaces de formar ferrofluidos con características superparamagnéticas se encuentran los metales y óxidos metálicos con tamaños de partícula que van desde 1 hasta 100 nm, como por ejemplo Fe, Ni, Co, Fe₃O₄, y γ -Fe₂O₃.¹⁴ Los metales puros son los que presentan las susceptibilidades magnéticas más altas como se aprecia en la Tabla 1.

Tabla 1. Magnetización de saturación y temperatura de Curie para algunos metales de transición y óxidos metálicos.¹⁴

Nombre	Fórmula	Magnetización de Saturación M _s (emu/cm ³) a 298 K	Temperatura de Curie (K)
Hierro	Fe (cúbico)	1700-1714	1043
Cobalto	Co (cúbico)	1400-1422	1404
Magnetita	FeO·Fe ₂ O ₃	480-500	858
Níquel	Ni	485	631
Ferrita de manganeso	MnO·Fe ₂ O ₃	410	573
Ferrita de cobalto	CoO·Fe ₂ O ₃	400	793
Maghemita	γ -Fe ₂ O ₃	394	820-986
Ferrita de níquel	NiO·Fe ₂ O ₃	270	858
Ferrita de cobre	CuO·Fe ₂ O ₃	135	728

Sin embargo los metales de transición son altamente tóxicos y muy sensibles a la oxidación. Debido a esto, los productos de oxidación de estos metales son antiferromagnéticos y no responden a la acción de un campo magnético externo.¹⁴



4.1.5 Magnetita

El componente principal de los ferrofluidos y del cual dependen sus propiedades magnéticas es un compuesto ferrimagnético. Los más comúnmente empleados en el diseño de estos fluidos y partículas son la magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$), las cuales son similares tanto en sus propiedades físicas como en sus estructuras cristalinas y ambas presentan un comportamiento ferrimagnético. Sin embargo la maghemita presenta una magnetización de saturación más baja (Tabla 1). En presencia de aire, la magnetita reacciona con el oxígeno (Figura 4), produciendo con el tiempo maghemita por lo que se deben tomar las medidas pertinentes si es que se quiere trabajar solamente con magnetita.¹⁴



Figura 4. Representación de la reacción estequiométrica de la magnetita con el oxígeno formando maghemita.

Las nanopartículas de magnetita son deseables por su fuerte comportamiento ferrimagnético y su menor sensibilidad a la oxidación en comparación con metales de transición. La magnetita empleada en la preparación de líquidos y partículas con respuesta magnética debe poseer un alto grado de dispersión para que se comporte como un material superparamagnético, de manera que los sistemas preparados con ella no presenten “memoria magnética”, es decir, que no contengan una magnetización residual.¹



4.1.6 Química de superficie de la magnetita

Las propiedades químicas en la superficie de la magnetita son de gran importancia. Los átomos de Fe en la superficie que no se unieron a átomos de oxígeno actúan como ácidos de Lewis y por lo tanto se coordinan con moléculas que donan pares electrónicos ó bases de Lewis.

En sistemas acuosos los átomos de Fe se coordinan con el agua la cual se disocia para formar una superficie con átomos de hierro funcionalizada con grupos hidroxilo. Los grupos hidroxilo en la superficie son anfotéricos y pueden reaccionar tanto con ácidos como con bases.

En dispersiones acuosas la superficie de la magnetita puede estar cargada tanto positivamente como negativamente, dependiendo del pH de la solución. El punto isoeléctrico se da a un cierto pH donde la superficie presenta cantidades iguales de cargas positivas y negativas. El punto isoeléctrico de la magnetita se observa a un pH de 6.8.¹⁴

La estabilización de las nanopartículas de magnetita se puede llevar a cabo mediante la formación de una bicapa, mediante la estabilización estérica ó mediante la modificación del punto isoeléctrico con citrato o con una cubierta de sílica.¹⁴ La estabilización de las nanopartículas es crucial para obtener ferrofluidos coloidales estables contra la agregación producida al aplicar un campo magnético.¹⁴



4.1.7 Síntesis de magnetita

Existen dos métodos generales para la síntesis de magnetita; ya sea por reducción de tamaño ó por precipitación acuosa. El método de reducción por tamaño desarrollado por Papell en los años 60's, emplea la molienda de magnetita micrométrica para formar partículas con diámetros alrededor de 10 nm.⁶ El proceso involucra la molienda en presencia de solventes y surfactantes como se observa en la Figura 5:

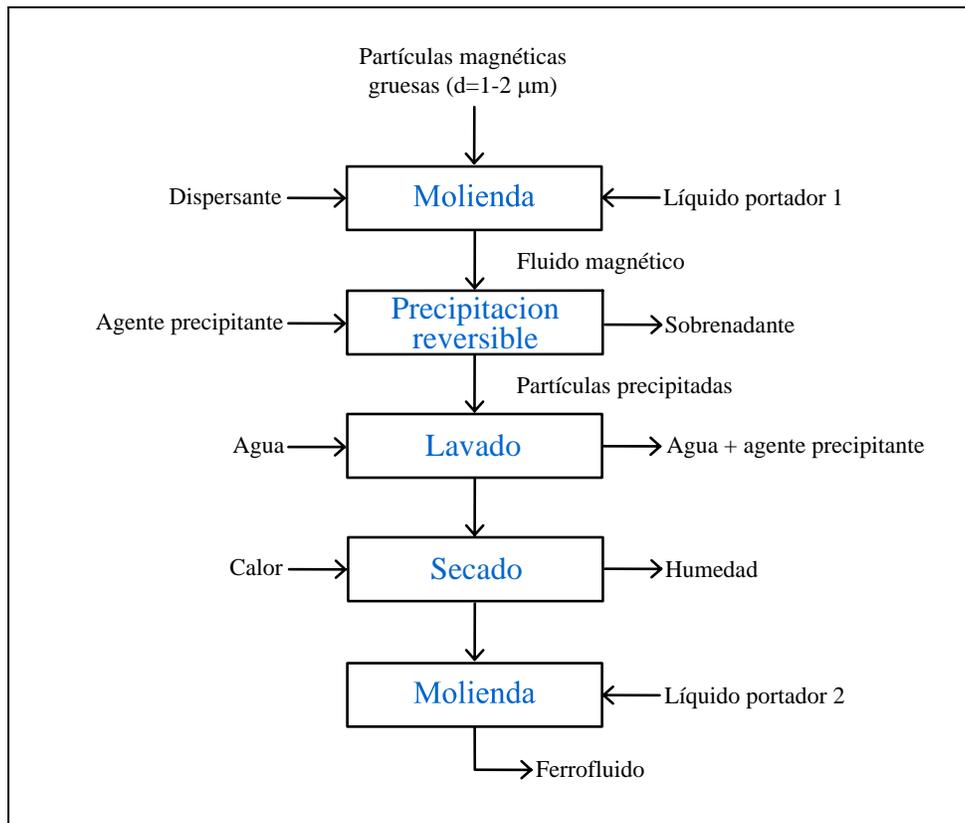


Figura 5. Reducción de partículas de magnetita por molienda.¹⁴

La desventaja de este proceso son los largos periodos de tiempo requeridos (500 a 1000 horas) para formar las nanopartículas por lo que es preferible utilizar los métodos de precipitación acuosa.



Los métodos de precipitación acuosa para la formación de nanopartículas de magnetita comprenden la oxidación de Fe^{2+} ,¹⁵ formación en microemulsiones agua en aceite,¹⁶ vesículas,¹⁷ apoferritina,¹⁸ liposomas,¹⁹ y en presencia de polímeros.²⁰

Sin embargo el método más común es mediante la coprecipitación de sales hidratadas de hierro divalentes y trivalentes (Fe^{2+} y Fe^{3+}) en presencia de una base fuerte. Este método data de principios del siglo XX, sin embargo en la actualidad no se tiene una percepción clara del mecanismo de reacción.¹⁴

La pureza de los reactivos es un parámetro importante en la formación de la magnetita. Por lo regular, las sales divalentes reportadas en la literatura empleadas para la co-precipitación son $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ó $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Estas sales de Fe^{2+} son inestables, ya que en presencia de aire se oxidan fácilmente formando compuestos de Fe no deseados. Así mismo, las sales de Fe^{3+} , como $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ó FeCl_3 , son higroscópicas por lo que pueden hidratarse alterando de este modo la estequiometría de la reacción. Por esta razón, los reactivos deben ser almacenados bajo atmósfera de nitrógeno y todas las soluciones deben ser cuidadosamente desoxigenadas antes de ser usadas, así como emplearlas inmediatamente previniendo su oxidación o reacciones secundarias.¹⁴

Otro parámetro importante es la estequiometría. Debido a que la fórmula de la magnetita es $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, la reacción requiere 1 mol de Fe^{2+} y dos moles de Fe^{3+} para obtener una conversión estequiométrica.



Se ha reportado que la adición de la base en la reacción debe ser rápida, pues una adición lenta crea regiones heterogéneas con especies de hierro hidratadas que conducen a la formación de compuestos de hierro no magnéticos.¹⁴

La naturaleza del catión del hidróxido empleado para formar magnetita ha sido investigado en base a sus propiedades magnéticas y estructura cristalina. La magnetización de saturación se incrementa desde hidróxidos alcalinos a hidróxido de amonio.



Figura 6. Incremento en la magnetización de saturación para diferentes bases.

Análisis de rayos X, muestran la presencia de compuestos de hierro no magnéticos cuando se emplean bases alcalinas fuertes como KOH y NaOH. Diversos autores han sugerido que el empleo de bases fuertes llevan la mezcla a $pH \approx 14$ lo cual crea complejos hidratados de hierro incapaces de formar magnetita; en cambio, las preparaciones de magnetita empleando hidróxido de amonio en un intervalo de pH de 8.5 a 10 es más deseable debido a que no produce óxidos de hierro no magnéticos.¹⁴

4.1.8 Perspectivas

El diseño y síntesis de ferrofluidos ó nanopartículas con propiedades magnéticas forma parte de la llamada “nanotecnología” la cual lleva ya dos décadas de desarrollo y actualmente se empiezan a vislumbrar sus primeras aplicaciones en campos como la medicina, electrónica, petroquímica, tecnología deportiva entre otros.



La inversión en el campo de la nanotecnología va en aumento. El gobierno de Estados Unidos destinó más de mil millones de dólares a la investigación en nanotecnología en 2005. Se han gastado cantidades similares en Japón y la Unión Europea y según predicciones de la Fundación Nacional de Ciencias de EUA, el mercado global de la nanotecnología tendrá un valor de un billón de dólares para 2015.²¹



4.2 MICROESFERAS POLIMÉRICAS MAGNÉTICAS

4.2.1 Inmovilización de biocatalizadores

La inmovilización de biocatalizadores en la superficie de matrices poliméricas es un campo de investigación de gran interés.²²⁻²⁵ Los biocatalizadores son inmovilizados exitosamente en soportes adecuados, presentando gran actividad catalítica. Las ventajas de la inmovilización de biocatalizadores se presentan en los siguientes apartados:

- Extiende la estabilidad del biocatalizador.
- El biocatalizador es recuperado más fácilmente.
- Permite la re-utilización del biocatalizador.
- Provee reducciones significativas en los costos de operación.

Aunque en la mayoría de las aplicaciones industriales las enzimas se utilizan en forma libre, la inmovilización de éstas en procesos industriales, en la industria alimentaria, farmacéutica, de químicos finos y en aplicaciones ambientales va en aumento.^{24, 26-29}

4.2.2 Microesferas poliméricas magnéticas

En los últimos años se han realizado esfuerzos notables dirigidos hacia el uso de microesferas poliméricas magnéticas en áreas como la biotecnología, la biomedicina, la biocatálisis, la ingeniería de proteínas entre otros, y se han empleado en campos tales como la separación de células, de ácidos nucleicos, en la inmovilización de enzimas, en la separación de proteínas, y en sistemas para el transporte de medicamentos o ensayos bioquímicos.^{11, 30-31}



Como se puede observar en la Figura 7, las partículas magnéticas están formadas de un núcleo magnético constituido por el metal u óxido metálico y una cubierta polimérica que protege al ligando de un posible contacto con el núcleo. Las microesferas poliméricas magnéticas se pueden diseñar en diferentes diámetros, distribuciones de tamaño, porosidad, con diferentes propiedades químicas en sus superficies y contenidos de magnetita, según su proceso de síntesis.³²

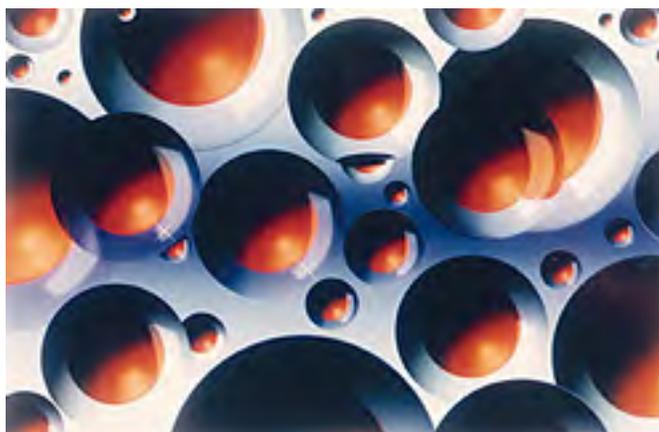


Figura 7. Representación visual de las microesferas poliméricas magnéticas.³²

El uso de partículas magnéticas en bioprocesos es deseable en casos donde el biocatalizador necesite ser recuperado de medios que contengan suspensiones coloidales, o presenten altas viscosidades, debido a que esta rápida separación se puede llevar a cabo mediante el empleo de un campo magnético externo.³³ Las microesferas magnéticas estabilizadas en reactores de lecho fluidizado exhiben movimientos rotacionales y vibratoriales en presencia de un campo magnético alterno (Yakup Arica *et al.* 2000).²⁵ Este fenómeno magnético puede ser empleado para prevenir la formación de películas de producto alrededor del soporte con enzima inmovilizada gracias a la acción de corriente eléctrica a través de un electroimán.



En dicho sistema, el medio de reacción vibrante alrededor del soporte puede facilitar la transferencia de sustrato a través de la superficie enzima-microesfera.^{25,}

34

4.2.3 Síntesis de microesferas poliméricas magnéticas

Las microesferas poliméricas se han sintetizado con distintos materiales dependiendo de las condiciones en que se requiera trabajar. Estos pueden estar basados en poliestireno, sílica, alcohol polivinílico, metilmetacrilato o acetato de vinilo, entre otros.³⁰ Se han reportado diferentes métodos en la preparación de microesferas magnéticas, sin embargo, la forma más común consiste en el recubrimiento de la magnetita con una matriz polimérica.³⁰ Algunas de las metodologías empleadas vienen descritas en los siguientes apartados:

- Evaporación del disolvente.^{25, 34-36}
- Deposición del material dentro de una matriz.³⁰
- Polimerización en emulsión.³⁷
- Polimerización por dispersión.³⁸
- Polimerización en suspensión.^{8, 39, 40}
- Polimerización en microemulsión.³⁰

Por otro lado, debido a que la interacción hidrofóbica es el mecanismo más comúnmente involucrado en la adsorción de proteínas, los polímeros con superficies hidrofóbicas suelen presentar altos grados de adsorción de proteína.³²



4.2.4 Polímeros

La polimerización es un proceso mediante el cual moléculas precursoras y de bajo peso molecular llamadas monómeros se combinan químicamente dando lugar a una molécula de gran peso molecular llamada polímero, bien en forma de cadena lineal, de cadena ramificada o formando redes tridimensionales como se observa en la Figura 8.

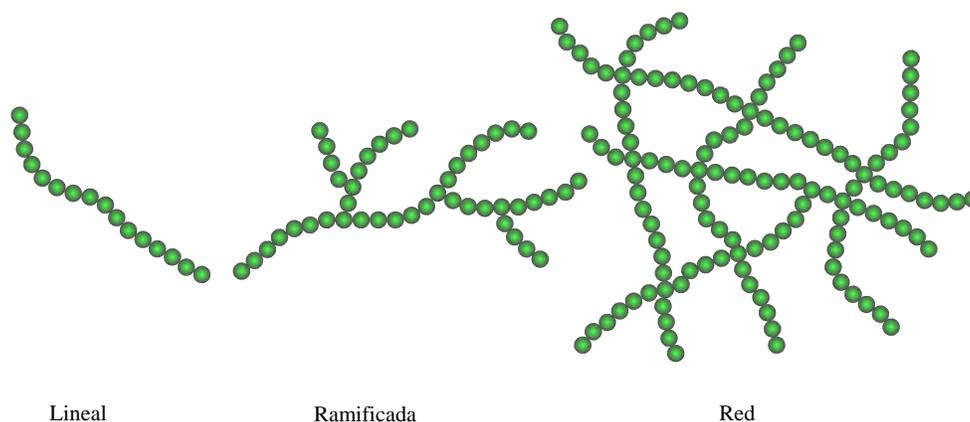


Figura 8. Estructuras representativas de polímeros lineales y no lineales.⁴¹

Se define un homopolímero como aquel polímero cuya estructura puede ser representada por un solo tipo de unidad estructural –monómero– repetida n veces, como por ejemplo polietileno, poliestireno o polipropileno. Mientras que un copolímero está constituido por dos o más unidades estructurales diferentes de repetición como por ejemplo poli(etilen-co-propileno). Existen diferentes categorías de copolímeros, cada una caracterizada por un arreglo particular de las unidades estructurales que contiene. Para ilustrar estas categorías se emplearán solo dos diferentes unidades estructurales (A y B).⁴¹



Los copolímeros aleatorios ó al azar son aquellos que presentan una secuencia desordenada en sus unidades de repetición. Los copolímeros alternados tienen solamente dos diferentes unidades de repetición la cuales aparecen de manera alternada a lo largo de la cadena polimérica. Los copolímeros en bloque son copolímeros lineales en los cuales las unidades del mismo tipo forman bloques que se encuentran unidos con otros bloques de unidades estructurales diferentes. Los copolímeros de injerto son polímeros ramificados en los cuales las cadenas ramificadas presentan una estructura química diferente a la cadena polimérica principal. En la Figura 9 se presenta una ilustración con los diferentes tipos de copolímeros.

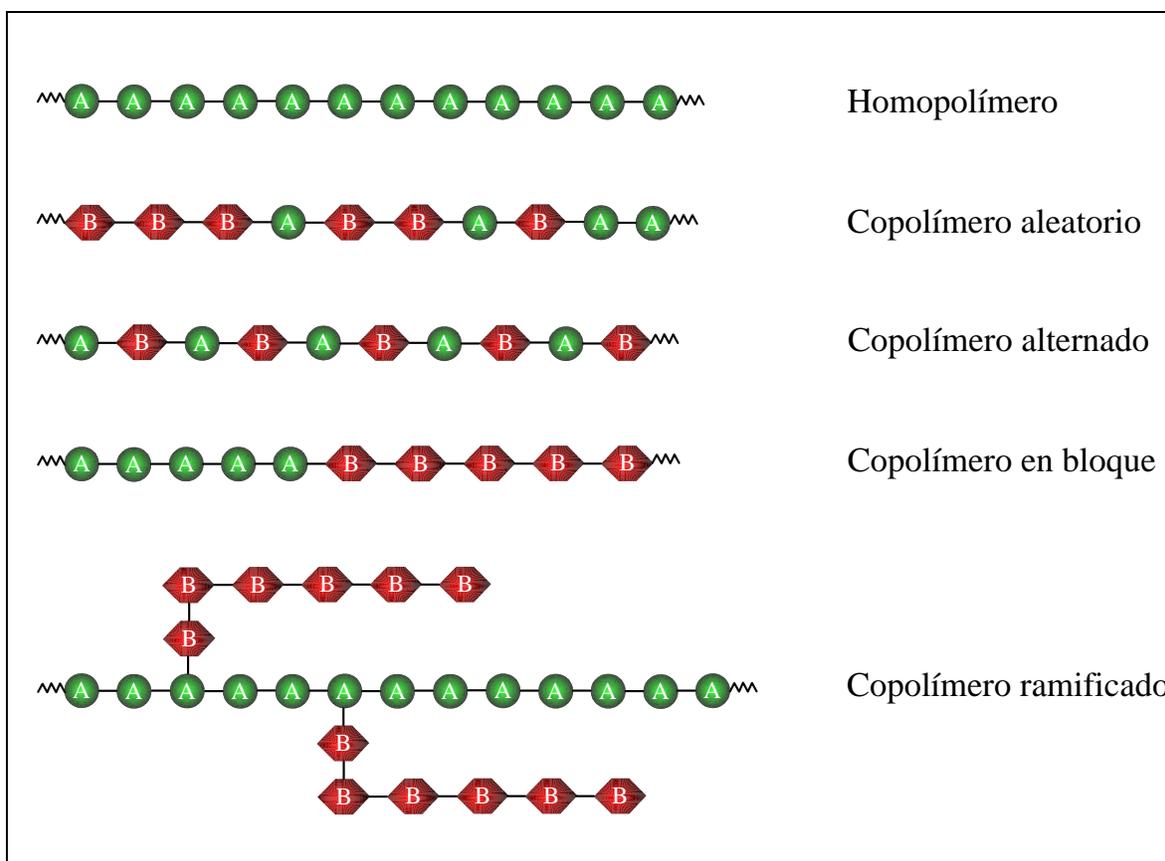


Figura 9. Homopolímero y diferentes tipos de copolímeros.⁴¹



4.2.5 Clasificación de polímeros

Una posible clasificación de los diferentes tipos de polímeros se presenta en el diagrama de la Figura 10, donde primeramente están separados en tres categorías: *termoplásticos*, *elastómeros* y *termoestables*. Los *termoplásticos* a su vez se dividen en *crystalinos* y *amorfos*. Esta clasificación se basa esencialmente en su estructura molecular.

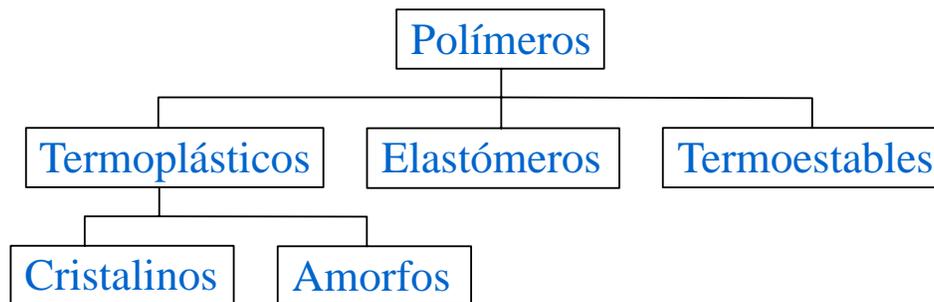


Figura 10. Clasificación de los polímeros.⁴¹

Los *termoplásticos* comúnmente conocidos como plásticos son polímeros lineales o ramificados los cuales se funden aplicando calor, pueden ser moldeados y remodelados prácticamente en cualquier forma aplicando técnicas como el moldeo por inyección o por extrusión y constituyen la proporción más grande de polímeros usados en la industria. Generalmente los termoplásticos no cristalizan fácilmente debido a los altos requerimientos energéticos que esto requiere y aquellos que lo logran invariablemente no cristalizan de manera perfecta, por lo que se les denomina materiales semi-cristalinos, los cuales presentan regiones cristalinas y regiones amorfas. Las fases cristalinas de dichos polímeros se caracterizan mediante su temperatura de transición cristalina (T_m) o punto de fusión.



Muchos termoplásticos sin embargo, son completamente amorfos y se caracterizan por tener una temperatura de transición vítrea (T_g) en la cual pasan de un estado “rígido” a un estado “flexible”. Esta transformación puede entenderse con el movimiento de las cadenas, pues por debajo de la T_g las cadenas son incapaces de moverse debido a la gran resistencia física que encuentran unas con otras en la matriz polimérica. Al aumentar la temperatura estas pueden deslizarse unas con otras creando así un material deformable. Esta temperatura T_g puede detectarse mediante la técnica analítica de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los *elastómeros* son polímeros ligeramente entrecruzados que presentan una elevada elongación al aplicar una fuerza y que rápidamente recuperan su forma original al dejar de aplicarla. Esta propiedad es reflejo de su estructura molecular en donde las redes formadas presentan un bajo porcentaje de entrecruzamiento.

Los polímeros *termoestables* son materiales rígidos en donde el movimiento de las redes poliméricas está altamente restringido por un alto grado de entrecruzamiento. Estos polímeros alcanzan un proceso químico de degradación a partir de cierta temperatura.⁴¹, la cual se puede analizar mediante la técnica de análisis termogravimétrico (TGA).

4.2.6 Clasificación de las reacciones de polimerización

Una posible manera de clasificar las reacciones de polimerización se basa en la comparación entre la fórmula molecular del polímero y la del monómero del cual está formado. Las reacciones de polimerización se pueden clasificar en dos tipos, siendo estas, polimerizaciones por *condensación* ó *a pasos* y polimerizaciones por *adición* ó *en cadena*.



Una polimerización es por *adición* si la molécula de monómero pasa a formar parte del polímero sin pérdida de ninguno de los átomos que conforman el monómero. La polimerización es por *condensación* si la molécula de monómero pierde átomos cuando pasa a formar parte del polímero; por lo general se pierde una molécula pequeña como H_2O o HCl . La polimerización por *condensación* genera subproductos, siendo opuesta en este sentido a la polimerización por *adición*.

Otro tipo de clasificación considera los mecanismos de polimerización siguiendo dos criterios: *crecimiento de cadena* ó *crecimiento por etapas*. En la polimerización por *crecimiento de cadena* los monómeros pasan a formar parte de la cadena polimérica uno detrás de otro. Primero se forman dímeros, después trímeros, a continuación tetrameros, y así sucesivamente hasta la formación de polímeros. La cadena se incrementa monómero a monómero y generalmente requiere la reacción inicial entre un monómero y un iniciador para comenzar con el crecimiento de la cadena. En la polimerización por *crecimiento en etapas*, la cual es común en polimerizaciones de radical libre, es posible que un oligómero reaccione con otros, por ejemplo un dímero con un trímero, o un tetramero con un dímero. En la polimerización por crecimiento en etapas, las cadenas en crecimiento pueden reaccionar entre si para formar cadenas aún más largas. En la Figura 11 se presentan las diferencias entre estos tipos de polimerización.⁴¹



Formación de	Polimerización por etapas	Polimerización en cadena
Dímero		
Trímero		
Tetrámero		
Pentámero		
Hexámero		
Heptámero		
Octómero		

molécula de monómero
 - enlace químico
 iniciador

Figura 11. Ilustración esquemática de las diferencias entre la polimerización por etapas y la polimerización por crecimiento de cadena.⁴¹



4.2.7 Polimerización por radicales libres

Los radicales libres son especies que poseen un electrón desapareado por lo que son altamente reactivas y presentan tiempos de vida cortos. Las polimerizaciones por radicales libres son polimerizaciones en cadena en las cuales cada molécula de polímero crece por medio de la adición de un monómero a un radical libre conocido como “centro activo”. Consecuentemente con cada adición de monómero, el centro activo se transfiere al último eslabón de la cadena el cual posee ahora el radical libre y pasa a ser el nuevo centro activo.

La polimerización por radicales libres es el método más ampliamente usado para polimerizar en cadena y se usa casi exclusivamente para la preparación de polímeros cuyos monómeros tienen la siguiente estructura general: $\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$. Las reacciones de polimerización en cadena se dividen en tres etapas: *iniciación*, *propagación* y *terminación*.

Iniciación

Esta etapa involucra la creación de los radicales libres y usualmente procede en dos pasos. El primero es la formación de radicales libres a partir de un iniciador y el segundo paso es la adición de uno de estos radicales libres a una molécula de monómero.

Existen dos maneras principales en las cuales los radicales libres pueden ser formados: (1) rompimiento homolítico (homólisis) de un enlace simple, y (2) transferencia de electrones para formar un ión o molécula (reacciones redox).



La homólisis se puede efectuar mediante la aplicación de calor (Δ), denominada termólisis, y existen varios compuestos, en particular aquellos conteniendo enlaces peróxido ($-O-O-$) ó azo ($-N=N-$), los cuales entran en termólisis dentro de un rango conveniente de temperatura: 50-100 °C. En la Figura 12 se presenta la formación de radicales libres por homólisis de diferentes especies.

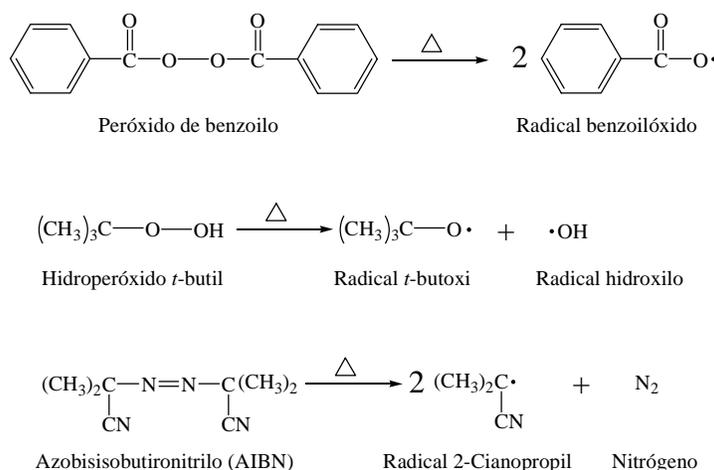


Figura 12. Formación de radicales libres por homólisis en diferentes especies. En cada uno de estos ejemplos el punto indica el sitio del electrón desapareado.⁴¹

Adicionalmente, la homólisis se puede llevar a cabo mediante fotólisis (acción de irradiar luz ultravioleta). Ejemplos son la disociación de azobisisobutironitrilo (AIBN) y la formación de tres radicales libres a partir de benzofenona y benzoin. Una ventaja de la fotólisis es que la formación de radicales libres empieza en el instante de exposición y cesa en cuanto la fuente de luz es removida, además se evita el gasto de energía necesario en los procesos de termólisis.



Las reacciones Redox se utilizan frecuentemente cuando es necesario llevar a cabo polymerizaciones a temperaturas moderadas. La Figura 13 presenta dos ejemplos.

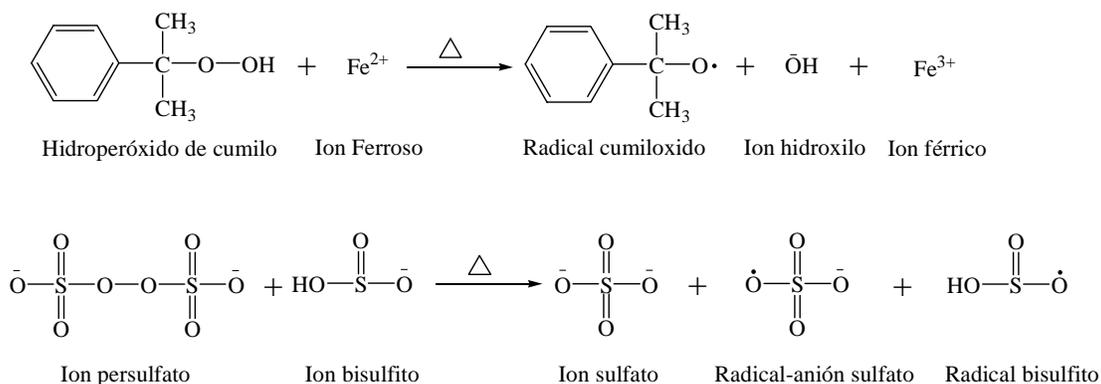


Figura 13. Formación de radicales libres mediante reacciones redox.⁴¹

En una reacción de polimerización por radical libre se crea un centro activo cuando un radical libre ($\text{R}\cdot$) ataca un enlace π de una molécula de monómero. En la Figura 14 se observan los dos modos posibles de adición.

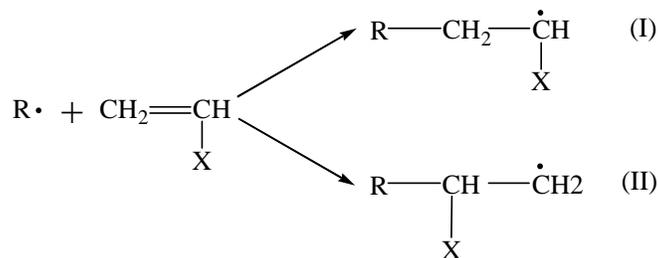


Figura 14. Diferentes modos de adición en la polimerización por radicales libres, el modo (I) es más viable estéricamente.⁴¹

El modo (I) predomina debido a que el ataque al carbono del grupo metileno presenta menos obstáculos estéricos y proporciona un radical libre más estable debido a los efectos del grupo adyacente X.



No todos los radicales libres formados a partir del iniciador son destinados a reaccionar con el monómero. Algunos se pierden en reacciones secundarias, como las que se presentan en la Figura 15 para el peróxido de benzoilo.

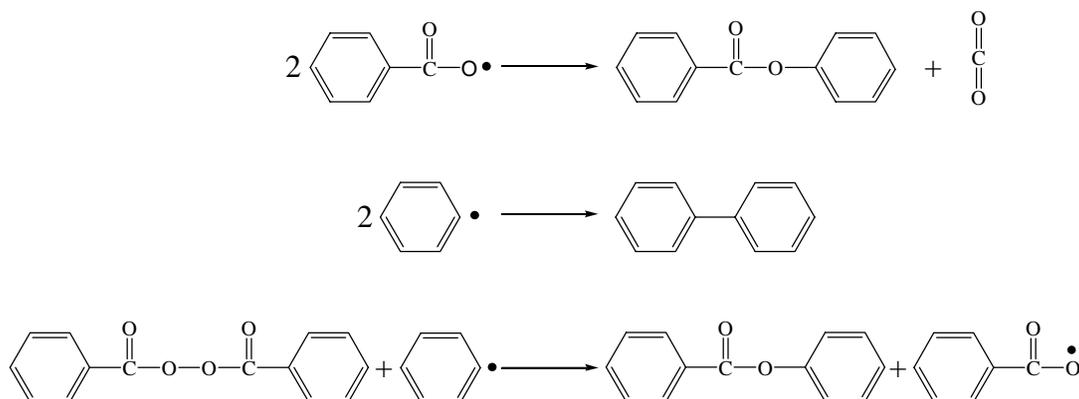


Figura 15. Pérdida de radicales libres en reacciones laterales para el peróxido de benzoilo.⁴¹

El último tipo de reacción se conoce como descomposición inducida y representa una contribución significativa en la pérdida de iniciadores peróxido.

Propagación

Involucra el crecimiento de la cadena polimérica mediante la adición secuencial de monómero al centro activo. Así como en el segundo paso de iniciación, existen dos posibles modos de propagación que se ilustran en la Figura 16.

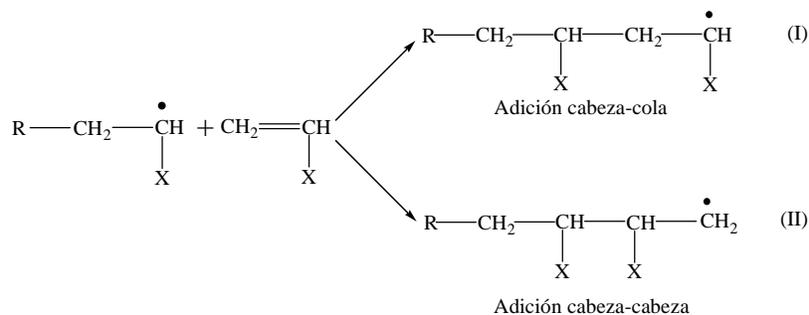


Figura 16. Crecimiento de la cadena polimérica por adiciones cabeza-cola (I) y cabeza-cabeza (II).⁴¹



El modo (I) nuevamente predomina por las mismas razones descritas en la sección anterior. Por tanto las cadenas de polímero son principalmente de la estructura que se presenta en la Figura 17.

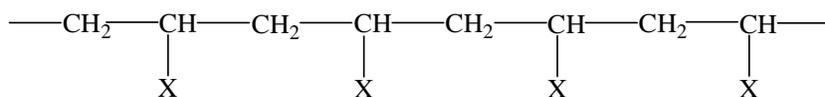


Figura 17. Forma principal de las cadenas poliméricas sintetizadas por radicales libres.⁴¹

El tiempo requerido para cada adición de monómero es típicamente del orden de milisegundos. Por tanto miles de adiciones se llevan a cabo en pocos segundos.

Terminación

En esta etapa, el crecimiento de la cadena polimérica termina. Los dos mecanismos mas comunes de terminación involucran reacciones bimoleculares de dos cadenas que están creciendo. La combinación involucra la unión de dos cadenas en crecimiento como se observa en la Figura 18.

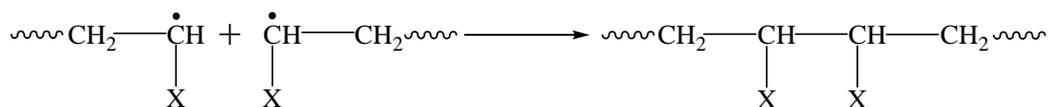


Figura 18. Terminación de la polimerización mediante la reacción de dos cadenas en crecimiento.⁴¹



Alternativamente, un átomo de hidrógeno puede ser abstraído por otra cadena en crecimiento, esta reacción conocida como desproporciónación se ilustra en la Figura 19.

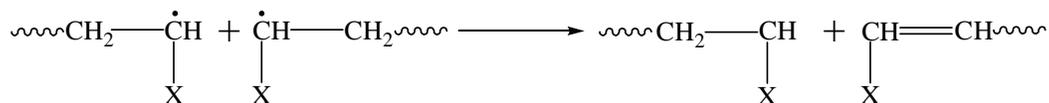


Figura 19. Reacción de desproporciónación que conduce a la terminación de la polimerización.⁴¹

De esta forma, dos moléculas de polímero son creadas, una con un grupo terminal saturado y la otra con un grupo terminal insaturado. Las cadenas tienen fragmentos de iniciador en uno de sus extremos, mientras que la combinación de estas produce moléculas de polímero con fragmentos de iniciador en ambos extremos.

En general, ambos tipos de terminación se llevan a cabo en diferentes proporciones dependiendo del monómero y de las condiciones de polimerización. Por ejemplo se ha encontrado que las cadenas radicales de poliestireno terminan principalmente por combinación mientras que las cadenas radicales de poli (metil metacrilato) terminan predominantemente por desproporciónación, especialmente a temperaturas por arriba de 60 °C.⁴¹

4.2.8 Inhibición y retardación

Ciertas sustancias al reaccionar con radicales libres producen especies (radicalarias o no radicalarias) que son incapaces de seguir propagando la reacción, en otras palabras reiniciar la polimerización. Si este tipo de reacción secundaria es muy eficiente, la polimerización se detiene y la sustancia es llamada *inhibidor* de la reacción.



En el caso de otras sustancias que provocan este tipo de reacciones secundarias pero su eficacia es menor, o producen especies que vuelven lenta la polimerización sin detenerla totalmente se dice que son *retardadores* de la reacción. Estos efectos se ilustran en la Figura 20.

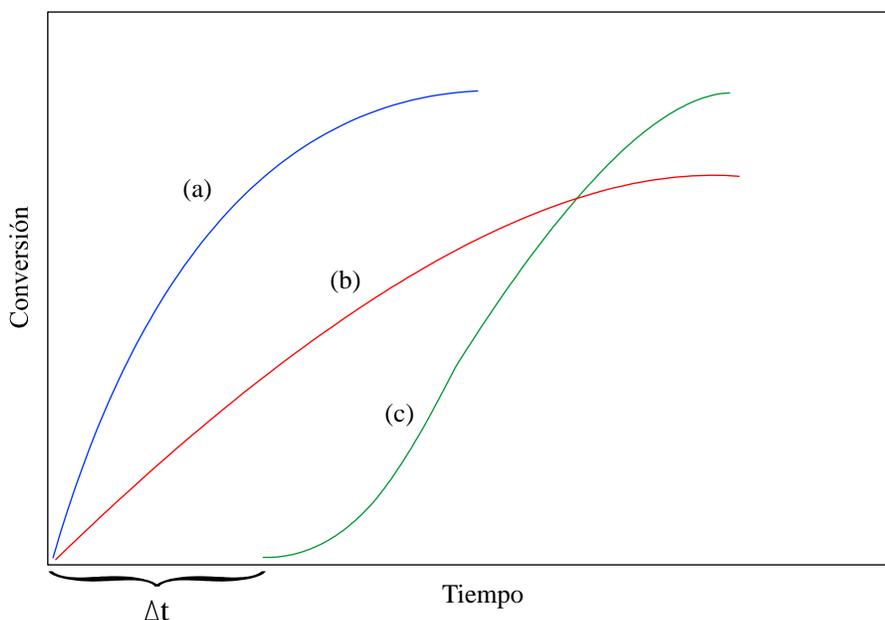


Figura 20. Diferentes efectos de los aditivos sobre la polimerización por radicales libres (a) reacción sin aditivos, (b) reacción en presencia de un retardador, (c) reacción en presencia de un inhibidor (Δt es el periodo de inducción).⁴¹

El nitrobeneno es un retardador en la polimerización del estireno y actúa mediante reacciones de transferencia de cadena. Los radicales producidos son de baja reactividad y se adicionan lentamente a las moléculas de estireno. En este caso tanto la velocidad como el grado de polimerización se ven reducidos.



Las quinonas inhiben la polimerización de varios monómeros actuando sobre los sitios activos formados. El oxígeno puede actuar como un retardador o un inhibidor por lo que debe ser excluido de toda polimerización para obtener resultados reproducibles. Debido a esto, es preferible llevar a cabo las reacciones de polimerización por radicales libres en atmósferas inertes.

Es común adicionar inhibidores en bajas concentraciones a los monómeros e iniciadores radicalarios con el fin de prevenir una polimerización prematura durante su transporte y almacenamiento; debido a esto, estas especies deben ser purificadas antes de ser usadas.⁴¹

4.2.9 Polimerización en “bulk” o en masa

La polimerización en bulk o masa es la más sencilla e involucra solamente al monómero y a un iniciador soluble en éste. La alta concentración de monómero permite obtener altas velocidades y altos grados de polimerización, sin embargo, la viscosidad del medio de reacción aumenta rápidamente con la conversión de monómero dificultando la remoción del calor y conduciendo a una autoaceleración de la reacción. Estos problemas pueden evitarse restringiendo la reacción a bajas conversiones, lo que a nivel industrial requiere una recuperación y recirculación del monómero sin reaccionar. Otra complicación se presenta cuando el polímero es insoluble en su monómero dado que precipita a medida que se forma y las cinéticas usuales ya no son aplicables. La principal ventaja de la polimerización en bulk es que produce polímeros de alta masa molecular con alta pureza y alta claridad óptica.⁴¹



4.2.10 Polimerización en solución

Muchas de las dificultades asociadas con la polimerización en bulk se pueden superar si el monómero es polimerizado en disolución. El solvente disminuye la viscosidad del medio de reacción, por tanto mejora la transferencia de calor y disminuye la probabilidad de autoaceleración. Sin embargo la presencia de disolvente tiene otras complicaciones. La concentración reducida de monómero trae como consecuencia una reducción de la velocidad de la reacción y limita el grado de polimerización. Además, la recuperación del polímero requiere de una evaporación del solvente o de una precipitación en un anti-solvente.

Por otro lado, el uso de disolventes orgánicos volátiles lleva consigo el empleo de medidas de protección tanto medioambientales como de salud humana, así como riesgo de incendio, por estas razones el uso comercial de la polimerización en solución está restringido.⁴¹

4.2.11 Polimerización en emulsión

Otro proceso heterogéneo de gran importancia industrial es la polimerización en emulsión. La diferencia con la polimerización en suspensión reside en que el iniciador no debe ser soluble en el monómero sino en la fase acuosa. Sin embargo, esta pequeña diferencia trae como consecuencia grandes cambios en el mecanismo y cinética de la polimerización, así como en la forma del producto que es una dispersión coloidal estable de partículas poliméricas en agua conocida como *látex*. Generalmente estas partículas poliméricas presentan diámetros entre 0.05-1 μm considerablemente más pequeñas que en la polimerización en suspensión y tiene gran aplicación en la industria de pinturas.⁴¹



4.2.12 Polimerización en suspensión

El término polimerización en suspensión se refiere a un sistema en el cual los monómeros se encuentran suspendidos como una fase discontinua de gotas dentro de una fase continua. El producto de reacción es una solución con partículas de polímero suspendidas. Los monómeros apropiados para la polimerización en suspensión generalmente pueden ser polimerizados mediante un mecanismo de radicales libres. La fase continua generalmente es agua, mientras que la mayoría de los monómeros son relativamente insolubles en ella. Los términos perlas de polimerización y cuentas de polimerización describen las partículas esféricas obtenidas a partir de las polimerizaciones en suspensión.

Las partículas de suspensión tienen diámetros entre 50-200 μm , dependiendo del tipo de monómero, los surfactantes empleados y la agitación del reactor. Estas partículas son mucho más grandes que aquellas obtenidas en polimerizaciones por emulsión (20-1000 nm) usualmente se mueven como polvos fluidos cuando están secas y son relativamente fáciles de recuperar de las soluciones mediante centrifugación.

Se pueden emplear procesos de micro-suspensión para obtener partículas en el rango de 20-30 μm , sin embargo constituyen una pequeña parte del mercado comercial. Estos materiales requieren una mayor cantidad de surfactantes así como una mayor agitación que las polimerizaciones en suspensión convencionales.

Un número importante de productos son fabricados mediante la polimerización en suspensión, incluyendo resinas de intercambio iónico, aplicaciones para extrusión y moldeo por inyección.

Varias características del método de polimerización en suspensión son comunes a la mayoría de los sistemas. La proporción en peso de la fase continua (agua) a la fase discontinua (monómeros) varía de 1:1 a 4:1 para la mayoría de los procesos comerciales. La viscosidad de la suspensión es muy cercana a la del agua durante la mayor parte de la polimerización. La baja viscosidad de la suspensión permite



un buen mezclado de los componentes del reactor empleando cantidades de energía moderadas y mejora la transferencia de calor en el reactor de polimerización. El agua es un buen medio para la remoción de calor de las gotas de polimerización debido a su alta capacidad calorífica y alta conductividad térmica. Sin embargo, los polímeros suspendidos deben ser separados y secados de la fase acuosa. Las gotas en suspensión no son termodinámicamente estables, por lo que su coalescencia debe ser controlada haciendo un balance entre la agitación y los agentes de suspensión.

Cierto número de los polímeros comercializados en el mercado son preparados mediante el proceso de polimerización en suspensión. Las ventajas potenciales sobre las polimerizaciones en bulk, solución y emulsión son:

1. Bajo costo de conversión con flexibilidad para variar las propiedades de las partículas.
2. Excelente transferencia de calor. Cuando la coalescencia es controlada, el calor es fácilmente transferido de las cuentas a la fase acuosa y de ahí a las superficies de transferencia de calor del reactor. La alta capacidad calorífica de la fase acuosa comparada con la fase monómero-polímero provee un buen depósito para absorber incrementos rápidos en la energía liberada.
3. Control del tamaño de partícula. Se puede controlar el tamaño de partícula promedio y la distribución de tamaño de partícula en un rango muy estrecho. Las partículas son relativamente fáciles de recuperar del agua o de corrientes gaseosas. La morfología de la partícula puede afectar su desempeño en mezclas y aplicaciones.
4. Bajos niveles de aditivos en el polímero. Los productos de suspensión tienen menores contenidos de aditivos en comparación con los productos de la polimerización en emulsión, pero en mayor cantidad que los productos de polimerización en bulk y solución.



Las propiedades químicas de los polímeros en suspensión pueden diferir de aquellos preparados por las técnicas de polimerización en bulk y emulsión. Los agentes de suspensión pueden ser incorporados dentro de las partículas poliméricas y pueden afectar las propiedades como la fusión de la partícula durante los procesos de mezclado. El agua empleada como fase continua es una fuente potencial de contaminantes como metales, iones los cuales pueden afectar la estabilidad térmica del producto. La solubilidad de los monómeros e iniciadores en la fase acuosa es baja por no nula. Es posible la formación de polímeros en la fase acuosa con propiedades diferentes de la resina normal. La mayoría de los procesos de suspensión son en batch, sin embargo se investigan métodos alternativos.⁶⁴

4.2.13 Surfactantes

El sistema de surfactantes además de ayudar a establecer la distribución de tamaño inicial de las gotas de monómero, controla la coalescencia de las gotas, y reduce la aglomeración de las partículas. El estabilizador de la suspensión afecta el tamaño y forma de la partícula así como su claridad, transparencia así como las propiedades en la película de la resina. En algunos sistemas, la suspensión puede ayudar a controlar la porosidad de la resina. La solubilidad del agua en el monómero y la posible solubilización del agua en el monómero debido a la presencia del estabilizador pueden afectar la claridad de las cuentas poliméricas.

En las primeras investigaciones se creía que los surfactantes funcionaban incrementando la viscosidad de la fase continua. Sin embargo, el bajo nivel de polímeros solubles en agua usados en algunas suspensiones (0.06-0.10% respecto al peso de monómero) hace parecer poco probable que el pequeño incremento en la viscosidad de la fase acuosa pueda ser la principal causa de la estabilización de las gotas. Otros investigadores han afirmado que al adsorción de los estabilizadores forma un recubrimiento resistente alrededor de las gotas, por lo que no pueden unirse unas con otras durante las colisiones. Los agentes activos no iónicos y



estabilizadores de suspensión poliméricos se piensa que promueven la formación de barreos estéricos debido a su adsorción en la interfase.

Se pueden emplear otras técnicas químicas para influenciar el tamaño de las partículas. Se emplean electrolitos como complemento a los surfactantes. Bufers y otros electrolitos generalmente incrementan la tensión interfacial entre las fases monomérica y acuosa. Así mismo reducen la solubilidad de los monómeros en la fase acuosa.

La elección del surfactante así como su método de aplicación son parte del arte en la polimerización por suspensión.⁶⁴



4.3 LIPASAS

4.3.1 Enzimas

En los últimos años la biotecnología ha experimentado grandes avances conjuntamente con aplicaciones industriales para la obtención de productos químicos finos, en la industria alimentaria y farmacéutica entre otras.^{42-43, 47} Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos entre las que se encuentran:

- Gran actividad catalítica.
- Amplia especificidad de sustrato.
- Decremento en reacciones secundarias.
- Son activas a temperatura ambiente y presión atmosférica.
- Se pueden llevar a cabo reacciones en diferentes medios: acuoso, orgánico, en líquidos iónicos, fluidos supercríticos y con compuestos en fase gaseosa.

El número de enzimas comercialmente disponibles así como su rango de aplicaciones va en aumento. En el año 2000 el mercado industrial de enzimas alcanzó 1.5 billones de dólares y se espera que para 2009 alcance 5.1 billones de dólares.⁴³



4.3.2 Lipasas

Las lipasas (glicerol ester hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas que hidrolizan triacilgliceroles en ácidos grasos y glicerol (Figura 21). También bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa, produciendo glicéridos a partir de glicerol y ácidos grasos.^{24, 43-47} Debido al papel que juegan en el metabolismo de grasas, las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por animales, plantas y microorganismos.^{45, 46}

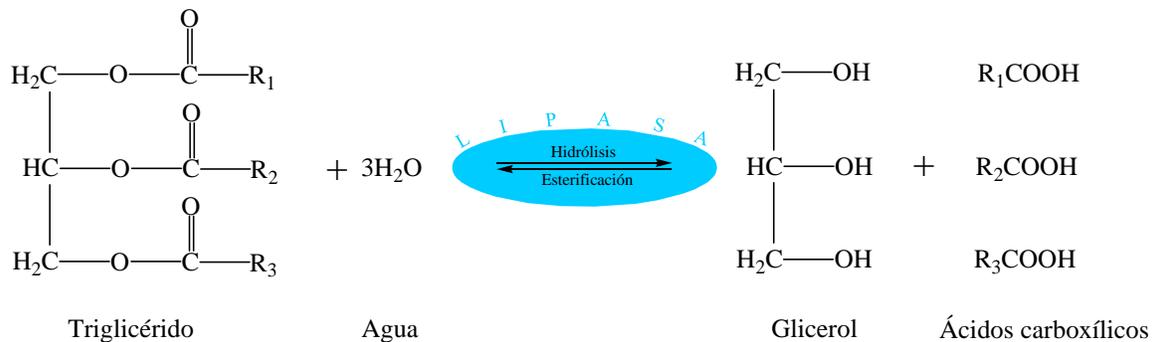
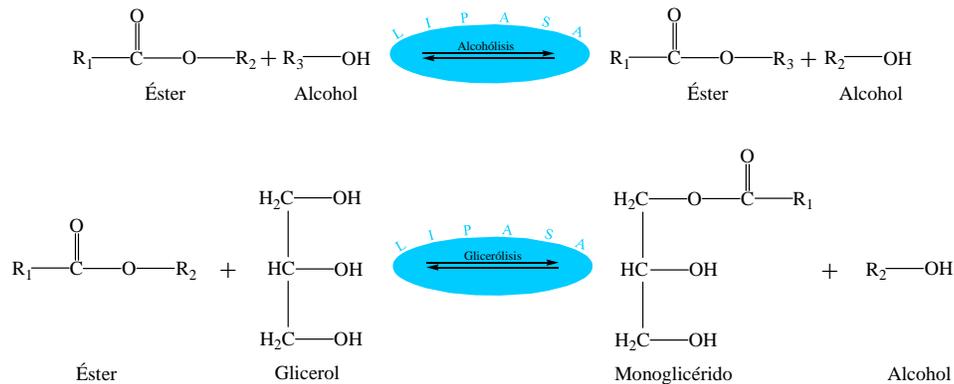


Figura 21. Reacción enzimática de lipasas catalizando la hidrólisis o síntesis de triglicéridos.^{43, 47}

Las lipasas son biocatalizadores versátiles. Además de su actividad hidrolítica sobre los triglicéridos, pueden catalizar otro tipo de reacciones como esterificaciones, interesterificaciones (acidólisis, esterólisis), transesterificaciones (alcoholisis, glicerólisis), aminólisis entre otras, como se ilustra en la Figura 22.^{43, 46}



Transesterificaciones



Interesterificaciones

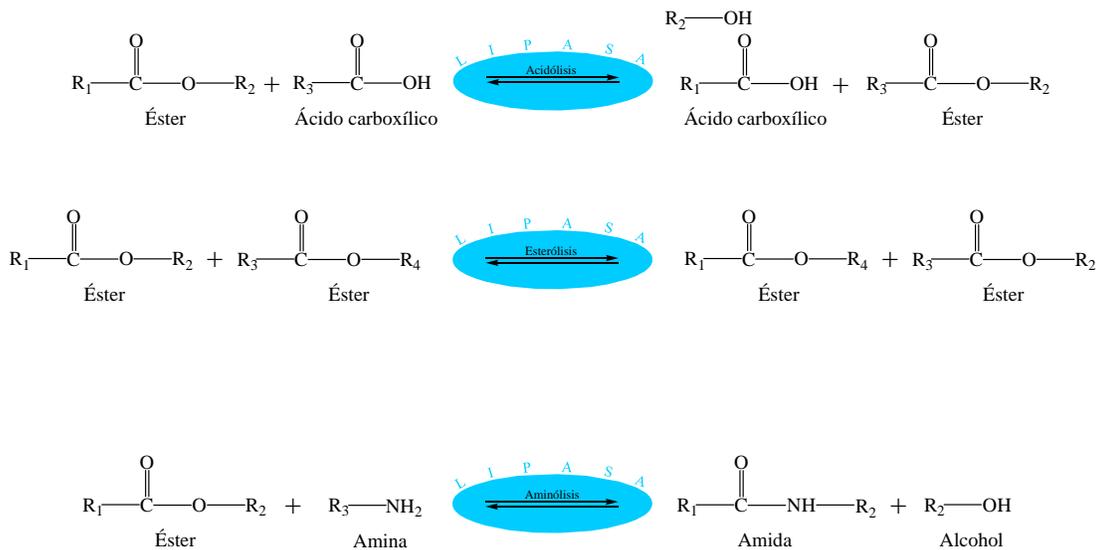


Figura 22. Reacciones industriales importantes catalizadas por lipasas. La transesterificación involucra la transferencia de un grupo acilo a un alcohol (alcoholólisis) o glicerol (glicerólisis). La interesterificación involucra la transferencia de un grupo acilo a un ácido graso (acidólisis) o a un éster de ácido graso.^{43, 47}

Debido a esto las lipasas constituyen el grupo más importante de biocatalizadores en aplicaciones biotecnológicas⁴⁸ y son las enzimas más empleadas en química orgánica debido a que combinan una amplia especificidad de sustrato con una alta enantio-selectividad y regio-selectividad.^{29, 49}



En particular, las lipasas extracelulares de microorganismos han recibido gran atención debido a su potencial uso en biotecnología, principalmente por su gran disponibilidad, su alta estabilidad y su amplia especificidad de sustrato, así como su empleo en aplicaciones industriales entre las que se encuentran:^{43-44, 46,48}

- Aditivos en alimentos (modificación de sabores).
- Químicos finos (síntesis de esteres).
- Detergentes (hidrólisis de grasas).
- Tratamiento de aguas residuales (descomposición y remoción de sustancias oleosas).
- Cosméticos (remoción de aceites y lípidos).
- Farmacéuticos (digestión de aceites y grasas en alimentos).
- Medicina (ensayos de triglicéridos en la sangre).
- Producción de Biodiesel (conversión de aceites vegetales en esteres de cadena corta).



Algunas de estas lipasas se encuentran disponibles comercialmente. La Tabla 2 presenta las marcas comerciales de algunas lipasas, así como sus aplicaciones industriales y sus proveedores.⁴³

Tabla 2. Lipasas disponibles comercialmente y sus aplicaciones industriales.⁴³

Industria	Aplicación	Marca comercial	Proveedor
Lácteos	EMC (sabores tipo cheddar)	Lipomod™ 187P-L187P (fungal lipases), Lipomod™ 224P-L224P (páncreas porcino)	Biocatalysts
	EMC (sabores tipo blue)	Lipomod™ 338P-L338P (<i>Penicillium roquefortii</i>)	Biocatalysts
	Intensificador de aroma en quesos	Palatasa® (<i>Rhizomucor miehei</i>)	Novozymes
	Aceites y grasas	Interesterificación de aceite vegetal	Lipozyme® TL IM
Farmacéutica	Ingrediente farmacéutico	Lipasa MY (<i>Candida cylindracea</i>)	Meito Sangyo
	Síntesis de compuestos quirales	Lipasa ALG (<i>Achromobacter</i> sp.), Lipasa QLG (<i>Alcaligenes</i> sp.)	Meito Sangyo
		Lipasa AK "Amano" (<i>Pseudomonas fluorescens</i>), Lipasa AYS "Amano" (<i>Candida rugosa</i>)	Amano
	Detergentes	Hidrólisis de grasas	Lipolase®, Lipolase® Ultra, Lipo Prime™, Lipex® (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)
Levaduras	Mejora en textura y color de masas	Lipomod™ 627P-L627P (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Biocatalysts
	Emulsificante	Lipopan® F	Novozymes
Curtidoras	Dispersión de grasas	Greasex®, NovoCor® AD	Novozymes
Cosméticos	Producción de isopropil miristato	Novozym® 435 (<i>Candida Antarctica B</i>)	Novozymes
Papel	Control de brea	Resinase® (<i>Candida rugosa</i>)	Novozymes
Pastas	Mejora de pastas	Noopazyme®	Novozymes
Alimentos	Suplemento alimenticio	Lipasa LO36P-L036P (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Biocatalysts
		Lipasa F-DS (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Amano

Las lipasas remarcadas son recombinantes
EMC: quesos modificados enzimáticamente (enzyme-modified cheeses)



4.3.3 Activación de las lipasas

Una característica de las lipasas es su activación en presencia de interfases hidrofóbicas (sustratos en micelas, solventes orgánicos inmiscibles, etc.). Esta activación de las lipasas fue reportada por primera vez en 1958 por Sarda y Desnuelle y posteriormente, a través de estudios de rayos X se ha descubierto como una característica común en éstas.^{24, 44-45, 47, 50}

En ausencia de interfases, las lipasas tienen un elemento de estructura secundaria (al menos una α -hélice) llamado "lid" cubriendo el sitio activo de la enzima haciéndola inaccesible a los sustratos. Sin embargo, en presencia de interfases hidrofóbicas ocurren cambios conformacionales importantes, que conducen a una estructura "abierta" de la lipasa. Estos cambios dan como resultado la exposición de superficies hidrofóbicas que ahora interactúan con la interfase hidrofóbica y que le confieren funcionalidad a la enzima. De esta manera las lipasas quedan fuertemente adsorbidas a las interfases hidrofóbicas a través de los residuos que rodean el sitio catalítico.^{24, 44-45, 47, 50-51}

4.3.4 Actividad acuosa (Aw)

El empleo de medios orgánicos en reacciones catalizadas enzimáticamente presenta las siguientes ventajas:⁵²

- Cataliza reacciones que no son favorables en medio acuoso.
- Permite la solubilidad de sustratos hidrofóbicos.
- Mayor facilidad en la recuperación de algunos productos.
- Mayor facilidad en la recuperación del biocatalizador insoluble.
- Incrementa la termoestabilidad del biocatalizador (a bajos contenidos de agua).



Sin embargo, la cantidad limitada de agua presente en estos medios tiene una gran influencia en las propiedades dinámicas y catalíticas de las enzimas.

El efecto del agua presente en un sistema de reacción enzimático no acuoso puede relacionarse mediante el parámetro termodinámico denominado “actividad acuosa (A_w)”. Los valores de A_w varían entre 0 y 1, tomando como referencia el último valor para el agua pura. La actividad acuosa se define como:⁵²

$$A_w = \frac{\text{Presión parcial del agua en una mezcla}}{\text{Presión de vapor del agua pura}}$$

En el caso de las lipasas se ha observado que el A_w juega un papel muy importante. Se sabe que la velocidad de la reacción en dichos sistemas depende de la cantidad de agua presente en el sistema, el disolvente empleado y la naturaleza del biocatalizador (Figura 23).⁵³

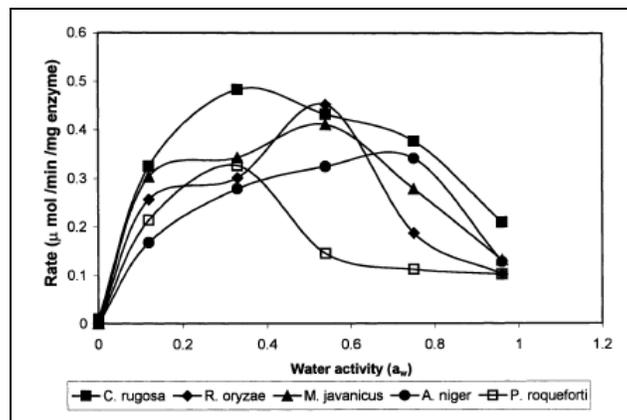


Figura 23. Perfil de velocidades de reacción en función del A_w para diferentes lipasas, en la reacción de transesterificación de 1-butanol con etilbutirato a 40 °C.⁵³



4.3.4 Lipasa de *Candida rugosa*

Candida rugosa (ATCC 14830) es una levadura no esporogénica, pseudofilamentosa, unicelular y no patogénica formalmente conocida como *Candida cylindracea*. Esta levadura sintetiza y secreta una mezcla de lipasas (isoenzimas). Se han identificado siete genes de la lipasa (Lip1 a Lip7), cinco de los cuales han sido caracterizados en su totalidad y tres de ellos (Lip1 a Lip3) han sido identificados en preparaciones comerciales crudas. Cada gen codifica una cadena polipeptídica constituida por 534 residuos aminoácidos con un peso molecular aproximado de 60 kDa.^{47, 54-55}

La lipasa de *Candida rugosa* contiene una triada catalítica conformada por los residuos: Ser-209, Glu-341, His-449 (Figura 24). La cubierta o “lid” que cubre el sitio activo presenta 31 aminoácidos, principalmente hidrofóbicos en la cara interna que apunta al sitio activo e hidrofílicos en la cara externa.

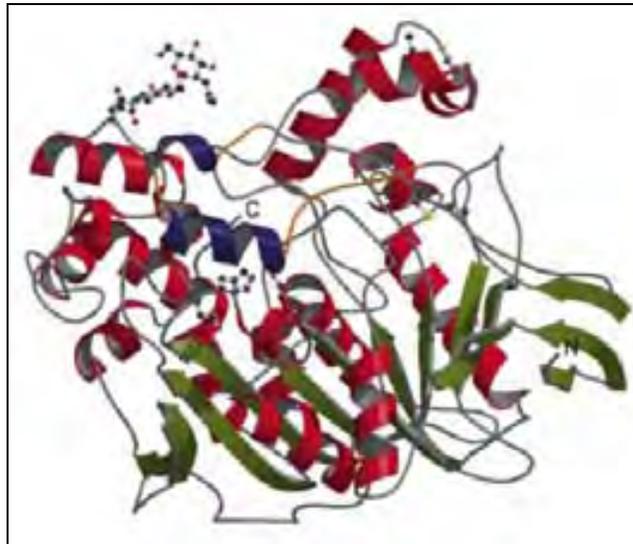


Figura 24. Estructura de la lipasa 2 de *Candida rugosa*, α -hélices en rojo, hojas β en verde, regiones de estructura irregular en gris. La α -hélice y pequeños segmentos formando el lid se muestran en azul marino y naranja respectivamente. La triada catalítica (Ser209, Glu341 e His449) así como los puentes disulfuro se representan con bolas y bastones.⁵⁶



La lipasa producida por *Candida rugosa* es una de las más empleadas en investigación debido a su alta actividad en reacciones de hidrólisis así como en esterificaciones. Ésta enzima ha sido inmovilizada en diferentes materiales como celita, polimetilmetacrilato, lechos de vidrio o silica gel entre otros.^{39, 44, 57-58} Dentro de la industria farmacéutica tiene importantes aplicaciones en la síntesis de precursores para la fabricación de medicamentos como: ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y antibióticos entre otros.⁴⁷



4.4 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

4.4.1 Magnetometría de muestra vibrante

Las características de cualquier material magnético definen sus posibles aplicaciones y están descritas en términos de su curva de magnetización en función del campo magnético (M vs. H). El instrumento de medición más comúnmente usado para la determinación de curvas M vs. H (lazo de histéresis) es el Magnetómetro de Muestra Vibrante o VSM por sus siglas en inglés (Vibrating Sample Magnetometer) que desde su invención en 1956, se ha convertido en la “técnica más usada” tanto en laboratorios de investigación básica como en ambientes de producción, dada su capacidad de medir las propiedades magnéticas básicas de materiales como función del campo magnético externo, la temperatura y el tiempo. El VSM es la técnica de inducción que por su fácil implementación en laboratorios, su gran adaptabilidad a rutinas de automatización, y su alta sensibilidad, ha sido catalogado como “el más popular de los equipos de caracterización magnética en la últimas décadas”.⁶⁰

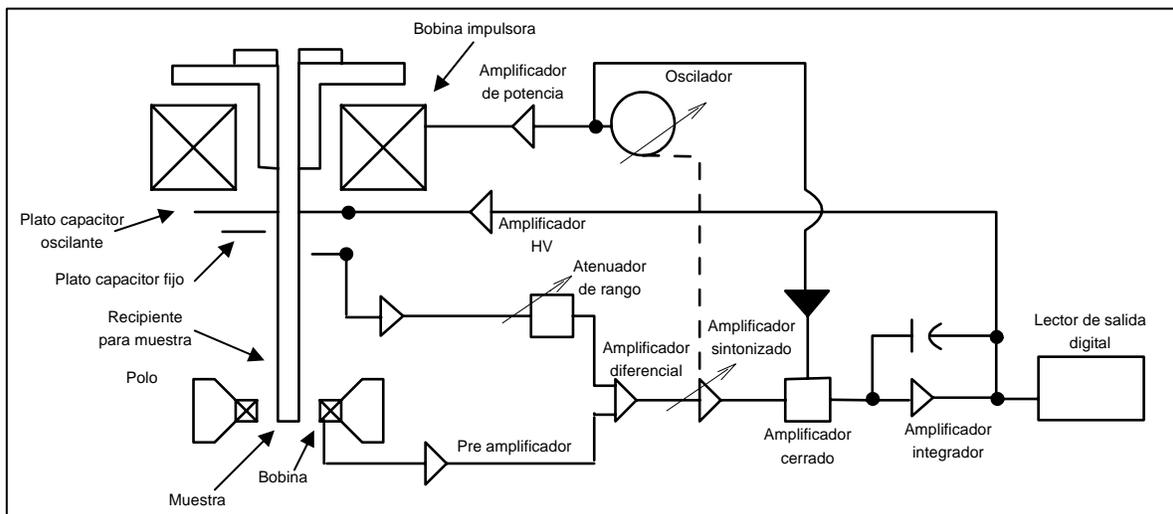


Figura 25. Diagrama de bloque de un magnetómetro de muestra vibrante



Si la muestra de un material es colocada en un campo magnético uniforme, creado entre los polos de un electro magneto, se induce un momento dipolo. Si la muestra vibra con un movimiento sinusoidal, una señal eléctrica sinusoidal puede ser inducida en bobinas colocadas apropiadamente. La señal tiene la misma frecuencia de vibración y su amplitud será proporcional al momento magnético, a la amplitud y a la posición relativa respecto al sistema de bobinas.⁶⁰

La muestra es colocada dentro de un pequeño compartimiento localizado al final de la varilla para muestras montada en un transductor electro mecánico. El transductor es impulsado por un amplificador de poder que a su vez es impulsado por un oscilador a una frecuencia de 90 Hertz. Entonces, la muestra vibra a lo largo del eje Z perpendicular al campo magnetizado. Este último induce una señal en el sistema de bobinas que es alimentado a un amplificador diferencial. La salida del amplificador diferencial es subsecuentemente alimentada a un amplificador sintonizado y a un amplificador interno cerrado el cual recibe una señal de referencia suministrada por el oscilador.⁶⁰

La señal del amplificador cerrado, o la señal del magnetómetro por si misma es una señal DC proporcional al momento magnético de la muestra estudiada, la calibración del magnetómetro de muestra vibrante se lleva a cabo midiendo la señal de un estándar de Ni puro, con un momento magnético de saturación conocido.⁶⁰



4.4.2 Microscopía electrónica de transmisión

Existen varios tipos de microscopios electrónicos. El primer tipo que se utilizó fue el microscopio electrónico de transmisión (MET), que recibe este nombre por que detecta los electrones que se transmiten a través de una muestra, como se ilustra en la figura 26.⁶¹

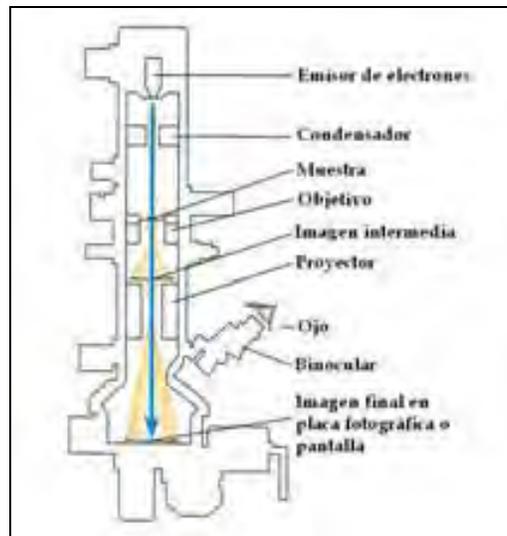


Figura 26. Microscopio electrónico de transmisión.

Un filamento de wolframio emite un haz de electrones, que se acelera mediante un campo eléctrico. Las lentes magnéticas enfocan el haz, de la misma forma que las lentes de vidrio enfocan un haz de luz en el microscopio convencional. La clave para la obtención de una mayor resolución es que los electrones, al igual que los fotones de la luz, tienen una naturaleza de tipo partícula y de tipo onda. Un fotón o un electrón que se mueve con una energía E está caracterizado por una longitud de onda.

$$\lambda = \frac{h}{E}$$

En donde h es la constante de Plank (6.626×10^{-27} erg. \cdot s= 6.626×10^{-34} J. \cdot s).



Cuando los electrones se aceleran mediante 50 000-100 000 voltios entre el cátodo y el ánodo, sus longitudes de onda son mucho más cortas que las de la luz visible; en realidad, inferiores a 1 nm. Esta longitud de onda predeciría una resolución que 1nm para un microscopio electrónico de transmisión. Algunas consideraciones prácticas hacen que el límite operativo se sitúe alrededor de 2 nm para la mayor parte de los instrumentos. No obstante, esta resolución es una 100 veces mejor que la que puede conseguirse con el mejor microscopio óptico: un buen microscopio electrónico de transmisión puede proporcionar generalmente una ampliación de más de 100 000 veces.

Por muy clara que sea esta ventaja, la microscopía electrónica de transmisión tiene ciertos inconvenientes. El haz de electrones requiere el mantenimiento de un vacío elevado en todo el instrumento, incluyendo la cámara en la que se coloca la muestra. Ello implica, a su vez, que tan solo pueden examinarse muestras completamente desecadas. Aunque se han diseñado muchos métodos para la fijación y el secado, siempre existe la posibilidad de inducir cambios en las muestras. Naturalmente no es posible examinar muestras vivas.

Las energías de los electrones en la mayor parte de los microscopios electrónicos de transmisión no les permiten penetrar en las muestras gruesas (>100 nm). En consecuencia, las muestras celulares deben fijarse, teñirse y cortarse de manera muy fina con un ultramicrotomo.⁶¹

4.4.3 Microscopía electrónica de barrido

Un tipo de técnica muy distinta es la denominada microscopía electrónica de barrido (MEB). En este caso, el haz de electrones se desplaza en uno y otro sentido a través de la muestra, siguiendo un patrón originado por el generador de barrido y el deflector del haz, y los electrones secundarios emitidos por el punto en el que el haz, y los electrones secundarios emitidos por el punto en el que el haz choca sobre la superficie de la muestra son captados por un detector.⁶¹



La imagen se presenta entonces en una pantalla de vídeo, cuya superficie se rastrea en correspondencia con el barrido de la muestra. El método de la MEB no alcanza la resolución de la MET, pero es excelente para obtener imágenes extraordinariamente claras de las superficies de objetos minúsculos. La preparación para los estudios de MEB no requiere realizar cortes, aunque la muestra debe fijarse y secarse para que se mantenga estable en el vacío elevado y suele recubrirse con una capa fina de oro para facilitar la emisión de los electrones secundarios.⁶¹

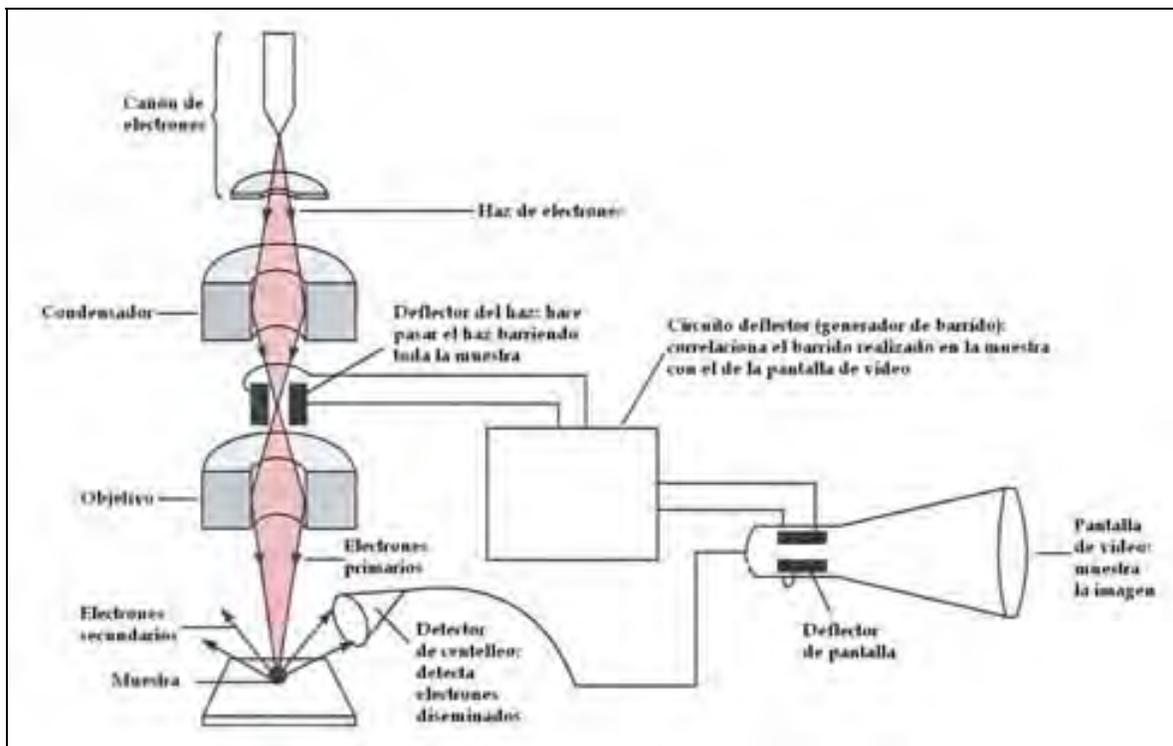


Figura 27. Principio de la microscopía electrónica de barrido.



4.4.4 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es uno de los fenómenos físicos que se producen al interaccionar un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, con una sustancia cristalina. La difracción de rayos X se basa en la dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia (se mantiene la longitud de onda de la radiación) y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinadas direcciones del espacio.

El fenómeno de la difracción puede describirse con la ley de Bragg, que predice la dirección en la que se da interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Cuando una radiación de cualquier tipo pasa a través de una estructura repetitiva regular, se observa difracción. Esto significa que la radiación dispersada por los elementos repetitivos de la estructura presenta un refuerzo de las ondas dispersadas en determinadas direcciones específicas y un debilitamiento de las ondas que van en otras direcciones. En la figura se presenta el ejemplo en el que se indica la radiación dispersada por una hilera de átomos espaciados de manera uniforme. Tan sólo en determinadas direcciones estarán las ondas dispersadas en fase y se interferirán, por tanto, de manera constructiva (se reforzarán) entre sí. En todas las demás direcciones las ondas estarán fuera de fase y se interferirán de manera destructiva entre sí. Se genera pues, un patrón de difracción. Para que el patrón de difracción esté bien delimitado, es esencial que la longitud de onda de la radiación utilizada sea algo inferior al espaciamiento regular que existe entre los elementos de la estructura.



Ésta es la causa de que se utilicen rayos X en el estudio de las moléculas, puesto que los rayos X se caracterizan por tener una longitud de onda de tan sólo décimas de nanómetro. Si el espaciamento regular existente en el objeto que se estudia es grande (como en una persiana de una ventana), podemos observar exactamente el mismo fenómeno con la luz visible, que tiene una longitud de onda miles de veces superior a la de los rayos X. Se observará que un motivo puntual, visto a través de la persiana de la ventana, produce un patrón de difracción regular de manchas. La regla que relaciona los espaciamentos periódicos de un objeto con el patrón de difracción es sencilla: a los espaciamentos cortos en la estructura periódica les corresponden espaciamentos grandes en el patrón de difracción y viceversa. Además, mediante la determinación de las intensidades relativas de las diferentes manchas, se puede determinar cómo está distribuida la materia dentro de cada repetición de la estructura.⁶¹

4.4.5 Espectrofotometría

Los métodos espectroscópicos de análisis se basan en la medición de la radiación electromagnética emitida o absorbida por los analitos. Los métodos de absorción se basan en la disminución de la potencia de un haz de radiación electromagnética como consecuencia de su interacción con el analito.

Los métodos electroscópicos también se clasifican de acuerdo con la región del espectro electromagnético que utilizan. Estas regiones incluyen los rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas y radiofrecuencias.

La mayoría de los instrumentos espectroscópicos incluyen cinco componentes: 1) una fuente estable de energía radiante; 2) un selector de longitud de onda que aísla una región limitada del espectro para hacer la medición; 3) uno o más recipientes la muestra; 4) un detector de radiación, que convierte la energía radiante en una señal medible (normalmente eléctrica), y 5) un sistema que procesa y lee la señal, y la visualiza en una escala de medida, en la pantalla de un osciloscopio, en un



medidor digital o en un registrador gráfico. Las celdas, ventanas, lentes y elementos dispersantes de la longitud de onda de los instrumentos deben ser transparentes en la región de longitud de onda seleccionada.

Todo analito molecular es capaz de absorber ciertas longitudes de onda características de la radiación electromagnética. En este proceso, la energía de la radiación es transferida temporalmente a la molécula y, como consecuencia, disminuye la intensidad de la radiación. Cuando se produce la absorción se dice que la radiación está atenuada.

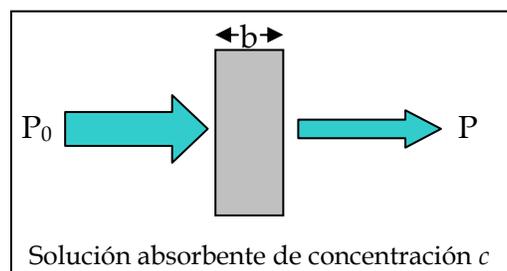


Figura 28. Principio de la microscopía electrónica de barrido.

La figura 28 ilustra la atenuación de un haz colimado de radiación monocromática, antes y después de haber atravesado una capa de solución con grosor b cm y una concentración c de una especie absorbente. A causa de la interacción entre los fotones y las partículas absorbentes, la potencia del haz disminuye de P_0 hasta P . La transmitancia T de la solución se define como la fracción de radiación incidente transmitida por la solución:

$$T = \frac{P}{P_0}$$

La absorbancia de una solución se define por la ecuación:

$$A = -\log_{10} T = \log \frac{P_0}{P}$$



De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente (c) y con la longitud de la trayectoria (b) de la radiación en el medio absorbente. Es decir:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abc$$

Donde a es una constante de proporcionalidad denominada absorptividad. Puesto que la absorbancia es una cantidad adimensional, la absorptividad debe tener unidades que cancelen las unidades de b y c .

Cuando la concentración c en la ecuación anterior se expresa en moles por litro, y b en centímetros, la constante de proporcionalidad se denomina absorptividad molar, y se le representa con el símbolo ϵ . Por tanto:

$$A = \epsilon bc$$

Donde ϵ tiene unidades de $L \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

Las mediciones de absorción en las regiones visibles y ultravioleta del espectro proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre moléculas orgánicas, inorgánicas y bioquímicas.⁶²

4.4.6 Difracción Láser

La técnica de difracción láser opera bajo la predicción del comportamiento de las partículas sobre la dispersión de la luz. Las partículas dispersan en todas las direcciones con un patrón de intensidad que es dependiente de su tamaño. La luz dispersada tendrá diferentes intensidades según el ángulo de observación. De una forma simple, las partículas pequeñas dispersan luz a grandes ángulos, mientras que las partículas grandes dispersan luz a pequeños ángulos. Si un conjunto o grupo de partículas suspendidas en aire o en cualquier otro medio transparente, como el agua o un solvente, es atravesado por un haz de láser, cada partícula dispersará luz frontalmente a un ángulo inversamente proporcional a su tamaño.



El principio básico considerado en los analizadores de tamaño de partículas por difracción láser es que, con ciertos límites, el patrón de dispersión creado por ese conjunto de partículas es idéntico a la suma de los patrones de dispersión individuales de todas las partículas presentes. Así, con el conocimiento de la disposición geométrica de los detectores de un instrumento y de la fuente de luz, junto con los datos que representan las intensidades relativas de la luz dispersada recibida sobre cada elemento detector del conjunto de todos los detectores, es posible calcular la distribución de tamaño de partículas.

Esta simple interdependencia de la intensidad de la dispersión, de la distribución angular de la luz dispersada y del tamaño de la partícula, alcanza su límite cuando el diámetro de las partículas está próximo a la longitud de onda de la fuente de luz usada. En este punto, los efectos adicionales de interferencia producidos no pueden ser ignorados y empieza a ser más complicada la relación entre la intensidad de la dispersión y el tamaño de partícula.



5. METODOLOGÍAS

5.1.1 Reactivos, materiales y equipos

Reactivos y materiales

- Sulfato de hierro heptahidratado 99.85 %, Mallinckrodt.
- Cloruro de hierro III 97%, Sigma-Aldrich.
- Hidróxido de amonio 28.2 % p/p, J. T. Baker.
- Ácido oleico grado industrial.
- Agua destilada y desionizada.
- Nitrógeno grado industrial, Praxair.
- Acetato de vinilo 99%, Sigma-Aldrich.
- Divinil benceno mezcla de isómeros, Sigma-Aldrich.
- Azo-bis-isobutironitrilo (AIBN), grado industrial.
- Sulfato de magnesio anhidro grado analítico, Mallinckrodt.
- Hidróxido de sodio 99.1%, J. T. Baker.
- Alcohol polivinílico 80% hidrolizado, Sigma-Aldrich.
- Alumina básica tipo WB-2, Sigma-Aldrich.
- Dodecil sulfato de sodio 98.5%, Sigma-Aldrich.
- Lipasa (E.C. 3.1.1.3) tipo VII de *Candida rugosa*, Sigma.
- Fosfato de potasio grado analítico, Mallinckrodt.
- Fosfato de sodio 12-hidrato grado analítico, J. T. Baker.
- Reactivo de Bradford # Catalogo 500-0006, Laboratorios Bio-Rad.
- Cartuchos de ultrafiltración con membranas de celulosa de 30 kDa Amicon Ultra, Millipore.
- Hexano 99.9%, J. T. Baker.
- Acetato de butilo 98%, Productos Químicos Monterrey.
- 1-Butanol 99.9%, Sigma-Aldrich.



- Etanol grado Q. P., Química Barsa.
- Acetona grado industrial, Química Barsa.
- Cloruro de litio 99%, Sigma-Aldrich.
- Cloruro de magnesio 98%, Sigma-Aldrich.
- Nitrato de magnesio hexahidratado 98%, Sigma-Aldrich.
- Cloruro de sodio 99.9%, J. T. Baker
- Nitrato de potasio grado analítico, Laboratorios Reasol.

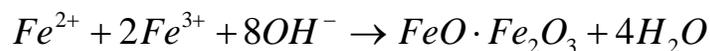
Equipos

- Reactor batch de vidrio enchaquetado con 3 bocas de 250 mL.
- Agitador mecánico Lightnin Labmaster TS2010., equipado con flecha de vidrio de 35 cm con propela de teflón de 3.5 cm.
- Recirculador de agua con control de temperatura Heto DT-1.
- Baño de agua con agitación recíproca New Brunswick Scientific, modelo R76.
- Equipo para destilación Sigma-Aldrich.
- Sonicador Branson 2510.
- Centrífuga clínica IEC.
- Espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 2S.
- Cromatógrafo de gases HP 5890 Serie II equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna Carbowax 20M de 25m×0.32 mm de espesor.
- Equipo Soxhlet vi-lab de vidrio con boca esmerilada 45/50.



5.2.1 Síntesis de magnetita

Se sintetizó un ferrofluido conteniendo magnetita mediante la co-precipitación de sales de hierro (II) y hierro (III) en presencia de hidróxido de amonio. La reacción estequiométrica es la siguiente¹:



Se pesaron 7.17 g (0.0258 mol) de sulfato de hierro heptahidratado los cuales fueron disueltos en 50 mL de agua. Por separado se pesaron 8.37 g (0.0516 mol) de cloruro de hierro III los cuales fueron disueltos en 100 mL de agua. Ambas soluciones fueron desoxigenadas burbujando nitrógeno durante 30 minutos para evitar la aparición de reacciones secundarias (Figura 29).



Figura 29 Desoxigenación de las sales de Fe II (derecha) y Fe III (izquierda).

A continuación estas soluciones fueron cargadas al reactor batch a 60°C y 600 rpm. Inmediatamente después se adicionaron rápidamente 28.43 mL (0.2064 mol) de hidróxido de amonio; al instante se formó un sólido negro indicativo de la presencia de magnetita, (Figura 30).



Después de 10 minutos se adicionaron gota a gota 3 ml de ácido oleico, para evitar la aglomeración de la magnetita y se dejó continuar la reacción por 30 minutos más. El ferrofluido se dejó enfriar a temperatura ambiente y se almacenó bajo atmósfera de nitrógeno.



Figura 30. Sales de Fe cargadas al reactor (izquierda). Formación de magnetita (derecha).

5.2.2 Caracterización de la magnetita por XRD

Cada sustancia cristalina posee un patrón característico y en una mezcla de sustancias cada una produce su patrón independientemente de las demás. Por lo tanto el patrón de difracción de una sustancia pura es como su huella digital. Debido a esto el método de difracción en sólidos es ideal para la caracterización e identificación de las fases policristalinas.

El patrón de difracción de rayos X (XRD) o imagen cristalográfica de rayos X es una técnica que consiste en hacer pasar un haz de electrones a través de un cristal de la sustancia sujeta a estudio, el cual da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de átomos del cristal, aplicando la ley de Bragg.⁵⁹

$$2d\sin\Theta = \lambda$$

Por lo que:

$$d = \lambda L / r$$



Donde:

Θ = Ángulo de difracción en grados

λ = Longitud de onda al voltaje de aceleración al cual se trabaja en Å o nm, en este caso 0.00251 nm.

L = Longitud de cámara del microscopio en cm o mm, en este caso 80 cm.

r = Radio medido en el negativo

d = Distancia calculada, la cual debe coincidir con la distancia reportada en las tablas de rayos X.

El patrón de difracción obtenido para la magnetita sintetizada fue comparado con un estándar de la Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) que conforma la base de los espectros orgánicos e inorgánicos. El estándar fue facilitado por la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

5.2.3 Caracterización de magnetita por TEM

El tamaño de partícula de la magnetita estabilizada con ácido oleico fue analizado digitalizando micrografías obtenidas por microscopía de transmisión electrónica (TEM). Se empleó un microscopio JEOL modelo 2010 trabajado a 200 kV, con una resolución de 1.9 Å y una amplificación hasta de 1, 500,000. El análisis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la USAI en la Facultad de Química de la UNAM.



5.2.4 Caracterización de magnetita por magnetometría de muestra vibrante

Esta técnica permite observar el comportamiento magnético de un sólido y cuantificar algunas de sus propiedades como: magnetización de saturación (M_S), remanencia magnética (M_R) y fuerza coerciva (H_C) entre otros. El ferrofluido fue caracterizado empleando un magnetómetro de muestra vibrante LDJ modelo 9600 con un campo máximo aplicado de 15,000 oersted, Oe. Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Propiedades Eléctricas y Magnéticas del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.



5.3.1 Microesferas poliméricas magnéticas

Las microesferas poliméricas magnéticas fueron producidas recubriendo nanopartículas de magnetita mediante polimerización en suspensión por radicales libres. El co-polímero se conformó de acetato de vinilo con divinil benceno y se empleó AIBN como iniciador.^{8, 39, 40}

5.3.2 Pre-tratamiento de monómeros

El acetato de vinilo (50 mL) fue tratado con un volumen igual de una solución de NaOH al 3 %p/v la cual se adicionó gota a gota a una temperatura de 4°C con la finalidad de remover la hidroquinona presente en el monómero, la cual actúa como inhibidor de polimerización (Figura 31 A). Una vez separadas las fases, por decantación se recuperó el acetato de vinilo. A continuación el acetato de vinilo se trató con sulfato de magnesio anhidro para eliminar el agua presente en el monómero.

La siguiente etapa consistió en una destilación a vacío del acetato de vinilo (Figura 31 B), eliminando las fracciones ligeras y pesadas. El monómero fue almacenado en el cuarto frío (4 °C) hasta su uso.



Figura 31. A) Remoción de hidroquinona presente en el acetato de vinilo.
B) Destilación al vacío del acetato de vinilo previo a su polimerización.



Por otro lado el divinil benceno fue tratado con alumina básica para remover el p-terbutilcatecol que actúa como inhibidor de polimerización del entrecruzante. A su vez, el AIBN se solubilizó y se recristalizó en etanol para eliminar impurezas.

5.3.3 Polimerización de microesferas magnéticas

Fase continua:

Se pesaron 0.2 gr de dodecil sulfato de sodio junto con 1 gr de alcohol polivinílico y se solubilizaron en 100 ml de agua desionizada. Esta solución se transfirió al reactor donde se agitó suavemente y se burbujeó nitrógeno durante media hora para remover el oxígeno.

Fase dispersa:

La magnetita se precipitó empleando una solución de HCl 1M. Una vez precipitada se lavó con agua desionizada hasta llevarla a pH neutro y posteriormente se secó bajo atmósfera de nitrógeno. En un matraz erlenmeyer se pesaron 1.5 gr de magnetita (0.006 mol), se añadieron 18.5 gr de acetato de vinilo (0.215 mol), 3.7 gr de divinil benceno (0.028 mol) y 0.4 gr de AIBN (0.002 mol). Esta solución se sonicó por 10 minutos e inmediatamente después fue burbujeada con nitrógeno durante 5 minutos.



Polimerización:

La fase dispersa se transfirió al reactor que contenía la fase continua a 45 °C. Se aplicó una rampa de temperatura de 45°C a 65°C en un lapso de 1 hora a una velocidad de agitación de 800 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, la velocidad de agitación fue disminuida a 600 rpm y se dejó continuar la polimerización por 24 horas más a 65°C (Figura 32).



Figura 32. Obtención de microesferas poliméricas magnéticas mediante polimerización en suspensión.

Recuperación del polímero:

Al terminar la polimerización, las microesferas se recuperaron por filtración y se lavaron con diferentes solventes para eliminar los monómeros, oligómeros y surfactantes residuales. Cada lavado se efectuó en un equipo soxhlet durante 24 horas. El primero se llevó a cabo con agua, el segundo con acetona y finalmente se empleó etanol en el último lavado.

Almacenamiento:

Las microesferas poliméricas magnéticas se almacenaron en etanol a 4°C antes de ser utilizadas.



5.3.4 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por SEM

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se analizó la morfología y tamaño de las microesferas poliméricas magnéticas obtenidas. Se empleó un microscopio JEOL modelo 5900LV trabajado a 20 kV, con una resolución de 3.5 Å y una amplificación hasta de 300,000. El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la USAI en la Facultad de Química.

5.3.5 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por difracción láser

Se analizó la distribución de tamaño de partícula de las microesferas poliméricas magnéticas mediante difracción de rayo láser empleando un equipo Mastersizer 2000 marca Malvern Instruments. Se empleó una mezcla de n-propanol con tween-80 (10:1 vol) como agente dispersante. Estos análisis se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

5.3.6 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por magnetometría de muestra vibrante

De igual manera que con el ferrofluido, también se obtuvo la curva de magnetización de las microesferas empleando un magnetómetro de muestra vibrante, para cuantificar la magnetización de saturación M_s así como la magnetización residual M_r del material sintetizado. Los estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de Propiedades Eléctricas y Magnéticas del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.



5.4.1 Pre-tratamiento de la lipasa de *Candida rugosa*

Se pesaron 2 gr de lipasa cruda comercial de *Candida rugosa*, la cual se disolvió en 60 ml de buffer de fosfatos (10 mM pH 7.0). Una vez solubilizada, la solución se centrifugó durante 20 minutos para separar los excipientes que contiene y que interfieren en el proceso de inmovilización. Se recuperó el sobrenadante proteico y se ultrafiltró por 40 minutos empleando membranas de 30 kDa para separar proteínas de peso molecular menor, tomando en cuenta que el peso molecular promedio de la lipasa de *Candida rugosa* es de 60kDa.



Figura 33. A) Solubilización de la lipasa CRL B) Separación de los excipientes presentes en la preparación comercial de CRL.

El contenido de proteína de las soluciones de *Candida rugosa* de cada una de las etapas anteriores se determinó empleando el método de Bradford. Para ello se construyó una curva patrón con soluciones de diferente concentración conocida de seroalbúmina serica bovina (BSA) en un rango entre 0.1 a 0.9 mg/mL (Anexo II). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2S.



5.4.2 Inmovilización

Una vez pre-tratada, la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) fue inmovilizada sobre microesferas poliméricas magnéticas mediante adsorción física. Antes de inmovilizar la enzima fue necesario secar las microesferas almacenadas en etanol y el secado del soporte se realizó en una estufa a 60°C durante 8 horas.

El proceso de inmovilización se llevó a cabo mediante la incubación de una solución de proteínas de concentración conocida (conteniendo CRL) junto con 0.5 gr de microesferas poliméricas magnéticas en un matraz erlenmeyer a 25°C y 100 rpm durante 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se determinó la diferencia de concentración de proteínas en la solución y mediante un balance de materia se calculó la cantidad de proteína adsorbida sobre las microesferas.

El biocatalizador (microesferas poliméricas magnéticas con enzima inmovilizada) se recuperó por separación magnética y se sometió a un lavado con buffer de fosfatos (10 mM pH 7.0) a 25°C y 100 rpm durante 48 horas para determinar una posible desorción de proteína. Finalmente, el biocatalizador se secó y almacenó a 4°C antes de ser utilizado.



5.4.3 Actividad catalítica

Mediante la reacción de transesterificación del acetato de vinilo con 1-butanol (Figura 34) usando hexano como medio orgánico, se determinó la actividad catalítica de la lipasa cruda, de las soluciones obtenidas en cada etapa del pre-tratamiento, así como en el biocatalizador obtenido.

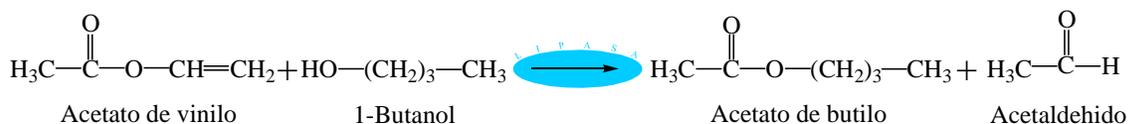


Figura 34. Reacción de transesterificación del acetato de vinilo con 1-butanol.

Lipasa cruda

Se pesaron muestras de 50 mg de lipasa cruda las cuales fueron ultracongeladas, liofilizadas y posteriormente pre-equilibradas a diferentes actividades acuosas empleando las siguientes soluciones salinas sobresaturadas: LiCl ($A_w=0.12$); MgCl₂ ($A_w=0.33$); Mg(NO₃)₂ ($A_w=0.54$); NaCl ($A_w=0.75$) y KNO₃ ($A_w=0.96$)

Biocatalizador

Del mismo modo, cierta cantidad de microesferas poliméricas magnéticas con lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada fueron ultracongeladas, liofilizadas y pre-equilibradas a los diferentes valores de A_w para llevar a cabo la reacción de transesterificación.

Reacción de transesterificación

Se mezclaron 0.5 mL (0.0054 mol) de acetato de vinilo junto con 0.3 mL (0.0032 mol) de 1-butanol y se llevó a 25 mL con hexano. La mitad de este volumen, se transfirió a un matraz erlenmeyer con tapón de rosca que no contiene lipasa, esto con el fin de tener un control.



En otro matraz se pesaron 50 mg de lipasa cruda comercial ó su equivalente en proteína inmovilizada sobre microesferas, y se adicionó el resto de la solución de acetato de vinilo con 1-butanol y hexano.

La reacción de transesterificación se llevó a cabo incubando los matraces a 45°C y 210 rpm durante 30 minutos, tomando alícuotas de 0.5 mL en diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 5, 10, 20 y 30 minutos). Las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases, determinando la aparición del producto acetato de butilo. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 110°C y 140°C respectivamente. La columna se mantuvo a 35°C por tres minutos, se programó a 85°C a una velocidad de 10°C/minuto y se empleó nitrógeno como gas acarreador.



6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1.1 Obtención del ferrofluido de magnetita

Se sintetizó un ferrofluido de magnetita mediante la co-precipitación de sales de hierro (II) y hierro (III) en presencia de hidróxido de amonio. Este ferrofluido se sometió a la acción de un campo magnético mediante un imán y se observó respuesta a éste. (Figura 35).



Figura 35. Ferrofluido de magnetita sintetizado, sometido a la acción de un campo magnético externo.

6.1.2 Caracterización de la magnetita por difracción de rayos X (XRD)

En la Figura 36 se presenta el patrón de difracción de rayos X para la magnetita sintetizada en el laboratorio:

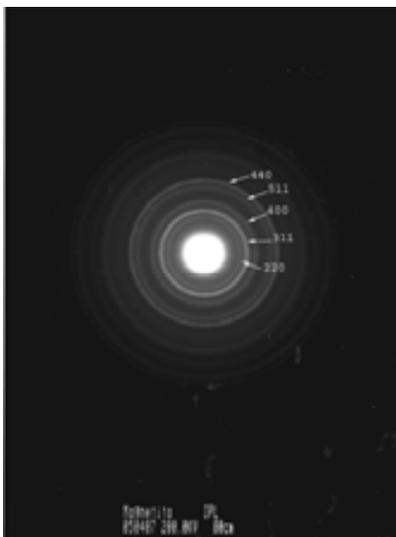


Figura 36. Patrón de difracción de rayos X para la magnetita sintetizada.



Este patrón de difracción se comparó con un estándar de magnetita (Anexo III) perteneciente a la Joint Committee of Powder Diffraction Standards (JCPDS). Empleando la ley de Bragg se calcularon las distancias y se confrontaron con las del estándar. Midiendo el negativo de la Figura 36 se obtuvieron los radios de los anillos identificados en el patrón (Hkl), como se aprecia en la Tabla 3.

Diámetros mm	Radios cm	Hkl
13.0	0.650	220
15.2	0.760	311
18.25	0.925	400
23.5	1.125	511
26.0	1.300	440

Tabla 3. Diámetros medidos sobre el patrón de difracción de rayos X para la magnetita sintetizada.

Aplicando la ley de Braggs y comparando las distancias obtenidas con las reportadas en el patrón, se calcularon los datos de la Tabla 4:

Distancia calculada Å	Distancia reportada Å	Hkl
2.960	2.967	220
2.531	2.532	311
2.080	2.099	400
1.637	1.615	511
1.480	1.484	440

Tabla 4. Comparación de resultados para la magnetita sintetizada y el estándar de magnetita.

Como se puede observar, las distancias calculadas son similares a las distancias reportadas en el estándar por lo que se puede deducir que el patrón de difracción obtenido pertenece al de la magnetita.



6.1.3 Caracterización de magnetita por TEM

Se obtuvieron micrografías mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), las cuales fueron digitalizadas para determinar el tamaño promedio así como la desviación estándar de las nanopartículas de magnetita estabilizada con ácido oleico, como se aprecia en la Figura 37.

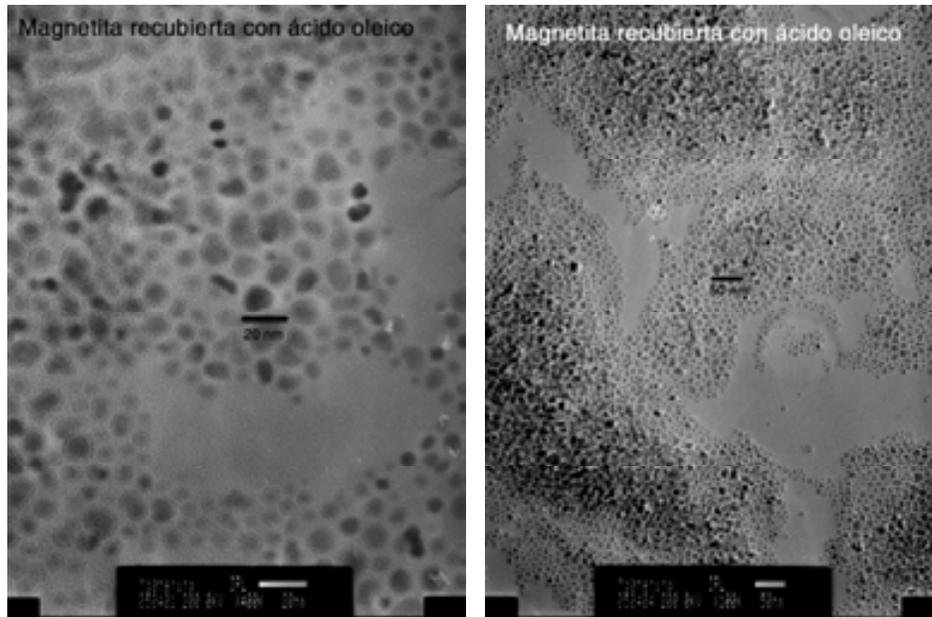


Figura 37. Micrografías de las partículas de magnetita obtenidas por microscopía de transmisión electrónica (TEM).



El diámetro promedio de las nanopartículas de magnetita estabilizadas con ácido oleico fue de 8.44 nm, con una desviación estándar de 2.30 nm; en la Figura 38 se presenta el histograma de la distribución de tamaño.

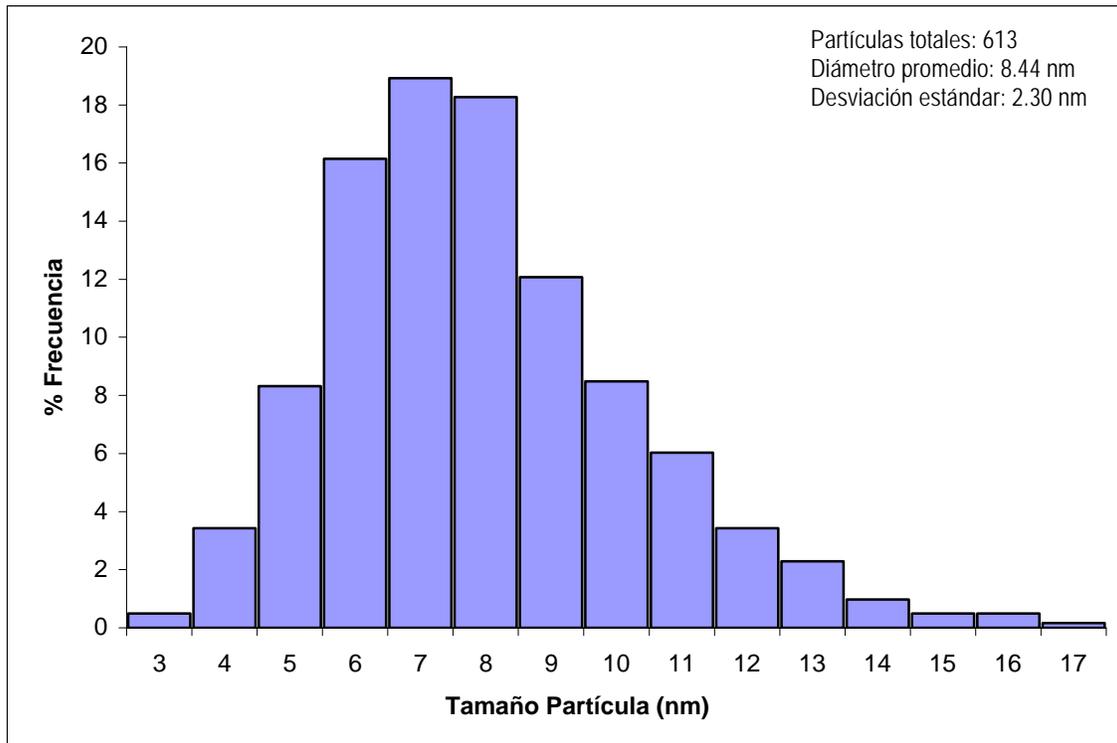


Figura 38. Histograma de distribución de tamaño de las partículas de magnetita estabilizada con ácido oleico.



6.1.4 Caracterización de magnetita por magnetometría de muestra vibrante

Se obtuvo la curva de magnetización para la magnetita sintetizada empleando un magnetómetro de muestra vibrante, aplicando un campo máximo de 15,000 oersteds, Oe, como se aprecia en la Figura 39.

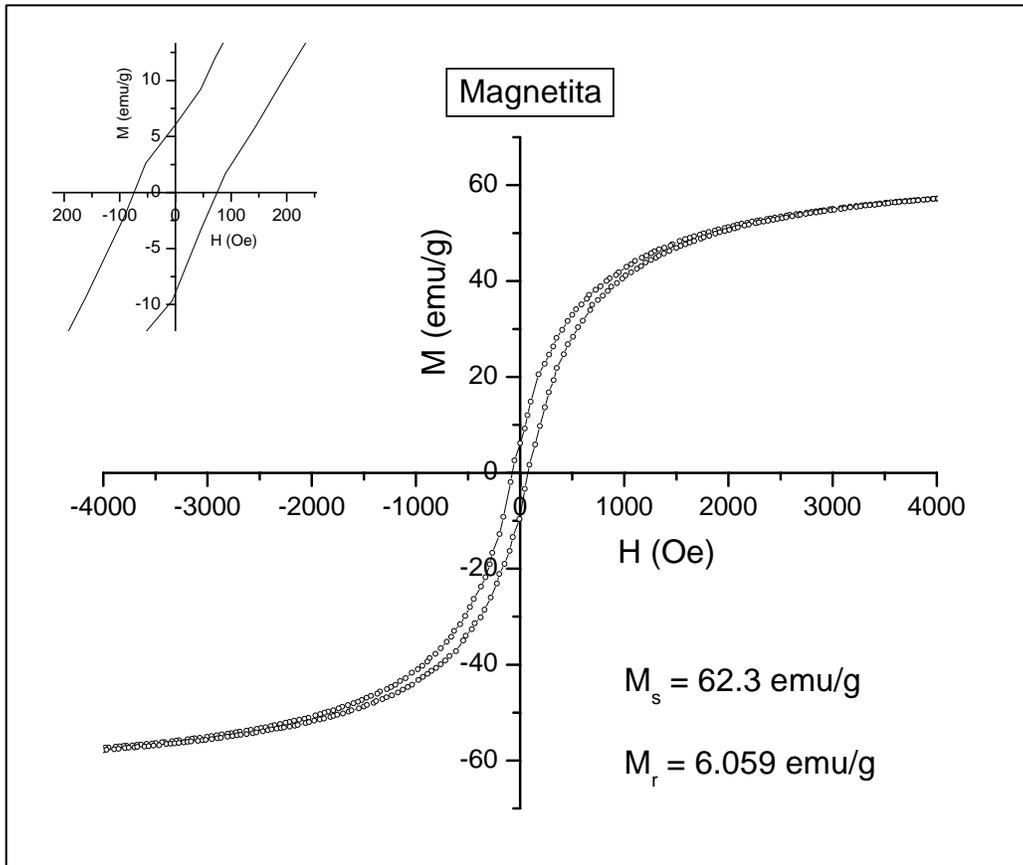


Figura 39. Curva de magnetización para la magnetita sintetizada, la gráfica que se muestra en la esquina superior izquierda es una amplificación del origen de la curva.

La magnetita presenta el comportamiento de un material superparamagnético con un ciclo de histéresis pequeño. Se determinó su magnetización de saturación, la cual fue de 62.3 emu/g así como una magnetización residual de 6.059 emu/g.



6.2.1 Obtención de microesferas poliméricas magnéticas

La Figura 40 presenta una fotografía de las microesferas poliméricas magnéticas. Para ello se sintetizaron recubriendo nanopartículas de magnetita estabilizada empleando acetato de vinilo con divinil benceno mediante una polimerización en suspensión por radicales libres, utilizando AIBN como iniciador.



Figura 40. Microesferas poliméricas magnéticas obtenidas encapsulando magnetita mediante polimerización en suspensión de acetato de vinilo con divinil benceno.

Al igual que el ferrofluido, las microesferas poliméricas también responden a la presencia de un campo magnético externo como se aprecia en la figura 41.

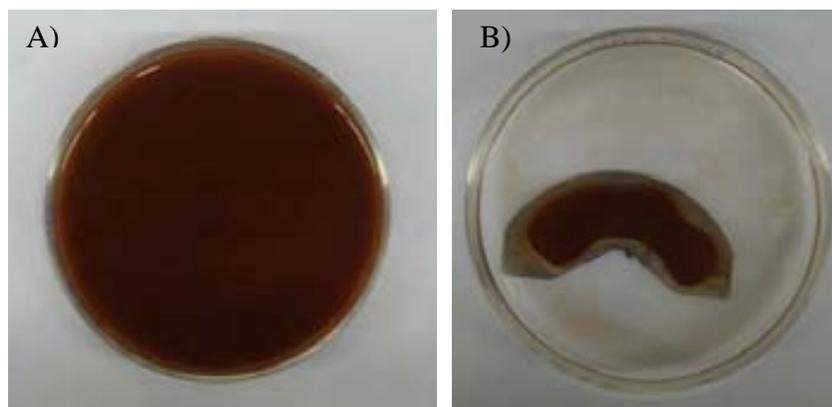


Figura 41. A) Microesferas poliméricas en solución. B) Recuperación de las microesferas poliméricas magnéticas empleando un campo magnético externo.



6.2.2 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por SEM

Se analizó la morfología y el tamaño del polímero obtenido mediante microscopía de barrido electrónico (SEM). El polímero presenta la forma de esferas con superficies rugosas y tamaños de partícula que oscilan entre 1 y 25 micras, como se puede apreciar en las siguientes micrografías (Figuras 42, 43 y 44).

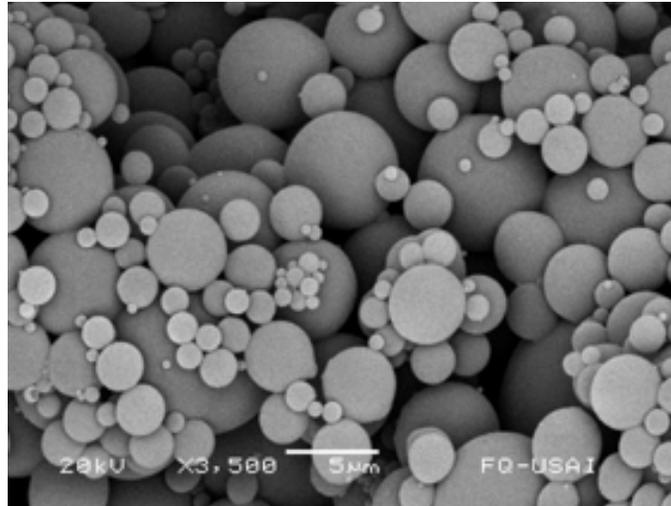


Figura 42. Micrografía obtenida por SEM de las esferas poliméricas magnéticas obtenidas en el laboratorio.

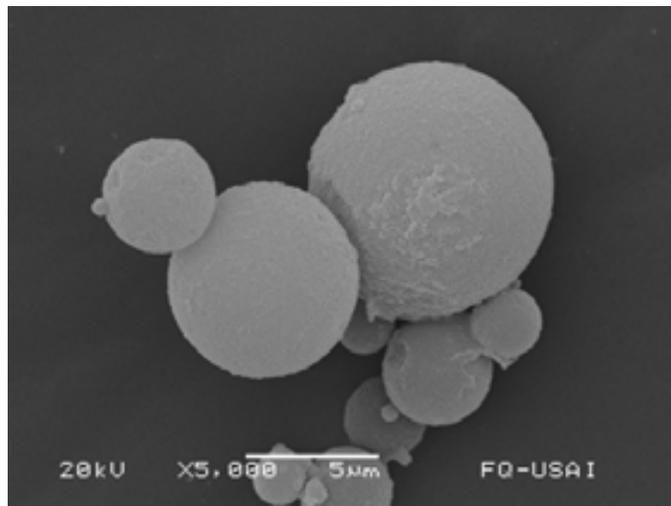


Figura 43. Se observan microesferas de diferente tamaño las cuales presentan superficies rugosas.

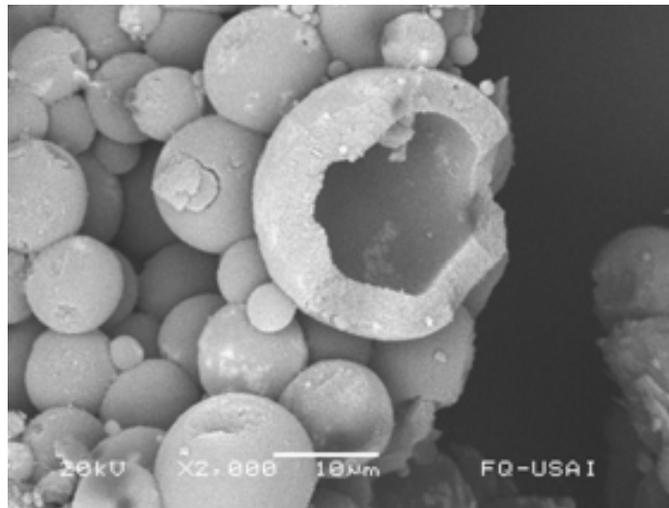


Figura 44. En esta imagen, se aprecia una microesfera rota, la cual ha perdido su núcleo de magnetita.

6.2.3 Caracterización de microesferas poliméricas magnéticas por láser

Se analizó la distribución de tamaño de las microesferas mediante difracción láser (Figura 45). Los resultados obtenidos arrojan un tamaño promedio de partícula de 15 micras que concuerdan con las micrografías obtenidas por SEM. Así mismo en la gráfica se puede apreciar una pequeña fracción de microesferas comprendidas entre 0.1-1 μm así como otra fracción correspondiente a agregados de microesferas entre 500-2000 μm .

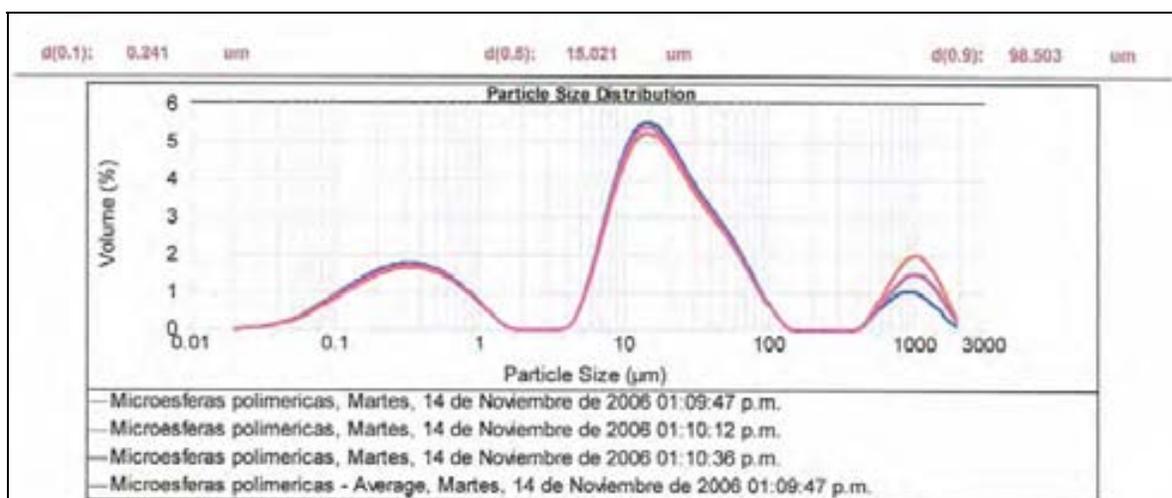


Figura 45. Distribución de tamaño de partícula de las microesferas poliméricas magnéticas mediante difracción láser.



6.2.4 Caracterización de microesferas poliméricas magnética por magnetometría de muestra vibrante

Al igual que con la magnetita, las microesferas poliméricas magnéticas se analizaron empleando un magnetómetro de muestra vibrante con un campo máximo aplicado de 15,000 oe para obtener su magnetización de saturación, así como su magnetización residual (Figura 46).

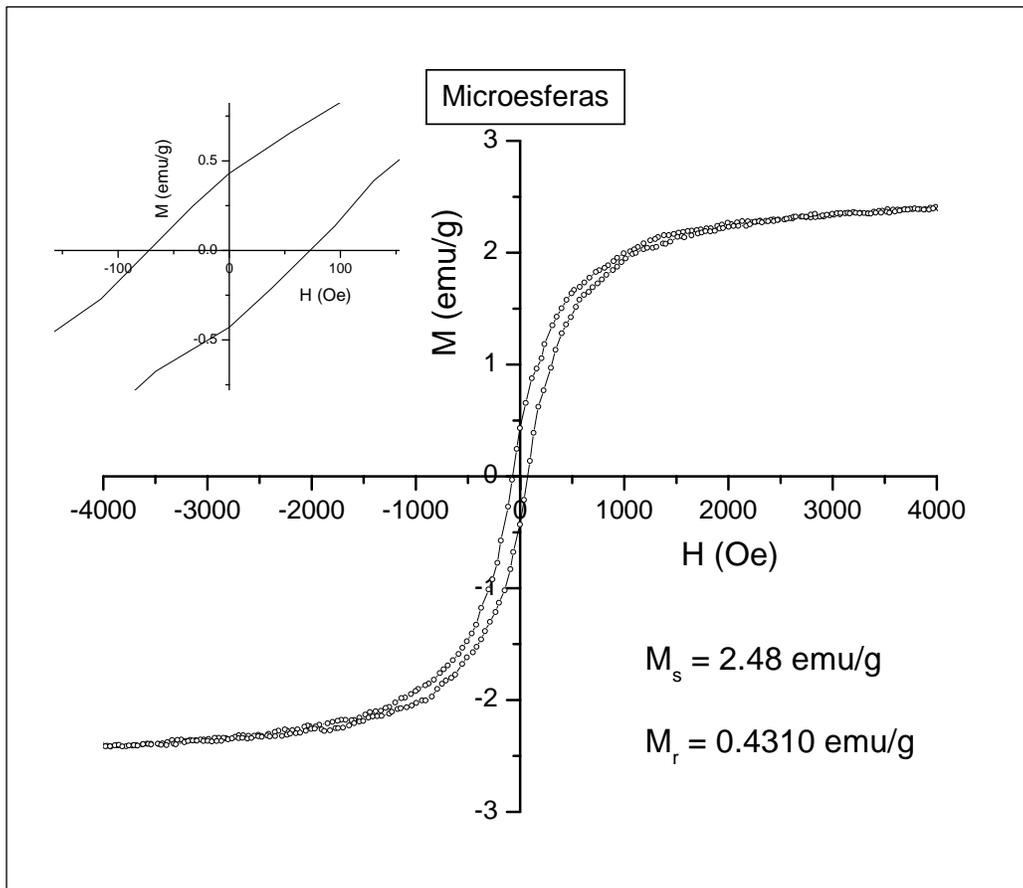


Figura 46. Curva de magnetización para las microesferas poliméricas obtenidas en el laboratorio. La gráfica que se presenta en la esquina superior izquierda es una ampliación del origen de la curva.

Las microesferas poliméricas magnéticas, también presentan un comportamiento superparamagnético, reflejado por un ciclo de histéresis pequeño y una magnetización residual baja.



La magnetización de saturación para las microesferas fue de 2.48 emu/g, mucho menor al valor encontrado para la magnetita, este decremento se debe a la presencia de material no magnético (polímero) en las microesferas.

6.3.1 Pre-tratamiento de la lipasa de *Candida rugosa*

La lipasa cruda comercial de *Candida rugosa* fue tratada antes de inmovilizarla para remover los excipientes y otras proteínas presentes. Este tratamiento consistió de tres etapas: solubilización, centrifugación y ultrafiltración, en cada etapa se determinó la concentración de proteína, las unidades, la actividad específica, y el porcentaje de recuperación (%R). Se definió a la unidad como la producción de 1 μmol de acetato de butilo por minuto por mg de proteína. La Tabla 5 presenta los resultados obtenidos.

Etapa	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Proteínas (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min mg prot}$)	Unidades totales ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	%R
Solubilización	60.0	0.63	37.8	22.31	843	100
Centrifugación	55.2	0.53	29.3	19.85	579	89
Ultrafiltración (Retenido)	20.96	0.95	19.91	25.23	500	59
Ultrafiltración (Filtrado)	32.24	0.12	3.87	0	0	0

Tabla 5. Pretratamiento de la lipasa de *Candida rugosa* antes de ser inmovilizada. El porcentaje de recuperación (%R) se calculo como la actividad específica de cada etapa entre la actividad específica inicial.



6.3.2 Inmovilización de CRL sobre microesferas poliméricas magnéticas

En la Tabla 6 se presenta la cantidad de microesferas empleadas, las concentraciones iniciales y finales de la solución de proteínas conteniendo lipasa de *Candida rugosa*, así como la cantidad de proteína adsorbida sobre las microesferas magnéticas.

Lote	Microesferas (gr)	Soln de proteínas (mL)	Conc inicial (mg/mL)	Conc final (mg/mL)	Prot adsorbida (mg prot/gr microesf)
Micro-1	0.5026	20.0	0.7905	0.1945	23.71
Micro-2	0.5049	12.4	0.9474	0.2788	16.42
Micro-3	0.4136	20.0	0.3557	0.0347	15.52
Micro-4	0.5113	30.0	0.7742	0.3370	25.65
Micro-5	0.5287	15.0	0.3100	0.1690	4.00

Tabla 6. Microesferas poliméricas magnéticas con lipasa CRL inmovilizada, se presentan los cuatro lotes obtenidos, así como la proteína adsorbida en cada caso.

En todos los casos se presenta la adsorción de proteína sobre las microesferas poliméricas magnéticas. Durante los lavados con buffer posteriores a la inmovilización no se detectó proteína ni actividad catalítica en el sobrenadante, por lo que no se observó el fenómeno de desorción de la lipasa.



6.3.3 Actividad catalítica de la lipasa cruda e inmovilizada

Lipasa cruda de *Candida rugosa*

Se determinó la actividad catalítica de la lipasa cruda comercial de *Candida rugosa* a diferentes valores de A_w , empleando la reacción de transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol (Figura 47).

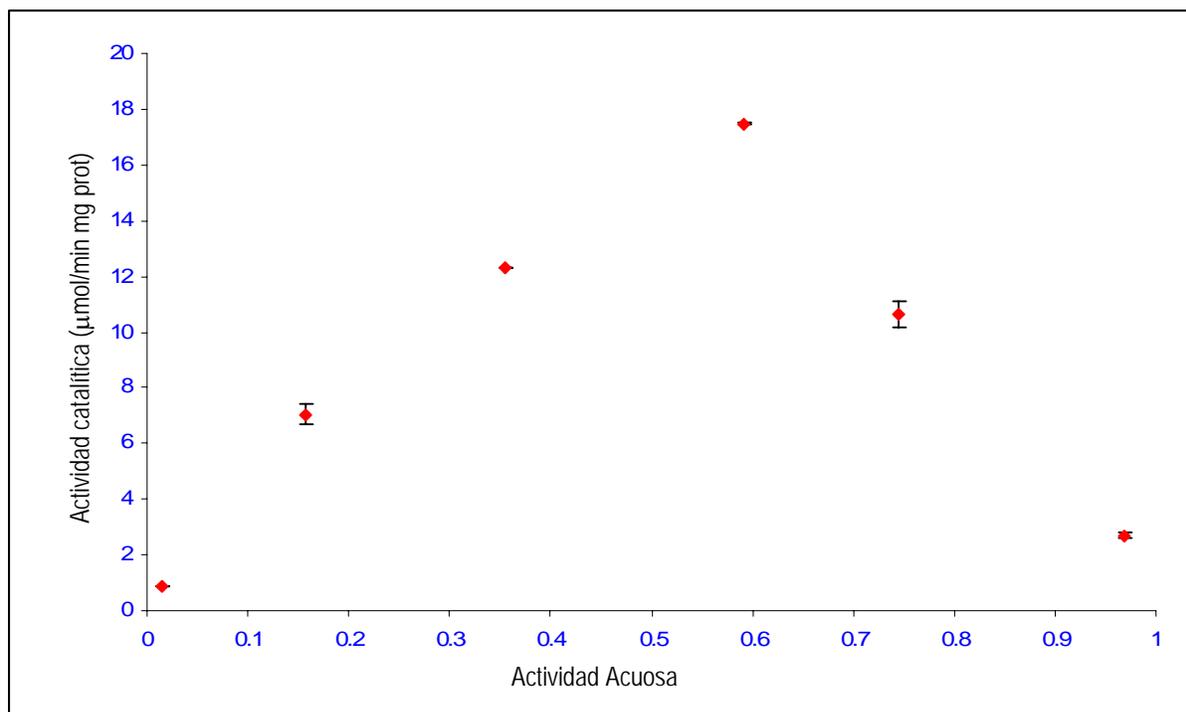


Figura 47. Actividad catalítica de la lipasa cruda de *Candida rugosa* para la reacción de transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol a diferentes valores de actividad acuosa.

Se observa actividad catalítica apreciable en el rango de A_w comprendido entre 0.16 y 0.75, donde el valor más alto de actividad ($17.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$) se obtuvo ajustando la lipasa a un valor de A_w de 0.59.



Empleando un A_w de 0.015 la lipasa esta prácticamente seca y no tiene la cantidad de agua suficiente para llevar a cabo su función catalítica debido a la rigidez que presenta, lo que se ve reflejado en un valor de actividad catalítica muy bajo ($0.86 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$). Por otro lado, empleando un A_w de 0.968, la lipasa forma grandes aglomerados los cuales se encuentran rodeados por una capa de agua. Estos grumos no se dispersan en la fase orgánica obteniéndose una actividad catalítica pobre ($2.69 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$).

Lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada sobre microesferas poliméricas magnéticas

Se determinó la actividad catalítica de la lipasa inmovilizada sobre las microesferas poliméricas magnéticas. Debido a la cantidad limitada de soporte que se obtuvo en cada lote, se llevaron a cabo pruebas a diferentes valores de actividad acuosa empleando diferentes lotes de microesferas.

Lote	Proteína inmovilizada (mg proteína/ gr microesfera)	Actividad acuosa A_w	Actividad ($\mu\text{mol/min mg prot}$)
Micro-1	23.71	0.21	1.64
		0.36	7.39
		0.48	5.99
		0.64	7.34
Micro-2	16.42	0.19	0.58
		0.38	6.26
		0.55	5.33
		0.73	8.10
Micro-3	15.52	0.38	7.41
		0.57	5.03
Micro-4	25.65	0.76	3.74
		0.93	3.05
Micro-5	4.00	0.44	5.53

Tabla 7. Actividad catalítica observada en los diferentes lotes obtenidos a diferentes valores de A_w .



Se observó actividad catalítica a diferentes valores de A_w para todos los soportes sintetizados (Micro-1, Micro-2, Micro-3 y Micro-4). En el rango de A_w entre 0.36 y 0.76 se presentaron los mejores valores de actividad para el biocatalizador obtenido.

En la siguiente gráfica se presentan perfiles de actividad catalítica tanto para la lipasa cruda así como para el biocatalizador obtenido (Figura 48).

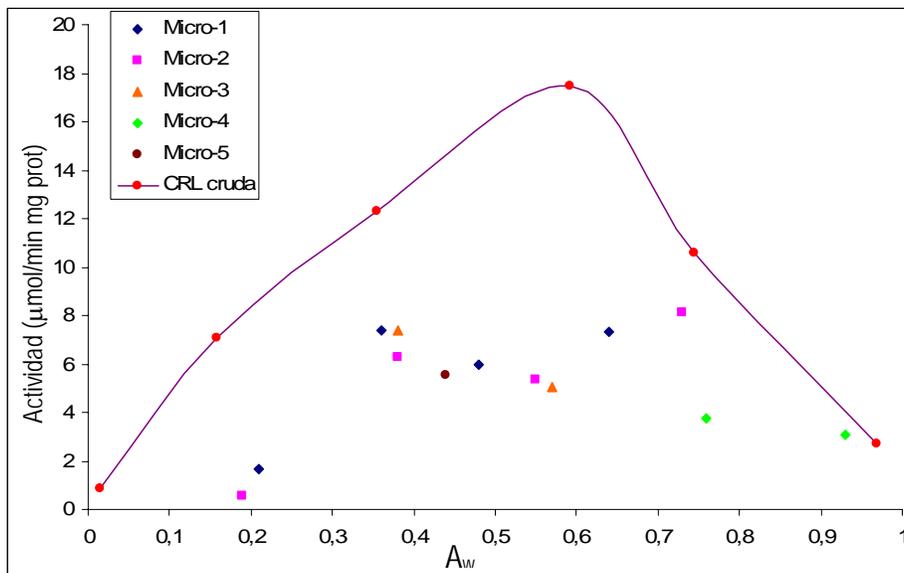


Figura 48. Valores de actividad catalítica obtenidos para la lipasa cruda y para el biocatalizador.

De acuerdo a lo esperado, los valores de actividad catalítica obtenidos empleando el biocatalizador resultaron menores que para la lipasa cruda, seguramente existe pérdida de actividad debido a que en las microesferas la lipasa se encuentra inmovilizada, es decir, esta confinada a un sitio más específico y presenta más restricciones de movilidad en comparación con la lipasa cruda.



Para los lotes Micro-3 y Micro-5 el biocatalizador es recuperado después de la reacción de transesterificación mediante el empleo de un imán. Una vez recuperado, el biocatalizador es reacondicionado mediante liofilización y ajuste de la actividad acuosa para ser utilizado nuevamente, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8.

Lote	Uso	Proteína inmovilizada (mg proteína/ gr microesfera)	Actividad acuosa A_w	Actividad ($\mu\text{mol}/\text{min mg prot}$)
Micro-3	Primer	15.52	0.38	7.41
Micro-3	Segundo	15.52	0.45	2.29
Micro-5	Primer	4.00	0.44	5.52
Micro-5	Segundo	4.00	0.43	3.39

Tabla 8. Reutilización del biocatalizador en la reacción de transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol.

El biocatalizador obtenido se recupera del medio de reacción más fácilmente lo que permite una fácil separación del medio así como un reacondicionamiento y reutilización, condición imposible de alcanzar con enzima soluble.

Este biocatalizador puede ser empleado para llevar a cabo reacciones enzimáticas en medios no convencionales como diferentes solventes, líquidos iónicos, fluidos supercríticos y reacciones con sustratos gaseosos. El método puede hacerse fácilmente extensivo a otras enzimas de interés.



7. CONCLUSIONES

Se sintetizaron partículas nanométricas de magnetita mediante la co-precipitación de sales de hierro (II) y hierro (III) en presencia de hidróxido de amonio. La magnetita fue estabilizada empleando ácido oleico evitando la aglomeración de las partículas. Se comprobó su respuesta a la presencia de un campo magnético externo. La comparación entre el patrón de difracción de rayos X entre la magnetita sintetizada y el estándar fue positivo.

La magnetita fue caracterizada por TEM y se obtuvo un tamaño promedio de partícula de 8.4 nm. Se analizó la curva de magnetización de las nanopartículas de magnetita, así como su magnetización de saturación (62.3 emu/g).

Las microesferas poliméricas magnéticas fueron sintetizadas mediante la copolimerización del acetato de vinilo con divinil benceno por radicales libres empleando AIBN como iniciador. Empleando SEM se observó que las microesferas presentan superficies rugosas. El tamaño promedio de las microesferas fue de 15 micras empleando difracción láser.

Se comprobó la respuesta de las microesferas poliméricas magnéticas en presencia de un campo magnético externo. Se obtuvo la curva de magnetización de las microesferas, así como su magnetización de saturación (2.48 emu/g) mediante magnetometría de muestra vibrante.



Se logró inmovilizar a la lipasa de *Candida rugosa* por adsorción física sobre las microesferas poliméricas magnéticas. No se observó pérdida de proteína durante el lavado. Se determinó la actividad catalítica del biocatalizador empleando la reacción de transesterificación del acetato de vinilo con 1-butanol en hexano a diferentes valores de A_w .

Los mayores valores de actividad catalítica para el biocatalizador obtenido se presentaron en un rango de A_w entre 0.36 y 0.76.

El biocatalizador puede ser recuperado, reacondicionado y reutilizado en la reacción de transesterificación del acetato de vinilo con 1-butanol en la cual sigue presentando actividad catalítica, condición difícil de alcanzar con la enzima cruda.

El biocatalizador obtenido presenta propiedades magnéticas las cuales facilitan su separación y recuperación del medio de reacción. Este biocatalizador puede emplearse para llevar a cabo reacciones en medio orgánico así como líquidos iónicos y fluidos supercríticos.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Veiga V., Peniche C; Obtención y caracterización de magnetita superparamagnética. *Revista Cubana de Química*, Vol. IX, No. 1, 77-82 (1997)
2. Shen L., Laibinis P.; Aqueous magnetic fluids stabilized by surfactant bilayers. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol. 194, 37-44, (1999)
3. Berger P., Nicholas B.; Preparation and Properties of an Aqueous Ferrofluid. *Journal of Chemical Education*, Vol. 76 No. 7, 943-948 (1999)
4. García-Cerda L., Rodríguez-Fernández O.; Síntesis y Propiedades de Ferrofluidos de Magnetita. *Superficies y Vacío*, Vol. 16 No. 1, 28-31 (2003)
5. Shen L., Laibinis P.; Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces. *Langmuir*, Vol. 15, 447-453, (1999)
6. Papell S. S.; Low Viscosity Magnetic Fluid Obtained by the Colloidal Suspension of Magnetic Particles. U. S. Patent 3 215 572, Nov. 2, (1965)
7. Wilson K., Harris L.; A generalized method for magnetite nanoparticle steric stabilization utilizing block copolymers containing carboxylic acids. *European Cells and Materials*, Vol. 3, 206-209, (2002)
8. Xianqiao L., Yueping G.; Preparation of superparamagnetic immunomicrospheres and application for antibody purification. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 94, 2205-2211, (2004)
9. Xue B., Sun Y.; Fabrication and characterization of a rigid magnetic matrix for protein adsorption. *Journal of Chromatography A*, Vol. 947, 185-193, (2002)



10. Dailey J., Phillips J.; Synthesis of silicone magnetic fluid for use in eye surgery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol. 194, 140-148, (1999)
11. Tsafnat N., Tsafnat G.; Modelling heating of liver tumours with heterogeneous magnetic microsphere deposition. *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 50, 2937-2953, (2005)
12. Bacri J., Perzynsky R.; Ionic ferrofluids: a crossing of chemistry and physics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol. 85, 27-32, (1990)
13. Wooding A., Kilner M.; Studies of the Double Surfactant Layer Stabilization of Water-Based Magnetic Fluids. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 144 No. 1 (1991)
14. Harris L.; Polymer Stabilized Magnetite Nanoparticles and Poly(propylene oxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks. Blacksburg, Virginia (2002)
15. Strable E., Bulte J.; Synthesis and characterization of soluble iron oxide-dendrimer composites. *Chemical Materials*, Vol. 13, 2201-2209, (2001)
16. Dresco P., Zaitsev V.; Preparation and properties of magnetite and polymer magnetite nanoparticles. *Langmuir*, Vol. 15, 1945-1951, (1999)
17. Yaacob I., Nunes A.; Magnetic nanoparticles produced in spontaneous cationic-anionic vesicles: room temperature synthesis and characterization. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 171, 73-84, (1995)
18. Wong K., Douglas T.; Biomimetic Synthesis and Characterization of Magnetic Proteins (Magnetoferritin). *Chemistry of Materials*, Vol. 10, 279-285, (1998)
19. Bulte J., Cuyper M.; Preparation, relaxometry, and biokinetics of PEGylated magnetoliposomes as MR contrast agent. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol. 194, 204-209, (1999)



20. Pardoe H., Chua-anusorn W.; Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol. 225, 41-46, (2001)
21. Kahn J., Thiessen M.; Nano's Big Future. *National Geographic Magazine*, 86-107, June (2006)
22. Sinan Akgöl, Yasemin Kaçar; Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinyl alcohol microspheres. *Food Chemistry*, Vol. 74, 281-288, (2001)
23. Bagi K., Simon L.; Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 20, 531-535, (1997)
24. Bastida A., Sabuquillo P.; A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 58, No. 5, 486-493, (1998)
25. Yakup A., Handan Y.; Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 11, 127-138, (2000)
26. Bozhinova D., Galunsky B.; Evaluation of magnetic polymer micro-beads as carriers of immobilized biocatalysts for selective and stereoselective transformations. *Biotechnology Letters*, Vol. 26, 343-350, (2004)
27. Katchalski-Katzir E.; Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. *Trends In Biotechnology*, Vol. 11, 471-478, (1993)
28. Vulfson E.; Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 4, 209-215, (1993)



29. Shu B., Zheng G.; Resolution of (\pm)-menthol by immobilized *Candida rugosa* lipase on superparamagnetic nanoparticles. *Food Chemistry*, Vol. 96, 1-7, (2006)
30. Liu Z., Yang X.; Preparation and characterization of magnetic P(St-co-MAA-co-AM) Microspheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol. 302, 529-535, (2006)
31. Müller-Schulte; Preparation of polyvinyl alcohol-based magnetic particles for binding biomolecules; United States Patent, US 6,204,033 B1, (2001)
32. Leigh B., Mary M.; Microspheres Part 1: Selection, cleaning, and characterization. *IVD Technology Magazine*, March, (1995)
33. Munro P., Dunnill P.; Nonporous magnetic materials as enzyme supports: studies with immobilized chymotrypsin. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XIX, 101-124, (1977)
34. Bahar T., Çelebi S.; Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 23, 301-304, (1998)
35. Bahar T., Çelebi S.; Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 26, 28-33, (2000)
36. Peniche H., Peniche C.; Preparación y caracterización de microesferas magnéticas de poliestireno. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol. 3, 15-32, (2002)
37. Kondo A., Kamamura H.; Development and application of thermo-sensitive magnetic immunospheres for antibody purification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 41, 99-105, (1994)



38. Horák D.; Magnetic polyglycidylmethacrylate microspheres by dispersion polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 39, 3707-3715, (2001)
39. Zheng G., Shu B.; Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 32, 776-782, (2003)
40. Santa Maria L., Marcia L.; Characterization of magnetic microspheres based on network styrene and divinylbenzene copolymers. *Materials Letters*, Vol. 58, 3001-3006, (2004)
41. Young R., Lovell P.; *Introduction to polymers*. Second edition. Chapman & Hall
42. Arroyo M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica* Vol. 39, No. 2, 23-39 (1998)
43. Houde A., Kademi A.; Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 118, 155-170, (2004)
44. Rúa M., Mauriño T.; Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1156, 181-189 (1993)
45. Fernández-Lafuente R., Armisén P.; Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol. 93, 185-197 (1998)
46. Burkert J., Maugeri F.; Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, Vol. 91, 77-84, (2004)
47. Benjamin S., Pandey A.; *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. *Yeast*, Vol. 14, 1069-1087, (1998)



48. Jaeger K., Eggert T.; Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 13, No. 4, 390-397 (2002)
49. Palomo J., Muñoz G.; Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 19-20, 279-286, (2002)
50. Grochulski P., Li Y.; Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science*, Vol. 3, 82-91, (1994)
51. Pernas M., López C.; Structural basis for the kinetics of *Candida rugosa* Lip 1 and Lip 3 isoenzymes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 26, 67-74, (2002)
52. Bell G., Halling P.; Biocatalyst behavior in low-water systems. *TIBTECH*, Vol. 13, 468-473, (1995)
53. Chowdary G., Prapulla S.; The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochemistry*, Vol. 38, 393-397, (2002)
54. Sánchez A., Ferrer P.; Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 25, 214-223, (1999)
55. Pernas M., López C.; Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Journal of Biotechnology*, Vol. 84, 163-174, (2000)
56. Mancheño J., Pernas M.; Structural Insights into the Lipase/esterase Behavior in the *Candida rugosa* Lipases Family: Crystal Structure of the Lipase 2 Isoenzyme at 1.97 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 332, 1059-1069, (2003)



57. Fadiloglu S., Söylemez Z.; Olive Oil Hydrolysis by Celite-Immobilized *Candida rugosa* Lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46, 3411-3414, (1998)
58. Magnin D., Dumitriu S.; Lipase Immobilization into Porous Chitoxan Beads: Activities in Aqueous and Organic Media and Lipase Localization. *Biotechnology Progress*, Vol. 17, 734-737, (2001)
59. Scintag, Inc.; Basics of X-ray Diffraction, Chapter 7. Pages 7.1-7.25, (1999)
60. A. Rosales Rivera, J. A. Restrepo, M. A. Sanin; Desarrollo de un magnetómetro de muestra vibrante. *Revista Colombiana de Física*, Vol. 38, No. 1, 77-80, (2006)
61. Christopher K. Mathews, K. E. van Holde, Kevin G. Ahern. *Bioquímica Tercera Edición*. Pearson Educación, Madrid (2002)
62. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler. *Química Analítica Sexta Edición*. McGraw-Hill (1999)
63. Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
64. Herman F. Mark, Norbert M. Bikales, Charles G. Overberger. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering Second Edition*. Volume 16 Styrene Polymers to Toys.



Apéndice I. Identificación y clasificación de residuos peligrosos⁶³

A1.1 Disposición del material

Los residuos peligrosos, en cualquier estado físico, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, inflamables, tóxicas y biológico-infecciosas, y por su forma de manejo pueden representar un riesgo para el equilibrio ecológico, el ambiente y la salud de la población en general, por lo que es necesario determinar los criterios, procedimientos, características y listados que los identifiquen.

Los avances científicos y tecnológicos y la experiencia internacional sobre la caracterización de los residuos peligrosos han permitido definir como constituyentes tóxicos ambientales, agudos y crónicos a aquellas sustancias químicas que son capaces de producir efectos adversos a la salud o al ambiente.

La Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005 establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Esta norma oficial mexicana es de observancia obligatoria en lo conducente para los responsables de identificar la peligrosidad de un residuo.

A1.2 Definiciones

Constituyente tóxico.- Cualquier sustancia química contenida en un residuo y que hace que éste sea peligroso por su toxicidad, ya sea ambiental, aguda o crónica.

CRETIB.- El acrónimo de clasificación de las características a identificar en los residuos peligrosos y que significa: corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico ambiental, inflamable y biológico-infeccioso



CRIT.- El acrónimo de clasificación de las características a identificar en los residuos peligrosos y que significa: corrosivo, reactivo, inflamable y tóxico ambiental.

Extracto PECT.- El lixiviado a partir del cual se determinan los constituyentes tóxicos del residuo y su concentración con la finalidad de identificar si éste es peligroso por su toxicidad al ambiente.

Fuente específica.- Las actividades que generan residuos peligrosos y que están definidas por giro o proceso industrial.

Fuente no específica.- Las actividades que generan residuos peligrosos y que por llevarse a cabo en diferentes giros o procesos se clasifican de manera general.

PECT.- Procedimiento de Extracción de Constituyentes Tóxicos.

Residuos peligrosos resultado del desecho de productos fuera de especificaciones o caducos.- Sustancias químicas que han perdido, carecen o presentan variación en las características necesarias para ser utilizados, transformados o comercializados respecto a los estándares de diseño o producción originales.

Toxicidad.- La propiedad de una sustancia o mezcla de sustancias de provocar efectos adversos en la salud o en los ecosistemas

Toxicidad ambiental.- La característica de una sustancia o mezcla de sustancias que ocasiona un desequilibrio ecológico.



Toxicidad aguda.- El grado en el cual una sustancia o mezcla de sustancias puede provocar, en un corto periodo de tiempo o en una sola exposición, daños o la muerte de un organismo.

Toxicidad crónica.- Es la propiedad de una sustancia o mezcla de sustancias de causar efectos dañinos a largo plazo en los organismos, generalmente a partir de exposiciones continuas o repetidas y que son capaces de producir efectos cancerígenos, teratogénicos o mutagénicos.



A1.3 Procedimiento para determinar si un residuo es peligroso

El procedimiento para determinar si un residuo es peligroso se presenta en la Figura 49.

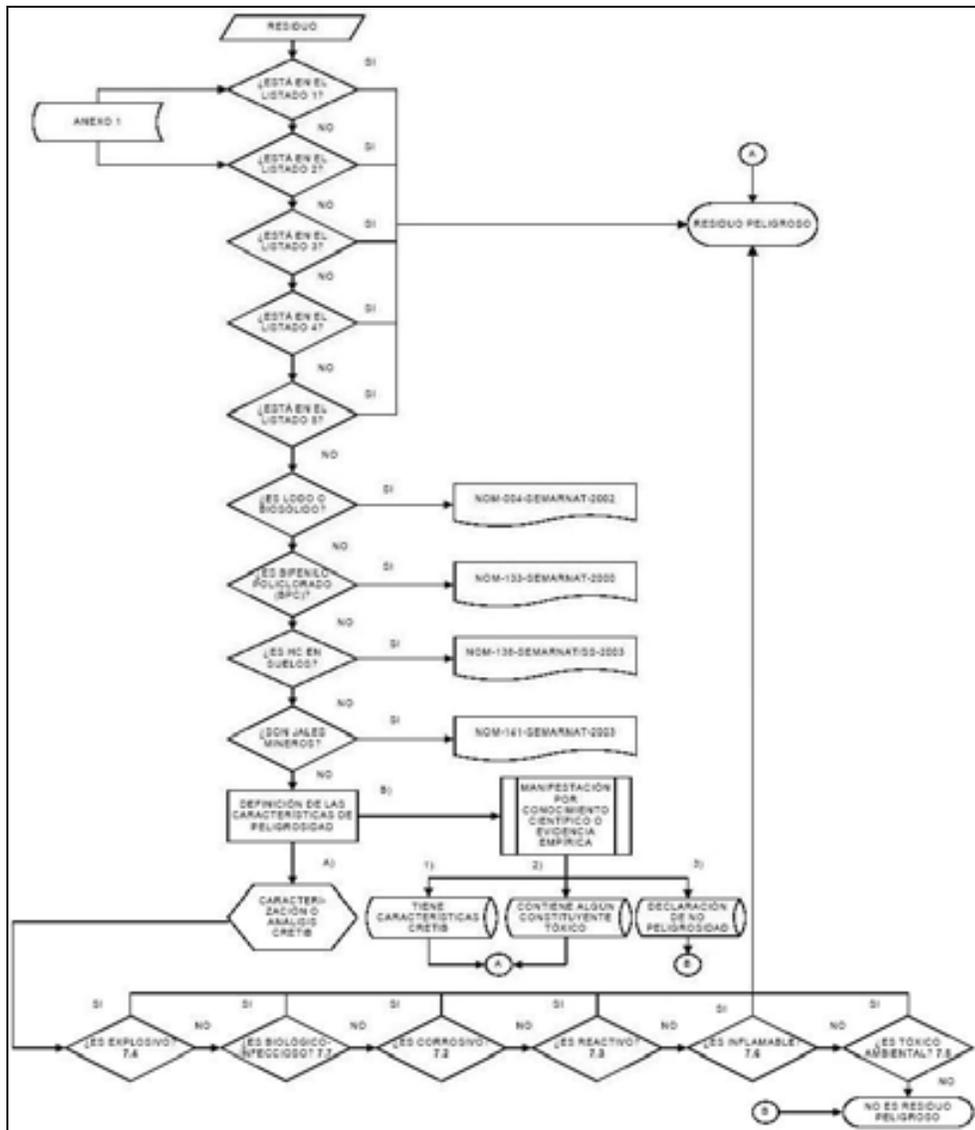


Figura 49. Diagrama de flujo del procedimiento para identificar la peligrosidad de un residuo (Listados y Caracterización)



Un residuo es peligroso si se encuentra en alguno de los listados contenidos en la norma NOM-052-SEMARNAT 2005.

Listado 1: Clasificación de residuos peligrosos por fuente específica.

Listado 2: Clasificación de residuos peligrosos por fuente específica.

Listado 3: Clasificación de residuos peligrosos resultado del desecho de productos químicos fuera de especificaciones o caducos (Tóxicos Agudos).

Listado 4: Clasificación de residuos peligrosos resultado del desecho de productos químicos fuera de especificaciones o caducos (Tóxicos Crónicos).

Listado 5: Clasificación por tipo de residuos, sujetos a Condiciones Particulares de Manejo.

Las toxicidades aguda y crónica referidas en los Listados 1, 2, 3 y 4 de la NOM-052-SEMARNAT-2005 no están contempladas en los análisis a realizar para la determinación de las características CRIT de peligrosidad de los residuos.

Los lodos y biosólidos están regulados por la NOM-004-SEMARNAT-2002

A1.4 Características que definen a un residuo como peligroso

El residuo es peligroso si presenta una de las siguientes características, bajo las condiciones señaladas en la NOM-052-SEMARNAT-2005:

- Corrosividad
- Reactividad
- Explosividad
- Toxicidad Ambiental
- Inflamabilidad
- Biológico-Infeciosa



Es **Corrosivo** cuando una muestra representativa presenta cualquiera de las siguientes propiedades:

- ✓ Es un líquido acuoso y presenta un pH menor o igual a 2.0 o mayor o igual a 12.5 de conformidad con el procedimiento que se establece en la Norma Mexicana correspondiente
- ✓ Es un sólido que cuando se mezcla con agua destilada presenta un pH menor o igual a 2.0 o mayor o igual a 12.5 según el procedimiento que se establece en la Norma Mexicana correspondiente.
- ✓ Es un líquido no acuoso capaz de corroer el acero al carbón, tipo SAE 1020, a una velocidad de 6.35 milímetros o más por año a una temperatura de 328 K (55°C), según el procedimiento que se establece en la Norma Mexicana correspondiente.

Es **Reactivo** cuando una muestra representativa presenta cualquiera de las siguientes propiedades:

- ✓ Es un líquido o sólido que después de ponerse en contacto con el aire se inflama en un tiempo menor a cinco minutos sin que exista una fuente externa de ignición, según el procedimiento que se establece en la Norma Mexicana correspondiente
- ✓ Cuando se pone en contacto con agua reacciona espontáneamente y genera gases inflamables en una cantidad mayor de 1 litro por kilogramo del residuo por hora, según el procedimiento que se establece en la Norma Mexicana correspondiente.
- ✓ Es un residuo que en contacto con el aire y sin una fuente de energía suplementaria genera calor, según el procedimiento que se establece en la Norma Mexicana correspondiente.



- ✓ Posee en su constitución cianuros o sulfuros liberables, que cuando se expone a condiciones ácidas genera gases en cantidades mayores a 250 mg de ácido cianhídrico por kg de residuo o 500 mg de ácido sulfhídrico por kg de residuo, según el procedimiento que se establece en la Norma Mexicana correspondiente.

Es **Explosivo** cuando es capaz de producir una reacción o descomposición detonante o explosiva solo o en presencia de una fuente de energía o si es calentado bajo confinamiento. Esta característica no debe determinarse mediante análisis de laboratorio, por lo que la identificación de esta característica debe estar basada en el conocimiento del origen o composición del residuo.

Es **Tóxico Ambiental** cuando:

- ✓ El extracto PECT, obtenido mediante el procedimiento establecido en la NOM-053-SEMARNAT-1993, contiene cualquiera de los constituyentes tóxicos listados en la Tabla 2 de la NOM-052-SEMARNAT-2005 en una concentración mayor a los límites ahí señalados, la cual deberá obtenerse según los procedimientos que se establece en las Normas Mexicanas correspondientes.

Es **Inflamable** cuando una muestra representativa presenta cualquiera de las siguientes propiedades:

- ✓ Es un líquido o una mezcla de líquidos que contienen sólidos en solución o suspensión que tiene un punto de inflamación inferior a 60.5 °C, medido en copa cerrada, de conformidad con el procedimiento que se establece en la Norma Mexicana correspondiente, quedando excluidas las soluciones acuosas que contengan un porcentaje de alcohol, en volumen, menor a 24%



- ✓ No es líquido y es capaz de provocar fuego por fricción, absorción de humedad o cambios químicos espontáneos a 25 °C, según el procedimiento que se establece en la Norma Mexicana correspondiente.
- ✓ Es un gas que a 20 °C y una presión de 101.3 kPa, arde cuando se encuentra en una mezcla del 13% o menos por volumen de aire, o tiene un rango de inflamabilidad con aire de cuando menos 12% sin importar el límite inferior de inflamabilidad.
- ✓ Es un gas oxidante que puede causar o contribuir más que el aire, a la combustión de otro material

Es **Biológico-Infecioso** de conformidad con lo que se establece en la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

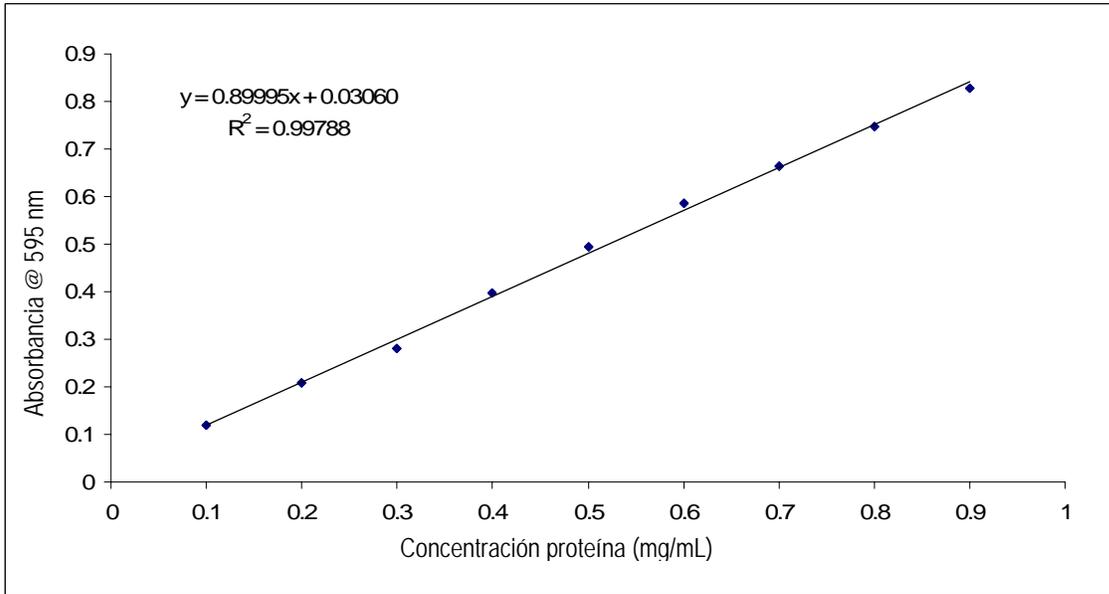
A1.5 Procedimiento para la evaluación de la conformidad

Las muestras para las determinaciones analíticas deben ser tomadas directamente a la salida del proceso o del área de almacenamiento en su caso, de conformidad con los procedimientos establecidos en la Norma Mexicana correspondiente y deberán ser representativas del volumen generado, considerando las variaciones en el proceso y, además, se debe establecer la cadena de custodia para las mismas.

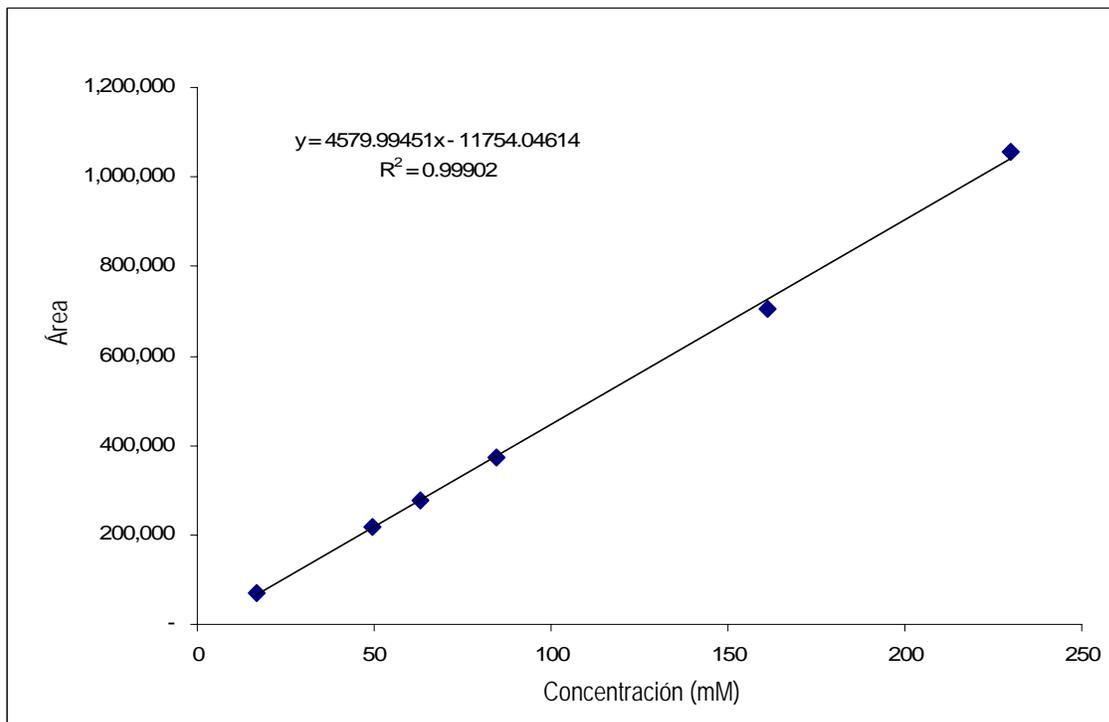
La Secretaría reconocerá las determinaciones analíticas de la prueba CRIT que hayan sido muestreadas y analizadas por un laboratorio acreditado y aprobado conforme a las disposiciones legales y aplicables.



Apéndice II. Curva patrón de concentración de proteína



Curva patrón de concentración de acetato de butilo





Apéndice III. Estándar de magnetita por XRD

19-629 JCPDS-ICDD Copyright (c) 1994 PDF-2 Sets 1-44 database Quality: *

Fe ₃ O ₄ 2 4		d Å	Int.	h k l				
Iron Oxide								
Magnetite, syn								
Rad: CuKα1 Lambda: 1.54054 Filter: Ni d-sp:								
Cutoff: Int: Diffractometer I/ICor: 4.90								
Ref: Natl. Bur. Stand. (U.S.) Monogr. 25, 5 31 (1967)								
Sys: Cubic S.G.: Fd3m (227)								
a: 4.396	b:	c:	A:	C:				
A:	B:	C:	I: #	sp:				
Ref: Ibid.								
Dx: 5.26 Dm: 5.18 SS/POM: P26-58(.611,34)								
RA: swB: 2.42 wy: Sign: 29:								
Ref: Dana's System of Mineralogy, 7th Ed., 1 698								
Color: Black								
Pattern taken at 25 C. Sample obtained from the Columbian Carbon Co., New York								
17, New York, USA. Spectrographic analysis showed the following major								
impurities: 0.91 to 0.14 Co, 0.981 to 0.919 Ag, Al, Mg, Mn, Mo, Ni, Si, Ti and								
Zn. Other data 75-1376. Opaque mineral optical data on specimen from								
Braestad, Norway: RR28e-20.1, Disp.-16, YMN100-592, Color values-.311								
.314, 29.1. Ref.: JMA Commission on Ore Microscopy QOF. See also 26-1136.								
a=4.3967 refined in 1975. Al ₂ MgO ₄ type, Spinel group, spinel subgroup. W								
used as internal standard. PSC: cP58. To replace 11-614. Wt: 151.54.								
Volume[CD]: 591.84.								
d Å	Int.	h k l	d Å	Int.	h k l	d Å	Int.	h k l
3.8080	4	10 2 2						

Strong lines: 2.53/4 1.48/4 2.97/1 1.62/1 2.10/2 1.99/1 1.71/1 1.38/1



Apéndice IV. Tamaño de partícula por difracción láser



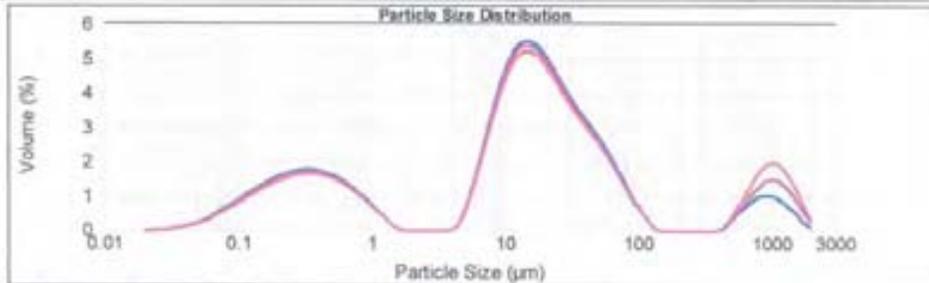
Result Analysis Report

Sample Name: Microesferas poliméricas - Average	SOP Name: 	Measured: Martes, 14 de Noviembre de 2006 01:09:47 p.m.
Sample Source & type: Factory = Facultad de Química, UNAM	Measured by: USAJ	Analysed: Martes, 14 de Noviembre de 2006 01:09:49 p.m.
Sample bulk lot ref: 	Result Source: Averaged	

Particle Name: Poliacetato de vinilo	Accessory Name: None	Analysis model: General purpose	Sensitivity: Normal
Particle RI: 1.455	Absorption: 0	Size range: 0.020 to 2000.000 μm	Obscuration: 14.50 %
Dispersant Name: Propan-2-ol	Dispersant RI: 1.390	Weighted Residual: 1.316 %	Result Emulation: Off

Concentration: 0.0364 %Vol	Span : 6.542	Uniformity: 7.18	Result units: Volume
Specific Surface Area: 7.57 m^2/g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 0.793 μm	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 113.266 μm	

d(0.1): 0.241 μm d(0.5): 15.021 μm d(0.9): 98.503 μm



- Microesferas poliméricas, Martes, 14 de Noviembre de 2006 01:09:47 p.m.
- Microesferas poliméricas, Martes, 14 de Noviembre de 2006 01:10:12 p.m.
- Microesferas poliméricas, Martes, 14 de Noviembre de 2006 01:10:36 p.m.
- Microesferas poliméricas - Average, Martes, 14 de Noviembre de 2006 01:09:47 p.m.

Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.012	0.00	0.120	0.88	1.048	0.42	11.482	4.75	130.226	0.40
0.017	0.00	0.130	1.01	1.259	0.23	13.190	4.87	136.036	0.39
0.023	0.00	0.136	1.13	1.445	0.09	15.136	4.94	139.496	0.38
0.031	0.00	0.148	1.24	1.690	0.00	17.279	4.94	141.970	0.37
0.042	0.00	0.160	1.25	1.905	0.01	19.560	4.26	146.900	0.36
0.056	0.00	0.209	1.43	2.188	0.00	22.900	4.26	150.880	0.35
0.075	0.00	0.240	1.60	2.512	0.00	26.300	3.99	155.420	0.34
0.098	0.00	0.275	1.80	2.884	0.00	30.200	3.94	160.220	0.33
0.030	0.00	0.300	1.94	3.311	0.00	34.674	3.93	165.078	0.32
0.025	0.04	0.300	1.93	3.822	0.00	39.671	3.91	170.000	0.31
0.040	0.08	0.417	1.93	4.303	0.00	45.733	3.73	175.000	0.30
0.045	0.13	0.479	1.88	5.073	0.36	52.481	3.48	180.541	0.30
0.052	0.19	0.550	1.81	5.754	0.80	60.296	3.14	187.957	0.29
0.060	0.26	0.601	1.80	6.607	1.62	69.190	2.76	204.496	0.28
0.064	0.48	0.724	0.96	7.588	3.09	79.433	1.82	221.754	0.27
0.075	0.81	0.860	0.81	8.730	3.77	91.201	0.87	240.980	0.26
0.081	0.73	0.960	0.82	10.000	4.33	104.713	0.38	262.479	0.25
0.108	0.00	1.080	0.82	11.482	4.33	120.226	0.38	286.000	0.25

Operator notes: Dra. Araceli Tovar / M. en C. Nayeli Lopez



Immobilization of *Candida rugosa* Lipase Onto Magnetic Microspheres

Francisco Vázquez-Ramírez¹ and Eduardo Bárzana²

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México
e-mail: franciscovr78@gmail.com¹ and ebg@servidor.unam.mx²



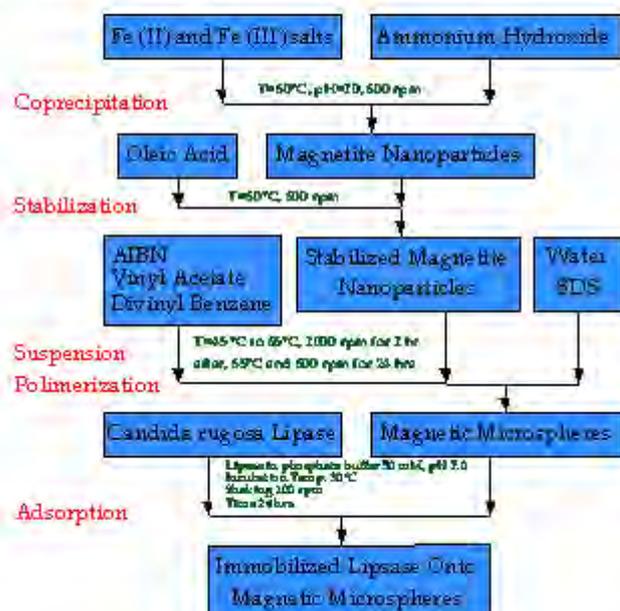
Introduction

Magnetic microspheres have been widely used for enzyme immobilization because they enable repeated use, provide significant reduction in operation cost, facilitate separation with a magnetic field, and provide enzyme stability.

General Objectives

The primary goals were to synthesize magnetic microspheres by coating magnetite nanoparticles with the co-polymer produced by vinyl acetate and divinyl benzene, and to immobilize *Candida rugosa* lipase (CRL) on the produced microspheres.

Methodology



Results and Discussion

A ferrofluid containing magnetite was synthesized by coprecipitation of iron (II) and iron (III) salts in presence of ammonium hydroxide. The reaction was performed in a batch reactor with mechanical stirring¹. Magnetite nanoparticles were stabilized with oleic acid to prevent aggregation by steric mechanisms. X-ray diffraction was used to compare patterns between pure magnetite and synthesized magnetite. Magnetite particle size was determined by Transmission Electron Microscopy (TEM). The analysis showed that the particle size was less than 20 nm (Fig. 1) It is reported that the critical size to obtain particles with a single magnetic domain is about 25 nm².

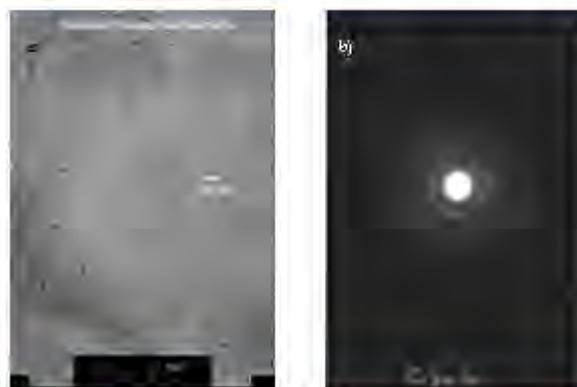


Fig. 1 a) TEM of magnetite nanoparticles b) X-ray diffraction pattern of synthesized magnetite

Coated magnetite was obtained by radical suspension polymerization of vinyl acetate and divinyl benzene using AIBN as initiator. Particle size of the microspheres was estimated by Scanning Electron Microscopy (SEM); the range was from 1 to 25 μm (Fig. 2).

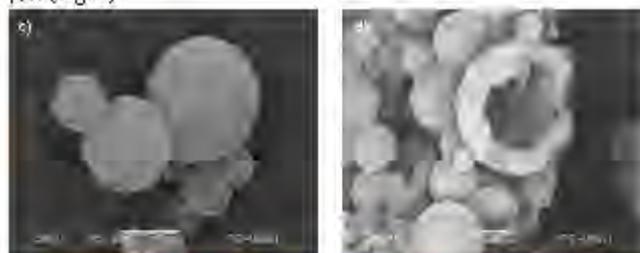


Fig. 2 c) SEM of microspheres d) Micrograph showing a broken microsphere with a 10 μm magnetic core

CRL was immobilized by physical adsorption on the microspheres, and the amount of protein adsorbed was determined using mass balance by Bradford method in the supernatant. Protein loading was about 15 mg protein/g microsphere. Activity of immobilized lipase was monitored by vinyl acetate transesterification with 1-butanol in hexane by GC. One unit of lipase activity was defined as the amount of lipase which catalyzed the production of 1 μmol of butyl acetate per minute under experimental conditions. The maximum load achieved was 139 U/g microsphere.

Conclusions

A biocatalyst was produced by coating magnetite with a vinyl acetate-divinyl benzene co-polymer, and by immobilizing CRL on the synthesized support. This microspheres can be easily separated from reaction medium by means of a magnetic field. The obtained biocatalyst could be used for synthesis of attractive commercial products in organic solvents or supercritical fluids.

References

1. K. S. Wilson et al. *European Cells and Materials*, 3, 206-209, 2002
2. Zheng Guo et al. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 776-782, 2003

