

**INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS
PARA APLICACIONES INDUSTRIALES**

KELLY JOHANA DUSSÁN MEDINA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MANIZALES
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA -INGENIERÍA QUÍMICA
Manizales, Mayo de 2008**

**INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS
PARA APLICACIONES INDUSTRIALES**

KELLY JOHANA DUSSÁN MEDINA
e-mail: kjdussanm@unal.edu.co

Tesis de Maestría en Ingeniería – Ingeniería Química

Director de Tesis
CARLOS ARIEL CARDONA ALZATE
Ingeniero Químico, M.Sc., Ph.D.
Co-director de Tesis
OSCAR HERNÁN GIRALDO OSORIO
Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MANIZALES
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA-INGENIERÍA QUÍMICA
Manizales, Mayo 2008

A mi mamá y mi hermano por apoyarme incondicionalmente y ser mi fuerza guía.

A Nes por escucharme, apoyarme y entenderme en los momentos más difíciles.

A Carlos Ariel y Óscar Hernán por creer en mí y ofrecerme esta oportunidad tan valiosa.

Y finalmente a mis familiares, amigos, profesores, y todos aquellos que apoyaron y creyeron en mí, así como en la realización de este trabajo.

Kelly Dussán Medina

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a cada una de las personas que hicieron posible la realización de este trabajo en especial a:

Laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales por los análisis de difracción de rayos X y área superficial y porosidad.

Laboratorio de microscopia de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por los análisis de microcopia electrónica de barrido.

Laboratorio de magnetismo y materiales avanzados de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales por los análisis de calorimetría diferencial de barrido.

Laboratorio de análisis instrumental de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por los análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.

Laboratorio de Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales por los análisis *Kjeldahl*.

Dirección de investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales (DIMA) por su apoyo económico.

Carlos Ariel Cardona Alzate y Óscar Hernán Giraldo Osorio por su apoyo constante durante la realización de esta tesis.

Además de expresar mi gratitud y agradecimiento a aquellas personas que me apoyaron constantemente y que aportaron un granito de arena para la culminación de este trabajo: Nayda Patricia Arias, Jhon Mauricio Aguirre, Luís Fernando Gutiérrez, Natalia Salgado y Óscar Darío Hernández.

Finalmente a mis compañeros de maestría que siempre estuvieron a mí lado para brindarme apoyo y alegrías: Sandra Montoya, Adela Ceballos, Julián Andrés Quintero, Juan Pablo Gutiérrez y María Isabel Montoya.

RESUMEN

La lipasa *Candida Rugosa* se inmovilizó sobre partículas magnéticas recubiertas vía activación con glutaraldehído. Las partículas magnéticas fueron sintetizadas por el método de co-precipitación de iones Fe^{+3} y Fe^{+2} en una solución de hidróxido de sodio. Además las partículas magnéticas fueron recubiertas con APTS-TEOS para lograr tener en la superficie grupos $-\text{NH}_2$ y así tener una mejor eficiencia de inmovilización. Los análisis de difracción de rayos X (XRD) mostraron que las partículas magnéticas son magnetita y que ocurrió el recubrimiento de la misma, además de que no ocurre un cambio significativo después de inmovilizar la enzima sobre esta magnetita recubierta, esto fue corroborado con análisis de SEM-EDS y análisis térmico (DSC). Los análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) sugieren que la partícula magnética ha sido recubierta, además ocurrió un cambio en cuanto a área superficial, la cual fue obtenida por análisis BET. La cantidad de proteína contenida en 1 gramo de enzima inmovilizada se halló por el método de Biuret y método Kjeldahl, encontrándose que la eficiencia de inmovilización fue del 30%. La actividad enzimática promedio ($\text{mmol ácido oleico esterificados/g}_{\text{proteína}} \cdot \text{h}$) fue obtenida para la esterificación de ácido oleico con butanol tanto para la lipasa libre como para la inmovilizada, para esta última la actividad fue de 0.8 veces la enzima libre. Este sistema biocatalítico fue probado cualitativamente en la transesterificación de aceite de palma con etanol presentando como positiva la prueba de ésteres para un periodo de 72 horas. Finalmente se realizó un análisis teórico de un proceso enzimático extracción reacción en el que se encontró la zona en la que debe ir ubicado el biocatalizador, esto con el fin de que el proceso sea más eficiente. Esta ubicación óptima del biocatalizador puede ser logrado con la aplicación de un campo magnético externo (≈ 11.600 Gauss).

Palabras Claves: magnetita, recubrimiento, inmovilización de enzimas, procesos extracción reacción.

ABSTRACT

Candida Rugosa Lipase was immobilized on covered magnetic particles via glutaraldehyde activation. The magnetic particles were synthesized by the method of coprecipitation of Fe^{+3} and Fe^{+2} ions in a sodium hydroxide solution. In addition, the magnetic particles were covered with APTS-TEOS to manage to have in the surface groups $-\text{NH}_2$ and better efficiency of immobilization. The X ray diffraction (XRD) analyses showed that the magnetic particles are magnetite and that the covering(recovering) of them occurred, besides, apparently no significant change after immobilizing the enzyme on this covered magnetite occurred, which was corroborated with SEM-EDS and DSC thermal analyses. The Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR) analyses suggest that magnetic particle has been covered (recovered), and also a change in the superficial area, which was obtained by BET analysis, was noticed. The amount of protein contained in 1 gram of immobilized enzyme was obtained by Biuret and Kjeldahl methods, with an immobilization efficiency being of 30%. The enzymatic activity average (mmol oleic acid esterificated/ $\text{g}_{\text{protein}} \cdot \text{h}$) was obtained using the esterification of oleic acid with butanol for free and immobilized lipases. For the last one, the activity was of 0.8 times the activity of the free enzyme. This biocatalytic system was proven qualitatively in the transesterification of palm oil with ethanol presenting as positive the test of esters for a 72 hours period. Finally, a theoretical analysis of an enzymatic process was carried out for an extraction-reaction system in which the zone where the biocatalyst should be located was found, this in order to make the process more efficient. This optimal location of the biocatalyst can be performed by the application of an external magnetic field ($\approx 11,600$ Gauss).

Keywords: magnetite, covering, enzyme immobilization, extraction-reaction processes.

TABLA DE CONTENIDO

<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
 <i>PARTÍCULAS MAGNÉTICAS</i>	
<i>RESUMEN</i>	<i>3</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>3</i>
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>7</i>
Materiales	7
Equipos	7
Métodos	10
Procedimiento de síntesis de las partículas magnéticas	10
Procedimiento de síntesis de las partículas magnéticas recubiertas	10
<i>RESULTADOS</i>	<i>12</i>
Difracción de Rayos X	12
Imágenes y análisis elemental	16
Análisis de grupos funcionales	25
Análisis térmico	26
Análisis Textural	28
<i>DISCUSIÓN</i>	<i>36</i>
<i>REFERENCIAS</i>	<i>38</i>
 <i>INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS</i>	
<i>RESUMEN</i>	<i>42</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>42</i>
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>47</i>
Materiales	47
Equipos	47
Métodos	48
Vínculo cruzado (cross-linking) con glutaraldehído	48
Inmovilización de la Lipasa Candida Rugosa	48
Determinación de la proteína (método Biuret).....	49
Nitrógeno total (Método Kjeldahl)	49
Medición de la actividad.....	50
Transesterificación del aceite de palma con etanol	51
Identificación de Esteres	51
Índice de Saponificación.....	51
Índice de Yodo	52

Índice de acidez.....	52
RESULTADOS	54
Difracción de Rayos X	54
Imágenes y análisis elemental	56
Análisis de grupos funcionales	60
Análisis térmico	62
Análisis textural	63
Método del <i>Biuret</i>	65
Actividad enzimática	66
Proceso enzimático de transesterificación del aceite de palma con etanol anhidro	70
Resultados de la caracterización del aceites.....	70
Resultados del proceso de transesterificación	70
Caracterización del biodiesel obtenido.....	71
DISCUSIÓN	72
REFERENCIAS	74
 PROCESOS EXTRACCIÓN REACCIÓN	
RESUMEN	79
INTRODUCCIÓN	79
Separación-Purificación	80
Extracción Reactiva Adsorbtiva	81
Reacción enzimática extractiva	81
Fermentación extractiva	82
MÉTODOS	84
Algoritmo par el cálculo del Equilibrio Líquido-Líquido-Reactivo (ELLR) para Reacciones Reversibles Utilizando la Cinética de Reacción	84
Algoritmo para el análisis y diseño de procesos de extracción reactiva	86
Método corto análisis del equilibrio líquido-líquido-reactivo	88
Plataforma del software ModELL-R	89
Para régimen por lotes	89
Para régimen en continuo.....	91
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
Reacción enzimática de transesterificación del aceite de palma con etanol	93
Cinética de la reacción	94
Método corto Equilibrio Líquido- Líquido-Reactivo (ELLR).....	95
Ecuaciones para el cálculo del campo magnético	103
REFERENCIAS	105

<i>CONCLUSIONES</i>	<i>107</i>
<i>RECOMENDACIONES</i>	<i>109</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.1 Concepto de nanómetro</i>	3
<i>Figura 1.2 Fluidos ferromagnéticos en presencia de un campo magnético externo</i>	4
<i>Figura 1.3 Foto cámara de nitrógeno, (a) vista de frente, (b) vista lateral izquierda y (c) vista por encima.</i>	8
<i>Figura 1.4 Esquema de formación de las partículas magnéticas recubiertas [49]</i>	11
<i>Figura 1.5 Diagrama general del proceso de síntesis de las partículas magnéticas</i>	11
<i>Figura 1.6 Diagrama general del proceso de síntesis de las partículas magnéticas</i>	11
<i>Figura 1.7 Patrón XRD para la partícula magnética obtenida en este trabajo (PM)</i>	12
<i>Figura 1.8 Patrón XRD para la partícula magnética con 10 mL de TEOS (PMR10)</i>	13
<i>Figura 1.9 Patrón XRD para la partícula magnética con 20 mL de TEOS (PMR20)</i>	13
<i>Figura 1.10 Patrón XRD para la partícula magnética con 30 mL de TEOS (PMR30)</i>	14
<i>Figura 1.11 Red de poliedros de Fe (los tetraedros son azules y los octaedros son verdes) en una celda unitaria de la magnetita.</i>	15
<i>Figura 1.12 SEM para las partículas magnéticas</i>	17
<i>Figura 1.13 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 10 mL de TEOS</i>	17
<i>Figura 1.13 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 10 mL de TEOS</i>	18
<i>Figura 1.14 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 20 mL de TEOS</i>	18
<i>Figura 1.15 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS</i>	19
<i>Figura 1.15 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS</i>	20
<i>Figura 1.16 EDS para las partículas magnéticas (Región 1)</i>	22
<i>Figura 1.17 EDS para las partículas magnéticas (Región 2)</i>	22
<i>Figura 1.18 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 10 mL de TEOS</i>	23
<i>Figura 1.19 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 20 mL de TEOS</i>	23
<i>Figura 1.20 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 1)</i>	23
<i>Figura 1.21 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 2)</i>	24
<i>Figura 1.22 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 3)</i>	24
<i>Figura 1.23 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 4)</i>	24
<i>Figura 1.24 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 5)</i>	25
<i>Figura 1.25 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 6)</i>	25
<i>Figura 1.26 Espectros FTIR para (a) partículas magnéticas y (b) partícula magnética recubierta</i>	26
<i>Figura 1.27 DSC para la partícula magnética (PM)</i>	27

<i>Figura 1.28 DSC para la partícula magnética con 10 mL de TEOS (PMR10)</i>	27
<i>Figura 1.29 DSC para la partícula magnética con 20 mL de TEOS (PMR20)</i>	28
<i>Figura 1.30 DSC para la partícula magnética con 30 mL de TEOS (PMR30)</i>	28
<i>Figura 1.31 Representación esquemática de los seis tipos de isothermas de adsorción.</i>	29
<i>Figura 1.32 Ciclos de histéresis según clasificación Boer</i>	30
<i>Figura 1.33 Ciclos de histéresis según clasificación IUPAC</i>	30
<i>Figura 1.34 Isothermas de adsorción para todas las partículas</i>	31
<i>Figura 1.35 Distribuciones de tamaño de poro calculado para el brazo de desorción por el método BJH con la corrección de Faas, $dV/d\log(D)$ para PM</i>	32
<i>Figura 1.36 Distribuciones de tamaño de poro calculado para el brazo de desorción por el método BJH con la corrección de Faas, $dV/d\log(D)$ para PMR10</i>	33
<i>Figura 1.37 Distribuciones de tamaño de poro calculado para el brazo de desorción por el método BJH con la corrección de Faas, $dV/d\log(D)$ para PMR20</i>	33
<i>Figura 1.38 Distribuciones de tamaño de poro calculado para el brazo de desorción por el método BJH con la corrección de Faas, $dV/d\log(D)$ para PMR30</i>	34
<i>Figura 1.39 Análisis de microporo por el método Horvath-Kawazoe para PM</i>	34
<i>Figura 1.40 Análisis de microporo por el método Horvath-Kawazoe para PMR10</i>	35
<i>Figura 1.41 Análisis de microporo por el método Horvath-Kawazoe para PMR20</i>	35
<i>Figura 1.42 Análisis de microporo por el método Horvath-Kawazoe para PMR30</i>	35
<i>Figura 2.1 Métodos de inmovilización mediante retención física.</i>	43
<i>Figura 2.2 Métodos de inmovilización mediante unión química.</i>	44
<i>Figura 2.3 Funcionalización del soporte magnético</i>	48
<i>Figura 2.4 Inmovilización de la lipasa sobre un soporte magnético</i>	48
<i>Figura 2.5 (a) Diagrama general del proceso de funcionalización del soporte. (b) Diagrama general del proceso de inmovilización</i>	49
<i>Figura 2.6 Patrón XRD para la partícula magnética recubierta funcionalizada con glutaraldehído (PMG)</i>	54
<i>Figura 2.7 Patrón XRD de la lipasa Candida Rugosa inmovilizada sobre la partícula magnética recubierta y con glutaraldehído (EI)</i>	55
<i>Figura 2.8 SEM para las partículas magnéticas recubiertas funcionalizadas con glutaraldehído (PMG)</i>	56
<i>Figura 2.9 SEM para la enzima inmovilizada sobre las partículas magnéticas (EI)</i>	57
<i>Figura 2.10 SEM para la enzima libre (Candida Rugosa) (EL)</i>	57
<i>Figura 2.11 EDS para las partículas magnéticas recubiertas funcionalizadas con glutaraldehído</i>	58
<i>Figura 2.12 EDS para la enzima inmovilizada sobre partículas magnéticas</i>	59

<i>Figura 2.13 EDS para la enzima libre (Candida Rugosa)</i>	59
<i>Figura 2.14 Espectros FTIR para (a) partículas magnéticas recubiertas (PMR) y (b) partícula magnética recubiertas funcionalizadas con glutaraldehído (PMG)</i>	61
<i>Figura 2.15 Espectros FTIR para (a) partícula magnética recubiertas funcionalizadas con glutaraldehído (PMG) y (b) enzima inmovilizada sobre la partícula magnética (EI).</i>	61
<i>Figura 2.16 Espectros FTIR para (a) enzima inmovilizada sobre la partícula magnética (EI) y (b) enzima libre (EL).</i>	62
<i>Figura 2.17 DSC para la partícula magnética recubierta funcionalizada con glutaraldehído (PMG)</i>	62
<i>Figura 2.18 DSC para la enzima inmovilizada sobre la partícula magnética (EI)</i>	63
<i>Figura 2.19 Isotherma de las partículas</i>	63
<i>Figura 2.20 Análisis de microporo por el método Horvath-Kawazoe para PMG</i>	64
<i>Figura 2.21 Curva patrón</i>	65
<i>Figura 2.22 Milimoles de ácido oleico por unidad de tiempo para la enzima libre</i>	67
<i>Figura 2.23 Milimoles de ácido oleico por unidad de tiempo para la enzima inmovilizada</i>	69
<i>Figura 2.24 Identificación de ésteres cuando se lleva 4, 24, 48 y 72 horas de reacción</i>	70
<i>Figura 3.1 Reactor Extractor. FE flujo de solvente entrada, FA flujo alimento, QE flujo extracto, QA flujo fase refinado, C0 concentración inicial del reactivo, CI concentración final del reactivo, P concentración final del producto en la fase acuosa, P* concentración del producto en la fase solvente [17].</i>	84
<i>Figura 3.2 Algoritmo ELLR utilizando la cinética de reacción</i>	87
<i>Figura 3.3 Intercepción del equilibrio químico y de fases. Líneas rojas equilibrio químico, líneas negras equilibrio de fases</i>	88
<i>Figura 3.4 Variación del parámetro R para la búsqueda de estados estables con máxima conversión</i>	89
<i>Figura 3.5 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 1</i>	90
<i>Figura 3.6 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 2</i>	90
<i>Figura 3.7 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 3</i>	90
<i>Figura 3.8 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 4</i>	91
<i>Figura 3.9 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 5</i>	91
<i>Figura 3.10 Software ModELL-R para un proceso continuo. Sección 1.</i>	92
<i>Figura 3.11 Software ModELL-R para un proceso continuo. Sección 2.</i>	92
<i>Figura 3.12 Reacción de transesterificación de triglicéridos</i>	93
<i>Figura 3.13 Equilibrio líquido-líquido presente en el sistema.</i>	95
<i>Figura 3.14 Equilibrio líquido-líquido-reactivo para el sistema trioleina (OOO)-etanol (EtOH)-glicerina (GL)-biodiesel (EO) utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.</i>	97

Figura 3.15 Comportamiento de la conversión de trioleína (OOO) y la pureza de biodiesel (EO) frente al cambio de R para régimen por lotes en la fase biodiesel utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético. _____98

Figura 3.16 Comportamiento de la conversión de trioleína (OOO) y la pureza de biodiesel (EO) frente al cambio de R para régimen continuo en la fase biodiesel utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético. _____99

Figura 3.17 Esquema del reactor extractor multietapa para la producción de biodiesel utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético. _____100

Figura 3.18 Perfil de concentración del reactor extractor multietapa en la fase biodiesel (extracto). OOOB = Trioleína, EtOHB = Etanol, GLB = Glicerina, EO = Etil Oleato, utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético. _____100

Figura 3.19 Perfil de concentración del reactor extractor multietapa en la fase glicerina (refinado). OOOGL = Trioleína (la concentración de la trioleína es cero), EtOHGL = Etanol, GLGL = Glicerina, EOGL = Etil Oleato, utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético. _____101

Figura 3.20 Perfil de la enzima en un reactor extractor de 4 etapas, utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético. _____102

Figura 3.21 Esquema del reactor extractor multietapa con un campo magnético externo para la producción de biodiesel utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético. _____102

Figura 3.22 Esquema de una etapa para el reactor extractor multietapa con un campo magnético externo utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.103

Figura A Esquema de formación obtenido de las partículas magnéticas recubiertas.____107

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1.1</i> <i>Indices de Miller para la PM</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 1.2</i> <i>Indices de Miller para la PMR10</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 1.3</i> <i>Indices de Miller para la PMR20</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 1.4</i> <i>Indices de Miller para la PMR30</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 1.5</i> <i>Diámetro medio de partícula</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 1.6</i> <i>Relaciones atómicas obtenidas del análisis SEM-EDS para las diferentes regiones analizadas.</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 1.7</i> <i>Resumen de propiedades texturales de los materiales sintetizados</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 2.1</i> <i>Volumen de muestra requerido para el cálculo del N_{total}</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 2.2</i> <i>Tamaño de la muestra según el índice de yodo esperado</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 2.3</i> <i>Cantidad de muestra, alcohol y concentración requeridos para la determinación de ácidos grasos libres</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 2.4</i> <i>Indices de Miller para la PMG</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 2.5</i> <i>Indices de Miller para la EI</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 2.6</i> <i>Diámetro medio de partícula</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 2.7</i> <i>Relaciones atómicas obtenidas del análisis SEM-EDS para las diferentes regiones analizadas.</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 2.8</i> <i>Resumen de propiedades texturales de los materiales sintetizados</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 2.9</i> <i>Curva patrón con albúmina</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 2.10</i> <i>Cálculo de la cantidad de proteína</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 2.11</i> <i>Datos obtenidos por Kjeldahl</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 2.12</i> <i>Resultados medición actividad enzimática para la enzima libre (Candida Rugosa)</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 2.13</i> <i>Resultados medición actividad enzimática para la enzima inmovilizada (1 Etapa)</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 2.14</i> <i>Resultados medición actividad enzimática para la enzima inmovilizada (2 Etapa)</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 2.15</i> <i>Resultados medición actividad enzimática para la enzima inmovilizada (3 Etapa)</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 2.16</i> <i>Actividades enzimáticas promedio</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 2.17</i> <i>Resultados de la caracterización de del aceite de palma</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 2.18</i> <i>Resultados para el proceso de transesterificación empleando la enzima inmovilizada</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 2.19</i> <i>Resultados de la caracterización del Biodiesel</i>	<i>71</i>

Tabla 3.1 Composiciones molares para el reactor extractor multietapa (4 etapas) utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético. _____100

INTRODUCCIÓN

La sustitución de los combustibles denominados fósiles o tradicionales, derivados del petróleo, por otros de origen vegetal, cobran gran importancia en nuestros días por varias razones fundamentales, como el hecho de provenir de una fuente renovable, ser un instrumento de lucha contra el deterioro medioambiental, además de un factor de desarrollo de la agricultura e industrias derivada, entre algunos beneficios.

Los biocombustibles son alcoholes, éteres, ésteres y otros compuestos químicos producidos a partir de biomasa, son utilizados como combustibles, generalmente son elaborados a partir de sustancias orgánicas renovables, como las plantas herbáceas y leñosas, residuos agrícolas y forestales y una gran parte de los residuos municipales e industriales como los desperdicios de la industria alimenticia.

El término biomasa hace referencia a toda materia que puede obtenerse a través de fotosíntesis. La mayoría de las especies vegetales utilizan energía solar para crear azúcares, partiendo de sustancias simples como el agua y el dióxido de carbono, almacenando esta energía en forma de moléculas de glucosa, almidón, aceite, etc.

Entre los biocombustibles podemos incluir al bioetanol, biodiesel, biometanol, y muchos otros. Los dos productos que más han adquirido interés en los últimos años son el bioetanol y el biodiesel.

El biodiesel es un biocarburante que puede producirse a partir de diferentes tipos de aceites vegetales como soja, colza, girasol, maní, higuera, entre otros, y grasas animales a través de un proceso denominado transesterificación, en el que sus triglicéridos son convertidos en ésteres alquílicos que pueden ser utilizados como un aditivo del diesel de petróleo, y en algunos casos, dependiendo de su pureza, usados directamente en motores de compresión. Esta reacción de transesterificación puede ser catalizada por catalizadores ácido, básicos o enzimas (lipasa)

Entre los catalizadores ácidos se utilizan preferiblemente el ácido sulfónico y el sulfúrico. Aunque estos catalizadores dan rendimientos muy altos en alquil ésteres, presentan algunas desventajas como son altas temperaturas de reacción (superiores a 100 °C) y tiempos de reacción muy elevados (hasta 50 horas) para alcanzar la conversión completa de los reactantes. Otra desventaja es que la reacción debe realizarse en ausencia de agua, ya que la presencia de ésta en los reactantes, conlleva a la formación competitiva de ácidos carboxílicos, lo que reduce notablemente el rendimiento de alquil ésteres.

En el caso de los catalizadores básicos, que a diferencia del anterior, la transesterificación se realiza más rápidamente. Por esta razón, y debido al hecho de que los catalizadores alcalinos son menos corrosivos que los ácidos, en la industria prefieren este tipo de catalizadores, entre los que se cuentan los alcóxidos e hidróxidos de metales alcalinos, así como los carbonatos de sodio y potasio. En el citado proceso se produce la reacción de las tres cadenas de los ácidos grasos de cada molécula de triglicérido, con un alcohol, produciéndose la separación de estas cadenas de la molécula de glicerina.

Esta separación necesita temperatura y un potente catalizador para que la reacción sea completa.

En el caso de las enzimas como biocatalizadores, se encuentran las lipasas. Algunas de las ventajas con las que cuenta este biocatalizador son, baja formación de co-productos, fácil separación de los productos, condiciones de reacción moderadas y formación de ésteres de ácidos grasos como producto principal.

El proceso de transesterificación con catalizadores químicos tiene varios inconvenientes, los cuales incluyen un gasto significativo de energía, difícil recuperación de la glicerina y finalmente exige un tratamiento de aguas residuales. Además, los ácidos grasos libres presentes en el aceite interfieren en la reacción, especialmente para el caso del catalizador alcalino, guiando a productos indeseables. Al utilizar enzimas se cuenta con la ventaja de menos gastos energéticos, además de que es un proceso amistoso ambientalmente. La transesterificación utilizando enzimas como biocatalizador puede superar los problemas que enfrentan los métodos químicos convencionales. Lo más importante, la glicerina puede ser fácilmente recobrada, los ácidos grasos libres contenidos en los aceites se pueden convertir completamente al ésteres y el tratamiento subsiguiente de aguas residuales no es necesario.

Recientemente, se ha estudiado la inmovilización de enzimas sobre diferentes tipos de soportes esto con el fin de mejorar la estabilidad, hacer más fácil separación y su posible reutilización en operaciones continuas. Para llevar a cabo la inmovilización de la enzima hay que tener en cuenta factores como la selección de un buen soporte y la estrategia de inmovilización con el fin de que la actividad enzimática no disminuya significativamente. Las partículas magnéticas apuntan a ser un novedoso soporte el cual puede ser utilizado en la inmovilización de enzimas ya que tienen tamaños nanométricos (1-1000 nm), además al ser magnéticas, pueden ser manipuladas por un gradiente campo magnético externo y finalmente tienen una superficie grande que se puede modificar para unir enzimas.

La mayor parte de los estudios se han centrado en la producción enzimática de biodiesel utilizando aceite de palma, soja, girasol, entre otros, y metanol y etanol como reactivos. Se han estudiado características como cantidad de alcohol, ya que la enzima sufre una inhibición, temperatura y algunas condiciones óptimas para llevar a cabo este proceso, además se han propuesto cinéticas de reacción con sus respectivos mecanismos teniendo en cuenta estas limitaciones. Realizando una recopilación bibliográfica todo lo que se ha hecho en cuanto a procesos enzimáticos para la producción de biodiesel, han sido ensayos y pruebas experimentales. Dejando así un vacío en la parte teórica la cual nos aporta las condiciones óptimas sin la imperiosa necesidad de realizar varios ensayos experimentales para encontrar estas condiciones.

En este trabajo se analiza teóricamente la transesterificación de aceite de palma con etanol en un proceso enzimático de extracción-reacción, se propone un esquema de un birreactor-extractor magnético en el que se puede ubicar el biocatalizador en una etapa específica y se realiza la síntesis de la partícula magnética (magnetita), recubrimiento con grupos silano y su posterior utilización como soporte en la inmovilización de la lipasa *Candida Rugosa*.

CAPÍTULO 1

PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

RESUMEN

En este capítulo se describe el procedimiento de síntesis de las partículas magnéticas (magnetita) por medio de un método de co-precipitación y el recubrimiento de las mismas con grupos silano, esto con el propósito de utilizarlas como soporte en el proceso de inmovilización de la lipasa *Candida Rugosa*, ya que este biocatalizador va a ser utilizado en la producción de biodiesel. Con el fin de verificar el recubrimiento de las partículas y confirmar características como tamaño de partícula, estructura cristalina, área superficial, grupos funcionales y características térmicas, se emplearon técnicas de caracterización como: difracción de rayos X (XRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), microscopia electrónica de barrido (SEM-EDS) y análisis de la área superficial.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad surgen aplicaciones en las que el magnetismo cumple un papel importante. Una de las áreas es el estudio y fabricación de materiales magnéticos y nanoestructurados. Para fabricar materiales nanoestructurados es necesario manipular objetos con un tamaño semejante al de agrupamientos de moléculas e incluso al de moléculas y átomos; el diámetro de estos materiales son menores a 1000 nanómetros (nm) (figura 1.1). La finalidad de manipular esta escala nanométrica en los materiales es debida a la posibilidad de crear dispositivos y sistemas con nuevas propiedades que permitan funciones específicas que emulen, o no, a la naturaleza [1].

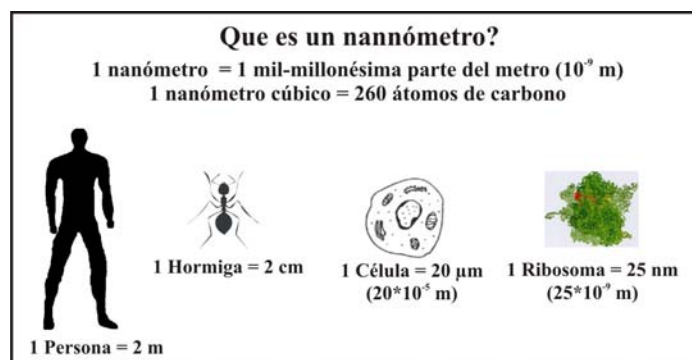


Figura 1.1 Concepto de nanómetro

El uso de materiales nanoestructurados magnéticos ofrece ventajas debido a las propiedades químicas, físicas y farmacológicas, incluyendo composición química, uniformidad granulométrica, estructura del cristal, comportamiento magnético, estructura superficial, propiedades de adsorción y solubilidad. Entre los materiales nanoestructurados magnéticos se encuentra la magnetita (Fe_3O_4) que es un material magnético de uso común por sus fuertes propiedades magnéticas y baja toxicidad, lo cual incentiva su aplicación en el campo de la biotecnología y medicina [1]. En estos materiales ferromagnéticos cada campo magnético de origen atómico es producido por

un dipolo o un momento magnético y cada uno está ordenado con los otros, en otras palabras, todos permanecen perfectamente orientados y unidos por una fuerza cohesiva. Esta energía involucrada en este proceso se llama 'energía de intercambio'. Si se desea cambiar la dirección de uno de los dipolos, los restantes tratarán de mantenerlo en su posición [2] (figura 1.2).



Figura 1.2 Fluidos ferromagnéticos en presencia de un campo magnético externo

En los últimos años, debido al rápido desarrollo de los materiales nanoestructurados magnéticos y la nanotecnología, en el campo de la biotecnología y medicina, las partículas magnéticas de tamaños nanométricos han recibido considerable atención [3-9]. Estas partículas pueden tener tamaños que las ponen en dimensiones comparables a la de los virus (20-500 nm), proteínas (5-50 nm) o genes (2 nm a lo ancho y 10-100 nm a lo largo). Además por ser magnéticas pueden ser manipuladas por un gradiente de campo magnético externo, y finalmente, tienen una gran superficie que puede ser modificada para adjuntar agentes biológicos.

Por ejemplo, en el campo de la biotecnología se está estudiando la inmovilización de enzimas utilizando las partículas magnéticas como soporte. Las ventajas que tiene este tipo de soporte son: área superficial específica alta, lo cual permite inmovilizar una cantidad considerable de enzima, baja resistencia a la transferencia de masa y menos ensuciamiento (*fouling*), y la fácil separación de las enzimas inmovilizadas del medio de reacción por la aplicación de un campo magnético externo (0.3-1.0 Tesla) [10, 11].

En el campo de la medicina, se está estudiando el transporte guiado de los medicamentos a un sitio específico por la aplicación de un campo magnético externo. Esto es logrado con una mínima cantidad de partículas magnéticas consiguiendo que los medicamentos magnéticos sean seguros y efectivos. El transporte guiado de sustancias biológicamente activas al órgano destino permite crear una concentración terapéutica óptima del medicamento en la parte deseada del organismo, al mantener la inyección total de la dosis en niveles bajos [12]. El uso de partículas magnéticas biocompatibles como portadores potenciales de medicamentos parece ser una técnica prometedora [13]. Las propiedades superparamagnéticas de las partículas magnéticas finas es de gran importancia desde un punto de vista práctico porque significa que esas partículas magnéticas pueden ser transportadas a lugares específicos, situadas en una posición conveniente y controladas en partes deseables de vasos sanguíneos u órganos con la ayuda de un campo magnético externo [14, 15].

Algunas de las ventajas de estos materiales magnéticos en esta área son: el tamaño de partícula (tamaños pequeños son tolerados para mejorar la difusión y tener tiempos de sedimentación grandes y altas áreas superficiales efectivas), las características

superficiales (son fácilmente encapsuladas lo cual las protege de la degradación y las dota de biocompatibilidad) y la buena respuesta magnética (la posibilidad de que la concentración de los nanomagnetos decrezca en la sangre y por lo tanto los efectos colaterales asociados disminuyan).

La separación magnética es un adelanto tecnológico desarrollado recientemente y utilizado en el campo de la bioseparación. El principio de este método es utilizar partículas magnéticas para inmovilizar las moléculas por vía ligando para formar un complejo que pueda ser separado de la solución por un gradiente de campo magnético externo. Este principio es utilizado en la inmovilización de proteínas, péptidos y enzimas [10, 16-20], en bioseparación [21-26], inmunoensayos [27, 28], liberación controlada de medicamentos [28-31], biosensores [32, 33], clasificación celular [34-36], adsorción y purificación de proteínas [37, 38] y en la separación del ácido nucleico [39, 40], entre otros.

Este mismo principio de separación de elementos se está utilizando en el área del tratamiento de residuos peligrosos (derrames de plantas químicas, metales pesados, residuos nucleares, etc.). El concepto es el mismo; las partículas son recubiertas con un emulsionante químicamente afín con el residuo que se desea depurar; los residuos reaccionan con el recubrimiento quedando unidos a las partículas. Una vez finalizada la reacción se remueven con un imán las nanopartículas magnéticas junto al residuo peligroso y se los traslada hasta su destino final. Este método ha demostrado ser altamente eficiente, principalmente para la seguridad humana y la conservación del medio ambiente [41-43].

Por otra parte, en procesos de separación (*in vitro*) las partículas magnéticas deben ser unidades estables compuestas de una alta concentración de nanopartículas superparamagnéticas, estas nanopartículas tienen un momento magnético permanente mucho mayor que las paramagnéticas. En ausencia de un campo magnético externo los momentos magnéticos individuales están orientados al azar, mientras que en presencia de un campo magnético, los momentos individuales se orientan paralelos, dando lugar a una fuerte atracción partícula-partícula.

La principal dificultad en la síntesis de estas partículas ultrafinas es controlar la dimensión de las partículas a escala nanométrica. Esta dificultad es el resultado de la alta energía superficial de estos sistemas. La tensión interfacial actúa como la fuerza guía para la reducción espontánea del área superficial por crecimiento durante el paso inicial de precipitación y durante el envejecimiento (*Ostwald ripening*) [44]. Por lo tanto, la búsqueda de rutas fáciles y flexibles para sintetizar y producir nanopartículas magnéticas con el tamaño deseado y distribución de tamaño aceptable sin tener agregado de partículas es de extrema importancia para comprender los potenciales que son estos materiales en biomedicina y biotecnología. Realizando una revisión bibliográfica se han encontrado rutas usadas frecuentemente para la preparación de nanopartículas magnéticas, como por ejemplo, método de co-precipitación, descomposición a altas temperaturas de precursores organometálicos, microemulsiones, entre otras. Además de la utilización de estas partículas en el campo de la biotecnología y en procesos de separación [45].

Algunos trabajos publicados se enfocan en la síntesis de una matriz polimérica de tamaños micrométricos que contengan partículas magnéticas y su aplicación en la separación de proteínas con la ayuda de un ligando específico que recubre la superficie de las partículas [22, 46]. Existen trabajos limitados en la aplicación de las partículas magnéticas de tamaño nanométrico en la separación de proteínas. Las nanopartículas pueden producir áreas superficiales específicas grandes y por lo tanto, puede resultar en capacidad de adsorción alta de proteínas. Por consiguiente, puede ser útil la síntesis de nanopartículas magnéticas con áreas superficiales altas y utilizarlas como soportes para la adsorción/desorción de proteínas [47].

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los reactivos necesarios para la síntesis y recubrimiento de la partícula magnética fueron: cloruro de hierro (III) hexahidratado (*Carlo Erba Reagenti* al 99%), cloruro de hierro (II) tetrahidratado (*J.T. Baker* al 99%), hidróxido de sodio (*Merck* al 99%), acetato de etilo (*Riedel de Haën* al 98%), 3-(2-amino-etil-amino)propiltrimetoxisilano (APTS) (*Fluka* al 98.0%), metanol (*FisherChemicals* al 99%), fluoruro de sodio (*AnalaR* al 97%), tetraetilortosilicato (TEOS) (*Fluka* al 98.0% (GC)) y alcohol etílico absoluto (*Carlo Erba* al 99.8%).

Equipos

Para llevar a cabo la síntesis del material es necesario utilizar los siguientes equipos: placa de agitación magnética y calentamiento, balanza de gran precisión, agitador eléctrico, estufa y una cámara de nitrógeno. Las especificaciones de estos equipos están a continuación:

- Agitador Eléctrico *Heidolph RZR 2102 control*, con un rango de velocidad de 12 a 2000 rpm y una potencia de salida de 100 W. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de biotecnología en las Plantas de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.
- Placa con agitación magnética y calentamiento *IKA RH-KT/C*, con una potencia de 400 W, rango de temperatura desde T_{amb} hasta 340°C, un indicador de velocidad de 1 a 7 y una velocidad de agitación de 0 a 2000 rpm. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales 2 de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.
- Cámara de nitrógeno construida en material acrílico (metacrilato), iluminación interior de serie con tubo fluorescente, conexión eléctrica interior y válvula para la salida del gas interior. Para facilitar la introducción del material de trabajo, la cámara dispone de una puerta circular con cierre de rosca para pasar todo el material necesario como por ejemplo matraces, filtros, columnas y demás artículos de vidrio. Además, gracias a la conexión eléctrica en el interior de la cámara, se puede introducir pequeños aparatos eléctricos como por ejemplo agitadores, balanzas, etc. Finalmente, para manipular el material se dispone de 2 guantes en el frontal de la cámara (figura 1.3). La cámara de atmósfera inerte resultó indispensable para la síntesis de la partícula magnética ya que los reactivos son fácilmente oxidables. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales 2 de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.
- Estufa *Binder series ED* con una temperatura máxima de 300°C, controlador DS con temporizador integrado de 0 a 99 horas, ajuste digital de temperatura con gran grado de precisión ($\approx 1^\circ\text{C}$) y cuenta con una función de rampa. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales 2 de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.



Figura 1.3 Foto cámara de nitrógeno, (a) vista de frente, (b) vista lateral izquierda y (c) vista por encima.

En este trabajo se realizó una caracterización en la cual se utilizan métodos convencionales como: (1) difracción de rayos X (XRD) para determinar la estructura del material, así como las diferentes fases sólidas; (2) la técnica infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) permite evaluar los grupos funcionales; (4) análisis térmicos (DSC) para analizar los cambios energéticos. Existen técnicas complementarias como la microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS), para estudiar morfología de superficies y la composición atómica; y finalmente la adsorción- desorción de nitrógeno la cual permite determinar la naturaleza del material poroso, calcular el tamaño promedio de poro y obtener el área superficial BET. El área superficial de un material es una propiedad de importancia fundamental para el control de velocidad de interacción química entre sólidos y gases o líquidos. El método básico de medición de la área superficial (Método BET) implica la determinación de la cantidad de un gas inerte, normalmente nitrógeno (N_2 como absorbato), requerido para formar una capa con un espesor monomolecular sobre la superficie de una muestra a una temperatura criogénica. La área de la muestra se calcula luego utilizando la área conocida (a partir de otras consideraciones) a ser ocupada por cada molécula de nitrógeno en esas condiciones. Las especificaciones de los equipos son:

- ***Difractómetro de rayos X***

La aplicación fundamental de la difracción de Rayos X (XRD) es la identificación cualitativa de la composición de las fases cristalinas de una muestra tanto orgánica como inorgánica (minerales, rocas, sedimentos, suelos, partículas atmosféricas, residuos, metales, aleaciones, plásticos, materiales de construcción, productos químicos, productos farmacéuticos, cerámicas,

pigmentos, etc.). La difracción está basada en las interferencias que se producen cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de anchura comparable a la longitud de onda de la radiación. Los análisis se realizaron en un equipo *Rigaku MINIFLEX II*, con una voltaje de 30mV y corriente de 15mA, a una velocidad de 2 deg./min., con un rango de escaneo de 3 a 90 deg. y un tamaño de paso de 0.08. Las muestras se encontraban en estado sólido y con la mayor uniformidad posible. La cantidad de muestra requerida es determinada por las dimensiones del porta muestras. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

- ***Microscopio electrónico de barrido***

La microscopia electrónica de barrido (SEM) es una técnica instrumental que encuentra gran cantidad de aplicaciones en diversos campos de la ciencia y la tecnología. El uso principal de la microscopia electrónica de barrido es el estudio de la morfología de materiales sólidos (forma y tamaño). Cuando SEM está acoplada a la técnica EDS se obtiene información cualitativa y semi-cuantitativa sobre la composición atómica del material, la cual se puede hacer de forma puntual o global. Los análisis se realizaron en un equipo marca *Jeol JSM-5910LV* con microsonda EDS. La muestra fue secada al vacío en un equipo marca *Desk II-Denton Vacuum*, de una presión de 1000 mtorr hasta 50 mtorr, y finalmente fue aplicada una capa de oro de aproximadamente 6 nm. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de microscopia de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

- ***Calorímetro diferencial de barrido***

La calorimetría diferencia de barrido (DSC) es una técnica de análisis térmico que permite medir los cambios energéticos de una sustancia en presencia de un material de referencia. Resulta de aplicación en estudio de polímeros, productos farmacéuticos, alimentos, materiales inorgánicos, etc. El propósito de los instrumentos térmicos diferenciales es registrar la diferencia entre el cambio de entalpía que ocurre en una muestra y un material inerte de referencia cuando ambos se calientan. Los análisis se realizaron en un equipo *DSC Q100-TA Instruments*, las muestras tenían una masa promedio de $11,00 \pm 1$ mg, las cuales fueron sometidas a una rampa de calentamiento lineal de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ desde 33°C hasta 600°C , bajo un flujo de Nitrógeno de $50\text{mL}/\text{min}$. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de magnetismo y materiales avanzados de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

- ***Analizador de área superficial y porosidad***

La adsorción-desorción de N_2 se llevó a cabo en un equipo *Micromeritics ASAP 2020* equipado con dos puertos de desgasificación. Las masas tomadas para análisis fueron de 0.1-0.15 g y los materiales fueron sometidos a desgasificación previa por un tiempo 24 horas a una temperatura de 60°C y con una presión residual de $10\mu\text{mHg}$. Las isothermas de adsorción-desorción fueron registradas a partir de una presión relativa de 10^{-6} hasta 0.99. La área superficial BET (*Brunauer-Emmett-Teller*) se registró en un rango de 0.06-0.3 P/Po. La distribución de microporo se analizó en un rango de 10^{-6} P/Po hasta 0.35 y se

analizó por el método *Hovarth-Kawazoe* utilizando una geometría tipo rendija. La distribución de mesoporo se analizó a partir de 0.35 P/Po siguiendo el procedimiento desarrollado por *Barrett, Joyner y Halenda* (método BJH), con la corrección de *Faas* y espesor estadístico de *Halsey*. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

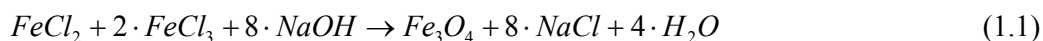
- ***Espectroscopio infrarrojo por transformada de Fourier***

El espectro infrarrojo de un compuesto proporciona gran información sobre sus propiedades internas (composición química, impurezas, interacción entre sustituyentes, análisis de grupos funcionales, etc.), por lo que es de gran importancia en análisis cualitativo. Los análisis se realizaron en un espectroscopio infrarrojo por transformada de Fourier marca *Perkin Elmer* modelo *Spectrum BX*. Con un rango de lectura de 400-4400 cm^{-1} . Las muestras estaban en estado sólido y en forma de pastilla, aproximadamente 0.15 mg muestra (0.3%), en 50 mg de KBr secado previamente a 100°C. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de análisis instrumental de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Métodos

Procedimiento de síntesis de las partículas magnéticas

Una mezcla de 500 mL de solución acuosa cloruro de hierro II- FeCl_2 (0.2 mol/L) y 500 mL de solución acuosa de cloruro de hierro III- FeCl_3 (0.3 mol/L) fueron mezcladas y agitadas a velocidad 6 en una placa de agitación magnética mientras se añadía gota a gota 200 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio- NaOH (4 mol/L). Después de añadir toda la solución acuosa de NaOH apareció un precipitado oscuro el cual sugiere ser magnetita (Fe_3O_4). Estos precipitados fueron filtrados y lavados dos veces con acetato de etilo y finalmente secados en una estufa a 30°C por 24 horas (ecuación 1.1 y figura 1.5) [48-50].



Procedimiento de síntesis de las partículas magnéticas recubiertas

Se suspendieron 2 gramos de partículas magnéticas (Fe_3O_4), anteriormente sintetizadas, en 100 ml de agua destilada. Paralelamente se preparó una mezcla de 5.0 mL de (3-(2-amino-etil-amino)propil)trimetoxisilano (APTS), 15 mL de metanol y 5 mL de solución acuosa de fluoruro de sodio- NaF (1%). Esta mezcla fue agitada a velocidad 4 en una placa de agitación magnética por 5 min. A esta mezcla, anteriormente preparada, se le añadió la solución de Fe_3O_4 y se continuó agitación con un agitador eléctrico a velocidad 250 rpm por 5 min. Entonces, mientras se agitaba fueron adicionados gota a gota 20 mL de tetraetilortosilicato (TEOS). Esta mezcla se agitó hasta un periodo de 48 horas a temperatura ambiente y velocidad 300 rpm. Esta solución fue lavada dos veces con etanol y agua destilada y finalmente filtradas y secadas en una estufa a 30°C por 48 horas. Se realizaron varios ensayos de recubrimiento de partícula variando la cantidad de TEOS (10, 20 y 30 mL), con el fin de escoger la cantidad adecuada de este reactivo (figuras 1.4 y 1.6).

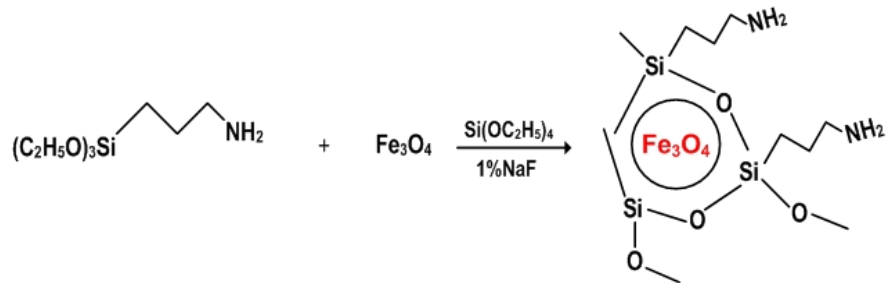


Figura 1.4 Esquema de formación de las partículas magnéticas recubiertas [49]

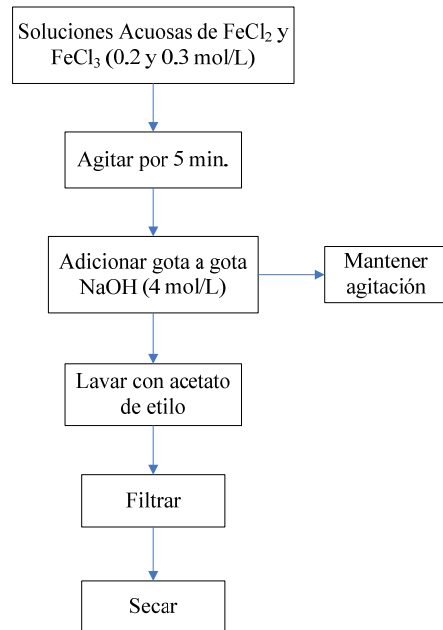


Figura 1.5 Diagrama general del proceso de síntesis de las partículas magnéticas

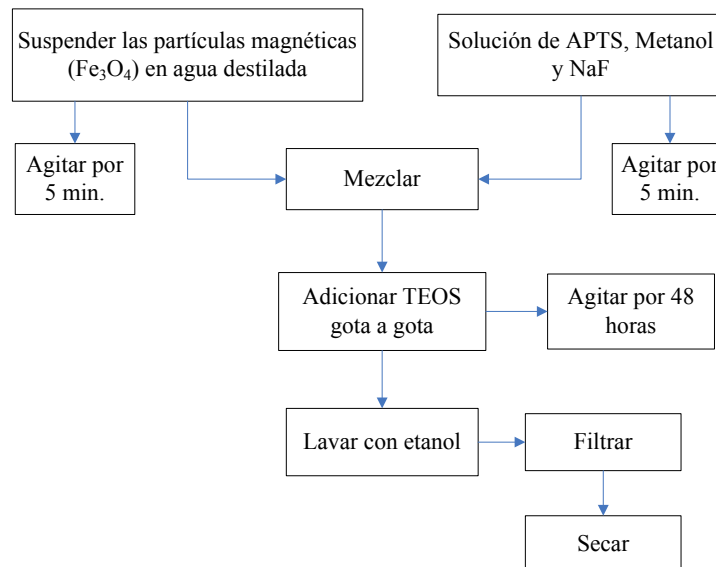


Figura 1.6 Diagrama general del proceso de síntesis de las partículas magnéticas

RESULTADOS

Difracción de Rayos X

En la figura 1.7 se observa el patrón XRD para la magnetita y en la tabla 1.1 los correspondientes índices de Miller ($d(\text{obs})$) y algunos datos reportados en la bibliografía ($d(\text{ref})$). Para la magnetita recubierta con diferentes cantidades de TEOS los patrones XRD son los mostrados en las figuras 1.8 a 1.10, sus respectivos índices de Miller ($d(\text{obs})$) y datos reportados en la bibliografía ($d(\text{ref})$) se encuentran en las tablas 1.2 a 1.4.

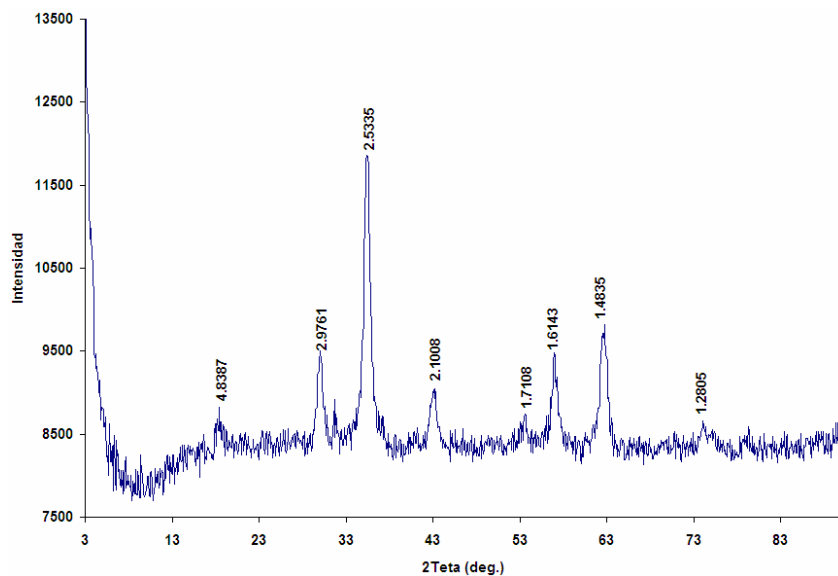


Figura 1.7 Patrón XRD para la partícula magnética obtenida en este trabajo (PM)

Tabla 1.1 Índices de Miller para la PM

(hkl)	$d(\text{obs})$	$d(\text{ref})$ [11]
----	4.8387	-----
(220)	2.9761	2.9761
(311)	2.5335	2.5384
(400)	2.1008	2.0966
(422)	1.7108	1.7063
(511)	1.6143	1.6086
(440)	1.4835	1.4801
----	1.2805	-----

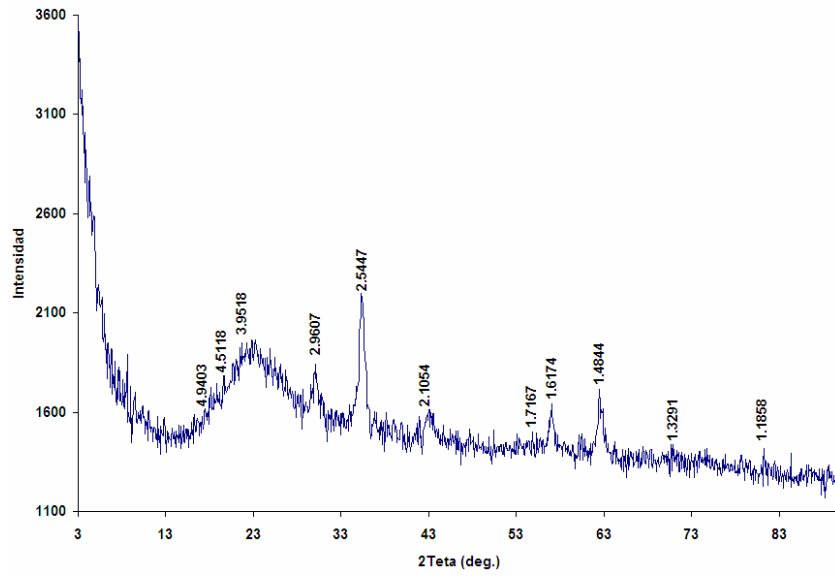


Figura 1.8 Patrón XRD para la partícula magnética con 10 mL de TEOS (PMR10)

Tabla 1.2 Índices de Miller para la PMR10

(hkl)	d(obs)	d(ref) [51]	d(ref) [11]
-----	4.9403	4.78	-----
-----	4.5118	-----	-----
(111)	3.9518	4.09	-----
(220)	2.9607	2.83	2.9761
(311)	2.5447	2.50	2.5384
(400)	2.1054	2.08	2.0966
(422)	1.7167	1.70	1.7063
(511)	1.6174	1.60	1.6086
(440)	1.4844	1.48	1.4801
-----	1.3291	-----	-----
-----	1.1858	-----	-----

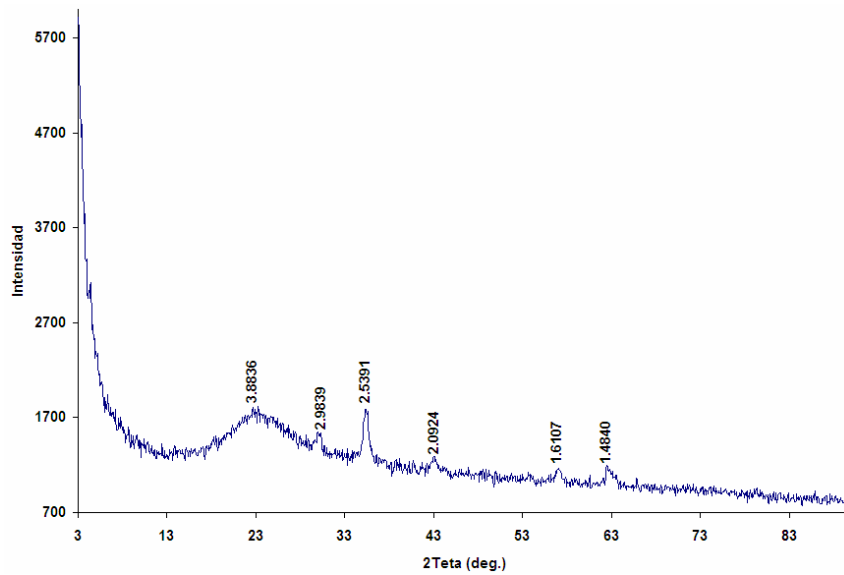
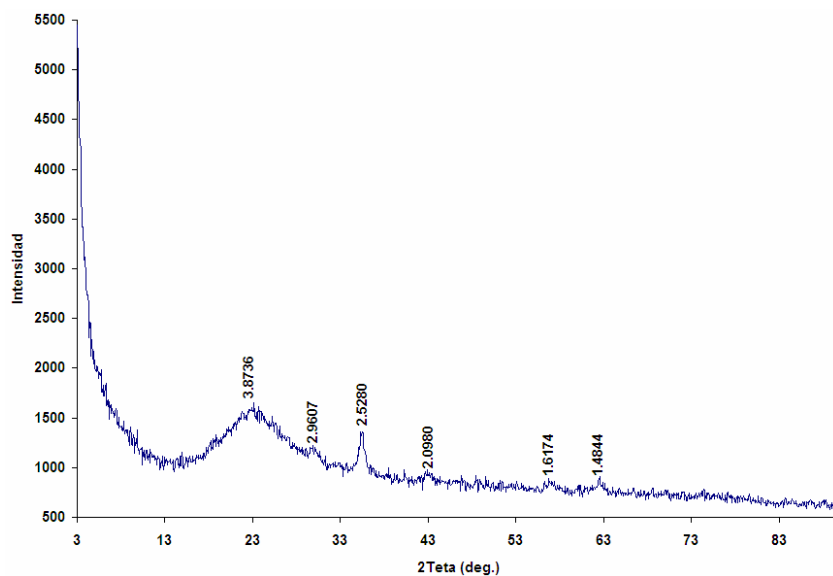


Figura 1.9 Patrón XRD para la partícula magnética con 20 mL de TEOS (PMR20)

Tabla 1.3 Índices de Miller para la PMR20

(hkl)	d(obs)	d(ref) [11]	d(ref) [51]
(111)	3.8836	-----	4.09
(220)	2.9839	2.9761	2.83
(311)	2.5391	2.5384	2.50
(400)	2.0924	2.0966	2.08
(422)	-----	1.7063	1.70
(511)	1.6107	1.6086	1.60
(440)	1.4840	1.4801	1.48

**Figura 1.10** Patrón XRD para la partícula magnética con 30 mL de TEOS (PMR30)**Tabla 1.4** Índices de Miller para la PMR30

(hkl)	d(obs)	d(ref) [11]	d(ref) [51]
(111)	3.8736	-----	4.09
(220)	2.9607	2.9761	2.83
(311)	2.5280	2.5384	2.50
(400)	2.0980	2.0966	2.08
(422)	-----	1.7063	1.70
(511)	1.6174	1.6086	1.60
(440)	1.4844	1.4801	1.48

Comparando los patrones de las partículas magnéticas (figura 1.7) con los reportados en la bibliografía (tabla 1.1) se sugiere que las partículas resultantes son magnetita- Fe_3O_4 las cuales tienen estructura tipo *spinel* (figura 1.11).

La magnetita Fe_3O_4 , también conocida como “*lodestone*”, adopta un tipo de estructura *spinel* con parámetros de redes de 8.93941 Å. La magnetita es un tipo de estructura *spinel* inversa. Los cationes se ordenan con un átomo de Fe^{+3} el cual llena los agujeros tetraédricos y los átomos de Fe^{+2} y el resto de átomos de Fe^{+3} están distribuidos al azar en los huecos octaédricos. Esto coloca a la mitad de los cationes más pequeños, Fe^{+3} en los sitios más pequeños tetraédricos (en comparación con los cationes grandes, Fe^{+2} , y los sitios más grandes octaédricos). Un estructura *spinel* normal tiene la fórmula AB_2O_4

con los átomos A en los sitios tetraédricos y los dos átomos B en los sitios octaédricos. La estructura *spinel* inversa tienen los átomos B en los sitios tetraédricos y los átomos A y B en los sitios octaédricos. La estructura inversa para la magnetita fue sugerida para explicar el rápido salto de electrones, en otras palabras, el intercambio continuo de electrones entre los átomos de Fe^{+2} y Fe^{+3} en la posición octaédrica [52, 53].

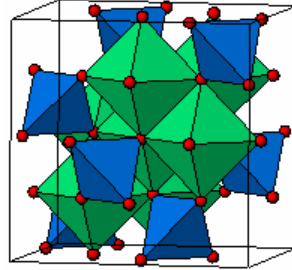


Figura 1.11 Red de poliedros de Fe (los tetraedros son azules y los octaedros son verdes) en una celda unitaria de la magnetita.

Al ser comparado el patrón XRD de las partículas recubiertas con las partículas magnéticas sin recubrir se observa un nuevo pico el cual corresponde al recubrimiento ($d = 3.9$), lo que sugiere que la partícula magnética ha sido recubierta con el óxido de silicio.

La variación de la cantidad de TEOS en el proceso de recubrimiento de la partícula magnética (10, 20 y 30 mL) no resulta en cambio de la fase de la misma pero si en un cambio en el área del pico correspondiente a $d \approx 3.9$ (las áreas calculadas son 275, 132, 185, para PMR10, PMR20 y PMR30 respectivamente), este cambio en el área da a entender que ha ocurrido algo importante en el material, lo que debe ser corroborado con otros análisis. Los valores de los índices de Miller fueron corroborados con los reportados en la bibliografía (tablas 1.2-1.4), encontrándose buenos resultados.

De los datos aportados por los patrones XRD también se puede calcular el tamaño de partícula promedio utilizando la ecuación propuesta por *Scherrer* (ecuación 1.2) y una modificación propuesta por *Warren* para el parámetro B. Esta ecuación utiliza el ancho del pico a la altura media proveniente del pico de difracción de rayos X más intenso [54].

$$L = \frac{\lambda * K}{B * \cos(\theta)} = \frac{\lambda * K}{\sqrt{(B_M^2 - B_S^2)} * \cos(\theta)} \quad (1.2)$$

Donde L es el diámetro medio de partícula en Å , λ es la longitud de onda del ánodo de cobre ($\lambda = 1.540562 \text{ Å}$), K es una constante ($K=0.9$), B es el ancho del pico a la altura media proveniente del pico de difracción más intenso (FWHM), B_M y B_S son FWHM de la muestra y el estándar ($B_S = 0.196$) y θ es ángulo de difracción del pico de mayor intensidad (ángulo de *Bragg*).

En la tabla 1.5 se puede observar los datos necesarios para la ecuación (1.2), los cuales son obtenidos de los patrones XRD, además el tamaño de partícula calculado para los diferentes materiales sintetizados (PM, PMR10, PMR20, PMR30). De estos datos

podemos decir que las partículas sintetizadas son de tamaño nanométrico, lo cual debe ser corroborado con las imágenes SEM.

Tabla 1.5 Diámetro medio de partícula

Material	$\theta_{\text{Picomáx}}$	FWHM	L(nm)
PM	35.412	0.658	13.1
PMR10	35.388	0.657	13.2
PMR20	35.405	0.699	12.9
PMR30	35.400	0.686	12.6

Imágenes y análisis elemental

En la figura 1.12 se observan las imágenes de las partículas magnéticas, en las figuras 1.13 a 1.15 se muestran las imágenes de las partículas magnéticas recubiertas variando la cantidad de TEOS (10, 20, 30 mL). Cada figura contiene diferentes distancias de acercamientos con el fin de observar con más detalle las partículas sintetizadas.

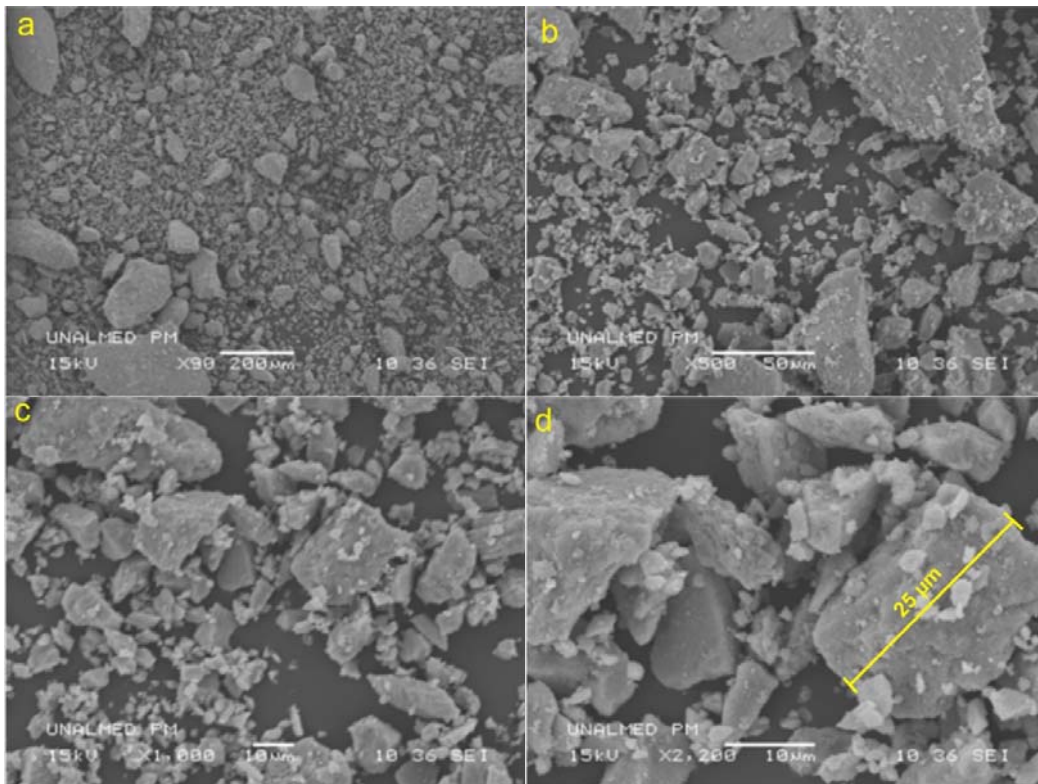


Figura 1.12 SEM para las partículas magnéticas

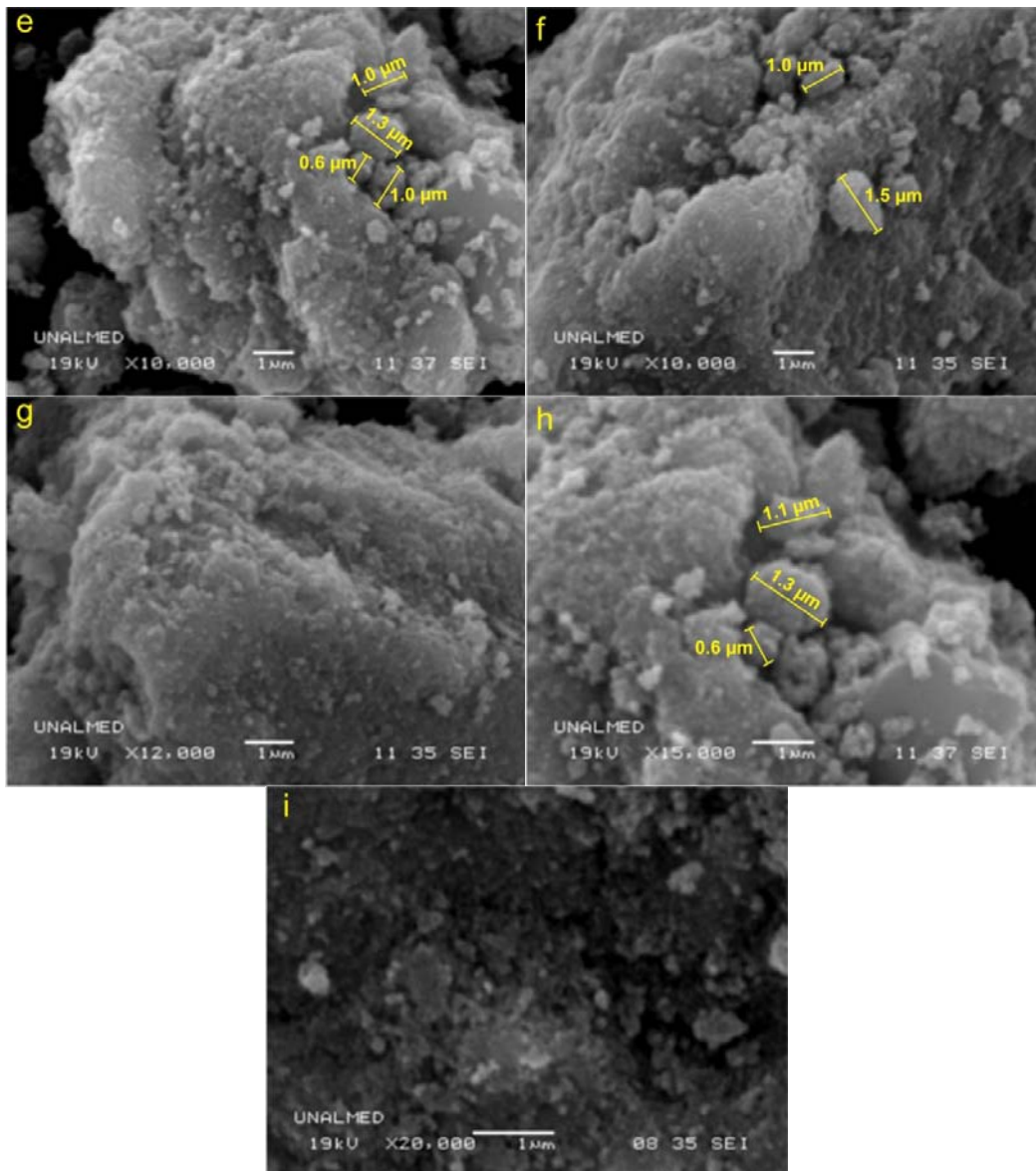


Figura 1.12 SEM para las partículas magnéticas

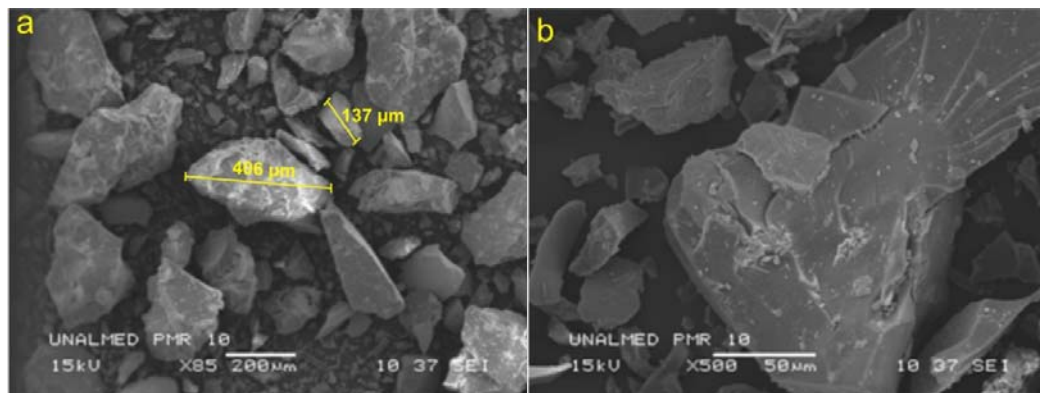


Figura 1.13 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 10 mL de TEOS

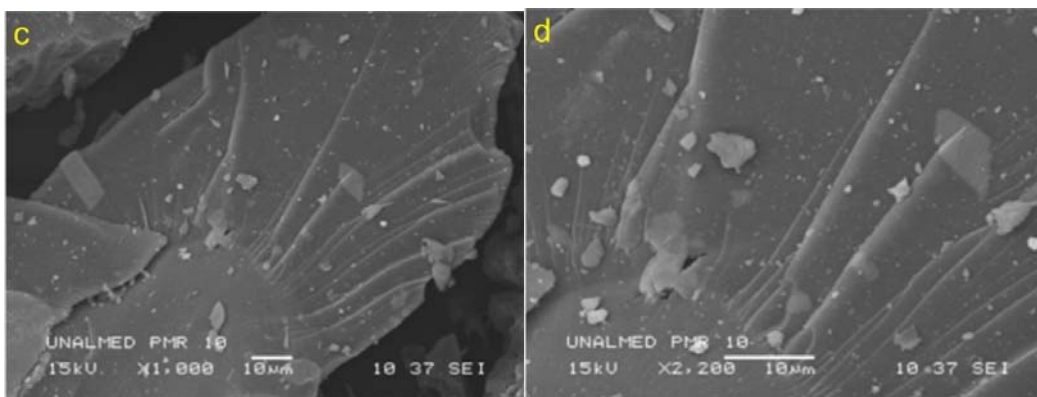


Figura 1.13 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 10 mL de TEOS

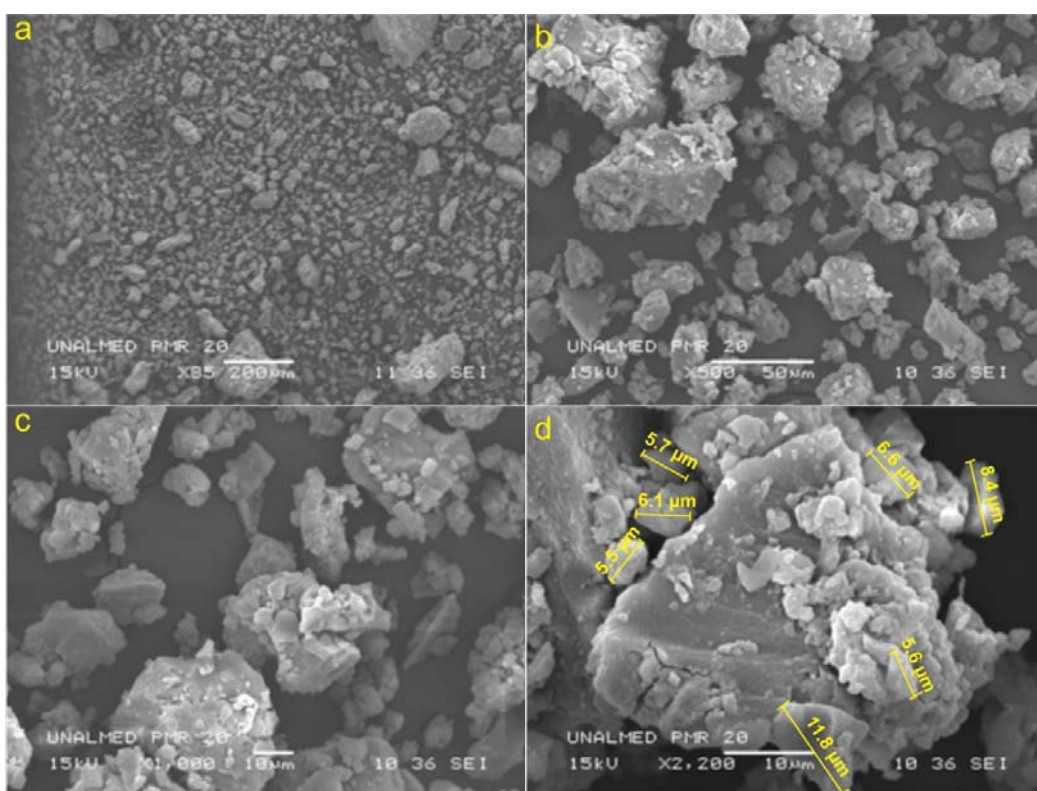


Figura 1.14 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 20 mL de TEOS

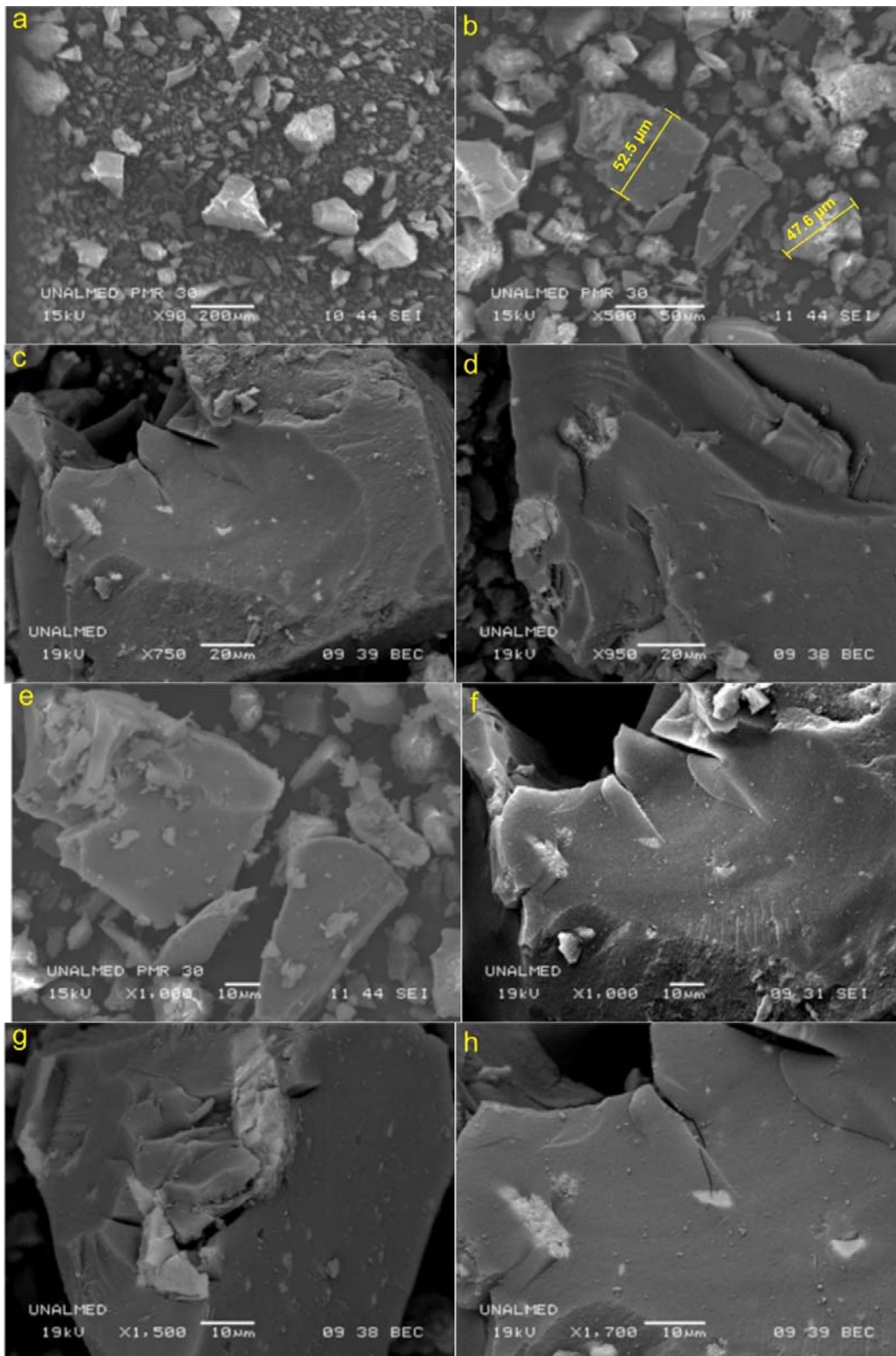


Figura 1.15 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS

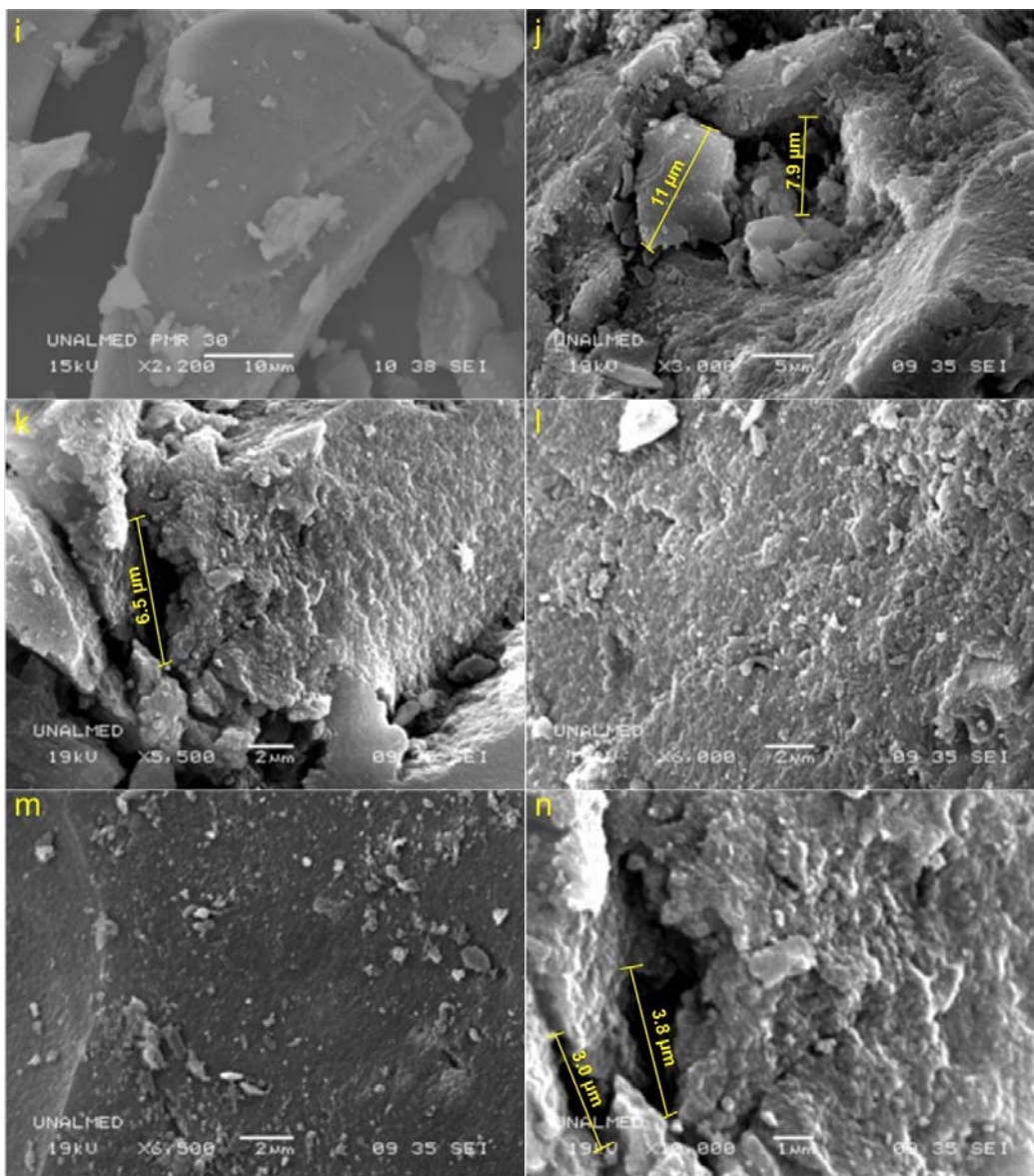


Figura 1.15 SEM para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS

En las imágenes de las partículas magnéticas (figura 1.12) se pueden observar tamaños aproximados de partículas de 25 μm teniendo un acercamiento de X2.200 (figura 1.12d). Al tener un acercamiento entre X10.000 y X15.000 (figura 1.12 e, f, h) se observa una aglomeración de las partículas debidas a que al ser magnéticas y al no ser dispersadas en una sustancia adecuada, ellas tienden a atraerse y a aglomerarse y generar espacios entre ellas mismas. Se observan tamaños de partículas aproximados entre 0.6 y 1.5 μm.

En la figura 1.13a con un acercamiento de X85 se pueden observar tamaños de partículas entre 137 y 406 μm. Además de observarse una mayor uniformidad en cuanto a superficie esto comparándolas con las partículas magnéticas sin recubrir, lo que da a entender que se recubrió el aglomerado de partículas anteriormente descrito, esto es

logrado llenando los espacios existentes en las partículas magnéticas sin recubrir (figura 1.13).

Las partículas recubiertas con 20 mL de TEOS (figura 1.14) tienen una gran diferencia con las PMR10 ya que las partículas pierden uniformidad en la superficie, debida a una mayor cantidad adicionada de TEOS, ya que hay suficiente TEOS para llenar todos los espacios generados por las mismas partículas magnéticas sin recubrir y cuando ya no se tiene más espacios que recubrir lo que hace es recubrir la superficie de estas partículas magnéticas. Además, se pueden observar tamaños entre 5.6 y 11.8 μm al tener un acercamiento X2.200 (figura 1.14d).

Las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (figura 1.15) tienen una gran diferencia con las PMR10 y PMR20 ya que las partículas tienden a ser más uniformes en la superficie, debido a una mayor cantidad adicionada de TEOS, lo que da a entender que la superficie toma características del óxido de silicio. Los tamaños aproximados de partículas son 47 a 54 μm , esto es observado a un acercamiento de X500 (figura 1.15b). Al hacer acercamientos de X3000, X5500 y X10000 (figuras 1.15 j, k, n), se pueden observar tamaños de partícula de 11 μm , además de cavidades con diámetros entre 3 y 8 μm . Las partículas magnéticas recubiertas con TEOS llenan completamente las cavidades generadas por las partículas magnéticas sin recubrir (PMR10 y PMR20), entonces para este caso el TEOS continua recubriendo la superficie de la misma a tal punto en el que hay suficiente TEOS para hacer que la superficie de la partícula magnética recubierta tome características similares al óxido de silicio.

Para complementar este análisis es necesario analizar los EDS de las partículas magnéticas (figuras 1.16 y 1.17) y las partículas magnéticas recubiertas (figuras 1.18 a 1.25).

En el caso de las partículas magnéticas se realizó el análisis en dos regiones (figuras 1.16 y 1.17). Es necesario normalizar los porcentajes atómicos con respecto al oro (Au) el cual está presente debido a que las partículas son recubiertas con este elemento y también con respecto al carbono (C) ya que las partículas son adheridas a una cinta de carbono (protocolo del SEM-EDS). La relación atómica Fe/O para dos regiones de las partículas magnéticas son 1.37 y 2.44 (tabla 1.6). Esta variación en la relación es debida a que hay zonas en las que existe un mayor porcentaje de Na y Cl, lo que ocasiona una variación en esta relación.

El EDS de la PMR10 (figura 1.18) tiene una relación Si/Fe igual a 10.90 y Fe/O = 0.039 (tabla 1.6) debido al recubrimiento de la partícula con óxido de silicio, esta relación se calculó normalizando los porcentajes atómicos como se explicó anteriormente.

Para la PMR20 (figura 1.19) la relación Si/Fe es igual a 22.52 y Fe/O = 0.023 (tabla 1.6), lo cual al ser comparado con la PMR10 se ve una diferencia significativa en las relaciones debido a que fue agregada más cantidad de óxido de silicio.

En el caso de PMR30 se analizaron varias regiones por EDS (figuras 1.20-1.25), las cuales tiene diferentes relaciones atómicas del Si/Fe y Fe/O (tabla 1.6), esto debido a que hay regiones en donde todavía existe Fe, ya que no fue recubierto, y en regiones en

donde el Si está en mayor cantidad debido a que el recubrimiento no ocurrió uniformemente. Hay regiones en donde la relación Si/Fe es mucho mayor a la encontrada en la PMR20 y esto es debido a la cantidad de TEOS adicionada.

Tabla 1.6 Relaciones atómicas obtenidas del análisis SEM-EDS para las diferentes regiones analizadas.

Material	Relación atómica Fe/O	Relación atómica Si/Fe
PM (Región 1)	1.37	N.A.
PM (Región 2)	2.44	N.A.
PMR10	0.039	10.90
PMR20	0.023	22.52
PMR30 (Región 1)	1.945	0.302
PMR30 (Región 2)	0.006	65.67
PMR30 (Región 3)	0.094	4.45
PMR30 (Región 4)	0.009	61.81
PMR30 (Región 5)	0.725	0.172
PMR30 (Región 6)	0.006	94.95

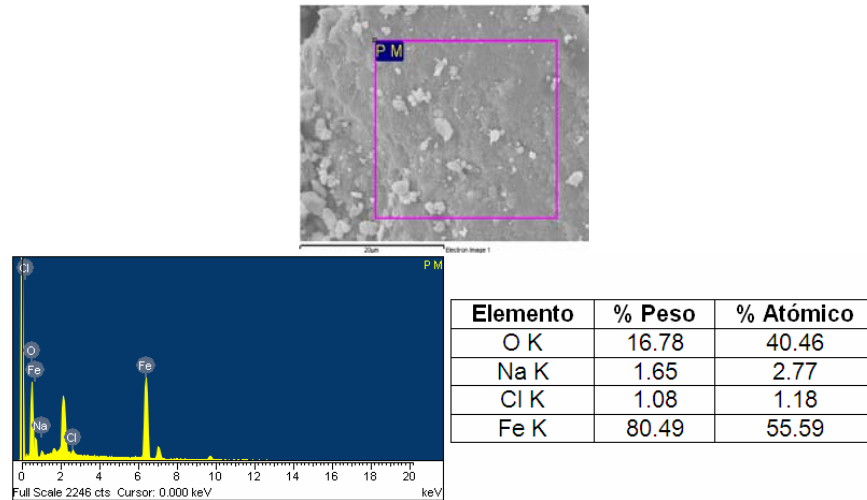


Figura 1.16 EDS para las partículas magnéticas (Región 1)

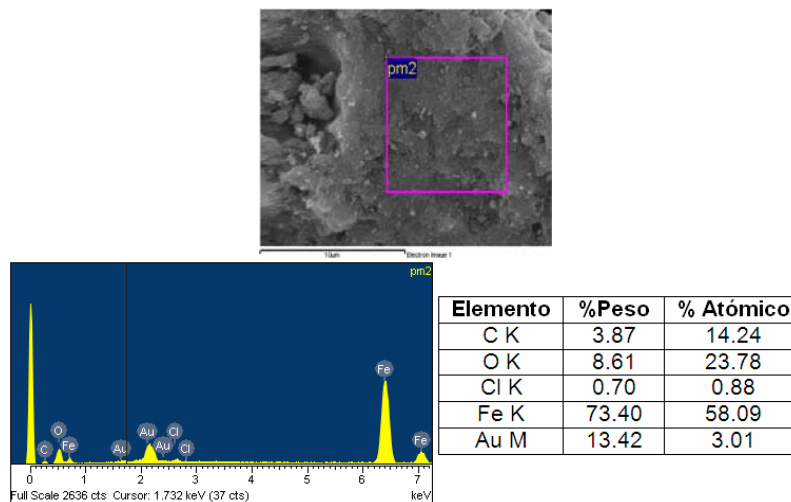


Figura 1.17 EDS para las partículas magnéticas (Región 2)

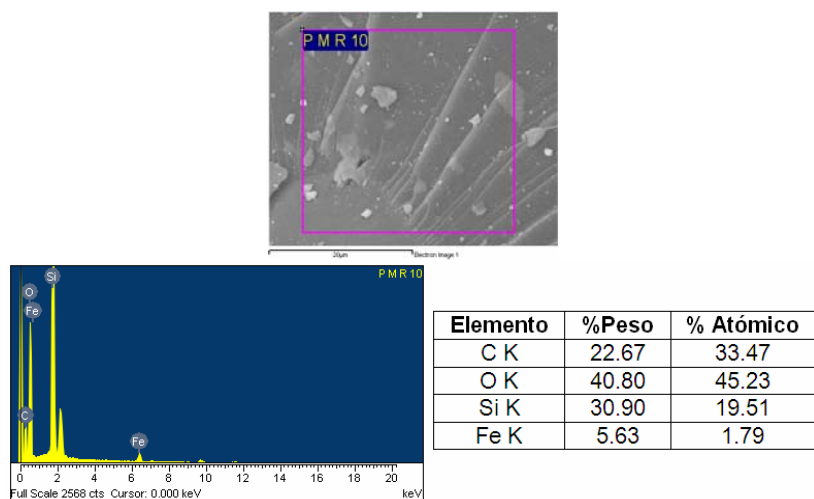


Figura 1.18 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 10 mL de TEOS

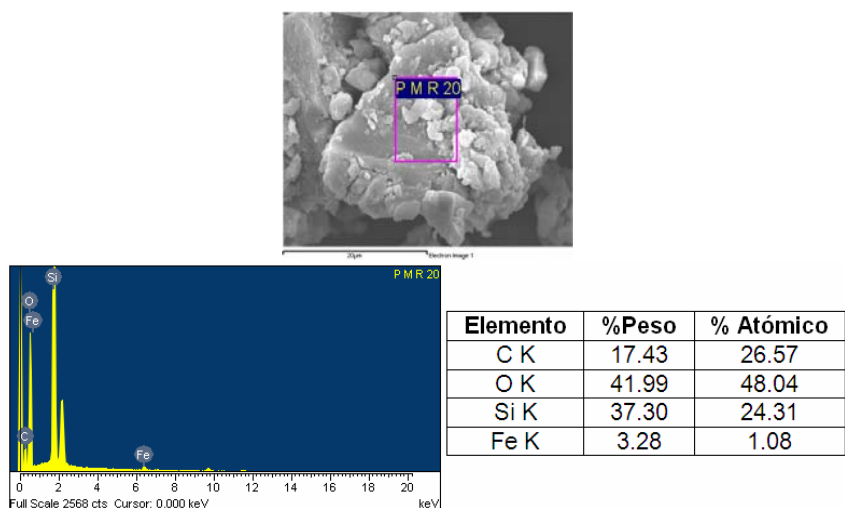


Figura 1.19 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 20 mL de TEOS

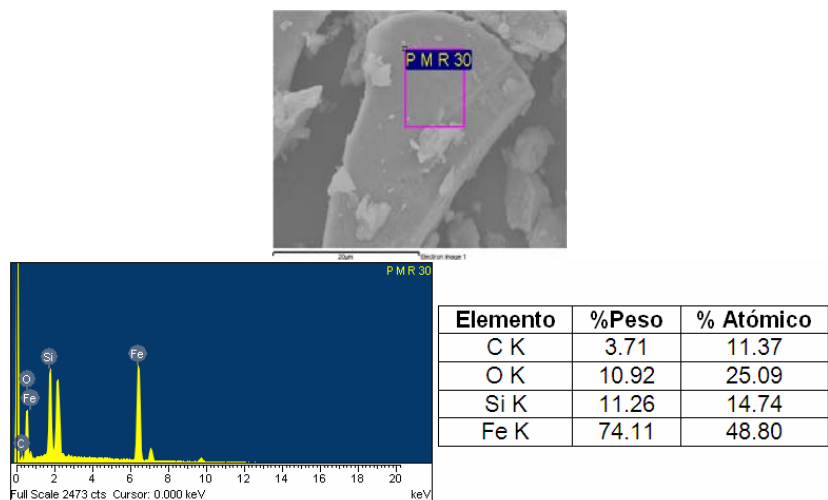


Figura 1.20 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 1)

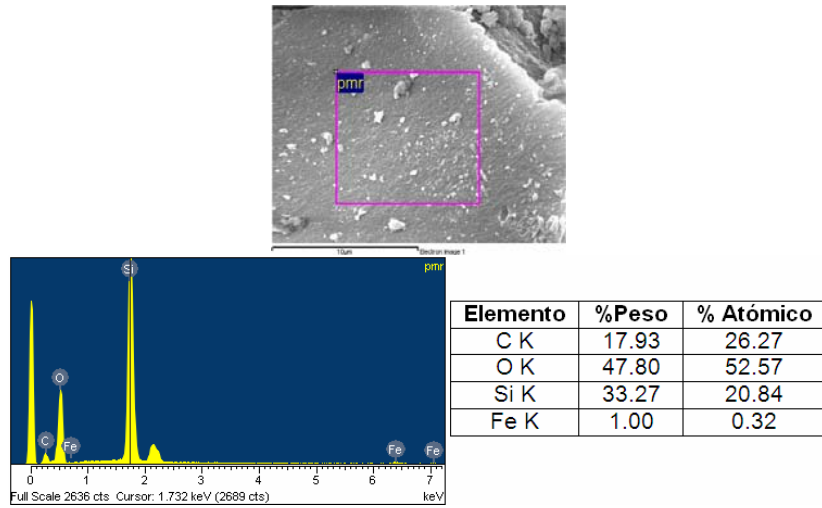


Figura 1.21 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 2)

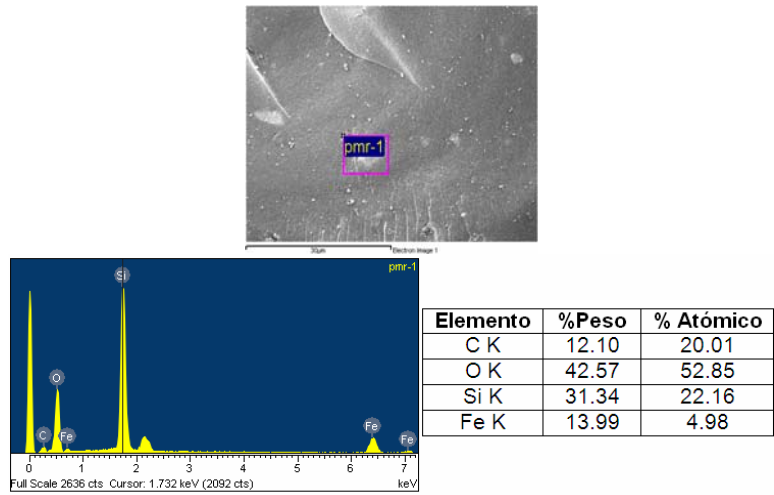


Figura 1.22 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 3)

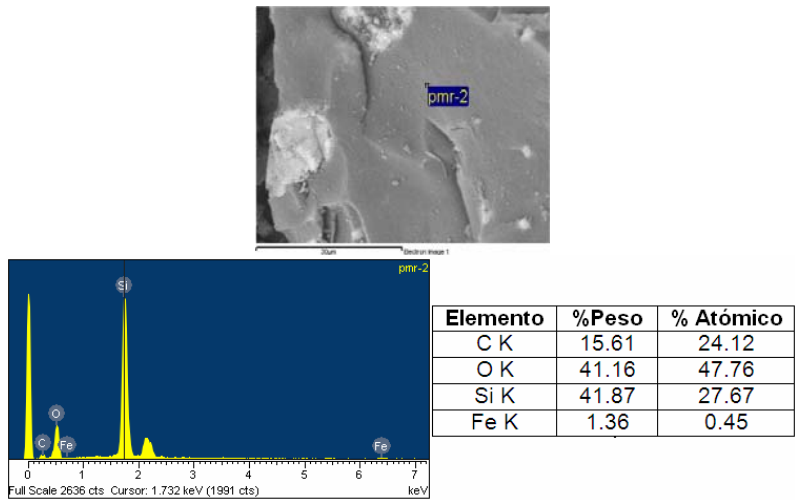


Figura 1.23 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 4)

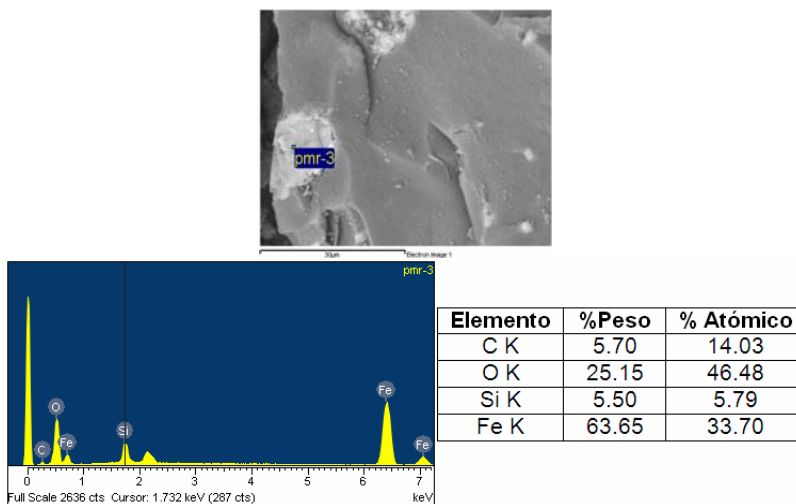


Figura 1.24 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 5)

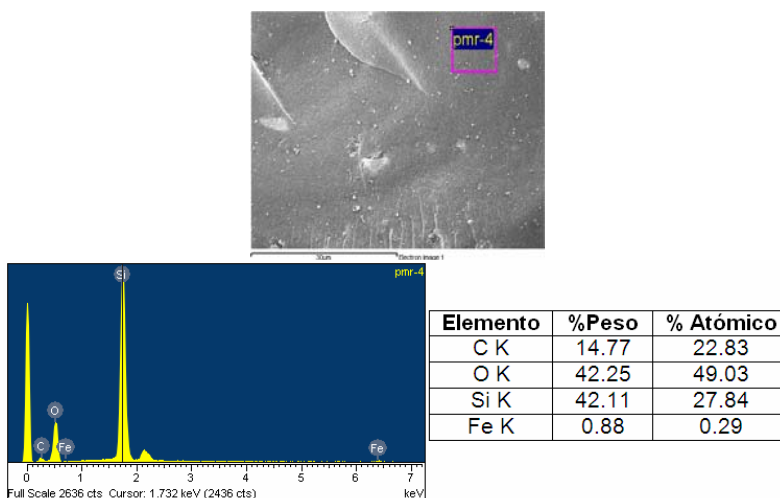


Figura 1.25 EDS para las partículas magnéticas recubiertas con 30 mL de TEOS (Región 6)

Análisis de grupos funcionales

En la figura 1.26 se observan los espectros infrarrojos para la partícula magnética y para la partícula magnética recubierta.

Para efectos de comparación de los resultados obtenidos se realizó una búsqueda en la literatura de las bandas características de las partículas magnéticas sin y con recubrimiento encontrándose lo siguiente: bandas cercanas a 3400 (modo estiramiento) y 1630 (modo tijera) cm^{-1} son correspondientes a los grupos hidroxilo (referidas a la presencia de H_2O en las muestras). Bandas cercanas a 2970 y 2920 cm^{-1} son debidas a los enlaces C-H (modo estiramiento). Banda cercana a 1091 cm^{-1} es debida a los enlaces C-N (modo estiramiento). Bandas cercanas a 1060 y 790 cm^{-1} son debidas a los enlaces Si-O-Si (modo estiramiento asimétrico). Banda cercana a 450 cm^{-1} es debida al “rocking” de los oxígenos [55]. Bandas cercanas a 570 y 375 cm^{-1} son debidas a los enlaces Fe-O [11, 51].

En el espectro infrarrojo de la partícula magnética (figura 1.26a) se puede observar la banda que corresponde a los enlaces Fe-O (578 cm^{-1}), la cual se caracteriza por ser un pico ancho y pronunciado. Al observar esta banda en el espectro de la partícula magnética recubierta (figura 1.26b), nos damos cuenta de que este pico ha tenido una reducción en tamaño y en amplitud, esto sugiere que el óxido de silicio ha recubierto la partícula magnética. Las bandas correspondientes a los enlaces Si-O-Si (1060 y 790 cm^{-1}) y al modo vibracional de “rocking” de los oxígenos (443 cm^{-1}) están presentes en el espectro de la partícula magnética recubierta (figura 1.26b) indicando el recubrimiento de la partícula.

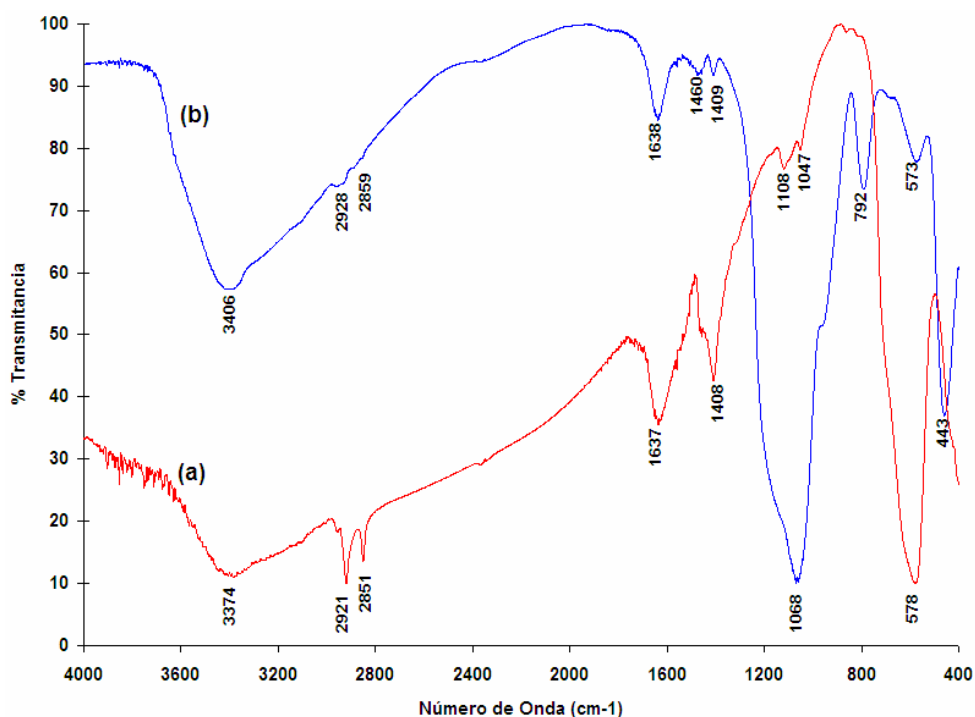


Figura 1.26 Espectros FTIR para (a) partículas magnéticas y (b) partícula magnética recubierta

Análisis térmico

Las propiedades de las silicas son determinadas en primer lugar por la actividad química, la cual depende de la concentración, distribución y el tipo de grupos hidroxil, y además, la presencia de puentes siloxanos (Si-O-Si). Un decrecimiento en la densidad superficial de los grupos OH está acompañado por una pérdida de hidrofobicidad. Por otro parte, cuando incrementa la concentración de puentes Si-O-Si esto resulta en un incremento de la hidrofobicidad de la silica.

Los procesos de deshidratación ocurren cuando existe una remoción de agua adsorbida físicamente en la superficie de la silica y la deshidroxilación se remueven grupos OH de la superficie de la misma.

La magnitud exacta T_1 que corresponde a la completa deshidratación y el inicio de la deshidroxilación es de aproximadamente $190 \pm 10^\circ\text{C}$. A 190°C , los parámetros cinéticos

calculados para los datos experimentales reportados por *Zhuravlev* muestran un incremento en la energía de activación del proceso de desorción de agua, la cual cambia de ~ 10 a ~ 17 kcal/mol, y también el orden cinético de la reacción de esta desorción térmica cambia de 1 a 2, esto debido a un cambio en la humedad superficial del material [56].

De los perfiles de DSC que se le realizó a las partículas magnéticas sin y con recubrimiento (figuras 1.27-1.30) se puede localizar la temperatura T_1 . Esta temperatura está muy cercana a la reportada por *Zhuravlev*, lo que confirma un cambio en la estructura del material lo que conlleva a un cambio en la capacidad de adsorber agua.

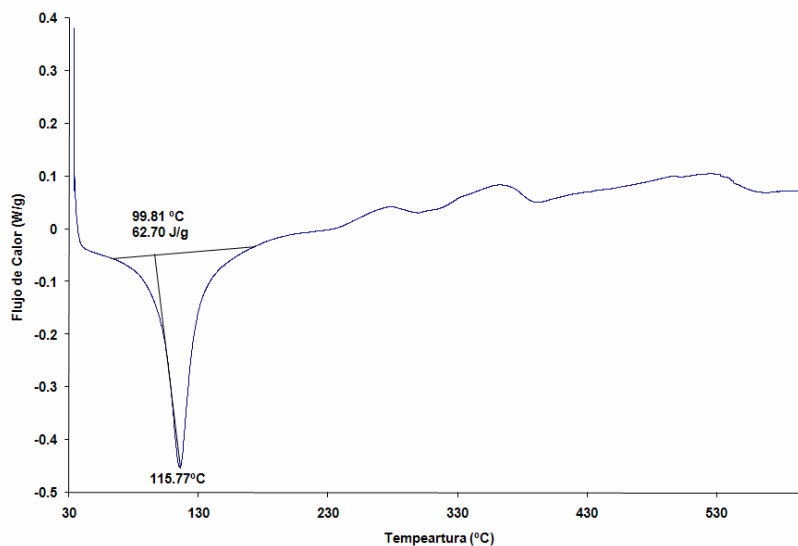


Figura 1.27 DSC para la partícula magnética (PM)

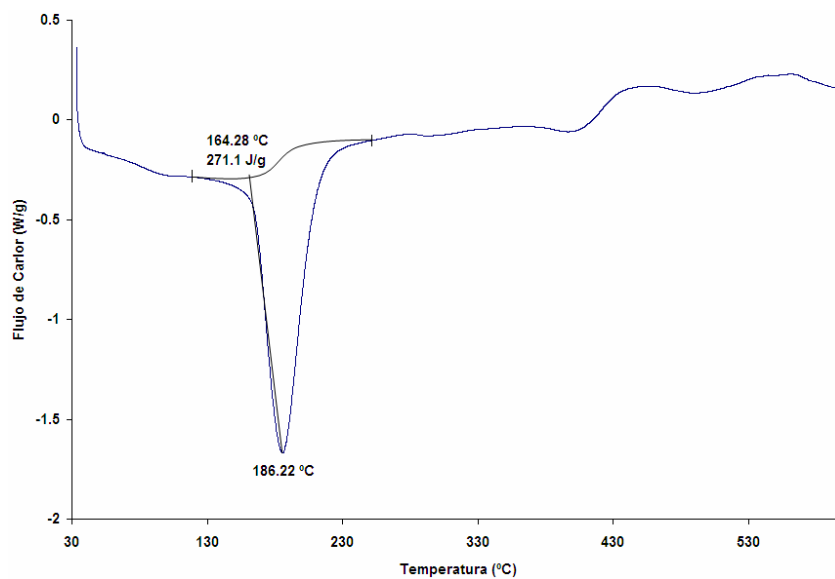


Figura 1.28 DSC para la partícula magnética con 10 mL de TEOS (PMR10)

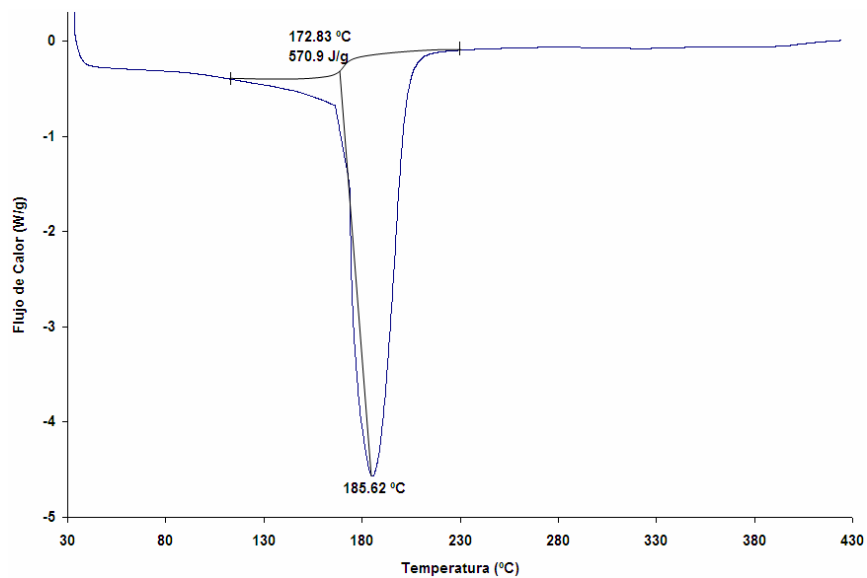


Figura 1.29 DSC para la partícula magnética con 20 mL de TEOS (PMR20)

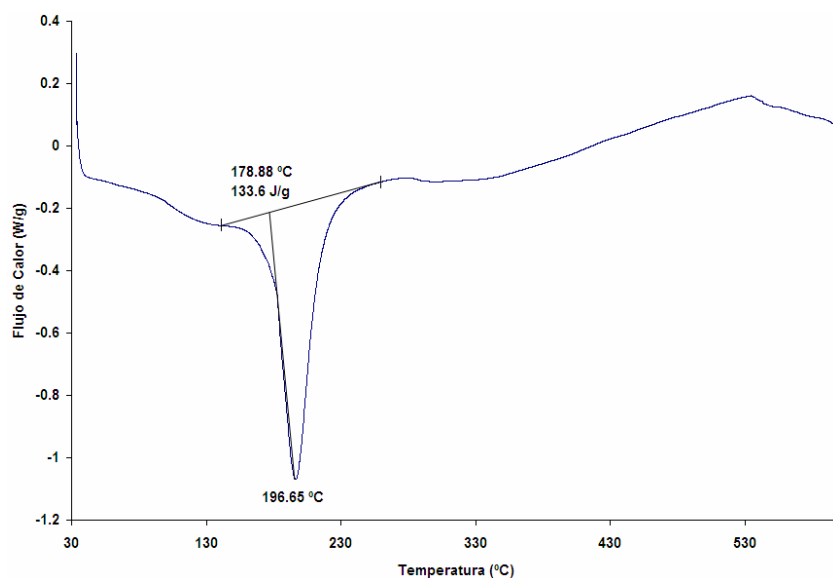


Figura 1.30 DSC para la partícula magnética con 30 mL de TEOS (PMR30)

Análisis Textural

Las isotermas de adsorción son muy útiles para la caracterización de sólidos porosos. La IUPAC reconoce 6 tipos de isotermas de adsorción [57]. En la figura 1.31 se muestra un esquema de cada una de ellas.

La isoterma tipo I se caracteriza porque la adsorción se produce a presiones relativas bajas y es la que muestran los sólidos microporosos. La isoterma tipo II es característica de sólidos macroporosos o no porosos, tales como negros de carbón. La isoterma tipo III ocurre cuando la interacción adsorbato-adsorbente es baja. Este tipo de isoterma se ha observado en adsorción de agua en negros de carbón grafitizados. La isoterma tipo IV es característica de sólidos mesoporosos. Presenta un incremento de la cantidad

adsorbida importante a presiones relativas intermedias y ocurre mediante un mecanismo de llenado en multicapas. La isoterma tipo V, al igual que la isoterma tipo III es característica de interacciones adsorbato-adsorbente débiles, pero se diferencia de la anterior en que el tramo final no es asintótico. La isoterma tipo VI es poco frecuente. Este tipo de adsorción en escalones ocurre sólo para sólidos con una superficie no porosa muy uniforme. Este tipo de isoterma se ha observado en la adsorción de gases nobles en carbón grafitizado.

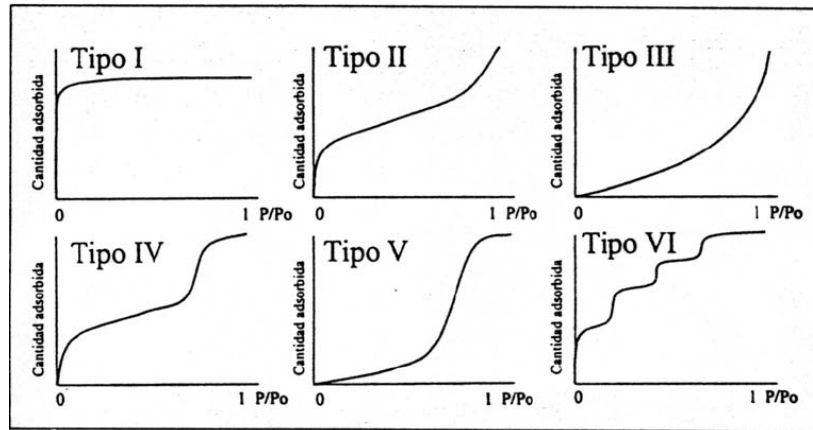


Figura 1.31 Representación esquemática de los seis tipos de isothermas de adsorción.

Los ciclos de histéresis se clasifican según *Boer* en Tipo A, B, C, D, E, F y G (figura 1.32) y según la IUPAC en H1, H2, H3 y H4 (figura 1.33).

Los ciclos de histéresis Tipo A se caracteriza porque las ramas de adsorción y desorción son muy pendientes a presiones relativas intermedias, es propia de poros en forma tubular abiertos en ambos extremos, y de poros en forma de botella. Tipo B se caracteriza por poseer una rama de adsorción muy pendiente cerca de la saturación, produciéndose la desorción a presiones intermedias, es propia de poros en forma de hendidura abierta con paredes paralelas y de poros con cuerpos anchos, cuellos cortos y estrechos. Tipo C se produce una brusca subida de la rama de adsorción a presiones relativas medias, y una rama de desorción algo pendiente, también situada a presiones relativas e intermedias. Es propia de materiales con poros esferoidales todos con un radio de la cavidad circular pero con entrada de varios tamaños. Tipo D es análogo al tipo B, pero con una rama de desorción mucho más pendiente, es un tipo de histéresis poco frecuente y se presenta en poros con forma de láminas de anchura variable y poros en forma de cuña, abiertos por los dos lados. Tipo E se caracterizan por presentar una rama de adsorción muy pendiente y de desorción mucho más pendiente a presiones relativas medias. Ocurre en forma de botella con cuerpos grandes y radios efectivos variables y cuellos pequeños y estrechos. Tipo F se caracteriza por la fuerte pendiente de las ramas de adsorción y desorción. Se presenta en el caso de poros con una distribución heterogénea de tamaños y de distintas geometrías. Tipo G se caracteriza por no presentar histéresis. Lo presentan materiales con poros cónicos cerrados por un extremo y poros en forma de cuña, de doble cono, cilíndrica y de sección esférica.

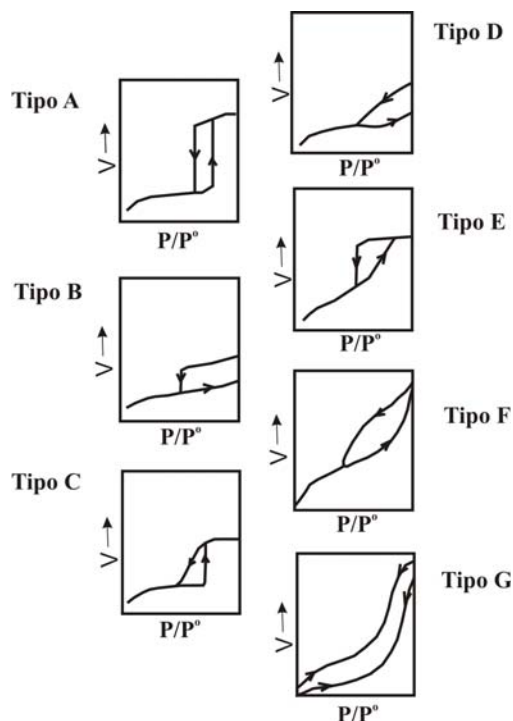


Figura 1.32 Ciclos de histéresis según clasificación Boer

En el ciclo de histéresis Tipo H1 (tipo A de la clasificación de la figura 1.32) se puede observar que las dos ramas de la isoterma de adsorción son paralelas y casi verticales, mientras que en H4 las ramas son paralelas y casi horizontales. Los tipos H2 (tipo E en figura 1.32) y H3 (tipo B en figura 1.32) son intermedios entre aquéllos.

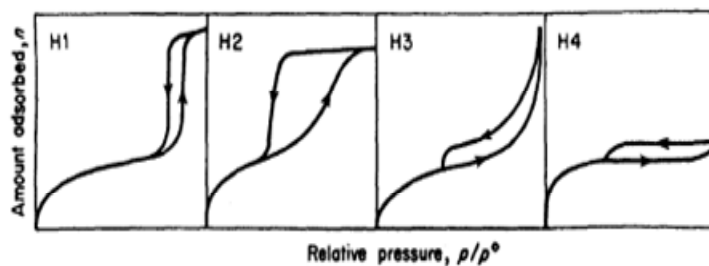


Figura 1.33 Ciclos de histéresis según clasificación IUPAC

En la figura 1.34 se observan las isothermas de la partícula magnética, partículas recubiertas con 10 mL, 20 mL y 30 mL de TEOS (PMR10, PMR20, PMR30), acorde con la representación esquemática de los seis tipos de isothermas de adsorción (figura 1.31) y a los ciclos de histéresis (figuras 1.32 y 1.33) se tiene que:

La isoterma de la partícula magnética (PM) y de las partícula magnética recubierta con 10 mL de TEOS (PMR10) son de tipo II, esta isoterma es característica de sólidos microporosos, con una histéresis Tipo F, la cual se caracteriza por la fuerte pendiente de las ramas de adsorción y desorción, presentando condensación capilar de nitrógeno en los poros y a bajas presiones relativas se observa el llenado de microporos. Se presenta

en el caso de poros con una distribución heterogénea de tamaños y de distintas geometrías (figura 1.34).

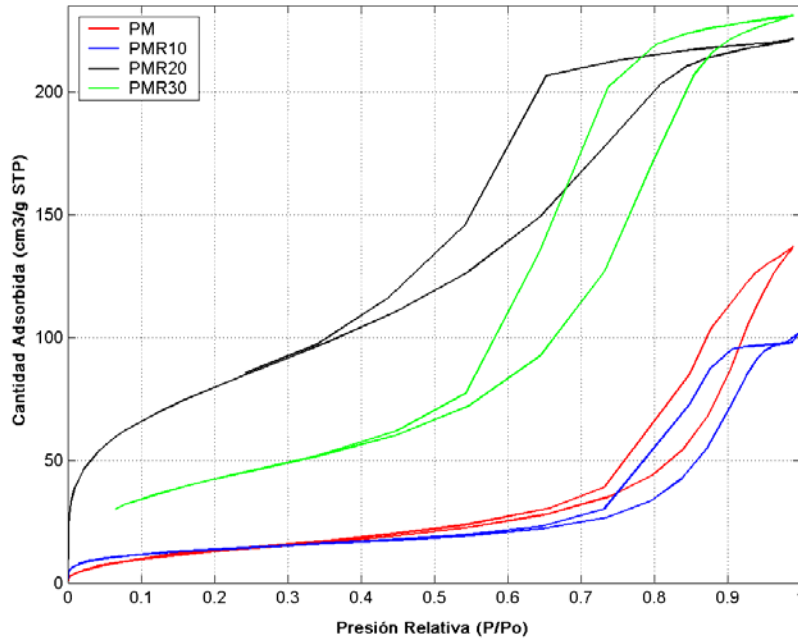


Figura 1.34 Isotermas de adsorción para todas las partículas

La isoterma de la partícula magnética recubierta con 20 mL de TEOS (PMR20) es de tipo IV, la cual se presenta en materiales porosos adsorbentes que contienen un rango de radio de poro de aproximadamente 15-1000 Å. La pendiente incrementa a presiones relativas altas indicando un incremento de adsorbato cuando el poro es llenado. Al igual que en la isoterma tipo II, el punto de inflexión de la isoterma generalmente ocurre cerca de la primera monocapa. Además, presenta una histeresis Tipo E según la clasificación *Boer* y H2 según la IUPAC, la cual se caracterizan por presentar una rama de adsorción muy pendiente y de desorción mucho más pendiente a presiones relativas medias. Ocurre en forma de botella con cuerpos grandes y radios efectivos variables y cuellos pequeños y estrechos (figura 1.34).

La isoterma de la partícula magnética recubierta con 30 mL de TEOS (PMR30) es de tipo IV, como el hallazgo encontrado para PMR20. A presiones relativas entre 0.65 y 0.7 la histeresis se comporta como la del tipo F, mientras que a presiones relativas superiores a esta el comportamiento de la histeresis es de tipo H2 según la IUPAC. La aparición de estas histeresis mixtas sugiere heterogeneidad en la forma de los poros (figura 1.34).

Las áreas superficiales, los calores isostéricos de adsorción, el volumen de monocapa, el volumen de poro y diámetro promedio de poro para los diferentes materiales se pueden observar en la tabla 1.7.

El área superficial de PM disminuyó drásticamente (90%) con el recubrimiento con óxido de silicio (PMR10), mientras que para las muestras PMR20 y PMR30 (450% y 250% respectivamente) las áreas fueron mayores al material original (PM). El diámetro

promedio de poro para PMR10 es mayor que para las otras partículas y lo contrario ocurre con el volumen de poro y el volumen de monocapa.

El valor de C (calor isostérico de adsorción) es la medida del estiramiento de la interacción entre la molécula de nitrógeno y la superficie del poro, valores bajos de C indica que la interacción entre el nitrógeno y la superficie del poro está relacionada a la presencia de estructuras mesoporosas (tabla 1.7).

Tabla 1.7 Resumen de propiedades texturales de los materiales sintetizados

Material	Área Superficial BET (m ² /g)	C*	Volumen de monocapa cm ³ /g STP	Volumen de poro (cm ³ /g)	Diámetro promedio de poro (Å)**
PM	65.0141	40.269575	14.9348	0.218582	134.4826
PMR10	6.9129	78.375761	1.5880	0.024260	140.3752
PMR20	294.4319	65.039211	67.6357	0.342465	46.5256
PMR30	162.0824	47.029211	37.233	0.405461	100.0629

*Calor isostérico de adsorción, **Tomado de la isoterma de adsorción

En las figuras 1.35-1.38 se observa las distribuciones de tamaño de poro calculado para el brazo de desorción por el método BJH con la corrección de *Faas* y el espesor estadístico según lo propuesto por *Halsey* (ecuación 1.3)

$$t = 3.540 * \left(\frac{-5}{\ln(P/P_o)} \right)^{1/3} \quad (1.3)$$

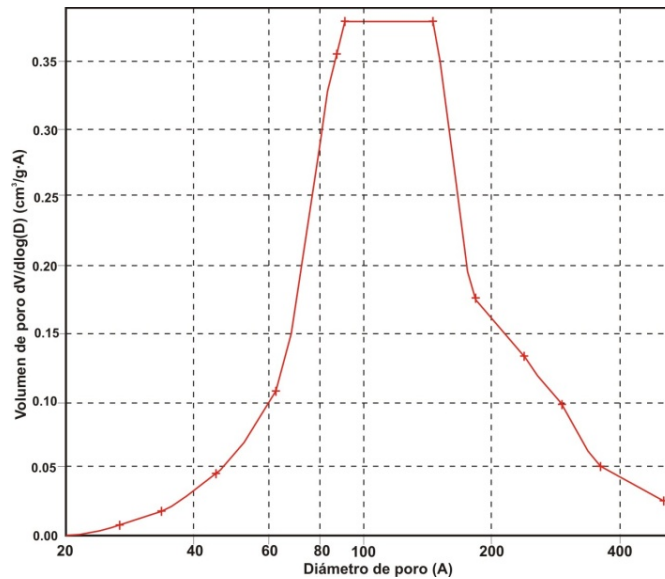


Figura 1.35 Distribuciones de tamaño de poro calculado para el brazo de desorción por el método BJH con la corrección de *Faas*, dV/dlog(D) para PM

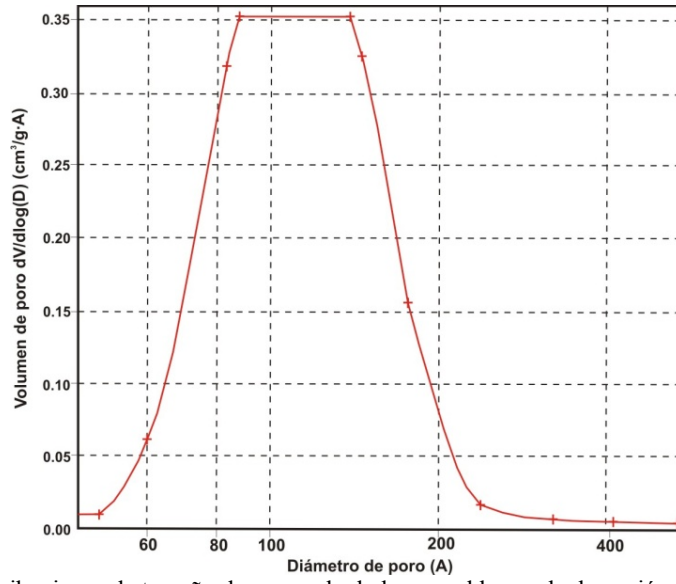


Figura 1.36 Distribuciones de tamaño de poro calculado para el brazo de desorción por el método BJH con la corrección de *Faas*, $dV/d\log(D)$ para PMR10

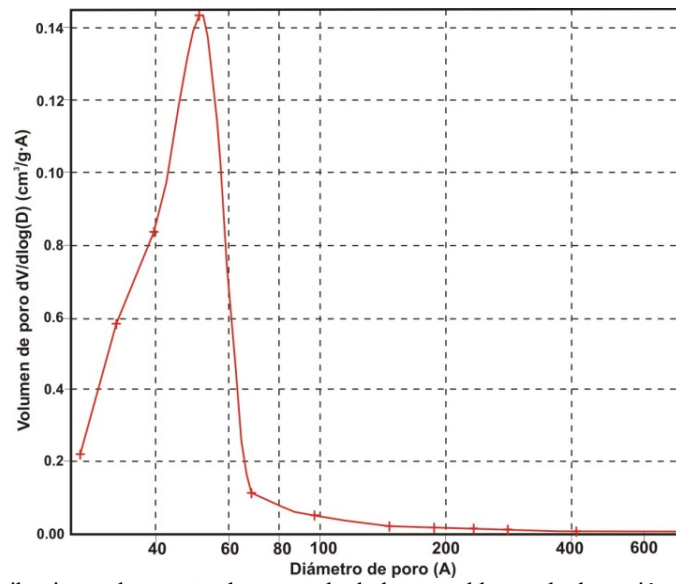


Figura 1.37 Distribuciones de tamaño de poro calculado para el brazo de desorción por el método BJH con la corrección de *Faas*, $dV/d\log(D)$ para PMR20

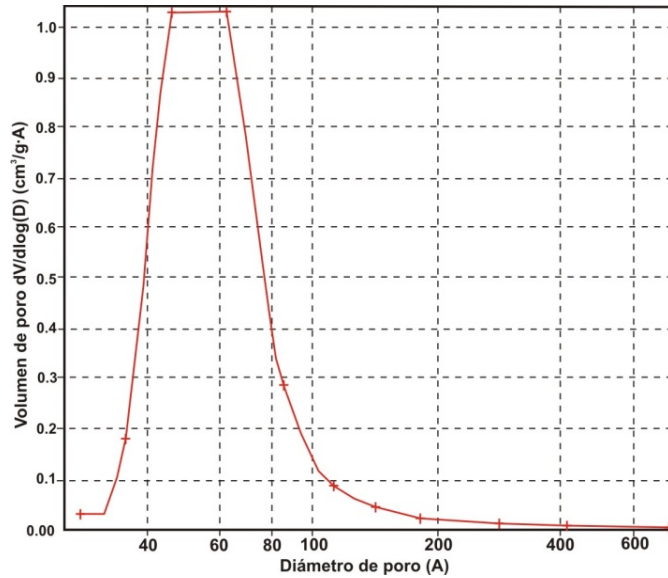


Figura 1.38 Distribuciones de tamaño de poro calculado para el brazo de desorción por el método BJH con la corrección de *Faas*, $dV/d\log(D)$ para PMR30

En la figura 1.35 se observa una distribución muy ancha, centrada en 100 Å, lo que soporta la heterogeneidad de los tamaños de poro. Para la PMR10 se observa un comportamiento similar al de la partícula magnética, aunque el tamaño de poro medio se encuentra en 120 Å (figura 1.36). Mientras que para la PMR20 (figura 1.37), esta distribución se hace un poco más aguda, centrada en 50 Å, aunque al parecer hay una contribución importante de partículas con un tamaño de poro de 40 Å. Para las partículas PMR30 (figura 1.38) se observa un comportamiento similar al de la partícula magnética y al de PMR10, aunque el tamaño de poro medio se encuentra en 50 Å.

Se realizó además un análisis de microporo por el método *Horvath-Kawazoe* (figura 1.39-1.42), para la partícula magnética se evidencia una distribución bimodal, encontrándose poros con tamaños entre 8 y 19 Å. Para la partícula PMR10 se observa una distribución bimodal. Para la partícula PMR20 se evidencia una distribución trimodal. Para la partícula PMR30 se evidencia una distribución unimodal.

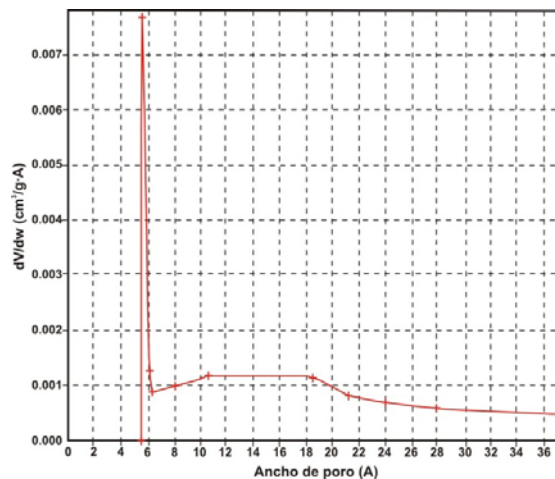


Figura 1.39 Análisis de microporo por el método *Horvath-Kawazoe* para PM

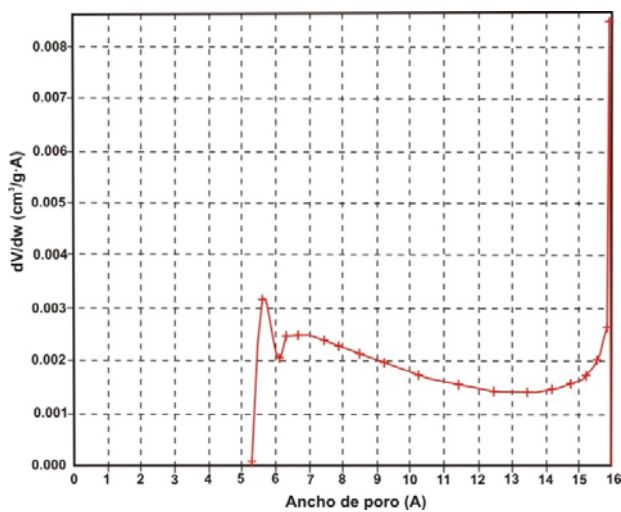


Figura 1.40 Análisis de microporo por el método *Horvath-Kawazoe* para PMR10

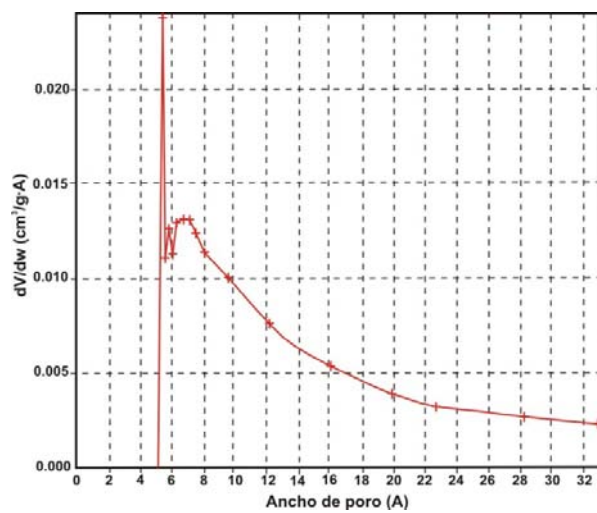


Figura 1.41 Análisis de microporo por el método *Horvath-Kawazoe* para PMR20

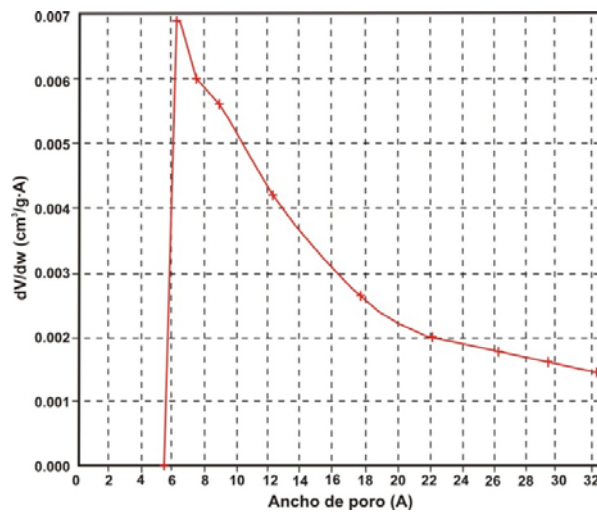


Figura 1.42 Análisis de microporo por el método *Horvath-Kawazoe* para PMR30

DISCUSIÓN

De los patrones XRD de la partícula magnética podemos sugerir que las partículas sintetizadas tienen características de la magnetita (Fe_3O_4), las cuales tienen estructura tipo *spinel*. Estas características de la magnetita fueron también corroboradas con los espectros infrarrojos y con su respectivo análisis EDS en los que se confirma la presencia de grupos Fe. El tamaño de partícula calculado con la ecuación de *Scherrer* nos da a entender que las partículas tienen un diámetro promedio de 9.6 nm, lo que no fue consistente con las micrografías SEM. En estas imágenes se observa que existe una aglomeración de partículas lo que da a lugar a un diámetro promedio de partícula mayor al que se esperaba (25 μm) y una uniformidad en la superficie de la partícula debida a esta aglomeración. Al tener estas aglomeraciones se puede decir que las partículas magnéticas tienen un área superficial considerable (65 m^2/g), la cual aporta grandes ventajas a la hora de realizar un recubrimiento, además del valor del calor isostérico de adsorción ($C=40$) podemos decir que este material tiene gran probabilidad de tener estructuras mesoporosas, ya que cuando este calor se hace menor existe mayor probabilidad de presencia de estas estructuras. El recubrimiento de la partícula magnética se hace necesario, debida a la necesidad de adecuarla para su posterior utilización como soporte en la inmovilización de enzimas. Para este caso en particular se emplean soluciones de APTS-TEOS los cuales nos aportan los grupos silanos, estos grupos nos van a permitir un proceso de inmovilización más eficiente.

La cantidad de APTS para este estudio fue constante (5 mL), pero la cantidad de TEOS se varió en 10, 20 y 30 mL. Al ser comparados los patrones XRD de las partículas magnéticas sin recubrir y las partículas magnéticas recubiertas se observa la aparición de un nuevo pico, el correspondiente al recubrimiento, lo que sugiere que ha existido un cambio en la estructura de la partícula. Para corroborar lo encontrado en los patrones XRD se realizó un espectro infrarrojo en el cual aparece unas nuevas bandas correspondientes a los grupos del óxido de silicio, lo cual nos sugiere que la partícula magnética ha sido recubierta.

En las imágenes SEM podemos observar que a medida que se aumenta la cantidad de TEOS existe un cambio en la superficie de las partículas y un cambio en el tamaño de partícula. El tamaño de partícula calculado por la ecuación de *Scherrer* nos da a entender que existen diámetros de partícula de aproximadamente 10 nm, que como para el caso de la partícula magnética sin recubrir, esto no pudo ser corroborado con las imágenes SEM, ya que como se dijo anteriormente existe un aglomerado de partículas magnéticas. Entonces lo que hace la solución de APTS-TEOS es llenar estos espacios generados por las partículas magnéticas, encontrándose una cantidad necesaria para llenar estos espacios que fue de aproximadamente 10 mL y cuando fue adicionado 20 mL lo que ocurre es que ya hay suficiente TEOS para llenar estos espacios y lo que ocurre es un recubrimiento de las partículas magnéticas en su superficie. Finalmente cuando es adicionado los 30 mL de TEOS ya existe un exceso de este reactivo lo que hace que la partícula magnética adquiera propiedades en su superficie del óxido de silicio. Esto puede ser visto con más detalle en los análisis de EDS en donde la partícula magnética recubierta con 10 mL de TEOS tiene una relación Si/Fe de 10.9, para 20 mL de 22.52 y para 30 mL hay regiones en donde esta relación es 65,67. Por otro lado, a medida que aumenta la cantidad de TEOS existe un aumento en la temperatura T_1 , la

cual fue obtenida de los perfiles DSC, que para el caso de PMR10, PMR20 y PMR30 son 186.22, 185.62, 196,65 °C, respectivamente. Este cambio en la temperatura está relacionado con la capacidad que tienen estos materiales de absorber agua, a medida que aumenta esta temperatura existe un aumento en la concertación de los puentes Si-O-Si lo que conlleva a un aumento en la hidrofobicidad del material.

Finalmente al analizar los datos del área superficial nos damos cuenta de que existe un cambio significativo en la partícula magnética recubierta con 10 mL de TEOS ya que su área superficial disminuye drásticamente ($6.91 \text{ m}^2/\text{g}$), lo cual confirma lo anteriormente observado en las micrografías SEM y en el análisis EDS, además podemos decir que en esta partícula existe una menor probabilidad de que existan estructuras mesoporosas debido a que el valor del calor isostérico de adsorción sufrió un aumento ($C=78$) comparado con las otras partículas recubiertas con 20 y 30 mL. Lo contrario es observado para la partícula magnética recubierta con 20 mL de TEOS ya que existe un aumento en el área superficial ($294.43 \text{ m}^2/\text{g}$) lo cual sigue siendo acorde a lo encontrado en las imágenes SEM y en el análisis EDS. Para este caso la probabilidad de que exista mesoporosidad aumenta un poco ya que el valor de calor isostérico de adsorción disminuyó ($C=65$) indicando que puede entonces existir estructuras mesoporosas en el material. La partícula magnética recubierta con 30 mL de TEOS está en un intermedio relacionada con la PMR10 y PMR20 ya que el área superficial es $162 \text{ m}^2/\text{g}$ y el calor isostérico de adsorción es 47 lo que da a entender que la partícula magnética tienen mayor probabilidad de estructuras mesoporosas y como ya se dijo anteriormente existe tal cantidad de TEOS para recubrir la partícula que esta toma características del óxido de silicio. Finalmente, con estas diferencias, anteriormente descritas, entre las partículas magnéticas recubiertas con 10, 20 y 30 mL de TEOS, podemos sugerir la utilización de la partícula magnética recubierta con 20 mL de TEOS como soporte para el proceso de inmovilización de la enzima.

REFERENCIAS

1. Sánchez, R.D., Rivas, J., Vaqueiro, P., Lopez-Quintela, M.A., and Caeiro, D., *Particle size effects on magnetic properties of yttrium iron garnets prepared by a sol-gel method*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2002. 247(1), p. 92-98.
2. Sánchez, R. and Zysler, R., *Magnetismo de sistemas nanoscópicos, algunas aplicaciones*. Ciencia Hoy, 2005. 15(85), p. 40-51.
3. Curtis, A. and Wilkinson, C., *Nanotechniques and approaches in biotechnology*. Trends in Biotechnology, 2001. 19, p. 97-101.
4. West, J.L. and Halas, N.J., *Applications of nanotechnology to biotechnology*. Current Opinion in Biotechnology, 2000. 11, p. 215-217.
5. Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., and Dobson, J., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2003. 36, p. 167-181.
6. Safarik, I. and Safarikova, M., *Magnetic nanoparticles and biosciences* Monats Chemistry, 2002. 133, p. 737-759.
7. Tartaj, P., *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. Vol. 6. 2004: American Scientific Publishers. 822-831.
8. Tartaj, P., Morales, M.P., Veintemillas-Verdaguer, S., González-Carreño, T., and Serna, C.J., *The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2003. 36(182-197).
9. Berry, C.C. and Curtis, A.S.G., *Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2003. 36, p. 198-206
10. Halling, P.J. and Dunnill, P., *Magnetic supports for immobilized enzymes and bioaffinity adsorbents*. Enzyme and Microbial Technology 1980. 2(1), p. 2-10.
11. Huang, S.H., Liao, M.H., and Chen, D.H., *Direct Binding and Characterization of Lipase onto Magnetic Nanoparticles*. Biotechnology Progress, 2003. 19(3), p. 1095-1100.
12. Kuznetsov, A.A., Filippov, V.I., Kuznetsov, O.A., Gerlivanov, V.G., Dobrinsky, E.K., and Malashin, S.I., *New ferro-carbon adsorbents for magnetically guided transport of anti-cancer drugs*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999. 194(1-3), p. 22-30.
13. Lubbe, A.S., Bergemann, C., Brock, J., and McClure, D.G., *Physiological aspects in magnetic drug-targeting*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999. 194(1-3), p. 149-155.
14. Koneracka, M., Kopcansky, P., Timko, M., and Ramchand, C.N., *Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2002. 252, p. 409-411.
15. Koneracka, M., Kopcansky, P., Timko, M., Ramchand, C.N., de Sequeira, A., and Trevan, M., *Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002. 18(1-3), p. 13-18.
16. Arica, M.Y., Yavuz, H., Patir, S., and Denizli, A., *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, 2000. 11(2-3), p. 127-138.

17. Akgol, S., Kacar, Y., Denizli, A., and Arica, M.Y., *Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres*. Food Chemistry, 2001. 74(3), p. 281-288.
18. Chen, J.P. and Su, D.R., *Latex Particles with Thermo-Flocculation and Magnetic Properties for Immobilization of α -Chymotrypsin*. Biotechnology Progress, 2001. 17(2), p. 369-375.
19. Horak, D., Rittich, B., Safar, J., Spanova, A., Lenfeld, J., and Benes, M.J., *Properties of RNase A Immobilized on Magnetic Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Microspheres*. Biotechnology Progress, 2001. 17(3), p. 447-452.
20. Josephson, L., Tung, C.H., Moore, A., and Weissleder, R., *High-Efficiency Intracellular Magnetic Labeling with Novel Superparamagnetic-Tat Peptide Conjugates*. Bioconjugate Chemistry, 1999. 10(2), p. 186-191.
21. Tong, X.D., Xue, B., and Sun, Y., *A Novel Magnetic Affinity Support for Protein Adsorption and Purification*. Biotechnology Progress, 2001. 17(1), p. 134-139.
22. Khng, H.P., Cunliffe, D., Davies, S., Turner, N.A., and Vulfson, E.N., *The synthesis of sub-micron magnetic particles and their use for preparative purification of proteins*. Biotechnology and Bioengineering, 1998. 60, p. 419-424.
23. Taylor, J.I., Hurst, C.D., Davies, M.J., Sachsinger, N., and Bruce, I.J., *Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA*. Journal of Chromatography A, 2000. 890(1), p. 159-166.
24. Tong, X.D. and Sun, Y., *Agar-Based Magnetic Affinity Support for Protein Adsorption*. Biotechnology Progress, 2001. 17(4), p. 738-743.
25. Dekker, R.F.H., *Immobilization of a lactase onto a magnetic support by covalent attachment to polyethyleneimine-glutaraldehyde-activated magnetite*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1989. 22, p. 289-310.
26. Kondo, A. and Fukuda, H., *Preparation of thermo-sensitive magnetic hydrogel microspheres and application to enzyme immobilization*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997. 84(4), p. 337-341.
27. Sauzedde, F., Elaissari, A., and Pichot, C., *Thermosensitive magnetic particles as solid phase support in an immunoassay*. Macromolecular Symposium, 2000. 151, p. 617-623.
28. Schutt, W., Gruttner, C., Hafeli, U., Zborowski, M., Teller, J., Putzar, H., and Schumichen, C., *Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy possibilities and limitations: a mini-review*. Hybridoma, 1997. 16, p. 109-117.
29. Rudge, S.R., Kurtz, T.L., Vessely, C.R., Catterall, L.G., and Williamson, D.L., *Preparation, characterization, and performance of magnetic iron-carbon composite microparticles for chemotherapy*. Biomaterials, 2000. 21(14), p. 1411-1420.
30. Lubbe, A.S., Alexiou, C., and Bergemann, C., *Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting*. Journal of Surgical Research, 2001. 95(2), p. 200-206.
31. Rusetski, A.N. and Ruuge, E.K., *Magnetic fluid as a possible drug carrier for thrombosis treatment*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1990. 85(1-3), p. 299-302.
32. Josephson, L., Pérez, J.M., and Weissleder, R., *Magnetic Nanosensors for the Detection of Oligonucleotide Sequences*. Angewandte Chemie International Edition, 2001. 40(17), p. 3204-3206.

33. Katz, E., Sheeney-Haj-Ichia, L., Buckmann, A.F., and Willner, I., *Dual biosensing by magneto-controlled bioelectrocatalysis*. *Angewandte Chemie*, 2002. 41, p. 1343-1346.
34. Haik, Y., Pai, V., and Chen, C.-J., *Development of magnetic device for cell separation*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999. 194(1-3), p. 254-261.
35. Hancock, J.P. and Kemshead, J.T., *A rapid and highly selective approach to cell separations using an immunomagnetic colloid*. *Journal of Immunological Methods*, 1993. 164(1), p. 51-60.
36. Molday, R.S. and Molday, L.L., *Separation of cells labeled with immunospecific iron dextran microspheres using high gradient magnetic chromatography*. *FEBS Letters*, 1984. 170(2), p. 232-238.
37. O'Brien, S.M., Thomas, O.R.T., and Dunnill, P., *Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption*. *Journal of Biotechnology*, 1996. 50(1), p. 13-25.
38. Abudiab, T. and Beitle, R.R., *Preparation of magnetic immobilized metal affinity separation media and its use in the isolation of proteins*. *Journal of Chromatography A*, 1998. 795(2), p. 211-217.
39. Levison, P.R., Badger, S.E., Dennis, J., Hathi, P., Davies, M.J., Bruce, I.J., and Schimkat, D., *Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification*. *Journal of Chromatography A*, 1998. 816(1), p. 107-111.
40. Uhlen, M., *Magnetic separation of DNA*. *Nature*, 1989. 340, p. 733-734.
41. Watson, J.H.P., Ellwood, D.C., and Duggleby, C.J., *A chemostat with magnetic feedback for the growth of sulphate; reducing bacteria and its application to the removal and recovery of heavy metals from solution*. *Minerals Engineering*, 1996. 9(9), p. 973-983.
42. Ngomsik, A.-F., Bee, A., Draye, M., Cote, G., and Cabuil, V., *Magnetic nano- and microparticles for metal removal and environmental applications: a review*. *Comptes Rendus Chimie*, 2005. 8(6-7), p. 963-970.
43. Orbell, J.D., Dao, H.V., Kapadia, J., Ngeh, L.N., Bigger, S.W., Healy, M., Jessop, R., and Dann, P., *An investigation into the removal of oil from rock utilising magnetic particle technology*. *Marine Pollution Bulletin*. In Press, Corrected Proof.
44. Sugimoto, T., *Preparation of monodispersed colloidal particles*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1987. 28, p. 65-108.
45. Tartaj, P., Morales, M.P., González-Carreño, T., Veintemillas-Verdaguer, S., and Serna, C.J., *Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005. 290-291, p. 28-34.
46. Suzuki, M., Shinkai, M., Kamihira, M., and Kobayashi, T., *Preparation and characteristics of magnetite-labelled antibody with the use of poly(ethylene glycol) derivatives*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1995. 21, p. 335-345.
47. Peng, Z.G., Hidajat, K., and Uddin, M.S., *Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004. 271, p. 277-283.

48. Sun, S., Zeng, H., Robinson, D.B., Raoux, S., Rice, P.M., Wang, S.X., and Li, G., *Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, 2004. 126(1), p. 273-279.
49. Zeng, L., Luo, K., and Gong, Y., *Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006. 38(1), p. 24-30.
50. Kitajima, K., Fujita, T., Sogoshi, N., and Nakabayashi, S., *Synthesis of Magnetic Composite Particles of γ -Fe₂O₃@SiO₂ and the Control of the Structural Color of the Colloidal Crystal by Magnetic Fields*. Chemistry Letters, 2004. 33(9), p. 1106-1107.
51. Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H.-y., Zhang, H.-q., and Gu, N., *Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003. 212(2-3), p. 219-226.
52. Fleet, M.E., *The structure of magnetite*. Acta Crystallographica Section B, 1981. 37, p. 917-920.
53. Rozenberg, G.K., Amiel, Y., Xu, W.M., Pasternak, M.P., Jeanloz, R., Hanfland, M., and Taylor, R.D., *Structural characterization of temperature- and pressure-induced inverse \leftrightarrow normal spinel transformation in magnetite* Physical Review B, 2007. 75, p. 020102.
54. Moore, D.M. and Reynolds, R.C., *X-Ray Diffraction and the identification and analysis of clay minerals*. Second Edition ed. 1997, New York: Oxford University Press.
55. Gunde, M.K., *Vibrational modes in amorphous silicon dioxide*. Physica B: Condensed Matter, 2000. 292(3-4), p. 286-295.
56. Zhuravlev, L.T., *The surface chemistry of silica - The Zhuravlev Model*, in *Colloidal silica. Fundamentals and application*, H.E. Bergna and W.O. Roberts, Editors. 2006, CRC Taylor and Francis: Portland, OR.
57. Webb, P.A. and Orr, C., *Analytical methods in fine particle technology*. First Edition ed. 1997, Norcross, U.S.A.: Micromeritics Instrument Corporation.

CAPÍTULO 2

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

RESUMEN

En este capítulo se describe el procedimiento de inmovilización de la lipasa *Candida Rugosa* en una partícula magnética (magnetita) por medio de activación con glutaraldehído. Se utilizaron técnicas de caracterización como difracción de rayos X (XRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), microscopia electrónica de barrido (SEM-EDS) y análisis del área superficial, con el fin de verificar la inmovilización de la enzima y confirmar características como tamaño de partícula, estructura cristalina, área superficial, grupos funcionales y características térmicas. Además se realizó la medición de la actividad enzimática siguiendo una reacción de esterificación del ácido oleico con butanol. El contenido de proteína de la enzima inmovilizada fue hallado por el método *Biuret* y confirmado con el método de *Kjeldahl*. Finalmente la enzima inmovilizada fue probada en la reacción de transesterificación de aceite de palma con etanol.

INTRODUCCIÓN

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente [1, 2].

Algunas de las ventajas del uso de enzimas inmovilizadas son el aumento de la estabilidad de la enzima, la posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso, la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada, posibilidad de reciclaje del catalizador, purificación de productos y prevención del crecimiento microbiano [2-5].

Algunos de los inconvenientes del proceso de inmovilización son la alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte, siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante el proceso de la inmovilización y el biocatalizador tiende a ser más caro que la enzima nativa [2].

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías, retención física y unión química (figuras 2.1 y 2.2) [2, 6].

Los métodos de inmovilización mediante retención física están divididos en atrapamiento e inclusión de membranas (figura 2.1). El atrapamiento consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o

mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. Este método de atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína [7-10].

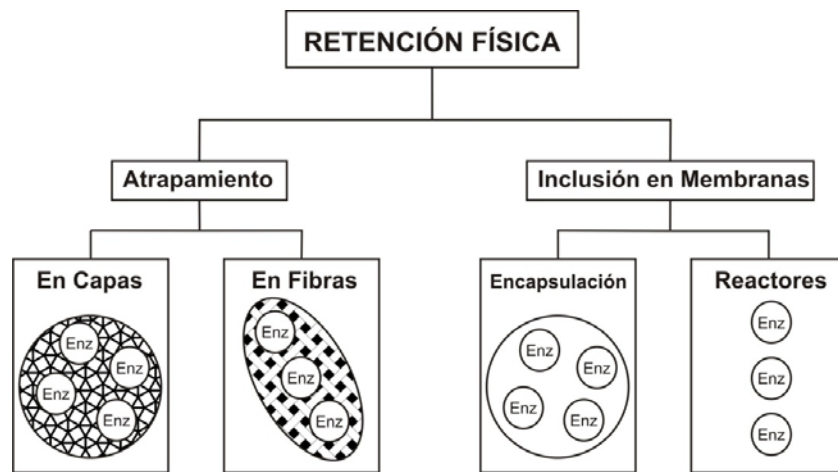


Figura 2.1 Métodos de inmovilización mediante retención física.

La inclusión en membranas, está dividida en dos tipos, la microencapsulación que es una técnica en la que las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos. Los reactores de membrana los cuales son sistemas que contienen enzimas atrapadas. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana o por contacto continuo de una solución enzimática con la membrana [11-15].

Los métodos de inmovilización de enzimas mediante unión química están divididos en unión a soportes y reticulado (figura 2.2). La unión a soportes es uno de los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información [16-21]. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el

comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos, soportes inorgánicos y orgánicos. Dentro de los primeros se tienen una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.). Los soportes orgánicos se pueden clasificar en polímeros naturales que a su vez están divididos en polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc), proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc), polímeros sintéticos los cuales están divididos en poliolefinas (como el poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.) y otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

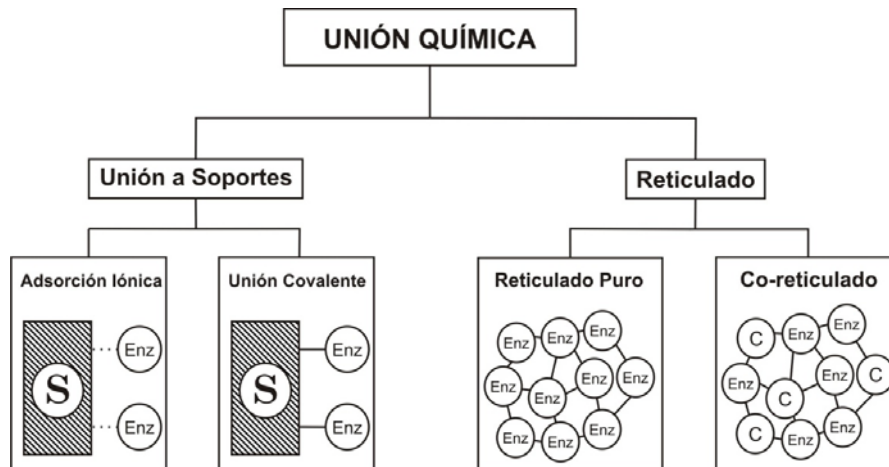


Figura 2.2 Métodos de inmovilización mediante unión química.

El reticulado, también denominado entrecruzamiento o *cross-linking*, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas. El método del reticulado consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de la enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida [22-25]. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una

elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional. Actualmente el método más novedoso de *cross-linking* que consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído [26-30] (*Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs*). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria es estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas. Esta tecnología se ha aplicado a enzimas muy diferentes, las cuales se han utilizado en la obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos [31, 32].

Existen varias posibilidades del uso de glutaraldehído para llevar a cabo el proceso de inmovilización de proteínas, como por ejemplo el uso de soportes previamente activados [26-33] o proteínas previamente adsorbidas sobre soportes con grupos aminos primarios tratadas con glutaraldehído [34, 35].

Desde el punto de vista de la inmovilización, ambos protocolos siguen un mecanismo similar, una primera adsorción rápida de la proteína por intercambio iónico, seguido de una reacción covalente [36, 37]. Sin embargo, la primera estrategia conduce a una modificación química de los grupos de la enzima, mientras en el segundo caso toda la superficie de la proteína es modificada [38].

Cuando la inmovilización se realiza sobre soportes pre-activados, los grupos amino primarios de la enzima reaccionan con los grupos aldehídos, los cuales han sido introducidos por modificación de los grupos amino del soporte (usualmente con 2 moléculas de glutaraldehído). El pH usual para realizar la inmovilización sobre estos soportes está entre de 7 y 8.5, ya que el soporte activado con glutaraldehído es poco estable a valores altos de pH. A estos valores de pH, la reactividad de los grupos *Lys*-amino estimada puede ser bastante baja [39].

Sin embargo, cuando la enzima es adsorbida sobre el soporte, y luego se trata con glutaraldehído dentro de las condiciones adecuadas, todos los grupos amino primarios de la enzima y del soporte se pueden activar con una molécula de glutaraldehído. Esto permite tener un vínculo cruzado (*cross-linking*) intenso dentro de las condiciones de reacción [38]. De esta forma, la molécula de glutaraldehído enlazada a los grupos amino-lisina de la enzima reaccionan covalentemente con la molécula de glutaraldehído enlazada a los grupos amino primarios del soporte estableciendo un enlace covalente multipunto de la enzima-soporte. Ambas estrategias han sido comparadas con la estabilidad enzimática, por ejemplo se han estudiado enzimas relevantes industrialmente como glutaril acilasa (GAC), d-aminoácido oxidasa (DAAO), y Glucosa oxidasa (GOX) [40]. Para estas enzimas, se realizó una adsorción sobre los soportes aminados, tratamiento de las enzimas adsorbidas con glutaraldehído y la inmovilización sobre soportes pre-activados con glutaraldehído. En todos los casos, el tratamiento de la adsorción enzimática sobre los soportes aminados con glutaraldehído produjo una

estabilidad alta. Además, después de este tratamiento, usando una fuerza iónica alta, las enzimas no fueron desorbidas [40, 41].

Recientemente, los nanomateriales han sido ampliamente usados como soportes para inmovilizar enzimas. Entre estos materiales, las nanopartículas magnéticas son famosas porque son utilizadas en conjunto con materiales biológicos como por ejemplo proteínas, péptidos, enzimas [23, 25, 42-45], anticuerpos y ácidos nucleicos [43].

Las partículas magnéticas como soporte cuentan con buen tamaño [46], y a pesar de no ser porosas, permiten inmovilizar aproximadamente 100 mg de proteína/gramo de partículas húmedas. El uso de partículas magnéticas puede ser la solución adecuada para superar los problemas de separación, ya que con el uso de un imán se permite una recuperación simple del biocatalizador del medio de reacción [47, 48]. En algunas instancias, estos soportes no porosos pueden presentar algunas ventajas comparados con el uso de soportes porosos. Por ejemplo, no tienen problemas de difusión externa. En realidad, los soportes no porosos pueden ser una opción industrial para la utilización en los sistemas sólidos-líquido (p.e., proteínas precipitadas, residuos agrícolas). Sin embargo, usando estas partículas no porosas, la enzima es inmovilizada sobre la superficie externa y por lo tanto, se pierde el efecto protector dado por la inmovilización dentro de los poros de un soporte poroso. Así, es posible que una enzima inmovilizada sobre estas partículas, pueda sufrir inactivación, especialmente a través de la interacción con burbujas de gas generadas por agitación fuerte o burbujeo con oxígeno [49].

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los reactivos necesarios para la inmovilización de la lipasa *Candida Rugosa* sobre el soporte magnético, pruebas de actividad enzimática y su posterior utilización en la producción de biodiesel son: Etanol (*Mallinckrodt* al 99.9%), Hidróxido de Potasio (*Mol Labs*, al 98%), Ácido Oleico (*Carlo Erbak*, Puro), Butanol (*Mallinckrodt* al 99.9%), Hexano (*Mallinckrodt* al 100%), Glutaraldehído, Fenolftaleína (*Mol Labs* al 1% en etanol), Lipasa *Candida Rugosa*, Hidróxido de Sodio (*Merck* al 99%), Sulfato de cobre (*Riedel de Haën*, al 98%), Tartrato de sodio y potasio (*Carlo Erba*, al 98%) Partículas magnéticas recubiertas con 20 mL de TEOS, Buffer de Fosfato (pH 7.0, 0.1M), Albúmina, Aceite de Palma (*Alianza Team*), Ácido Hidroclórico (*Mallinckrodt*, aprox. 37%), Tiosulfato de sodio (*Mol Labs*, al 98%), Reactivo de *Hamus* (Yodo, Acido acético y Bromo), Yodo (*Merck*, al 50%), Acido Acético, (*J.T. Baker* al 80%), Bromo (*Merck*, 98%), Cloroformo (*Mallinckrodt*, 57%), Yoduro de Potasio (*Mol Labs*, 80%).

Equipos

Para llevar a cabo la funcionalización del soporte, la inmovilización de la enzima, y su posterior utilización en la producción de biodiesel es necesario utilizar los siguientes equipos: placa de agitación magnética y calentamiento, balanza de gran precisión, agitador eléctrico, *shaker* y un baño termostático. Las especificaciones de estos equipos están a continuación:

- Placa con agitación magnética y calentamiento *IKA RH-KT/C*, con una potencia de 400 W, rango de temperatura desde T_{amb} hasta 340°C, un indicador de velocidad de 1 a 7 y una velocidad de agitación de 0 a 2000 rpm. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de catálisis de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.
- Estufa *Binder series ED* con una temperatura máxima de 300°C, controlador DS con temporizador integrado de 0 a 99 horas, ajuste digital de temperatura con gran grado de precisión ($\approx 1^\circ\text{C}$) y cuenta con una función de rampa. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales 2 de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.
- *Shaker Unitronic OR* con un rango de temperatura desde T_{amb} hasta 90°C y una velocidad de agitación de 10 a 100 U/min. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de catálisis de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.
- Baño termostático *Lauda*, con un rango de temperatura de T_{amb} hasta 90°C. Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de biotecnología en las Plantas de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

En este trabajo se realizó una caracterización en la cual se utilizan métodos convencionales como: difracción de rayos X (XRD), la técnica infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), análisis térmicos (DSC). Técnicas complementarias como la microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS), y finalmente la adsorción-

desorción de nitrógeno. Las especificaciones de estos equipos fueron descritas en el Capítulo 1.

Métodos

Vínculo cruzado (cross-linking) con glutaraldehído

Se adicionaron 4.4 gramos de partículas magnéticas recubiertas (PMR) a 100 mL de solución acuosa de glutaraldehído (10%) y se agitó en una placa de agitación magnética a velocidad 4 por 24 horas a temperatura ambiente. Los filtrados se lavaron con agua destilada y finalmente se secaron a temperatura ambiente por 48 horas (figuras 2.3 y 2.5a) [50].

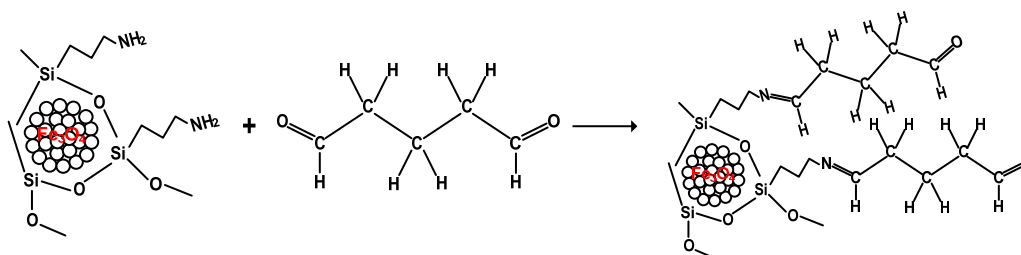


Figura 2.3 Funcionalización del soporte magnético

Inmovilización de la Lipasa *Candida Rugosa*

Se disolvieron 764 mg de lipasa *Candida Rugosa*, lo que equivale aproximadamente a 200 mg de proteína, en 100 mL de Buffer de Fosfato (pH 7, 0.1 M) y se agitaron en una placa de agitación magnética a velocidad 4 hasta que la lipasa estuvo completamente disuelta. (aprox. 10 min). A esta solución se le añadió 1 gramo de partículas magnéticas recubiertas previamente funcionalizadas con glutaraldehído (PMG) y fueron agitadas en una placa de agitación magnética a velocidad 4 por 24 horas a temperatura ambiente [50]. Esta solución fue filtrada y lavada dos veces con buffer de fosfato. Finalmente los precipitados se secaron a temperatura ambiente por 48 horas. Los filtrados se guardaron para posterior análisis de proteína por el método *Biuret* (figuras 2.4 y 2.5b).

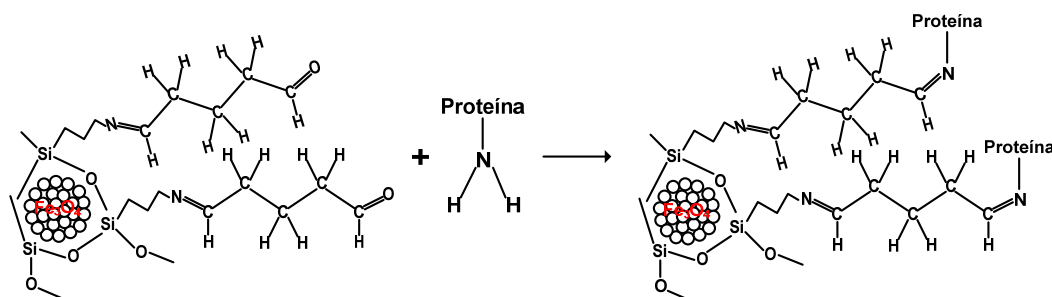


Figura 2.4 Inmovilización de la lipasa sobre un soporte magnético

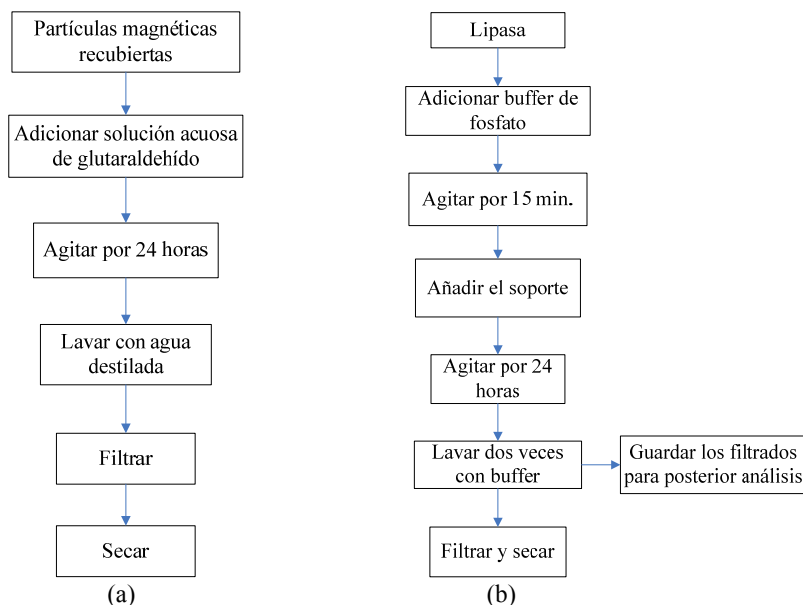


Figura 2.5 (a) Diagrama general del proceso de funcionalización del soporte. (b) Diagrama general del proceso de inmovilización

Determinación de la proteína (método Biuret)

Para realizar la curva patrón, se preparó el reactivo *Biuret* de la siguiente forma: se disolvió 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y 6 g de tartrato de sodio y potasio, y se aforo a 500 mL. Se adicionó 300 mL de NaOH al 10%. Finalmente se aforo a 1 Litro. Además, se preparó una solución de albúmina (10 mg/mL) y adicionó un poco de NaCl para mejor dilución. Se preparó la curva patrón de 0-1 mg/mL de albúmina adicionando 4 mL del reactivo *Biuret* y 1 mL de la muestra y después fue almacenado en un lugar oscuro por 30 min. Se midió la absorbancia a 540 nm, teniendo como blanco el agua [51, 52].

Para medir la cantidad de proteína en los filtrados y lavados que se realizaron en la inmovilización de enzimas, a 1 mL de estos filtrados y lavados, fueron adicionados 4 mL del reactivo *Biuret* y almacenados en un lugar oscuro por 30 min. Se midió la absorbancia a 540 nm, teniendo como blanco el agua y luego se calculó la cantidad de proteína presente en estos filtrados y lavados por medio de la correlación dada por la curva patrón.

Nitrógeno total (Método Kjeldahl)

El proceso se desarrolla en tres etapas, digestión, neutralización y destilación. En la digestión se toma un volumen de muestra de acuerdo a la cantidad de nitrógeno total (tabla 2.1).

Tabla 2.1 Volumen de muestra requerido para el cálculo del N_{total}

N_{total} en la muestra mg/l	Tamaño de la muestra mL
0-1	500
1-10	250
10-20	100
20-50	50
50-100	25

Para la determinación de el N_{total} en una muestra, se debe pasar el volumen de la muestra seleccionada al tubo del digestor, adicionar 20 ml de H_2SO_4 concentrado, 2 perlas de vidrio y 5 gramos de la mezcla catalizadora; se coloca el tubo en el digestor, se calienta la muestra hasta que esta sea de aspecto incoloro o transparente y se sigue el calentamiento por 15 minutos más.

Para el proceso de la neutralización y destilación, se enfría la mezcla y se adiciona 0.5 ml de fenolftaleína. Se conecta el tubo al equipo de destilación; se diluye con agua libre de amonio hasta un volumen de 50 ml y finalmente se adiciona suficiente NaOH hasta que la muestra se vuelve alcalina.

El proceso de titulación del destilado se hace de la misma forma que en la determinación de amonio. Para muestras con un contenido alto de nitrógeno, se recomienda titular con 0.1N de H_2SO_4 y muestras con poco contenido de nitrógeno se utiliza 0.01N de H_2SO_4 .

La ecuación que se utiliza para cuantificar el contenido de nitrógeno total es la siguiente:

$$\%N_{total} = \frac{(A - B) * N * 14.000}{ml \text{ de muestra}} \quad (2.1)$$

Donde, A son los mililitros de H_2SO_4 utilizados en la titulación de la muestra, B son los mililitros de H_2SO_4 utilizados en la titulación del blanco y N es la normalidad de la solución de H_2SO_4 .

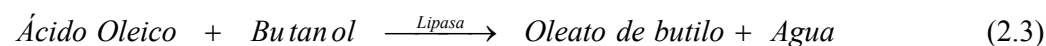
Teniendo el nitrógeno total se procedió a calcular el porcentaje de proteína en las muestras utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Proteína} = \%N_{total} * f \quad (2.2)$$

Donde f es un factor que se utiliza para calcular el porcentaje de proteína en la muestra, en este caso este factor es 6.25 [53, 54].

Medición de la actividad

Para llevar a cabo la medición de la actividad enzimática se siguió la siguiente reacción:



En un *erlenmeyer* se adicionó 1.57 mL de ácido oleico, 48 mL de hexano y la enzima (aprox. 31 mg de proteína). Se acondicionó a 40°C, agitación 90 u/min por 1 hora. Después de acondicionar la enzima, se adicionó a esta mezcla 0.46 mL de butanol, e inició el tiempo cero. Las concentraciones del ácido oleico y el butanol en hexano fueron de 0.1N. Se sacó una alícuota de 1 mL de la mezcla reaccionante, se calentó a 60°C por 1 minuto y se aforo con etanol grado absoluto hasta 5 mL, con el fin de parar la reacción. Se tituló esta mezcla con potasio alcohólico (0.01 N). Se repitieron estos

pasos por un determinado tiempo. La actividad es expresada por la cantidad de ácido oleico que se gasta por unidad de tiempo. Este procedimiento fue realizado para la enzima libre y la enzima inmovilizada [55].

Transesterificación del aceite de palma con etanol

Se preparó una solución de aceite-hexano, la cual se llevó a un reactor de 200 ml en donde se mezcló, en la proporción definida, primero con el etanol y finalmente con la enzima, con el fin de evitar la inhibición de ésta por efecto de la alta concentración del alcohol. Posteriormente el sistema se calentó de manera gradual hasta alcanzar la temperatura de trabajo empleando agua proveniente de un baño termostático, y se fijó una velocidad de agitación tal que asegurara que la enzima se mantuviera suspendida en la mezcla reaccionante. En este caso la reacción se prolongó durante 72 h. Una vez finalizada la reacción, se suspendió el calentamiento y se recuperó la enzima [56].

Identificación de Esteres

La determinación de ésteres se realizará mediante la reacción con hidroxilamina para formar ácidos hidroxámicos que producen una coloración rojiza en presencia de iones férricos. Los ácidos carboxílicos y los fenoles también reaccionan, por lo que la presencia de estos compuestos interfiere en la determinación.

En tubos de ensayo se añaden 0,5 ml de una solución de clorhidrato de hidroxilamina (1 N) en etanol y 50 µl de las correspondientes muestras a valorar. A cada tubo se le añade, gota a gota, una solución de KOH (2 N) en metanol hasta que la mezcla tenga un pH de 9-10 (utilizar el papel indicador de pH) y se completan con otras 4 gotas adicionales de la misma solución de KOH (2 N). Se calientan los tubos hasta iniciar la ebullición colocándolos en un vaso de precipitado con agua en un agitador/calentador. Se enfrían y se añade gota a gota HCl (2 N) hasta un pH aproximado de 3 (usar papel indicador de pH). Finalmente, se añade una gota (unos 15 µl) de una solución de FeCl₃ al 10%. En las muestras con ésteres se produce una coloración roja [57].

Índice de Saponificación

El procedimiento se realiza para la grasa o aceite y para el blanco por duplicado. Pesar entre 2 y 2.5 gramos de la grasa o aceite en el balón donde se vaya a realizar el reflujo. Adicionar 25 mL de etanol purificado. Colocar en reflujo constante por 40 minutos. Cuando finaliza el reflujo, se deja reposar la mezcla con el fin de dar inicio a la titulación con una solución de HCl y con fenolftaleína como indicador. La titulación finaliza cuando el color rosa ha desaparecido por completo.

Por medio de la siguiente ecuación se procede a calcular el índice de saponificación (I.S.)

$$I.S. = \frac{56.1056 * (V_1 - V_2) * N}{G} \quad (2.4)$$

Donde V₁ es el volumen gastado de HCl en la valoración del blanco (mL), V₂ es el volumen gastado de HCl en la valoración de la muestra (mL), N es la concentración del HCl empleado en la valoración (Normalidad) y G es la masa exacta de la muestra [58].

Índice de Yodo

Pesar directamente en un frasco *winkler*, la cantidad de muestra requerida según la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Tamaño de la muestra según el índice de yodo esperado

Valor del índice de yodo esperado	Gramos de muestra
3	10.58 – 8.46
10	3.17 – 2.5
14	1.59 – 1.27
40	0.79 – 0.63
80	0.40 – 0.32
120	0.26 – 0.21
160	0.20 – 0.16
200	0.16 – 0.13

En el mismo frasco que contiene la muestra se adicionan 5 mL de cloroformo y 12.5 mL del reactivo de *Hamus*. Dejar reposar la mezcla en un sitio oscuro durante 30 minutos agitando a intervalos de 5 minutos. Cumplido el tiempo, con la tapa inclinada sin destapar del todo se adicionan 5 mL de solución de KI al 15% y se agita intensamente para recoger los vapores de yodo. Finalmente adicional 50 mL de agua destilada.

Con una solución de tiosulfato de sodio se inicia la titulación, teniendo en cuenta una agitación fuerte para evitar la separación de las fases. Se adiciona tiosulfato hasta la desaparición total del color amarillo que tiene inicialmente la muestra, luego adicionar 1 mL de solución indicadora de almidón y continuar la titulación hasta que haya desaparecido totalmente el color azul.

Por medio de la siguiente ecuación se calcula el índice de yodo (I.Y.):

$$I.Y. = \frac{12.6905 * (V_1 - V_2) * N}{G} \quad (2.5)$$

Donde V_1 es el volumen gastado de tiosulfato de sodio en la valoración del blanco (mL), V_2 es el volumen gastado de tiosulfato de sodio en la valoración de la muestra (mL), N es la concentración del tiosulfato de sodio empleado en la valoración (Normalidad) y G es la masa exacta de la muestra [58].

Índice de acidez

Se pesan directamente en un *erlenmeyer* la cantidad de muestra como se indica en la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Cantidad de muestra, alcohol y concentración requeridos para la determinación de ácidos grasos libres

Ácidos grasos libres (%)	Cantidad de muestra (g)	Cantidad de etanol (mL)	Concentración de álcali (N)
0.0 – 0.2	56.4 ± 0.2	50	0.1
0.2 – 1.0	28.2 ± 0.2	50	0.1
1.0 – 3.0	7.05 ± 0.05	75	0.25
30 – 50	7.05 ± 0.05	100	0.25 o 1.0
50 – 100	3.525 ± 0.001	100	1.0

En el mismo *erlenmeyer* que contiene la muestra se adiciona la cantidad determinada de alcohol etílico neutralizado caliente y unas gotas de fenolftaleína. Calentar con agitación en la placa calefactora para disolver los ácidos grasos. Con la solución de hidróxido de potasio estandarizado y con una concentración cercana a la indicada en la tabla 3, se titula la muestra hasta la aparición del color rosa tenue, que indica el punto final de la titulación.

Por medio de la siguiente ecuación se calcula el índice de acidez (I.A.):

$$I.A. = \frac{56.1056 * V * N}{G} \quad (2.6)$$

Donde V es el volumen gastado de la solución de hidróxido de potasio en la valoración de la muestra (mL), N es la concentración del hidróxido de potasio empleado en la valoración (Normalidad) y G es la masa exacta de la muestra [58].

RESULTADOS

Difracción de Rayos X

En la figura 1.9 del capítulo 1 se puede observar el patrón XRD para la partícula magnética recubierta (PMR). En las figuras 2.6 y 2.7 se pueden observar los patrones XRD para el soporte magnético funcionalizado (PMG) y para la enzima inmovilizada (EI), respectivamente. En las tablas 2.4 y 2.5 se encuentran los correspondientes índices de Miller ($d(\text{obs})$) y algunos datos reportados en la bibliografía ($d(\text{ref})$).

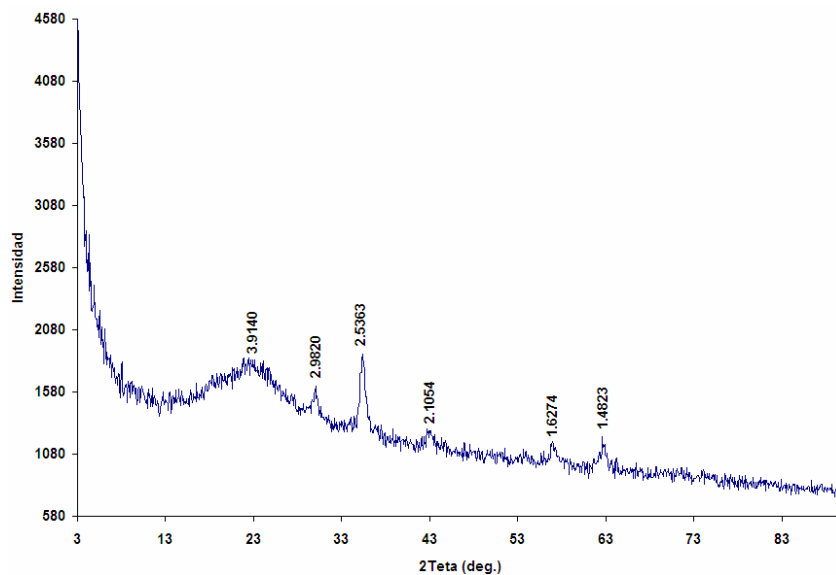


Figura 2.6 Patrón XRD para la partícula magnética recubierta funcionalizada con glutaraldehído (PMG)

Tabla 2.4 Índices de Miller para la PMG

(hkl)	$d(\text{obs})$	$d(\text{ref})$ [25]	$d(\text{ref})$ [59]
-----	3.9140	-----	4.09
(220)	2.9820	2.9761	2.83
(311)	2.5363	2.5384	2.50
(400)	2.1054	2.0966	2.08
(422)	-----	1.7063	1.70
(511)	1.6274	1.6086	1.60
(440)	1.4823	1.4801	1.48

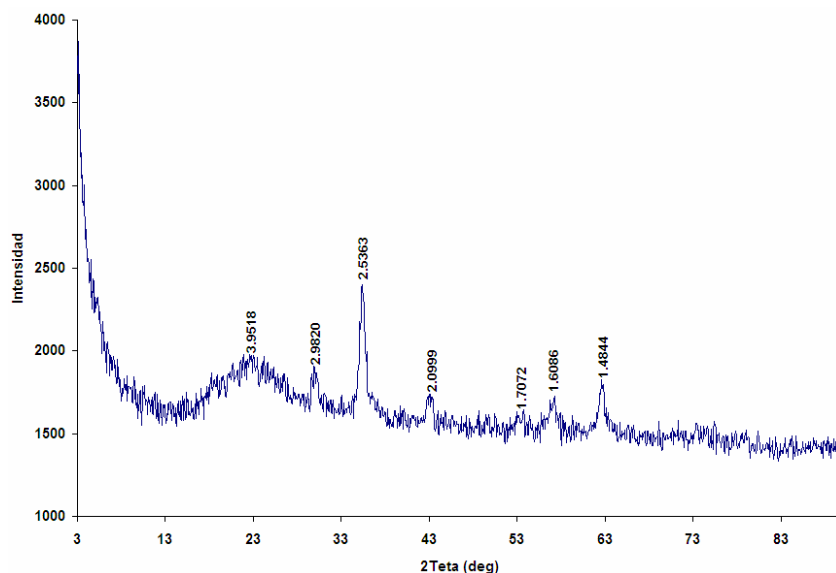


Figura 2.7 Patrón XRD de la lipasa *Candida Rugosa* inmovilizada sobre la partícula magnética recubierta y con glutaraldehído (EI)

Tabla 2.5 Índices de Miller para la EI

(hkl)	d(obs)	d(ref) [25]	d(ref) [59]
-----	3.9518	-----	4.09
(220)	2.9820	2.9761	2.83
(311)	2.5363	2.5384	2.50
(400)	2.0999	2.0966	2.08
(422)	1.7072	1.7063	1.70
(511)	1.6086	1.6086	1.60
(440)	1.4844	1.4801	1.48

Comparando los patrones (figura 1.9 del capítulo 1 y figuras 2.5 y 2.6), se puede decir que no existió modificación estructural en la partícula magnética recubierta que fue funcionalizada con glutaraldehído (PMG) y lo mismo ocurre en el caso de la enzima inmovilizada sobre este soporte funcionalizado (EI).

De los datos aportados por los patrones XRD también se puede calcular el tamaño de partícula promedio como se hizo en el capítulo 1:

$$L = \frac{\lambda * K}{B * \cos(\theta)} = \frac{\lambda * K}{\sqrt{(B_M^2 - B_S^2)} * \cos(\theta)} \quad (2.7)$$

En la tabla 2.6 se puede observar los datos necesarios para la ecuación (2.7), los cuales son obtenidos de los patrones XRD, además el tamaño de partícula calculado para los diferentes materiales sintetizados. De estos datos podemos decir que las partículas sintetizadas son de tamaño nanométrico, lo cual debe ser corroborado con las imágenes SEM.

Tabla 2.6 Diámetro medio de partícula

Material	$\theta_{\text{Picomáx}}$	FWHM	L(nm)
PMG	35.391	1.462	11.06
EI	35.396	1.762	9.177

Imágenes y análisis elemental

En la figura 1.14 del capítulo 1 se observan las imágenes de las partículas magnéticas recubiertas (PMR). En las figuras 2.8, 2.9 y 2.10 se observan las imágenes de las partículas magnéticas recubiertas funcionalizadas con glutaraldehído (PMG), enzima inmovilizada sobre este soporte magnético (EI) y enzima libre (EL). Cada figura contiene diferentes distancias de acercamientos con el fin de observar con más detalle las partículas sintetizadas.

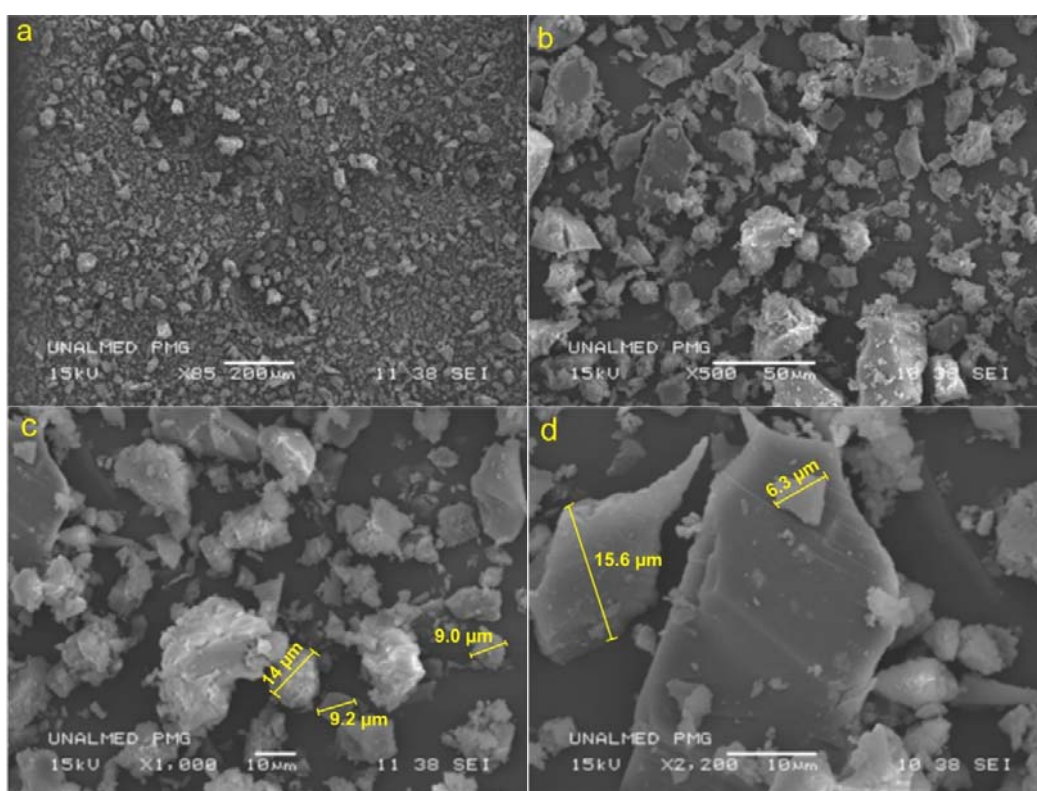


Figura 2.8 SEM para las partículas magnéticas recubiertas funcionalizadas con glutaraldehído (PMG)

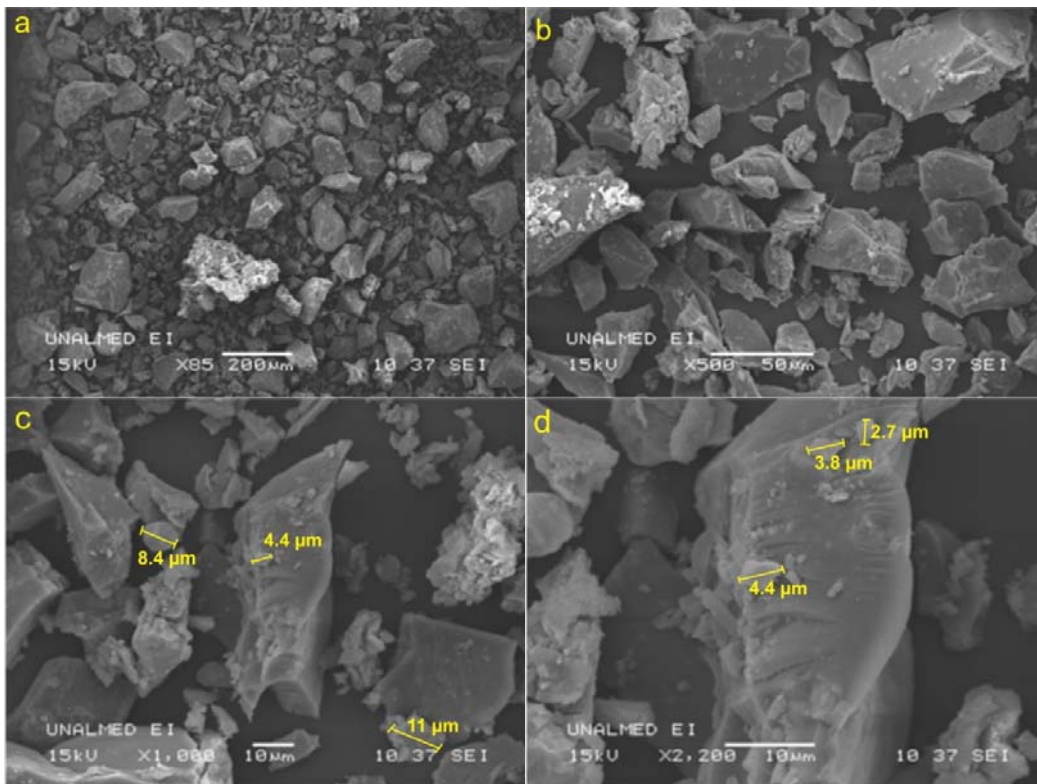


Figura 2.9 SEM para la enzima inmovilizada sobre las partículas magnéticas (EI)

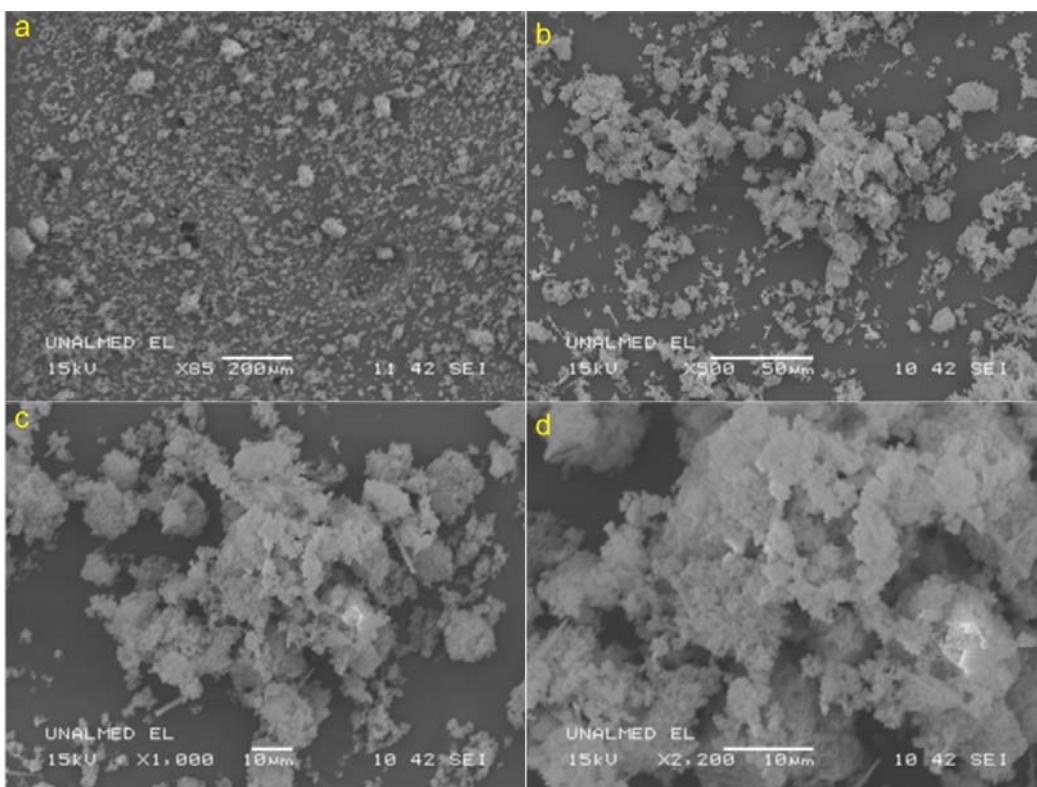


Figura 2.10 SEM para la enzima libre (*Candida Rugosa*) (EL)

En las imágenes de las partículas magnéticas recubiertas con 20 mL de TEOS (figura 1.14 del capítulo 1) se pueden observar tamaños de partículas entre 5.6 y 11.8 μm al tener un acercamiento X2.200. Además de presentar una uniformidad en la superficie debida a la cantidad de TEOS adicionada. Esto se puede observar con más detalle en el capítulo 1.

En la figura 2.8, se observa una mayor uniformidad en cuanto a superficie. Además en la figura 2.8c se observan tamaños de partículas entre 9 y 14 μm al tener un acercamiento X1.000. Al realizar un acercamiento X2200 se pueden encontrar tamaños de partículas entre 15 y 6 μm (figura 2.8d)

En las imágenes de la enzima inmovilizada sobre este soporte magnético se sigue observando una uniformidad en la superficie, además de tamaños de partículas entre 3 y 11 μm , esto visto a acercamientos de X1000 y X2200 (figura 2.9).

En la figura 2.10 se pueden observar las imágenes correspondientes a la lipasa *Candida Rugosa*, se observan partículas muy pequeñas y se podría decir que existe una homogeneidad.

Para complementar este análisis es necesario analizar los EDS de las partículas magnéticas recubiertas (PMR) (figura 1.19 del capítulo 1), el soporte funcionalizado (PMG), enzima inmovilizada (EI) y enzima libre (EL) (figuras 2.11-2.13).

Del análisis EDS de los diferentes materiales (figuras 2.11 y 2.12) podríamos decir que la relación Fe/O y Si/Fe cambia significativamente debido a que ya existen nuevos elementos como el C y el O, estos elementos debido a la presencia del glutaraldehído y en la lipasa (tabla 2.7), lo que da a entender que ocurrió la funcionalización del soporte y su posterior inmovilización.

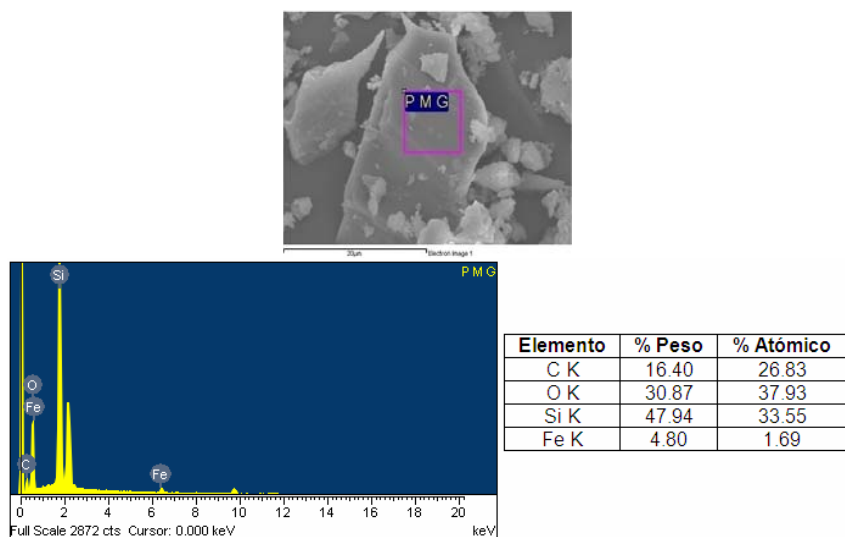


Figura 2.11 EDS para las partículas magnéticas recubiertas funcionalizadas con glutaraldehído

Tabla 2.7 Relaciones atómicas obtenidas del análisis SEM-EDS para las diferentes regiones analizadas.

Material	Relación atómica Fe/O	Relación atómica Si/Fe
PMG	0.045	19.85
EI	0.073	5.22

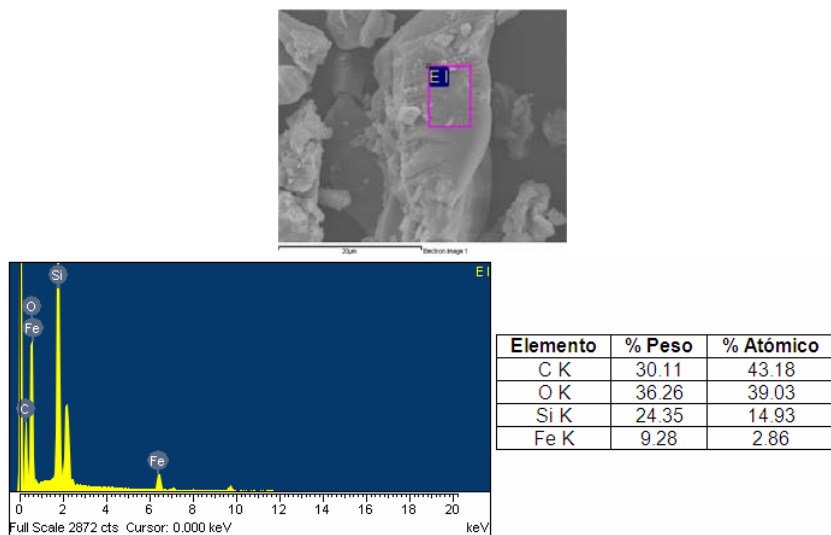


Figura 2.12 EDS para la enzima inmovilizada sobre partículas magnéticas

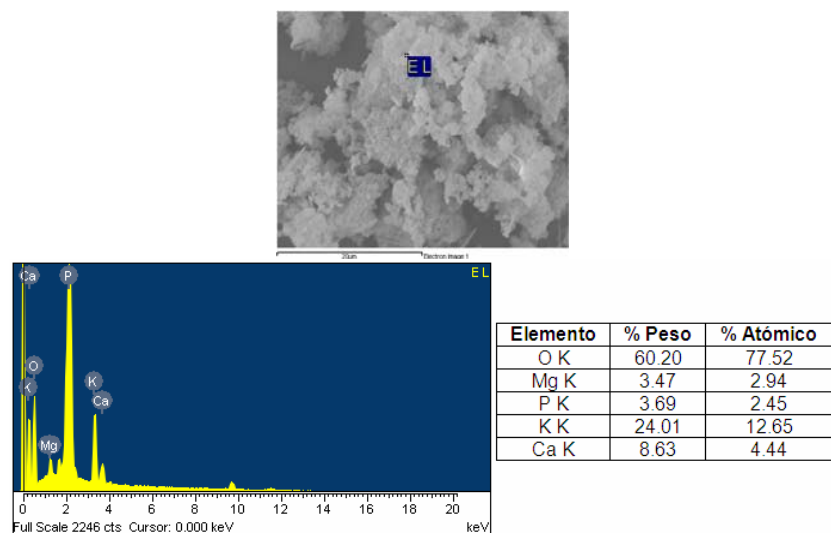


Figura 2.13 EDS para la enzima libre (*Candida Rugosa*)

En la figura 2.13 podemos observar el análisis EDS de la enzima libre. Como se puede observar existen elementos como Mg, P, K y Ca, los cuales pueden estar presentes debido a impurezas de la enzima libre, teniendo en cuenta que la enzima es de tipo comercial y no solo tiene la lipasa *candida rugosa*, si no otros tipos de enzimas.

Análisis de grupos funcionales

En las figuras 2.14 a 2.16 se pueden observar los espectros infrarrojos para la partícula magnética recubierta (PMR), soporte magnético funcionalizado (PMG), enzima inmovilizada (EI) y enzima libre (EL).

Para efectos de comparación de los resultados obtenidos se realizó una búsqueda en la literatura de las bandas características de estas partículas encontrándose lo siguiente: bandas cercanas a 3400 (modo estiramiento) y 1630 (modo tijera) cm^{-1} son correspondientes a los grupos hidroxilo (referidas a la presencia de H_2O en las muestras). Bandas cercanas a 2970 y 2920 cm^{-1} son debidas a los enlaces C-H (modo estiramiento). Banda cercana a 1091 cm^{-1} es debida a los enlaces C-N (modo estiramiento). Bandas cercanas a 1060 y 790 cm^{-1} son debidas a los enlaces Si-O-Si (modo estiramiento asimétrico). Banda cercana a 450 cm^{-1} es debida al “*rocking*” de los oxígenos [60]. Bandas cercanas a 570 y 375 cm^{-1} son debidas a los enlaces Fe-O [25, 59]. Bandas características de las proteínas (p.e. lipasa) son 1659 y 1538 cm^{-1} [25, 61].

En el espectro de la partícula magnética recubierta (figura 2.14a) se pueden observar la banda característica de los enlaces Fe-O (578 cm^{-1}), las bandas correspondientes a los enlaces Si-O-Si (1060 y 790 cm^{-1}) y al modo vibracional de “*rocking*” de los oxígenos (443 cm^{-1}) (ver capítulo 1).

La partícula magnética funcionalizada con glutaraldehído (figura 2.14b) tiene estas características anteriormente nombradas, además de que aparece un nuevo pico a los 1559 cm^{-1} correspondiente al grupo que identifica el glutaraldehído.

Al comparar la partícula magnética funcionalizada con glutaraldehído (figura 2.15a) con el espectro de la enzima inmovilizada (figura 2.15b) no se alcanza a identificar un cambio en los espectros, ya que los picos característicos de la enzima se confunden con los picos característicos del soporte, por lo cual es muy difícil ver un cambio en estos espectros.

En la figura 2.16 se pueden observar los espectros de la enzima inmovilizada sobre la partícula magnética recubierta y la de la enzima libre, en este caso ocurre lo mismo que se describió para la PMG. Aunque para la enzima libre si se diferencian claramente las bandas características de la proteína (1542 y 1405 cm^{-1}).

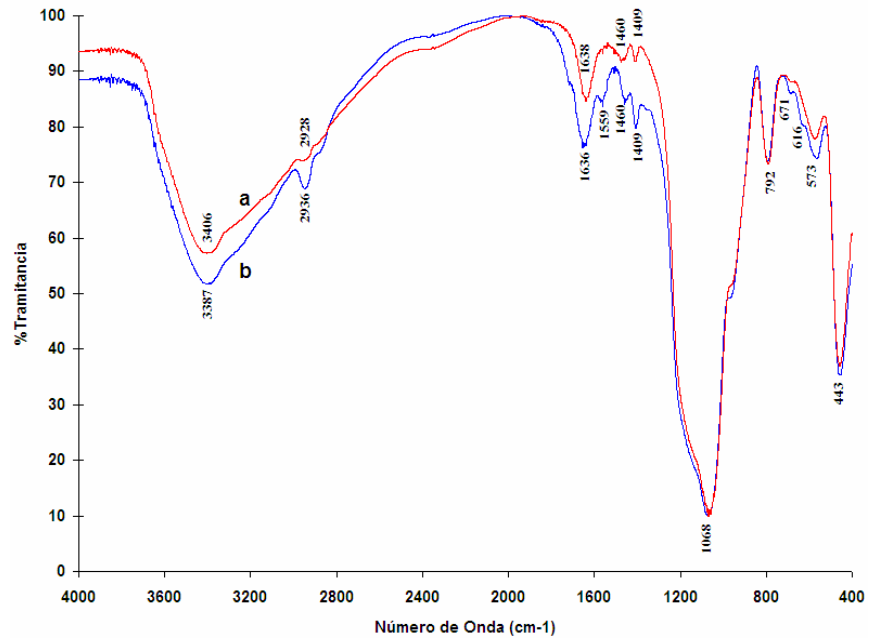


Figura 2.14 Espectros FTIR para (a) partículas magnéticas recubiertas (PMR) y (b) partícula magnética recubiertas funcionalizadas con glutaraldehído (PMG)

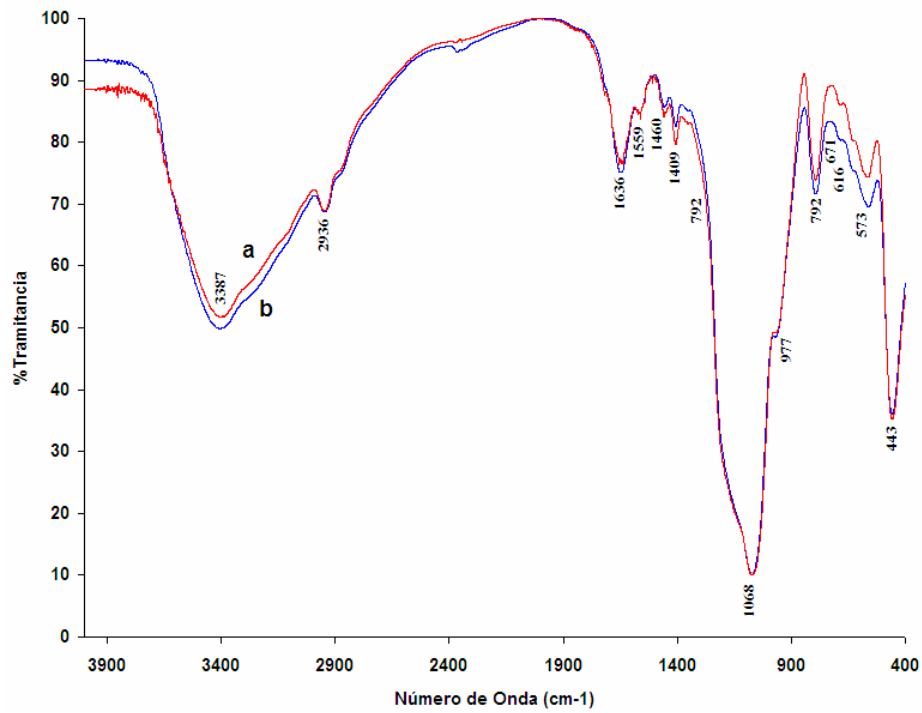


Figura 2.15 Espectros FTIR para (a) partícula magnética recubiertas funcionalizadas con glutaraldehído (PMG) y (b) enzima inmovilizada sobre la partícula magnética (EI).

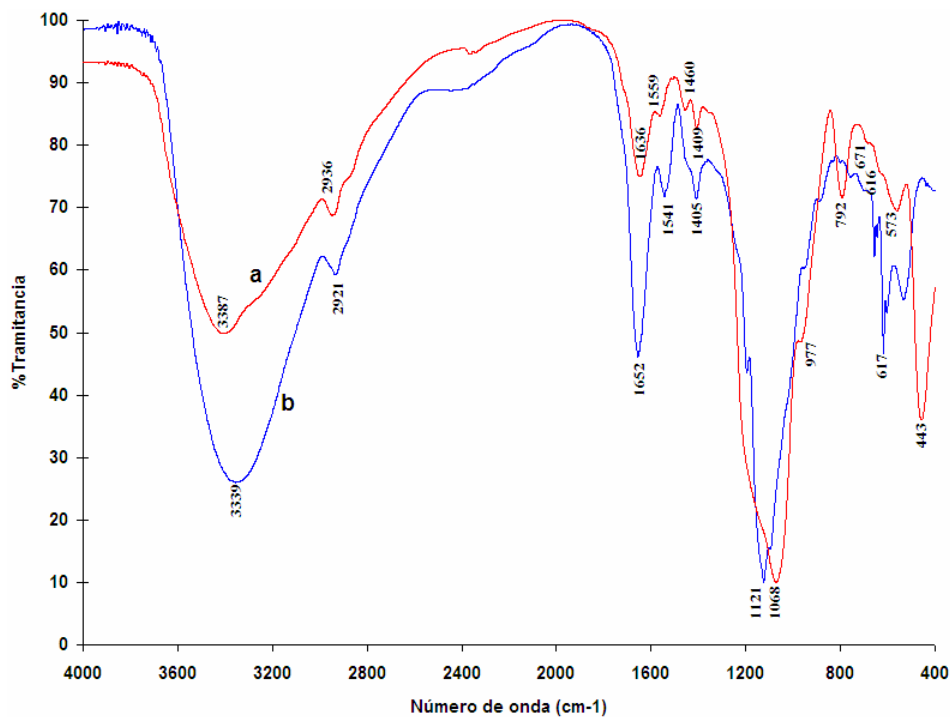


Figura 2.16 Espectros FTIR para (a) enzima inmovilizada sobre la partícula magnética (EI) y (b) enzima libre (EL).

Análisis térmico

En el análisis térmico que se le realizó al material (figuras 2.17 y 2.18) se puede observar que la temperatura T_1 , dada por los perfiles DSC, la cual es muy cercana a la reportada por Zhuravlev (Se explica con mas detalle en el capítulo 1), lo que confirma que hay un cambio en la capacidad de adsorber agua del material.

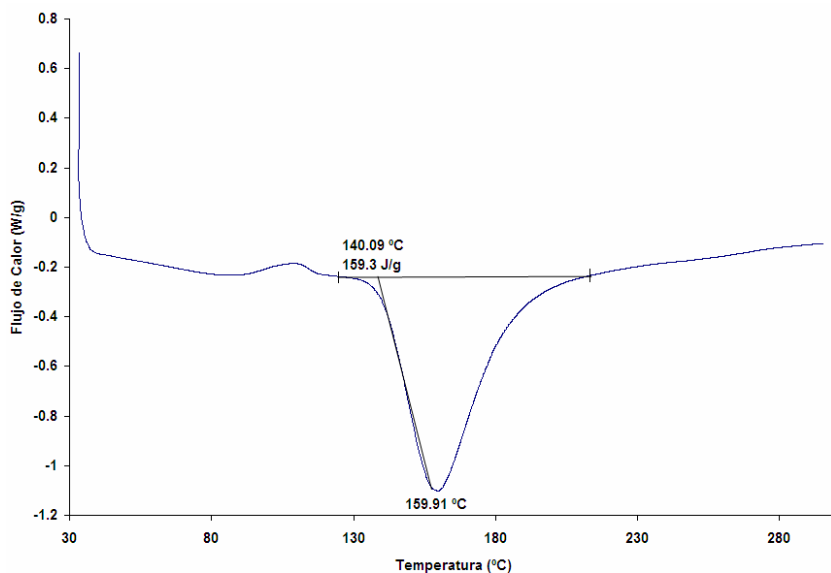


Figura 2.17 DSC para la partícula magnética recubierta funcionalizada con glutaraldehído (PMG)

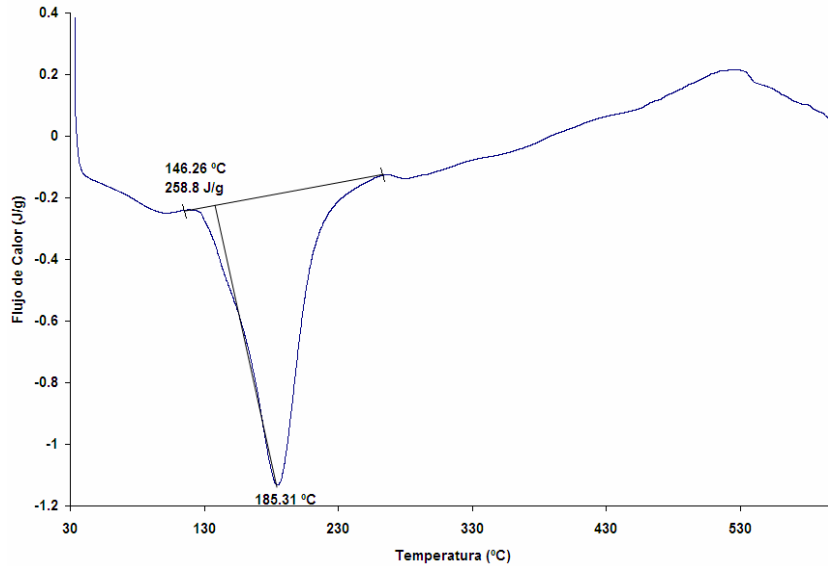


Figura 2.18 DSC para la enzima inmovilizada sobre la partícula magnética (EI)

Análisis textural

En la figura 2.19 se observan las isotermas de la partícula magnética recubierta (PMR) y funcionalidad con glutaraldehído (PMG), acorde con la representación esquemática de los seis tipos de isotermas de adsorción y los ciclos de histéresis, que se explican en el capítulo 1, se tiene que:

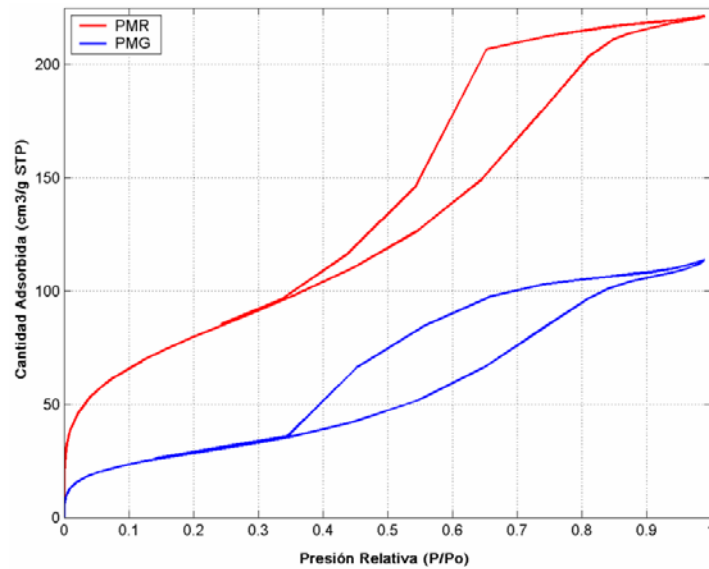


Figura 2.19 Isotherma de las partículas

Como se dijo en el capítulo 1, la isoterma de la partícula magnética recubierta es de tipo IV, la cual se presenta en materiales porosos adsorbentes que contienen un rango de radio de poro de aproximadamente 15-1000 Å.

La isoterma de la PMG es de tipo IV, como el hallazgo encontrado para PMR. Presenta una histéresis de Tipo F, la cual se caracteriza por la fuerte pendiente de las ramas de adsorción y desorción, presentando condensación capilar de nitrógeno en los poros y a bajas presiones relativas se observa el llenado de microporos. Se presenta en el caso de poros con una distribución heterogénea de tamaños y de distintas geometrías (figura 2.19).

Las áreas superficiales, los calores isostéricos de adsorción, el volumen de monocapa, el volumen de poro y diámetro promedio de poro para los diferentes materiales se pueden observar en la tabla 2.8.

El área superficial del material PMR disminuyó drásticamente (31%) con el glutaraldehído (PMG) (tabla 2.8) y para la muestras EI en relación con PMG disminuyó un 96%.

El valor de C (calor isostérico de adsorción) es la medida del estiramiento de la interacción entre la molécula de nitrógeno y la superficie del poro, valores bajos de C indica que la interacción entre el nitrógeno y la superficie del poro está relacionada a la presencia de estructuras mesoporosas.

Tabla 2.8 Resumen de propiedades texturales de los materiales sintetizados

Material	Área Superficial BET (m ² /g)	C*	Volumen de monocapa cm ³ /g STP	Volumen de poro (cm ³ /g)	Diámetro promedio de poro (Å)**
PMR	294.4319	65.039211	67.6357	0.342465	46.5256
PMG	92.6113	58.394520	21.2743	0.173265	74.8354
EI	3.1033	28.250241	0.7129	0.007716	99.4529

*Calor isostérico de adsorción. ** Tomado de la isoterma de adsorción

Se realizó además un análisis de microporo por el método *Horvath-Kawazoe*, para la partícula PMR se evidencia una distribución trimodal (figura 1.41 del capítulo 1) y para la partícula magnética funcionalizada con glutaraldehído (PMG) se observa una distribución bimodal con tamaños de poro entre 7 y 9 Å (figura 2.20).

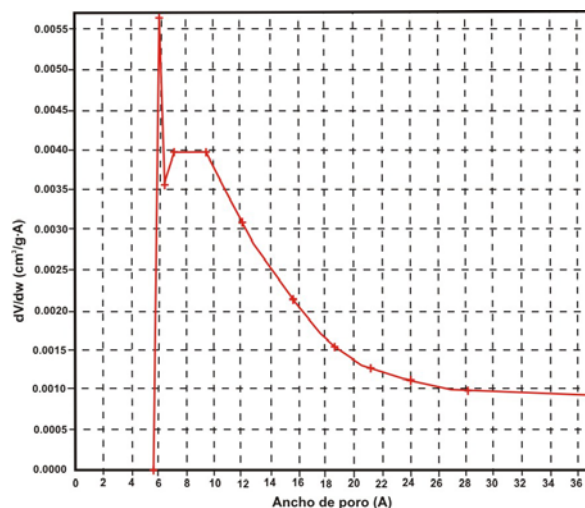


Figura 2.20 Análisis de microporo por el método *Horvath-Kawazoe* para PMG

Método del *Biuret*

En la tabla 2.9 se pueden observar los datos de absorbancia a diferentes concentraciones de albúmina, esto con el fin de obtener una curva patrón que al ser correlacionada con una línea recta nos permite calcular la cantidad de proteína en diferentes soluciones problema.

Tabla 2.9 Curva patrón con albúmina

Concentración (mg/mL)	Absorbancia con <i>Biuret</i>	Absorbancia restando el patrón de <i>Biuret</i>
0	0.044	0.000
0.2	0.056	0.012
0.4	0.066	0.022
0.6	0.078	0.034
0.8	0.091	0.047
1	0.109	0.065

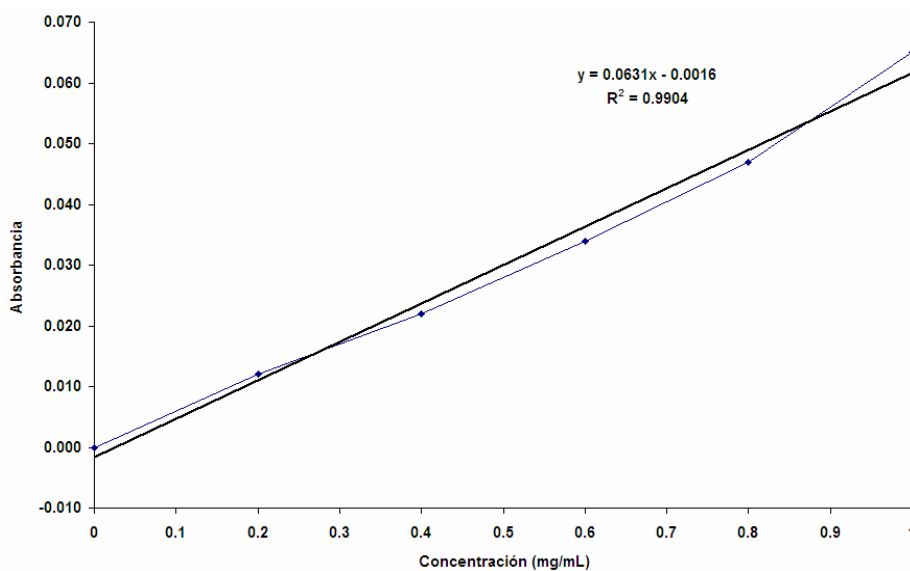


Figura 2.21 Curva patrón

Al correlacionar los datos obtenidos (tabla 2.9) con una línea recta (figura 2.21), se obtuvo la siguiente expresión: $\text{Absorbancia} = 0.0631 * \text{Concentración (mg/mL)} - 0.0016$. Esta expresión es utilizada para calcular la concentración enzimática en las muestras a valorar (tabla 2.10). Las muestras valoradas están representadas como E.L, que es la enzima libre antes de adicionarla al soporte, filtrado que es lo que queda cuando se realiza la primera filtración a la enzima inmovilizada y los lavados 1 y 2 son los correspondientes a los lavados y filtrados con buffer de fosfato.

En la tabla 2.10 se puede observar la cantidad de proteína contenida en cada una de las muestras a valorar. Teniendo estos datos es posible calcular la cantidad de proteína que tiene la enzima inmovilizada. La cantidad de proteína que se pegó fue de 65 mg lo que

corresponde a un 6.5% de contenido de proteína en la enzima inmovilizada. En otras palabras hay 65 mg de proteína por gramo de enzima inmovilizada.

Tabla 2.10 Cálculo de la cantidad de proteína

	Absorbancia	Absorbancia restando el patrón de <i>Biuret</i>	mg/mL	mL	mg
E.L	0.174	0.130	2.0794	100	207.94
Filtrado	0.116	0.072	1.1587	100	115.87
Lavado 1	0.056	0.012	0.2063	100	20.63
Lavado 2	0.048	0.004	0.0794	100	7.94

Este valor se verificó utilizando el método de *Kjeldahl*, análisis realizado por el laboratorio de Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. Los valores reportados se encuentran en la tabla 2.11. En esta tabla se tienen datos como el porcentaje de proteína que contiene la lipasa *candida rugosa* libre (EL), que para este caso es del 27.19%. Para el caso de la enzima inmovilizada (EI) es necesario restar el contenido de nitrógeno total del soporte (PMG) dando como resultado un 8% de proteína.

Tabla 2.11 Datos obtenidos por *Kjeldahl*

Muestras	% Nitrógeno Total	Factor de conversión de nitrógeno a proteína	% Proteína
EL	4.35	6.25	27.19
PMG	3.43	-----	-----
EI	4.71	-----	-----
EI-PMG	1.28	6.25	8

Actividad enzimática

La actividad se determina de la siguiente expresión:

$$actividad = \frac{mmoles\ de\ ácido\ oleico\ esterificado}{tiempo(hr) * g_{enzima}} \quad (2.8)$$

Donde

$mmoles\ de\ ácido\ oleico\ esterificado = (V_{KOH\ en\ t=0} - V_{KOH\ en\ t=t}) * N_{KOH} * 1000 * FD$ y FD es un factor de dilución de la muestra (FD = 75 para t = 0).

En las tablas 2.12-2.15 se puede observar los datos experimentales de actividad enzimática, para la enzima libre y la enzima inmovilizada. Las milimoles de ácido oleico esterificados por gramo de enzima fueron graficados en función del tiempo (figuras 2.22 y 2.23) con el fin de correlacionarlos a una línea recta y la pendiente de esta línea recta es conocida como la actividad enzimática promedio (tabla 2.16). La cantidad de enzima es representada por la cantidad de proteína, que para este caso fue de aproximadamente 32 mg.

Tabla 2.12 Resultados medición actividad enzimática para la enzima libre (*Candida Rugosa*)

Tiempo (hr)	ml KOH	mmol. de ac. Oleico trans	mmol. Ac. Ol./ genz	Actividad mmol. Ac. Ol./ genz-hr	Conversión
0	12.8	0	0	0	0
0.08	12.3	0.245	7.782	93.39	0.038
0.17	11.5	0.624	19.821	118.93	0.097
0.25	11.2	0.752	23.888	95.55	0.117
0.33	11	0.828	26.302	78.90	0.129
0.5	10.4	1.056	33.546	67.09	0.165
0.58	9.6	1.376	43.713	74.93	0.215
0.67	9.4	1.429	45.365	68.04	0.223
0.75	8.6	1.723	54.706	72.94	0.269
0.83	8.4	1.761	55.914	67.09	0.275
0.92	8.2	1.795	56.996	62.17	0.280
1	8	1.825	57.950	57.95	0.285

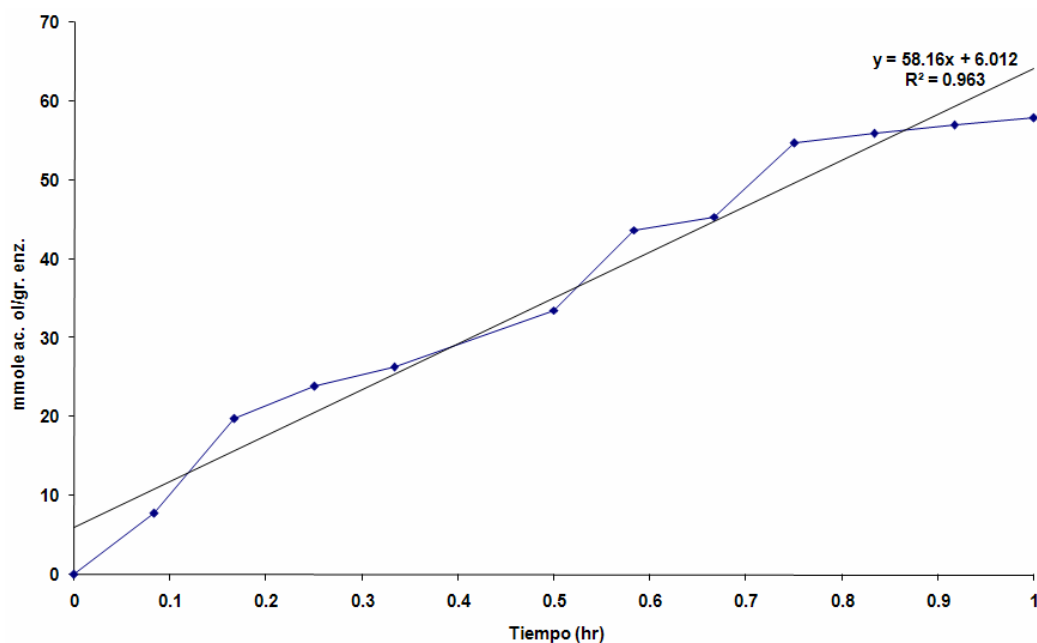


Figura 2.22 Milimoles de ácido oleico por unidad de tiempo para la enzima libre

En la figura 2.22 se pueden observar las milimoles de ácido oleico por unidad de tiempo para la enzima libre, teniendo en cuenta los gramos de enzima. Este ajuste a una línea recta tiene un coeficiente de correlación de 0.963, lo cual puede ser considerado como un buen ajuste. Como se dijo anteriormente la pendiente de esta recta es considerada como la actividad enzimática promedio.

Tabla 2.13 Resultados medición actividad enzimática para la enzima inmovilizada (1 Etapa)

Tiempo (hr)	ml KOH	mmol. de ac. Oleico trans	mmol. Ac. Ol./ genz	Actividad (mmol. Ac. Ol./ h-genz)	Conversión
0	12	0	0	0	0
0.18	11.6	0.19212	6.033	32.912	0.0320
0.27	11.3	0.32921	10.339	38.773	0.0548
0.35	11	0.4603	14.456	41.304	0.0766
0.43	10.6	0.63042	19.799	45.691	0.1050
0.52	10.4	0.70448	22.125	42.823	0.1173
0.6	10.2	0.77454	24.326	40.543	0.1290
0.68	9.4	1.09278	34.320	50.225	0.1820
0.77	9.1	1.18987	37.370	48.743	0.1981
0.85	8.8	1.28096	40.231	47.330	0.2133
0.93	8.5	1.36605	42.903	45.968	0.2275
1.02	8.2	1.44514	45.387	44.643	0.2407

Tabla 2.14 Resultados medición actividad enzimática para la enzima inmovilizada (2 Etapa)

Tiempo (hr)	ml KOH	mmol. de ac. Oleico trans	mmol. Ac. Ol./ genz	Actividad (mmol. Ac. Ol./ h-genz)	Conversión
0	11.8	0	0	0	0
0.25	11.6	0.09406	2.9541	11.816	0.0159
0.33	11.4	0.18412	5.7826	17.347	0.0311
0.42	11.2	0.27018	8.4855	20.365	0.0457
0.5	11	0.35224	11.0627	22.125	0.0596
0.58	10.8	0.4303	13.5144	23.167	0.0728
0.67	10.6	0.50436	15.8404	23.760	0.0854
0.75	10.4	0.57442	18.0408	24.054	0.0973
0.83	10.2	0.64048	20.1155	24.138	0.1084
0.92	10	0.70254	22.0646	24.070	0.1190
1	9.9	0.72257	22.6937	22.693	0.1223

Tabla 2.15 Resultados medición actividad enzimática para la enzima inmovilizada (3 Etapa)

Tiempo (hr)	ml KOH	mmol. de ac. Oleico trans	mmol. Ac. Ol./ genz	Actividad (mmol. Ac. Ol./ h-genz)	Conversión
0	11.8	0	0	0	0
0.1	11.7	0.04903	1.539	15.398	0.0083
0.2	11.6	0.09606	3.016	15.084	0.0162
0.3	11.5	0.14109	4.431	14.770	0.0238
0.4	11.4	0.18412	5.782	14.456	0.0311
0.5	11.3	0.22515	7.071	14.142	0.0381
0.6	11.2	0.26418	8.297	13.828	0.0442
0.7	11.1	0.30121	9.460	13.514	0.0519
0.8	11	0.33624	10.560	13.200	0.0569
0.9	10.9	0.36927	11.597	12.886	0.0625
1	10.8	0.4003	12.572	12.572	0.0678

En la figura 2.23 podemos observar las milimoles de ácido oleico esterificados por unidad de tiempo para la enzima inmovilizada, teniendo en cuenta los gramos de

enzima. En esta gráfica se observan tres etapas, con etapas se quiere decir las veces de reutilización que se probó en la enzima inmovilizada con las mismas condiciones de reacción anteriormente descritas. En la etapa uno la enzima inmovilizada es nueva y cuando la reacción de esterificación finaliza se retira del medio por la aplicación de un campo magnético externo y es lavada con hexano para su próxima reutilización. Esto se repite para las etapas dos y tres. Para cada etapa se tienen coeficientes de correlación de 0.9, siendo un valor muy bueno para ser un ajuste realizado a una línea recta. Como se dijo anteriormente, la pendiente de estas líneas rectas corresponden a las actividades enzimáticas promedio.

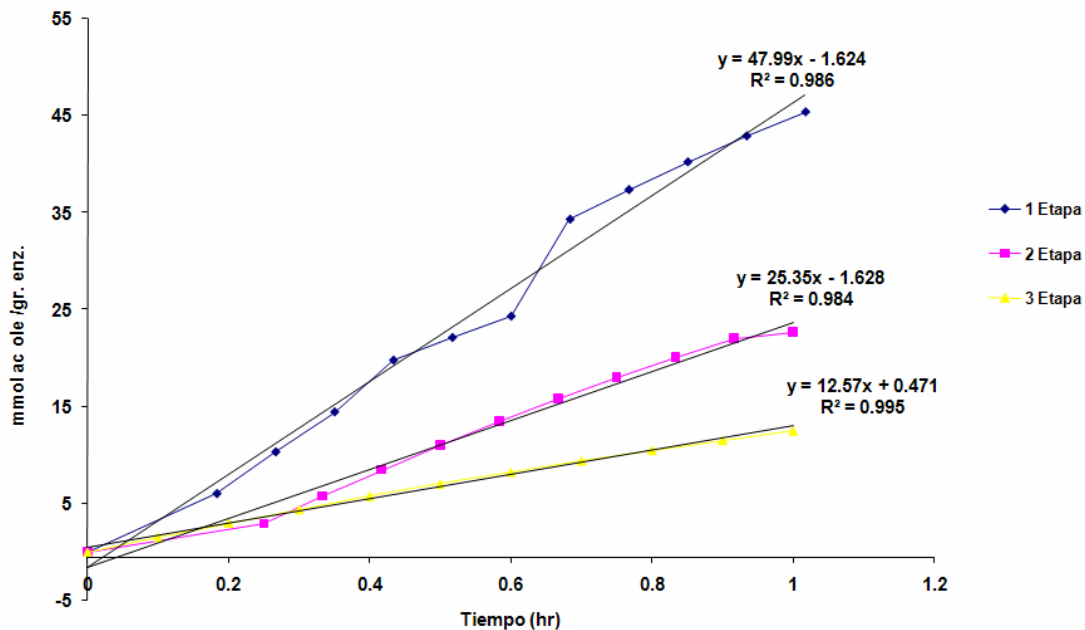


Figura 2.23 Milimoles de ácido oleico por unidad de tiempo para la enzima inmovilizada

En la tabla 2.16 podemos observar las actividades enzimáticas promedio para la enzima libre y para la enzima inmovilizada. Esta actividad es inversamente proporcional a los gramos de la enzima. Para realizar el proceso de esterificación del ácido oleico, se utilizó aproximadamente 32 mg de proteína, que para el caso de la enzima libre corresponde a 120 mg de la lipasa *Candida Rugosa* y para la enzima inmovilizada corresponde a 370 mg. El cambio en la actividad sugiere una inhibición por reactivos o productos.

Tabla 2.16 Actividades enzimáticas promedio

Enzimas	Actividad promedio (mmol. Ac. Ol./h-genz)
Lipasa <i>Candida Rugosa</i> Libre	58.16
Enzima Inmovilizada (1 Etapa)	47.99
Enzima Inmovilizada (2 Etapa)	25.35
Enzima Inmovilizada (3 Etapa)	12.57

Proceso enzimático de transesterificación del aceite de palma con etanol anhidro

Antes de iniciar el proceso de transesterificación es necesario realizar una caracterización del aceite de palma.

Resultados de la caracterización del aceites

De acuerdo a estos resultados (tabla 2.17) el aceite de palma refinado conteniente gran cantidad de materia saponificable y por ende una alta cantidad de triglicéridos que podían ser transformados a biodiesel (ésteres). Adicionalmente, su poco contenido de ácidos grasos libres ayuda a la disminución de reacciones colaterales y facilita la separación de las fases.

Tabla 2.17 Resultados de la caracterización de del aceite de palma

Propiedades	Valor
Índice de saponificación	208.50
Índice de yodo	52.88
Índice de acidez	1.108
Índice de refracción (22 °C)	1.4657

Resultados del proceso de transesterificación

En la tabla 2.18 se pueden observar las condiciones de operación del proceso de transesterificación del aceite de palma con etano, anhidro, con su respectiva respuesta cualitativa a la prueba de ésteres realizada.

Durante el proceso de transesterificación se realizaron unas tomas de muestras a 4, 24, 48 y 72 horas, a estas muestras se le aplicó la prueba de identificaron de esterres arrojando los resultados mostrados en la figura 2.24 y en la tabla 2.18. Esta técnica de identificación de ésteres es cualitativa y se observa que a medida que aumenta la cantidad de esterres existe un aumento en el color rojizo.

Tabla 2.18 Resultados para el proceso de transesterificación empleando la enzima inmovilizada

Tiempo (h)	T _{rxn} (°C)	Aceite/Alcohol (% mol/mol)	Aceite/enzima (g/g)	Aceite-solvente (Molaridad)	Prueba de ésteres
4	40	1/10	1/0.1	0.34	Negativa
24					Positiva
48					Positiva
72					Positiva



Figura 2.24 Identificación de ésteres cuando se lleva 4, 24, 48 y 72 horas de reacción

Caracterización del biodiesel obtenido

Al producto obtenido después de 72 horas de reacción es necesario realizar la caracterización para luego ser corroborado con la literatura y comprobar que lo que se obtuvo es biodiesel (tabla 2.19). La mezcla obtenida se le evaporó el hexano y se separó en dos fases, siendo una de ellas la glicerina con etanol que no reaccionó y la otra en donde se encuentran los ésteres y el aceite de palma y el etanol que no reaccionó y a esta solución fue a la que se le realizó la caracterización.

Tabla 2.19 Resultados de la caracterización del Biodiesel

Propiedades	Valor	[56]*
Índice de saponificación	43.2	16.1988
Índice de yodo	40.61	-----
Índice de acidez	0.582	0.5918
Índice de refracción (22 °C)	1.3805	1.3505

*empleando un catalizador alcalino

DISCUSIÓN

Por los hallazgos encontrados en los patrones XRD para la PMR, PMG y EI se sugiere que no existe un cambio en la estructura del material, pero si existió un cambio en el área del pico correspondiente al recubrimiento, lo que nos da a entender que ha ocurrido algún cambio en cuanto a superficie del material. Esto es corroborado con las imágenes SEM de los diferentes materiales, en estas imágenes se observan un cambio cuando la partícula magnética es funcionalizada con glutaraldehído ya que su superficie se hace más homogénea y los tamaños de partícula oscilan entre 14 y 9 μm , no se observan cavidades como las observadas en la partícula magnética recubierta. En cambio para la enzima inmovilizada sobre este soporte magnético no se observan grandes cambios, lo único es que aparecen tamaños de partículas entre 11 y 4 μm y su superficie se observa menos homogénea. Con los análisis de EDS pueden ser confirmados estos resultados, teniendo en cuenta que para este caso los datos no pueden ser normalizados en cuanto al carbono debido a que el glutaraldehído y la enzima tienen estos compuestos, la relación Si/Fe para PMR, PMG y EI son 22.52, 19.85, 5.2, este cambio tan significativo es debido a la aparición de los grupos de carbono, sugiriéndonos que ha ocurrido un cambio o sea que ha ocurrido la funcionalización e inmovilización.

Con los espectros FT-IR podemos concluir que el soporte magnético recubierto ha sido funcionalizado con el glutaraldehído, pero lo que no es tan visible es la inmovilización de la enzima debido a que las bandas de la proteína son similares a las que tiene el soporte. Además de los análisis térmicos obtenemos la T_1 para la PMR, PMG y EI siendo 185.62, 159.91 y 185.31 $^{\circ}\text{C}$, este cambio es debido a la capacidad que tiene el material de adsorber agua que para el caso de la enzima es mayor debido a que la enzima tiene gran afinidad por el agua.

Al analizar los datos de área superficial nos damos cuenta de que existe un cambio significativo tanto para la PMG y EI (92 y 3 m^2/g) estas relacionadas con la PMR (294 m^2/g), ya que el área disminuye significativamente esto confirma lo encontrado con los patrones XRD y con las imágenes SEM, ya que existen menos cavidades lo que hace que las partículas sean más uniformes en cuanto a superficie. Además de una mayor presencia de estructuras mesoporosas en la enzima inmovilizada debido a que el calor isostérico de absorción es 28 y valores bajos de C hacen más factible la presencia de estas estructuras.

Para corroborar la inmovilización de la enzima se analizaron los filtrados y los lavados que quedaron del proceso de la inmovilización por medio del método del *Biuret* en el cual se puede conocer la cantidad de proteína por gramo de enzima que para este caso fue del 6.5%. Este dato fue confirmado por el método de *Kjeldahl*, el cual mide el contenido de nitrógeno total en el soporte y en el complejo enzima-soporte, los cuales son restados y multiplicados por el factor que convierte el porcentaje de nitrógeno total a porcentaje de proteína, siendo este porcentaje de aproximadamente el 8%. De esto podemos decir que existe una diferencia del 1.5%, esto debido a que el método de *Biuret* depende de los valores de absorbancia de la curva patrón, en cambio el método *Kjeldahl* tiende a dar valores más acertados, debido a que mide el contenido total de nitrógeno en las muestras.

Esta enzima inmovilizada fue empleada en un proceso de esterificación de ácido oleico con butanol, obteniéndose buenos resultados. Aunque comparado con la enzima libre es necesario adicionar más enzima debido a que tiene muy poco contenido de proteína. Pero no podemos olvidar que esta enzima fue reutilizada 3 veces y la separación del medio de reacción se hizo fácil debido de que al ser magnéticas estas pueden ser separadas por medio de la aplicación de un campo magnético y vueltas a activar con mucha facilidad. Finalmente esta enzima fue probada en el proceso de transesterificación del aceite de palma con etanol anhidro el cual nos sugiere que el biocatalizador (lipasa inmovilizada en una partícula magnética) funciona también en este tipo de reacciones, arrojando positiva la prueba cualitativa de ésteres. Y su separación del medio de reacción es muy fácil, como se explicó anteriormente y su posterior reutilización se hace posible. Los resultados de la caracterización del aceite de palma y del biodiesel dan resultados acordes con los reportados en la bibliografía [56, 62, 63]

REFERENCIAS

1. Tischer, W. and Wedekind, F., *Immobilized enzymes: methods and bio-catalysis from discovery to applications*. Topics in Current Chemistry, 1999. 200, p. 95-125.
2. Arroyo, M., *Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Ars Pharmaceutica 1998. 39(2), p. 23-39.
3. Bornscheuer, U.T., *Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. 42(29), p. 3336-3337.
4. Kouassi, G.K., Irudayaraj, J., and McCarty, G., *Activity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles*. BioMagnetic Research and Technology, 2005. 3(1), p. 1-10.
5. Jia, H., Zhu, G., and Wang, P., *Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility*. Biotechnology and Bioengineering, 2003. 84(4), p. 406-414.
6. Cao, L. and Schmid, R.D., *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. 2006, New York. 578.
7. Diaz, J.F. and Balkus, K.J., *Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1996. 2(2-3), p. 115-126.
8. Varlan, A.R., Suls, J., Jacobs, P., and Sansen, W., *A new technique of enzyme entrapment for planar biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 1995. 10(8), p. xv-xix.
9. Daubresse, C., Grandfils, C., Jerome, R., and Teyssie, P., *Enzyme Immobilization in Nanoparticles Produced by Inverse Microemulsion Polymerization*. Journal of Colloid and Interface Science, 1994. 168(1), p. 222-229.
10. Mirza, M. and Saleemuddin, M., *Entrapment of Nonproteolytic Enzymes in [alpha]2-Macroglobulin Using Immobilized Trypsin*. Analytical Biochemistry, 1993. 213(1), p. 133-139.
11. Oliveira, G.B., Lima Filho, J.L., Cavalcante Chaves, M.E., Azevedo, W.M., and Carvalho Jr, L.B., *Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/polyethyleneimine or polyaniline composites*. Reactive and Functional Polymers, 2008. 68(1), p. 27-32.
12. Alacam, S., Timur, S., and Telefoncu, A., *A novel biosensor based on l-homocysteine desulhydrase enzyme immobilized in eggshell membrane*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007. 49(1-4), p. 55-60.
13. Gonzo, E.E. and Gottifredi, J.C., *A simple and accurate method for simulation of hollow fiber biocatalyst membrane reactors*. Biochemical Engineering Journal, 2007. 37(1), p. 80-85.
14. Starodub, N.F. and Rebriev, A.V., *Liquid photopolymerizable compositions as immobilized matrix of biosensors*. Bioelectrochemistry, 2007. 71(1), p. 29-32.
15. Huang, X.-J., Ge, D., and Xu, Z.-K., *Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization*. European Polymer Journal, 2007. 43(9), p. 3710-3718.
16. Gupta, M.N., *Thermostabilization of proteins*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1991. 14, p. 1-11.

17. Klibanov, A.M., *Stabilization of enzymes against thermal inactivation*. Advances in Applied Microbiology, 1982. 29, p. 1-28.
18. Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., and Guisán, J.M., *Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment*. Enzyme and Microbial Technology, 2000. 26(7), p. 509-515.
19. Arica, M.Y., Yavuz, H., Patir, S., and Denizli, A., *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, 2000. 11(2-3), p. 127-138.
20. Bayramoglu, G., Yilmaz, M., and Arica, M.Y., *Immobilization of a thermostable [alpha]-amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis*. Food Chemistry, 2004. 84(4), p. 591-599.
21. Pessela, B.C.C., Fernández-Lafuente, R., Fuentes, M., Vian, A., García, J.L., Carrascosa, A.V., Mateo, C., and Guisán, J.M., *Reversible immobilization of a thermophilic [beta]-galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. 32(3-4), p. 369-374.
22. Mehta, R.V., Upadhyay, R.V., Charles, S.W., and Ramchand, C.N., *Direct binding of protein to magnetic particles*. Biotechnology Techniques, 1997. 11, p. 493-496.
23. Koneracka, M., Kopcansky, P., Antalík, M., Timko, M., Ramchand, C.N., Lobo, D., Mehta, R.V., and Upadhyay, R.V., *Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999. 201(1-3), p. 427-430.
24. Kuncová, G. and Scaronivel, M., *Lipase Immobilized in Organic-Inorganic Matrices*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 1997. 8(1-3), p. 667-671.
25. Huang, S.H., Liao, M.H., and Chen, D.H., *Direct Binding and Characterization of Lipase onto Magnetic Nanoparticles*. Biotechnology Progress, 2003. 19(3), p. 1095-1100.
26. Magnan, E., Catarino, I., Paolucci-Jeanjean, D., Preziosi-Belloy, L., and Belleville, M.P., *Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability*. Journal of Membrane Science, 2004. 241(1), p. 161-166.
27. Tukul, S.S. and Alptekin, O., *Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate*. Process Biochemistry, 2004. 39(12), p. 2149-2155.
28. Burteau, N., Burton, S., and Crichton, R.R., *Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase*. FEBS Letters, 1989. 258(2), p. 185-189.
29. Van Aken, B.P., Henry, L., Spiros, N., and Agathos, N., *Co-immobilization of manganese peroxidase from Phlebia radiata on porous silica beads*. Biotechnology Letters, 2000. 8, p. 641-647.
30. Dos Reis-Costa, L.S., Andreimar, M., Franca, S.C., Trevisan, H.C., and Roberts, T.J.C., *Immobilization of lipases and assay in continuous fixed bed reactor*. Protein and Peptide Letters, 2003. 10, p. 619-647.
31. Barros, R.M., Extremina, C.I., Goncalves, I.C., Braga, B.O., Balcao, V.M., and Malcata, F.X., *Hydrolysis of [alpha]-lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. 33(7), p. 908-916.

32. Lamas, E.M., Barros, R.M., Balcao, V.M., and Malcata, F.X., *Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from Cynara cardunculus and immobilized onto highly activated supports*. Enzyme and Microbial Technology, 2001. 28(7-8), p. 642-652.
33. Zhou, Q.Z.K. and Dong Chen, X., *Immobilization of [beta]-galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde*. Journal of Food Engineering, 2001. 48(1), p. 69-74.
34. D'Souza, S.F. and Kubal, B.S., *A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2002. 51(2), p. 151-159.
35. Hwang, S., Lee, K.-T., Park, J.-W., Min, B.-R., Haam, S., Ahn, I.-S., and Jung, J.-K., *Stability analysis of Bacillus stearothermophilus L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels*. Biochemical Engineering Journal, 2004. 17(2), p. 85-90.
36. Balcao, V.M., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Malcata, F.X., and Guisan, J.M., *Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports*. Biotechnology Progress, 2001. 17(3), p. 537-542.
37. Mielgo, I., Palma, C., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., Moreira, M.T., Feijoo, G., and Lema, J.M., *Covalent immobilisation of manganese peroxidases (MnP) from Phanerochaete chrysosporium and Bjerkandera sp. BOS55*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. 32(7), p. 769-775.
38. Fernández-Lafuente, R., Rosell, C.M., Rodríguez, V., and Guisán, J.M., *Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents*. Enzyme and Microbial Technology, 1995. 17(6), p. 517-523.
39. Monsan, P., *Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization*. Journal of Molecular Catalysis, 1978. 3(5), p. 371-384.
40. López-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortíz, G., Guisán, J.M., and Fernández-Lafuente, R., *Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports*. Journal of Biotechnology, 2005. 119(1), p. 70-75.
41. Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, C., Dellamora-Ortíz, G., Fernández-Lafuente, R., and Guisán, J.M., *Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. 39(4), p. 877-882.
42. Kondo, A. and Fukuda, H., *Preparation of thermo-sensitive magnetic hydrogel microspheres and application to enzyme immobilization*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997. 84(4), p. 337-341.
43. Niemeyer, C.M., *Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science*. Angewandte Chemie International Edition, 2001. 40(22), p. 4128-4158.
44. Wilhelm, C., Gazeau, F., Roger, J., Pons, J.N., Salis, M.F., Perzynski, R., and Bacri, J.C., *Binding of biological effectors on magnetic nanoparticles measured by a magnetically induced transient birefringence experiment*. Physical Review E, 2002. 65(3), p. 031404.

45. Liao, M.-H. and Chen, D.-H., *Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability*. Biotechnology Letters, 2001. 23(20), p. 1723-1727.
46. Koneracka, M., Kopcansky, P., Timko, M., Ramchand, C.N., de Sequeira, A., and Trevan, M., *Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002. 18(1-3), p. 13-18.
47. Bahar, T. and Celebi, S.S., *Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR)*. Enzyme and Microbial Technology, 2000. 26(1), p. 28-33.
48. Liu, Y.A., Hamby, R.K., and Colberg, R.D., *Fundamental and practical developments of magnetofluidized beds: A review*. Powder Technology, 1991. 64(1-2), p. 3-41.
49. Colombie, S., Gaunand, A., and Lindet, B., *Lysozyme inactivation under mechanical stirring: effect of physical and molecular interfaces*. Enzyme and Microbial Technology, 2001. 28(9-10), p. 820-826.
50. Zeng, L., Luo, K., and Gong, Y., *Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006. 38(1), p. 24-30.
51. Okutucu, B., Dincer, A., Habib, O., and Zihnioglu, F., *Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007. 70(5), p. 709-711.
52. Goshev, I. and Nedkov, P., *Extending the range of application of the biuret reaction: Quantitative determination of insoluble proteins*. Analytical Biochemistry, 1979. 95(2), p. 340-343.
53. Marco, A., Rubio, R., Compano, R., and Casals, I., *Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed*. Talanta, 2002. 57(5), p. 1019-1026.
54. Etheridge, R.D., Pesti, G.M., and Foster, E.H., *A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory*. Animal Feed Science and Technology, 1998. 73(1-2), p. 21-28.
55. Salgado, N., *Estudio de la cinética de la reacción de esterificación de ácido oleico con butanol en hexano catalizada por lipasas (Candida Rugosa y Candida Antartica)*, in *Ingeniería Química*. 2007, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales: Manizales.
56. Torres, J., *Obtención de biodiesel a partir de aceite de palma utilizando enzimas*, in *Ingeniería Química*. 2005, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales: Manizales.
57. Conrado, V. *Identificación de algunos grupos funcionales orgánicos de interés bioquímico*. 2007 [cited 2007; Available from: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/>].
58. Andrade, P., *Manual de Prácticas para el Laboratorio de Operaciones Unitarias III*, in *Ingeniería Química*. 2005, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales: Manizales.
59. Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H.-y., Zhang, H.-q., and Gu, N., *Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane*.

- Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003. 212(2-3), p. 219-226.
60. Gunde, M.K., *Vibrational modes in amorphous silicon dioxide*. Physica B: Condensed Matter, 2000. 292(3-4), p. 286-295.
 61. Zhuravlev, L.T., *The surface chemistry of silica - The Zhuravlev Model*, in *Colloidal silica. Fundamentals and application*, H.E. Bergna and W.O. Roberts, Editors. 2006, CRC Taylor and Francis: Portland, OR.
 62. Talukder, M.M.R., Beatrice, K.L.M., Song, O.P., Pua, S., Wu, J.C., Won, C.J., and Chow, Y., *Improved Method for Efficient Production of Biodiesel from Palm Oil*. Energy Fuels, 2007, p. In Press.
 63. Moreira, A.B.R., Perez, V.H., Zanin, G.M., and de Castro, H.F., *Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol Using Lipases from Several Sources Immobilized on Silica*. Energy Fuels, 2007. 21(6), p. 3689-3694.

CAPÍTULO 3

PROCESOS EXTRACCIÓN REACCIÓN

RESUMEN

En este capítulo se muestra el modelamiento y simulación de un biorreactor-extractor utilizando el software ModELL. Se explican los algoritmos utilizados para el desarrollo de este proceso no convencional y se muestra el funcionamiento de este software. El sistema a analizar es el involucrado en la producción de biodiesel el cual tiene características termodinámicas que crean la posibilidad de implementar un proceso enzimático de extracción-reacción para la obtención de este importante producto. Finalmente se propone un esquema de un birreactor-extractor el cual permite ubicar el biocatalizador magnético en la zona correspondiente a la concentración máxima de reactivos.

INTRODUCCIÓN

La extracción reacción es un proceso que involucra el fenómeno de reacción y separación de fases líquidas e una misma unidad. La inmiscibilidad puede ocurrir naturalmente en el sistema reactivo o puede ser introducido deliberadamente por la adición de un solvente. La extracción reacción puede ser utilizada para obtener una significativa mejoría en el rendimiento y selectividades de productos deseados en un sistema multireaccionante, consiguiendo reducir los flujos de reciclo y la formación de flujos de desecho. La combinación de reacción con extracción líquido-líquido se puede usar para la purificación de productos que son difíciles de separar por técnicas convencionales [1].

El principal objetivo de la extracción reacción es la síntesis de productos químicos, es decir, implementar la componente de reacción, y adicionar la componente de separación para lograr la extracción selectiva de compuestos intermedios o productos para prevenir su reacción posterior y alcanzar así un mayor rendimiento [2, 3].

La extracción reacción presenta algunas desventajas como lo es la selección y adición de un solvente que logre extraer selectivamente el producto de interés. Esta desventaja sumada a la ausencia de metodologías claras de diseño para este tipo de procesos, ha impedido una mayor aplicación industrial de esta tecnología [1].

Existen varios tipos de procesos de reacción separación, en donde se agrupan los procesos simultáneos en donde se conjuga la reacción y la extracción líquido-líquido, los cuales son aplicables en la producción y/o separación de sustancias químicas por vía sintética. Dentro de estos procesos se encuentran [4]:

- Reacción extractiva: su principal objetivo es la síntesis de productos químicos, es decir, implementar la componente de reacción, y adicionar la componente de separación para lograr la extracción selectiva de compuestos intermedios o productos para prevenir su reacción posterior y alcanzar así un mayor rendimiento. Esta separación *in-situ* conlleva a una reconcentración de reactivos

con lo cual se engaña el equilibrio químico (cuando se tienen reacciones reversibles) llegando a conversiones más elevadas. Además del efecto sinérgico alcanzado por la combinación de reacción y separación, se tiene la gran ventaja de llevar a cabo el proceso en un solo equipo.

- Extracción reactiva: su objeto primario es la separación. Utiliza una reacción reversible para convertir sustancias difíciles de separar, en otras sustancias cuyas características fisicoquímicas las hacen fáciles de separar. En esta categoría podemos mencionar, separación o purificación, enriquecimiento, conversión de sales y extracción reactiva adsortiva.

Además de las aplicaciones en síntesis de productos químicos, los procesos reacción extracción se ha venido implementando de manera exitosa en el campo de la biotecnología, en el cual se agrupan:

- Procesos de fermentación extractiva que es un proceso en el que se combina biorreacción aerobia o anaerobia con microorganismos y extracción líquido-líquido *in situ* de los productos principales o inhibidores. Su principal ventaja es el control de la inhibición por producto final, lo cual lleva a mayores rendimientos y a la posibilidad de fermentar mezclas más concentradas en sustrato [5].
- Reacción enzimática extractiva la cual conjuga de manera simultánea las componentes de separación por extracción líquido-líquido y la reacción biológica empleando enzimas como catalizador [6].

La extracción reactiva ha sido estudiada a nivel experimental dando resultados favorables para sistemas difíciles de controlar. Sin embargo, la aplicación a escala industrial se hace un poco difícil ya que las bases teóricas aún no han sido estudiadas, lo cual no permite una comprensión de los fenómenos que involucran estos procesos. Algunos de los estudios experimentales se presentan a continuación:

Separación-Purificación

El proceso de destilación convencional para llevar a cabo la separación del 1,3-propanediol tiene en cuenta factores como la volatilidad y la naturaleza hidrofílica de las sustancias presentes en el proceso para lograr una separación eficiente y económicamente viable. Para este caso la volatilidad es baja y además existe una alta tendencia a formar puentes de hidrógeno con el agua lo que dificulta la separación y lo vuelve poco viable económicamente.

Para mejorar este problema en la separación convencional del 1,3-propanediol, en la literatura se ha propuesto convertirlo en 2-metil-1,3-dioxano, por medio de una reacción reversible con el acetaldehído. El nuevo compuesto es recuperado por una extracción simultánea utilizando un solvente orgánico y finalmente el nuevo compuesto es transformado nuevamente en 1,3 propanediol [7].

Extracción Reactiva Adsorptiva

Una aplicación importante de la extracción reactiva se da en la recuperación de productos de los caldos de fermentación, como ácidos carboxílicos, antibióticos y alcoholes. Estos productos convencionalmente se recuperan por precipitación, adsorción, separación con membrana o extracción. Pero estos procesos generalmente están asociados a una selectividad baja, lo que puede contaminar el producto principal [8]. Introducir una reacción reversible de formación de complejos con un agente transportador adecuado, puede incrementar en gran medida la selectividad y la recuperación fraccional del producto deseado.

Este tipo de proceso no debe confundirse con fermentación extractiva, ya que en ésta última la fermentación y la extracción se dan simultáneamente en el fermentador mediante la adición de un solvente selectivo al producto principal, mientras que la extracción reactiva da una alternativa de recuperación de los productos obtenidos de la fermentación (que se lleva a cabo de forma independiente), adicionando solventes y resinas de intercambio iónico que extraen el producto en forma de un complejo que luego se regenera mediante re-extracción.

En la extracción reactiva adsorptiva generalmente se usan intercambiadores iónicos o agentes transportadores, por ejemplo, en la industria química en la extracción de ácidos orgánicos e inorgánicos, de furfural, etc. en la industria bioquímica y farmacéutica en la extracción de penicilina, aminoácidos, etc.

El intercambiador iónico se disuelve en un solvente que por fines prácticos se prefiere sea no aromático, de alto punto de ebullición (p.e. ≈ 500 K) e inmiscible en agua. Esto da a la fase orgánica las propiedades físicas necesarias (tensión interfacial alta, baja viscosidad, baja densidad), ya que la mayoría de intercambiadores iónicos son altamente viscosos o sólidos.

El soluto forma con el intercambiador un complejo que es soluble solo en el disolvente, por lo que la reacción de formación de complejos se da en la interfase y de esta forma se extrae el producto.

El disolvente no solo influye sobre las propiedades físicas e hidrodinámicas, sino también en la transferencia de masa y en el equilibrio de fases. En contraste con la extracción simple líquido-líquido, la selección del intercambiador iónico es la etapa decisiva en el diseño del proceso, por lo cual la variedad de disolventes es más bien limitada (alifáticos, nafténicos y aromáticos) [9].

Reacción enzimática extractiva

El ácido 6-aminopenicílico (6-APA) es una sustancia intermedia muy importante en la síntesis de penicilinas modificadas con amoxicilina. Su producción a partir de la penicilina G es uno de los procesos enzimáticos comercialmente establecidos en la industria farmacéutica. La enzima utilizada es la penicilina G acilasa (PGA) inmovilizada en varios soportes sólidos. La reacción se lleva a cabo a 37 °C y el control del pH es la variable más importante para mantener la estabilidad del proceso [10]. La

hidrólisis enzimática de la sal de potasio de la penicilina G (PenGK) produce sal de potasio de 6-APA y ácido fenilacético (PAA) que tras su acumulación disminuye el pH del caldo, lo cual afecta la estabilidad de la enzima. Si el pH cae por debajo de 5.0 se acelera la inactivación de la enzima, por lo que es esencial controlar el pH. El método industrial clásico controla el pH mediante la adición de cal para precipitar de la sal de calcio del 6-APA, seguida por la adición del ácido sulfúrico para regenerar el ácido carboxílico mientras se precipita el sulfato de calcio. Este método consume mucho ácido sulfúrico y cal y produce sulfato de calcio como residuo sólido, por lo que resulta nocivo para el ambiente.

La reacción enzimática extractiva es aplicable a procesos como la obtención de ácido 6-aminopenicilico (6-APA). Para llevar a cabo este proceso se propone la extracción del PAA (subproducto) por medio de una amina, Alamina 336, la cual es diluida en queroseno o isobutilcetona, que constituye la fase orgánica dispersa. El PAA formado en la fase acuosa continua, se extrae mediante la reacción con la amina en la interfase líquido-líquido, para formar un complejo soluble en la fase orgánica. La sal de potasio de 6-APA permanece en la fase acuosa. La recuperación del PAA extraído y la regeneración de la amina se logran mediante re-extracción a una solución acuosa de una amina más volátil como la dimetilamina (DMA), que luego se puede destilar para obtener como producto de fondos PAA acuoso y por la cima DMA, o bien, mediante un cambio en las condiciones de pH, temperatura, etc., para promover la re-extracción del ácido en agua. La DMA es recirculado para obtener un sistema de ciclo cerrado [11-13]. Esta técnica además de controlar el pH evita la inhibición competitiva del PAA y constituye un proceso sostenible ya que no consume reactivos extra (solo de reposición) y no tiene corrientes de desecho.

Fermentación extractiva

La fermentación extractiva, es un proceso que combina la biorreacción y la extracción del producto principal de ésta, en un régimen continuo y de manera simultánea en el recipiente de fermentación. Es un proceso unificado muy promisorio para aumentar la producción de químicos como antibióticos, vitaminas, alcoholes, ácidos orgánicos y solventes. Esta técnica ha encontrado aplicación en sistemas donde el crecimiento microbiano (y por ende la generación de producto) se ve inhibido por la concentración del producto en el fermentador, fenómeno conocido como inhibición por producto final (*end product inhibition*), o por algún otro metabolito indeseable. La recuperación del producto por extracción es de particular interés para tales sistemas, ya que permite la remoción in situ del agente inhibidor [14].

Esta técnica también puede ser implementada cuando la separación del producto a partir del caldo de fermentación (una mezcla compleja y diluida) es crítica, debido a propiedades como baja volatilidad o carácter hidrofílico. La extracción se consigue generando una segunda fase con el uso del contacto continuo de un solvente orgánico inmiscible en el caldo de fermentación, que por lo general es de naturaleza acuosa. Esto provocará una menor concentración inhibidora del producto en el caldo, haciendo mayor la velocidad de reacción. Adicionalmente, este proceso permitirá la fermentación de mezclas más concentradas en sustrato (debido a las altas velocidades de crecimiento celular, que se presentan al no existir inhibición por producto), disminución en los

costos de recuperación de producto (la purificación se efectúa al extracto, no al caldo fermentado), en los costos de tratamiento de agua de desecho y en el consumo de energía (se emplea menos agua) [15].

La diferencia más marcada entre la fermentación extractiva y la reacción extractiva química es que en la primera el proceso debe llevarse a cabo teniendo como prioridad conservar la viabilidad de las células, lo cual incluye el uso de un solvente que sea biocompatible con estas (biomasa) y la implementación de un control más riguroso de factores como pH y temperatura en rangos más limitados. La identificación del solvente adecuado es la principal desventaja o complejidad de esta técnica. El solvente a utilizar debe cumplir las características fisicoquímicas que se exponen en secciones subsecuentes y además, características biológicas que se relacionan con la biocompatibilidad, es decir, con el buen desempeño y supervivencia de los microorganismos durante el proceso de fermentación, cuando éstos entran en contacto con el solvente (así sea en mínimas cantidades) [3, 5, 16].

MÉTODOS

Algoritmo par el cálculo del Equilibrio Líquido-Líquido-Reactivo (ELLR) para Reacciones Reversibles Utilizando la Cinética de Reacción

El equilibrio de fases reactivo es una poderosa herramienta útil para determinar la viabilidad de un proceso de extracción reactiva. El equilibrio líquido-líquido reactivo está ligado a sistemas en los cuales hay presencia de fases líquidas simultáneamente con reacciones químicas. En este tipo de sistemas el extracto y refinado se encuentran en el sub-espacio del equilibrio químico y en el sub-espacio del equilibrio líquido-líquido [4].

Con la cinética de reacción el ELLR puede resolverse para un CSTR (figura 3.1) en régimen continuo o por lotes. Las ecuaciones del modelo corresponden a los balances de masa alrededor de un volumen de control que para este caso conciernen a un reactor de mezcla completa (CSTR). En extracción reactiva este reactor actúa además como un separador de fases por esa razón el CSTR lo denominaron un Reactor Extractor (RE). Un RE representa una etapa de equilibrio líquido-líquido-reactivo y en esa etapa los reactivos reaccionan hasta alcanzar la composición pseudo-inicial. Después de llegar a ese estado estable sucede la separación de fases consiguiendo con ello eliminar la limitante termodinámica del equilibrio químico de reacción debido a que ocurre una redistribución de campos concentracionales que permite que la nueva distribución de reactivos en las fases corresponda a zonas donde existe una fuerza motriz para el proceso (intensificación del proceso en general). Estas etapas de ELLR pueden ser extendidas a sistemas de múltiples etapas convirtiendo el RE en un Reactor Extractor Multietapa (REME).

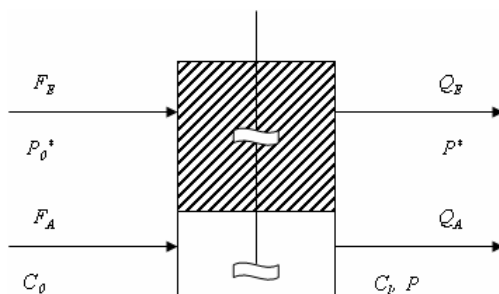


Figura 3.1 Reactor Extractor. FE flujo de solvente entrada, FA flujo alimento, QE flujo extracto, QA flujo fase refinado, C0 concentración inicial del reactivo, C1 concentración final del reactivo, P concentración final del producto en la fase acuosa, P* concentración del producto en la fase solvente [17].

El balance general de masa para un RE operando por lotes es:

$$\text{Flujo de entrada} + \text{Generación} - \text{Flujo de salida} = \text{Acumulación} \quad (3.1)$$

La ecuación (3.1) corresponde al balance de masa, en este caso los flujos, el término de generación y el término de acumulación se expresan en unidades de mol/tiempo. En un reactor-extractor por lotes no existen flujos de entrada ni de salida por lo que la ecuación (3.1) se reduce al término de generación y acumulación. Realizando los balances de masa para los i componentes en la fase líquida donde sucede la reacción se tiene:

$$\frac{dx_i}{dt} = V_r \cdot r_{x_i} \quad (3.2)$$

Donde dx_i/dt representa el cambio de la composición del componente i con respecto al tiempo, V_r es el volumen de reacción y r_{x_i} es la velocidad de reacción del componente i .

Es de anotar que en la ecuación (3.2) el término de reacción es negativo cuando corresponde a reactantes y positivo cuando son productos. Para este balance de masa se realizan las siguientes suposiciones: la reacción solo toma lugar en una de las fases líquidas, la mezcla reacciona hasta el equilibrio y luego se separa por extracción líquido-líquido. Los productos de la reacción son los que migran a la fase solvente. La cantidad de producto que migra y la concentración se calcula utilizando por las relaciones de equilibrio fásico así:

$$x_i^s = k_i * x_i \quad (3.3)$$

Donde x_i^s es la composición del componente i en la fase solvente, k_i es el coeficiente de distribución y x_i es la composición del componente i en la fase donde sucede la reacción.

Las ecuaciones (3.2) y (3.3) se resuelven simultáneamente, utilizando el algoritmo de la figura 3.2. Se necesita entrar al algoritmo los valores iniciales de concentración dentro del reactor. Una vez ingresados estos valores se resuelven las ecuaciones del balance de masa que son diferenciales utilizando un método numérico como *Runge-Kutta* de 4 orden. Con los valores de la cinética se resuelve el equilibrio líquido-líquido. Las composiciones de entrada al equilibrio son las correspondientes a las condiciones de mezcla pseudo-inicial. Por medio del equilibrio líquido-líquido se determinan las composiciones de cada componente en la fase solvente, y se re-calculan las composiciones de la fase líquida en la cual procede la reacción. Luego esas composiciones se ingresan nuevamente a los balances de masa. El proceso iterativo se realiza hasta que la composición del componente i calculada por la cinética en la fase donde sucede la reacción sea igual a la composición del componente i calculada por equilibrio líquido-líquido en la fase donde sucede la reacción. Cuando esto se cumple se continua con la integración numérica (*Runge-Kutta*) hasta el final del tiempo de reacción.

Si el proceso de extracción reactiva se realiza en régimen continuo los balances de masa para reactivos y productos se escriben:

Balance de masa de los reactivos

$$F_A * x_{i0} - Q_A * x_i - V_A * r_{x_i} = 0 \quad (3.4)$$

Balance de masa productos

$$F_E * x_{io}^s - Q_A * x_i - Q_E * x_i^s + V_A * r_{x_i} = 0 \quad (3.5)$$

Balance de masa total

$$F_E * \rho_E - Q_A * \rho_A - Q_E * \rho_E + F_A * \rho_A = 0 \quad (3.6)$$

Relaciones del equilibrio líquido-líquido

$$x_i^s = k_i * x_i \quad (3.7)$$

Donde, F y Q son los flujos molares de entrada y salida al RE, los subíndices A y E representan la fase donde se lleva a cabo la reacción y la fase solvente respectivamente, r es la velocidad total de reacción. El resto de términos de las ecuaciones 3.4 a 3.7 tienen el mismo significado del ELLR para régimen por lotes.

El sistema de ecuaciones que modelan el régimen continuo, se resuelve de forma similar al algoritmo mostrado en la figura 3.2, solo que en lugar de utilizar el método de *Runge-Kutta* para ecuaciones diferenciales se usa el método numérico de Newton multivariado. Este método tiene la desventaja de ser un problema de valor inicial. Como es conocido el problema de valor inicial depende mucho del conjunto de valores del cual parte la búsqueda de la solución. En muchas ocasiones se requiere ingresar más de un conjunto de valores iniciales para conseguir la convergencia.

Algoritmo para el análisis y diseño de procesos de extracción reactiva

La metodología propuesta para analizar y diseñar un proceso de extracción reactiva es la siguiente [3-5, 16-18]:

- Estudio de compatibilidad de los componentes de reacción y separación, es decir, que la reacción se presente en una de las dos fases líquidas y que las condiciones de temperatura y presión óptimas para la reacción satisfagan o se aproximen a las condiciones de separación.
- Selección del solvente apropiado para la extracción líquido-líquido, se necesita seleccionar un solvente adecuado que logre extraer selectivamente el producto de reacción. El solvente debe cumplir algunos criterios como: bajo costo, alta selectividad, fácil adquisición, valores medios de viscosidad y tensión superficial, no corrosivo y para el caso de reacciones que involucren material biológico debe ser biocompatible.
- Análisis de la influencia de la componente de separación sobre la de reacción. Para esto se utilizan técnicas de termodinámica topológica para visualizar cuales sectores del campo concentracional se ven más favorecidas con el avance de la reacción al retirar selectivamente los componentes.
- Método corto extendido, es un método donde se identifican las posibilidades y restricciones del sistema reaccionante, también se delimita la relación solvente/alimento que permite la presencia del fenómeno simultáneo de extracción reacción.
- Modelamiento matemático.

- Verificación de los modelos matemáticos (adecuación).
- Simulación, mostrando el diagrama de flujo simplificado donde vienen dada la relación alimento/solvente con la cual se obtiene una máxima selectividad, alta conversión y por lo tanto máximo rendimiento y pureza de los productos, mínimo gasto energético.
- Experimentación física, que debe ser lo mínima posible. Solo para la verificación de los resultados obtenidos teóricamente.
- Dinámica, (función del tiempo). Depende de los antecedentes estáticos, revisión de los estados estables múltiples (existen o no) y la estabilidad de los estados estables múltiples. Control y automatización.
- Comparación de los esquemas de extracción reactiva con los esquemas secuenciales reacción-separación, (métodos cortos), gastos y balances energéticos.
- Planta piloto.
- Introducción a la industria.

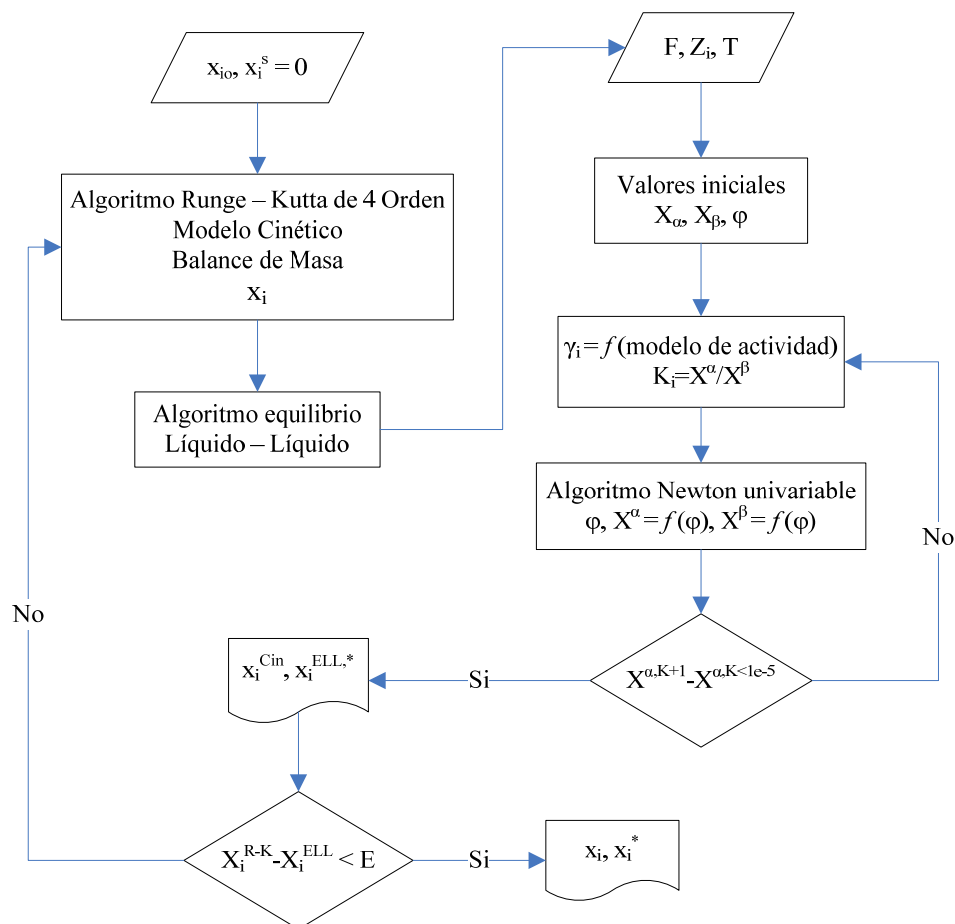


Figura 3.2 Algoritmo ELLR utilizando la cinética de reacción

Método corto análisis del equilibrio líquido-líquido-reactivo

Para la utilización del método corto se debe contar con la información termodinámica necesaria, las cuales son utilizadas para determinar la viabilidad del proceso de extracción reactiva. Además se debe seleccionar el modelo de actividad que prediga el comportamiento del equilibrio líquido-líquido.

Con toda la información preliminar se resuelve el equilibrio líquido-líquido-reactivo utilizando el algoritmo anteriormente descrito (figura 3.2). La solución del ELLR permite en primera instancia determinar si el espacio geométrico del *simplex* de concentración donde se lleva a cabo la reacción se intercepta con el espacio geométrico correspondiente a la formación de dos fases líquidas (figura 3.3). Este procedimiento es útil para determinar la viabilidad de procesos de extracción reactiva en sistemas auto-inducidos. Si no existe un espacio de intercepción entre los equilibrios químicos y de fases, el proceso de extracción reactiva no puede llevarse a cabo. La evaluación preliminar es útil para sistemas inducidos ya que sirve como criterio de selección para los posibles solventes.

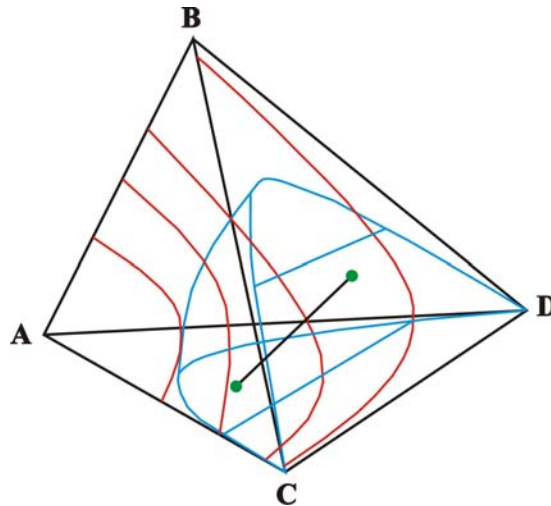


Figura 3.3 Intercepción del equilibrio químico y de fases. Líneas rojas equilibrio químico, líneas negras equilibrio de fases

Cuando se tiene la certeza de que el proceso de extracción reactiva es posible, se puede a través de la solución del ELLR delimitar el espacio de operación. Esto se consigue manipulando el parámetro de diseño R . R se define como la relación de flujo de solvente/flujo de alimento. La variación de esta relación permite identificar la mínima y la máxima cantidad de solvente para que se presente el fenómeno simultáneo de extracción reacción. Esto indica que a valores de R menores al mínimo y mayores al máximo el sistema reaccionante estaría ubicado en la región homogénea, es decir que no se presentaría el fenómeno de extracción reacción simultánea. La aplicación de esta metodología es clara para sistemas inducidos porque en ellos es evidente la presencia de un solvente. Para sistemas auto-inducidos la relación solvente/alimento se calcula entre los flujos de reactantes que ingresan al sistema.

La relación de flujos de reactantes influye directamente sobre la cantidad de productos obtenidos en la reacción y esto a su vez afecta la formación de las dos fases en equilibrio. En este caso específico uno de los reactantes “actúa” como solvente y los otros como alimentación.

El parámetro R definido es aplicable a procesos de extracción en régimen continuo. Para extenderlo a régimen por lotes el parámetro de diseño R debe ser redefinido. En los procesos por lotes los reactivos son inicialmente cargados en el reactor y se dejan reaccionar hasta que uno de los reactivos se agota o se alcanza el equilibrio de reacción. En este caso el parámetro R se define como la relación entre el volumen de solvente y el volumen de la fase donde sucede la reacción, para diferenciarlo se denominará R_V . El parámetro R_V puede ser calculado para sistemas inducidos y auto-inducidos.

Una vez encontrados los límites de operación se puede evaluar otros parámetros encaminados a encontrar los estados estables con máxima conversión o rendimiento. Esto se consigue graficando el parámetro R o R_V (figura 3.4) según sea el caso contra la conversión o el rendimiento del proceso. El método corto descrito permite sin mucho esfuerzo de cálculo concluir en forma preliminar si el proceso de extracción reactiva tiene posibilidades de ser implementado. Una vez obtenida esta respuesta se puede continuar con los demás pasos descritos en el esquema de diseño [3-5, 16, 17].

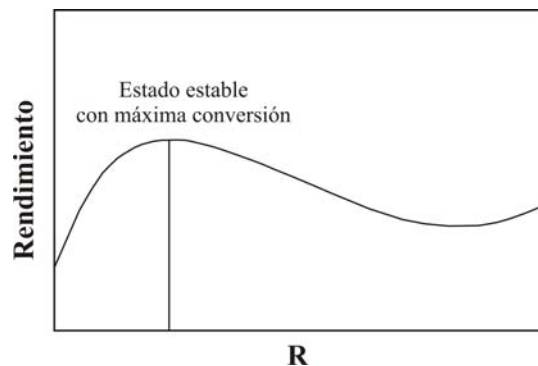


Figura 3.4 Variación del parámetro R para la búsqueda de estados estables con máxima conversión

Plataforma del software ModELL-R

Para régimen por lotes

El software ModELL-R es utilizado para calcular un reactor extractor por lotes o continuo. En la figura 3.5 se puede observar el software. Como primer paso se deben seleccionar los componentes que están presentes en el proceso, tanto reactivos como productos. En la figura 3.6 se puede observar cómo se seleccionan los componentes y en la figura 3.7 se observa la ventana que permite realizar este paso. En la figura 3.8 se puede observar los datos necesarios para resolver el reactor extractor por lotes, como por ejemplo, la ecuación de estado, el modelo de actividad, temperatura del sistema, flujos iniciales de los reactivos, entre otros. Después de tener todas las condiciones iniciales se procede a calcular el proceso de extracción reactiva (figura 3.9, recuadro azul) y finalmente en la figura 3.9 se puede observar unos recuadros verdes en los cuales se presentan los resultados de este cálculo.

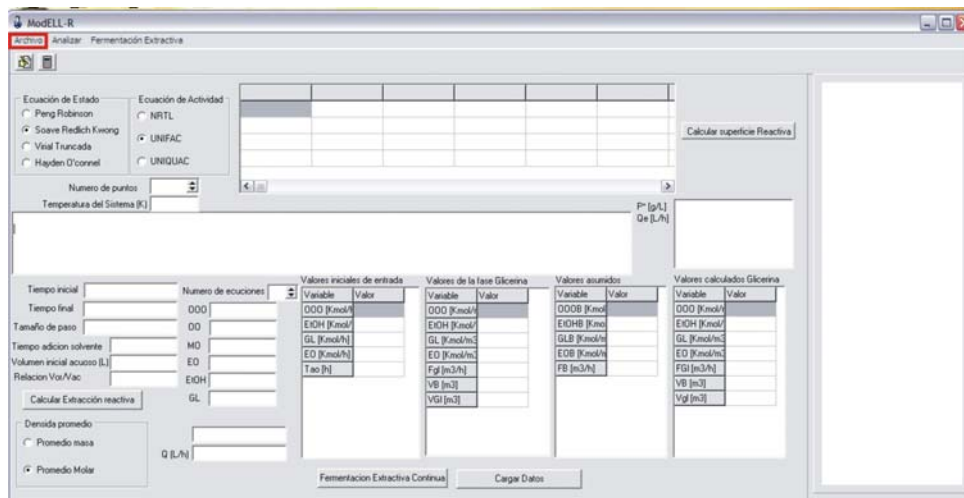


Figura 3.5 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 1

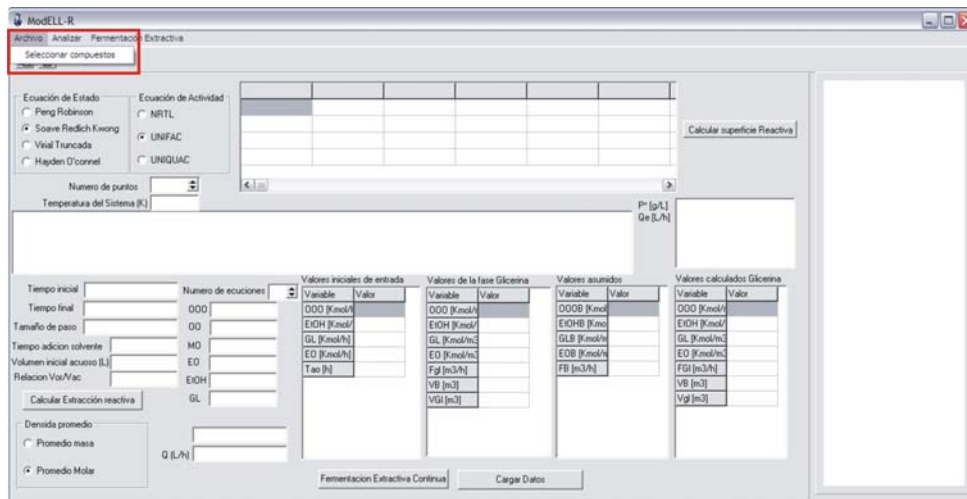


Figura 3.6 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 2

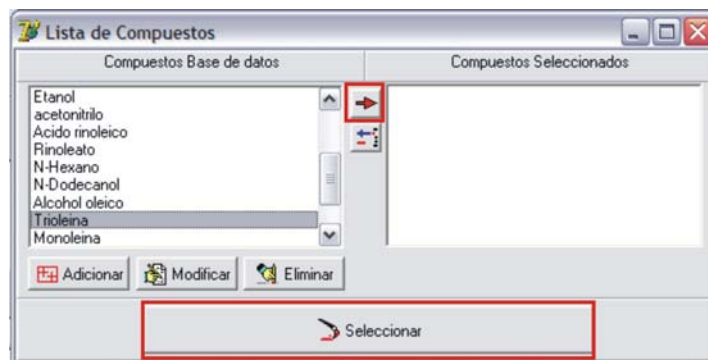


Figura 3.7 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 3

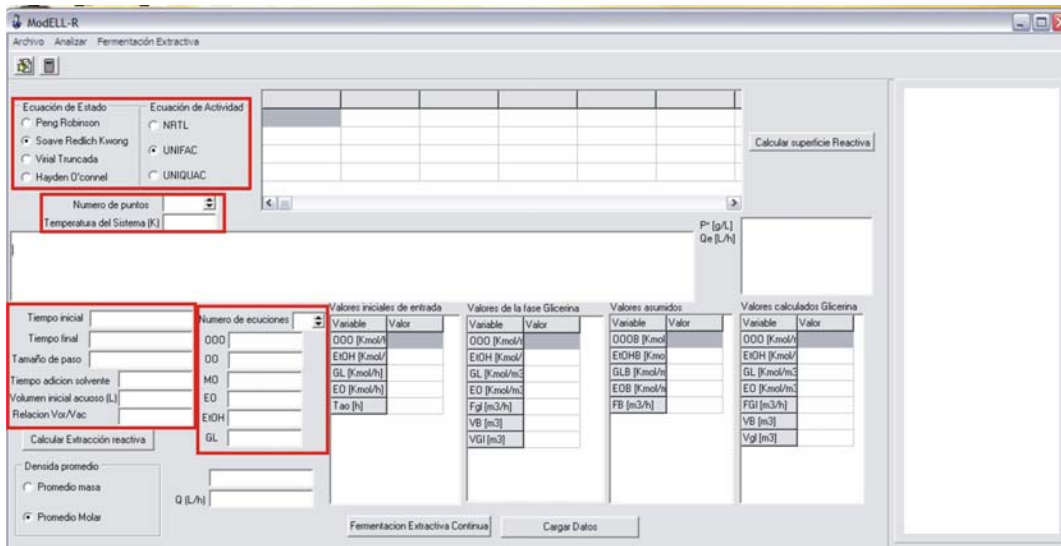


Figura 3.8 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 4

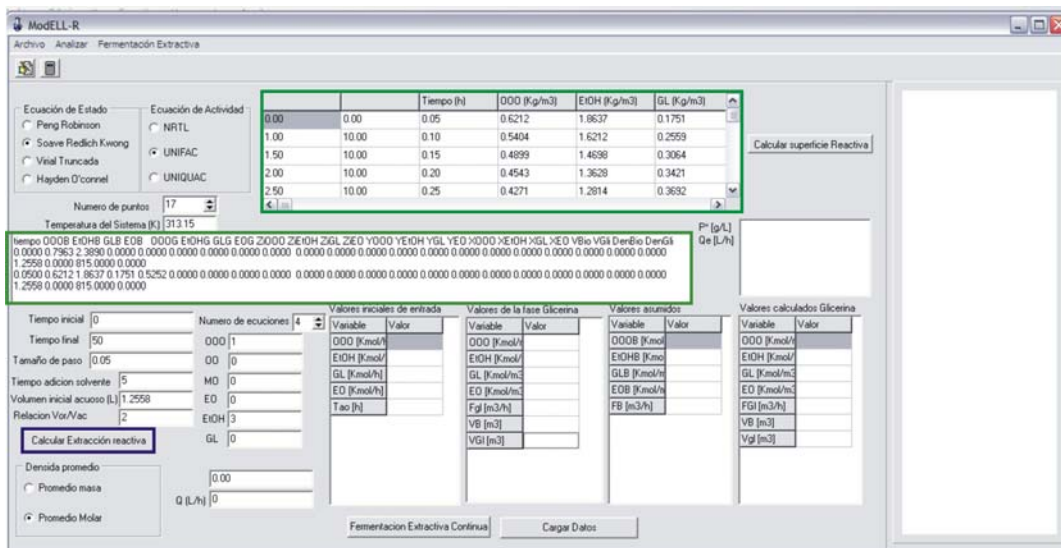


Figura 3.9 Software ModELL-R para un proceso por lotes. Sección 5

Para régimen en continuo

Como se explicó en el proceso de reacción extracción por lotes, de las figuras 3.5 a la 3.7 se pueden observar los primeros pasos a seguir antes de dar las condiciones iniciales y necesarias para realizar el cálculo de este reactor extractor. Después de tener los componentes seleccionados (figura 3.7), se procede a introducir los datos iniciales, como la ecuación de estado, el modelo de actividad, temperatura de operación, valores iniciales de entrada, valores asumidos de la fase glicerina y de la fase biodiesel (figura 3.10), entre otros. Teniendo estos datos se procede a realizar el cálculo del proceso en continuo (figura 3.11, recuadro azul). Cuando se hace por primera vez, el software permite recalculer los flujos de la fase biodiesel y de la fase glicerina y a la vez calcular un porcentaje de error (figura 3.11, recuadros verdes). Hasta que el porcentaje de error sea mínimo, el cual es calculado con los valores de la fase glicerina y los valores

calculados glicerina, se para la simulación y se obtienen ya los resultados finales del proceso, los cuales están representados en la figura 3.11 en los recuadros verdes.

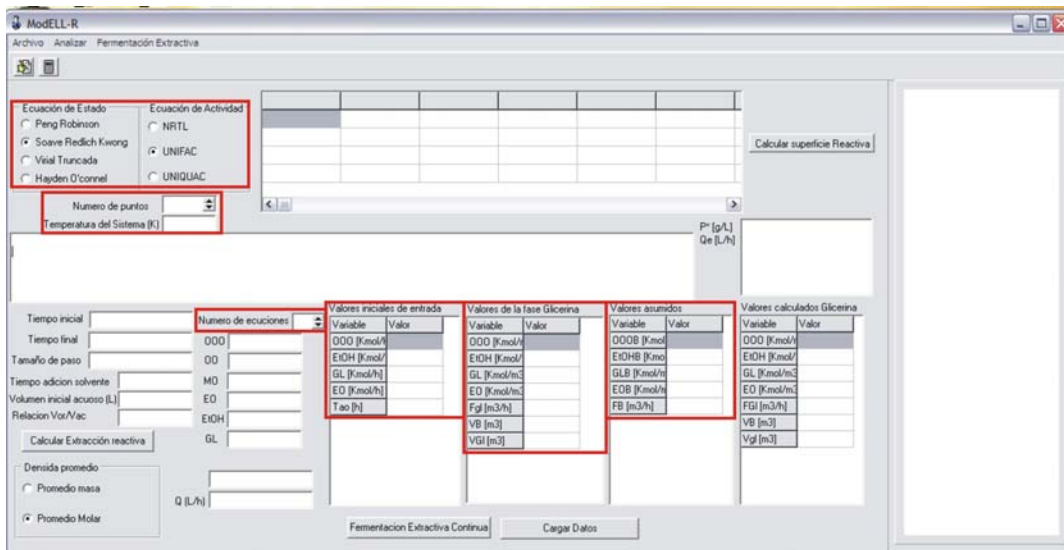


Figura 3.10 Software ModELL-R para un proceso continuo. Sección 1.

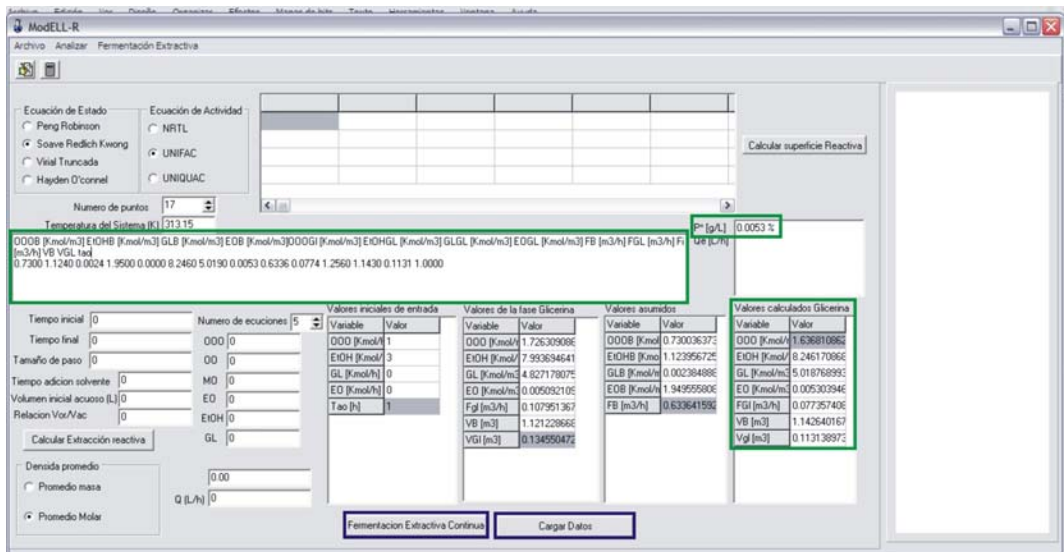


Figura 3.11 Software ModELL-R para un proceso continuo. Sección 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reacción enzimática de transesterificación del aceite de palma con etanol

El proceso más utilizado para la producción de biodiesel es la transesterificación, la cual se refiere a la reacción entre un aceite o grasa y un alcohol en un medio catalizado, para producir ésteres alquílicos de ácidos grasos (i.e. biodiesel) y glicerol o glicerina. La figura 3.12 muestra la reacción que transforma las moléculas de triglicéridos, grandes y ramificadas, en moléculas de ésteres alquílicos, lineales, no ramificadas, de menor tamaño y muy similares a las del petrodiesel [19].



Figura 3.12 Reacción de transesterificación de triglicéridos

Los alcoholes empleados deben ser de bajo peso molecular; entre éstos, el más utilizado es el metanol debido a su bajo costo, seguido por el etanol [20]. Los procesos de producción de biodiesel pueden ser por lotes o continuos. Los primeros, han sido ampliamente estudiados tanto a nivel de laboratorio como industrial y en la bibliografía se reportan condiciones de operación detalladas. *Van Gerpen* et al. presentan una buena recopilación de esquemas de proceso tanto por lotes como continuos [21]. Los procesos continuos pueden emplear bien sea reactores de tanque agitado CSTR (*continuous stirred tank reactor*) como tubulares PFR (*plug flow reactor*).

Un esquema de proceso típico es el uso de varios CSTR en serie. Después de que parte de la glicerina producida se sedimenta en el primer reactor, la reacción en el segundo es bastante rápida. Gran cantidad de procesos emplean mezcladores estáticos o bombas para aumentar la intensidad de mezclado de la corriente que ingresa al reactor. El uso de reactores PFR ofrece menores tiempos de residencia, del orden de 6-10 min., aunque debe garantizarse que el diseño de los reactores brinde el grado de agitación necesario para obtener conversiones adecuadas. Asimismo, pueden instalarse en un arreglo secuencial que permita la sedimentación de la glicerina [19].

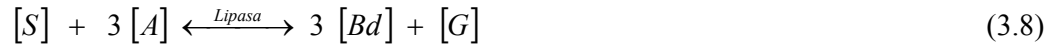
La producción enzimática del biodiesel por la transesterificación de triglicéridos es uno de los procesos enzimáticos comercialmente poco establecido en la industria de los biocombustibles debido al alto costo de la enzima y que para poder usar la enzima repetidamente, se debe implementar un proceso de inmovilización apropiado para permitir que la enzima inmovilizada no pierda mucha actividad enzimática relacionada con la enzima libre. La enzima utilizada para estos procesos es la *lipasa*, esta ha sido inmovilizada sobre varios soportes sólidos usando técnicas de inmovilización convencionales [22, 23].

Cinética de la reacción

La cinética de reacción puede ser aplicable cuando se tienen en cuenta las siguientes suposiciones:

- La reacción es reversible.
- No existe ninguna pérdida de la actividad de enzima durante el curso de la reacción.
- No se tienen en cuenta la formación de mono y di glicéridos.
- Se excluyen las limitaciones de transferencia de masa.

Esta reacción es catalizada por la enzima *Lipozyme IM (Mucor miehei)* inmovilizada sobre una resina de intercambio iónica macroporosa (0.15 U/g y 4% de agua) [24, 25]. Esta cinética puede ser aplicable a la enzima *Candida Rugosa* inmovilizada sobre un soporte magnético, el cual es el biocatalizador a utilizar en este trabajo. La reacción es la siguiente:



Donde S es trioleína en concentración molar (Kmol/m³), A es etanol en concentración molar (Kmol/m³), G es glicerol en concentración molar (Kmol/m³) y Bd es oleato de etilo en concentración molar (Kmol/m³).

Las ecuaciones diferenciales para el sistema de reacción pueden ser derivadas de la ecuación 3.9:

$$\frac{d[G]}{dt} = k_1 * [S] * [A]^3 - k_2 * [G] * [Bd]^3 \quad (3.9)$$

De la estequiometría de la reacción se tiene:

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{1}{3} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[G]}{dt} = -\frac{1}{3} \frac{d[Bd]}{dt} \quad (3.10)$$

Y las constantes para la cinética de reacción son:

$$k_1' = (k_1 + k_4 * [E]) * \exp(k_3 * [A]) \quad (3.11)$$

$$\begin{aligned} k_1 &= 0.534 && (m^3/Kmol)^3 * h^{-1} \\ k_2 &= 1.54872 * 10^{-6} && (m^3/Kmol)^3 * h^{-1} \\ k_3 &= 1.6554 * 10^{-3} && m^3/Kmol \\ k_4 &= 158.94 && (m^3/Kmol)^4 * h^{-1} \\ [E] &= 1.21 * 10^{-6} && Kmol/m^3 \end{aligned} \quad (3.12)$$

Método corto Equilibrio Líquido- Líquido-Reactivo (ELLR)

Las propiedades termodinámicas del sistema no son de fácil adquisición. Las bases de datos no contienen información de propiedades termodinámicas de los componentes existentes en los aceites vegetales que son materia prima para la producción de biodiesel. En este trabajo se utilizó aceite de palma y etanol anhidro como materias primas. La reacción fue catalizada con la enzima *Candida Rugosa* inmovilizada sobre un soporte magnético. Para este caso se considera que el aceite de palma está constituido solo por trioleína.

Como no se tiene información de propiedades termodinámicas de la trioleína se utilizaron los parámetros de interacción modificados para la ecuación UNIFAC desarrollados por Batista et al. [26], ellos modificaron los parámetros de interacción de UNIFAC para tener en cuenta las interacciones de las moléculas del triglicérido con los alcoholes etanol y metanol. De esta forma es posible predecir el comportamiento del equilibrio líquido-líquido del sistema.

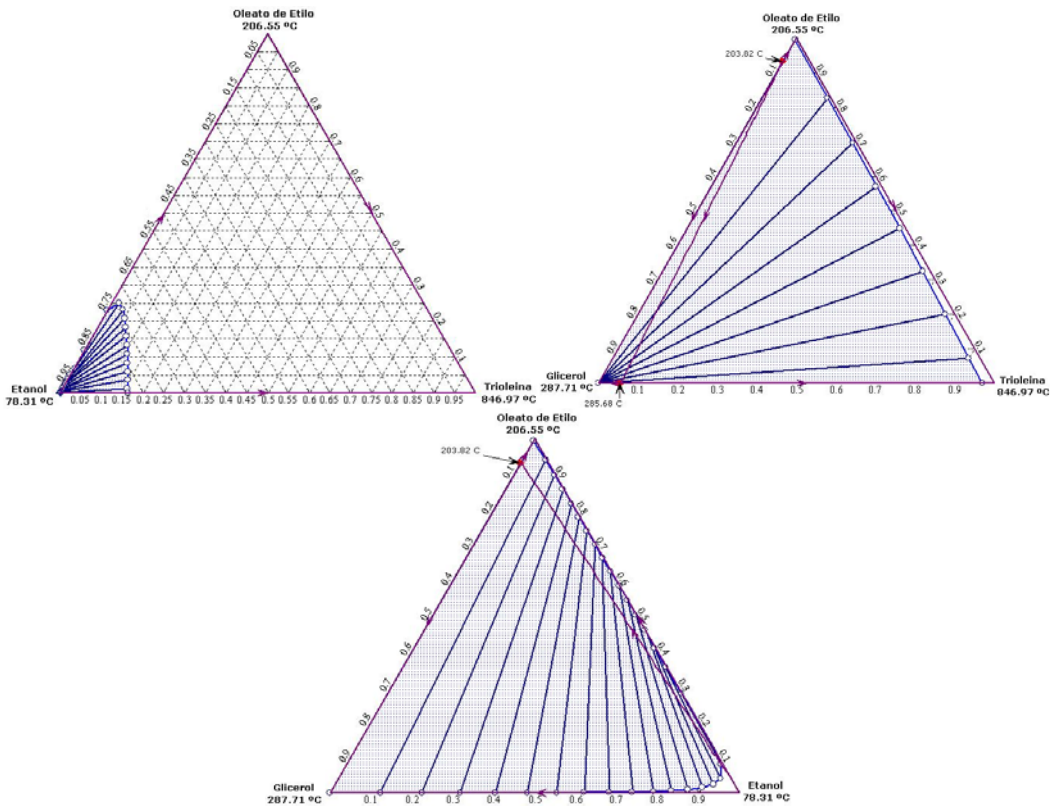


Figura 3.13 Equilibrio líquido-líquido presente en el sistema.

Para simular el equilibrio líquido-líquido se utilizó el software MoDELL-R [27]. La figura 3.13, muestra el comportamiento termodinámico del sistema, como se observa hay formación de equilibrio líquido-líquido en tres mezclas ternarias del sistema cuaternario (trioleína, etanol, etil oleato y glicerina). La presencia de estos equilibrios genera la posibilidad de implementar un proceso de reacción-extracción, que permita

aprovechar las características propias del sistema, sin la imperiosa necesidad de adicionar un solvente para extraer el producto de interés.

Se utilizó el software ModELL-R [27] para determinar los rangos de operación de la variable R en los cuales la reacción extractiva puede ser desarrollada. Para este caso R es la relación molar de las corrientes de alimentación debido a que el proceso no necesita la adición de un solvente para lograr la separación de fases. En el software ModELL-R se asume: a) la reacción se realiza en una sola fase, b) únicamente el biodiesel se distribuye en las dos fases líquidas, b) el reactor extractor se encuentra perfectamente agitado, c) el volumen del reactor es suficiente para alcanzar el equilibrio de reacción [17].

Los balances de masa para un reactor que opera en régimen por lotes son:

Balance para la Trioleína

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1' * [S] * [A]^3 + k_2 * [G] * [Bd]^3 \quad (3.13)$$

Balance del Etanol

$$\frac{d[A]}{dt} = -3 * k_1' * [S] * [A]^3 + 3 * k_2 * [G] * [Bd]^3 \quad (3.14)$$

Balance del Etil Oleato

$$\frac{d[Bd]}{dt} = 3 * k_1' * [S] * [A]^3 - 3 * k_2 * [G] * [Bd]^3 \quad (3.15)$$

Balance de la Glicerina

$$\frac{d[G]}{dt} = k_1' * [S] * [A]^3 - k_2 * [G] * [Bd]^3 \quad (3.16)$$

El ELLR se resuelve utilizando los balances de masa (ecuaciones 3.13 a 3.16) acoplados con los del equilibrio líquido-líquido (ecuación 3.7). El comportamiento del sistema se presenta en la figura 3.14. La fase glicerina corresponde al refinado y la fase biodiesel a la fase extracto. La figura muestra que se obtiene por el refinado mezcla de glicerina-etanol y por el extracto mezclas enriquecidas de biodiesel (etil oleato). Una vez resuelto el sistema se procede a delimitar los rangos de operación para la variable R.

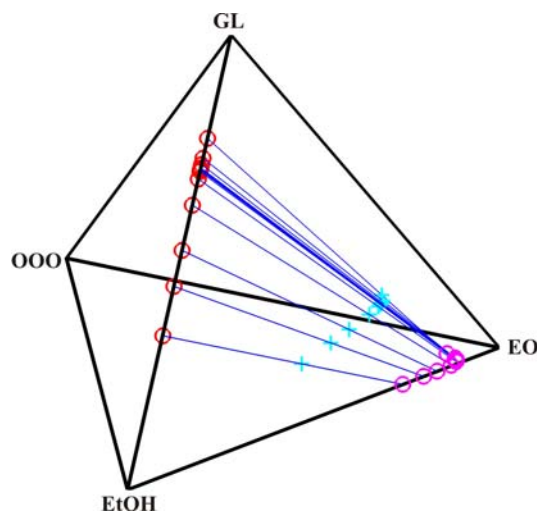


Figura 3.14 Equilibrio líquido-líquido-reactivo para el sistema trioleína (OOO)-etanol (EtOH)-glicerina (GL)-biodiesel (EO) utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

Hay que denotar que el sistema está operando en régimen por lotes y es catalizado por la enzima *Candida Rugosa* inmovilizada sobre un soporte magnético y que para este caso de estudio la inmiscibilidad se presenta naturalmente en el sistema, por esta razón no es necesario utilizar un solvente para extraer el producto de interés (biodiesel). Como el etanol debe ser alimentado en exceso al reactor extractor, la relación R es entonces controlada por la concentración de etanol en la alimentación. El valor mínimo de R está dado por la relación molar presente en la reacción de transesterificación ($R = 3$).

La figura 3.15, muestra el comportamiento de la pureza de biodiesel en la fase liviana cuando se modifica las moles de etanol en la alimentación. En la figura se observa que existe un máximo ($R = 3.56$) en el que la concentración molar del oleato de etilo se hace máxima. Esto es debido a que un exceso de etanol inhibe la reacción y como se observa en la figura la concentración del oleato de etilo empieza a decrecer. En cambio para la conversión de trioleína se observa que a medida que aumenta la relación (R) la conversión aumenta aunque tiende a hacerse constante a $R = 5.0$. En resumen el exceso de etanol favorece la conversión de la reacción de transesterificación, pero inhibe la enzima, lo cual se traduce en una reducción en la concentración del oleato de etilo. De lo anteriormente descrito se concluye que el proceso de reacción extractiva por lotes puede realizarse a una relación $R = 3.56$ para evitar un poco la inhibición de la enzima y obtener una concentración molar de oleato de etilo de aproximadamente 95%.

Después de realizar el proceso en régimen por lotes se procede a realizar el proceso en continuo, teniendo en cuenta que es catalizado por la enzima *Candida Rugosa* inmovilizada sobre un soporte magnético. Este biocatalizador puede ser manipulado por un campo magnético externo y puede ser movido a lo largo de un reactor extractor multietapa (REME). Con esto se quiere decir que en el REME se tiene un perfil de la trioleína la cual está relacionada con la concentración enzimática y a su vez con el campo magnético externo el cual permite mover el biocatalizador a lo largo de este equipo, permitiéndola ubicar en la zona en donde se encuentre la mayor concentración de los reactivos. En este capítulo se realiza una aproximación a esta operación, ya que no se cuenta con parámetros suficientes para realizar este modelo riguroso.

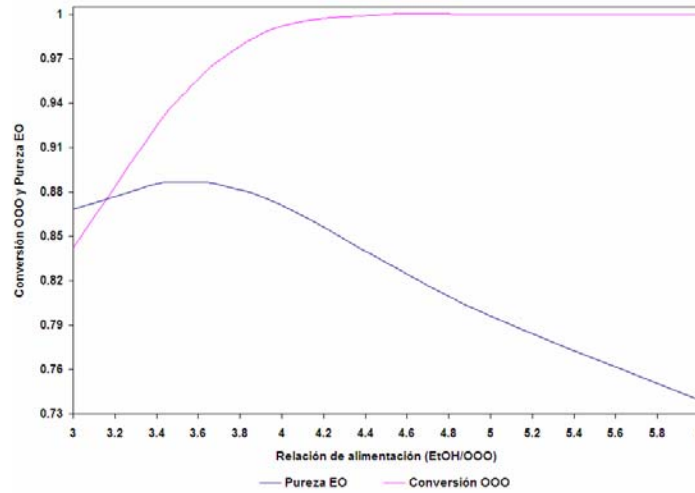


Figura 3.15 Comportamiento de la conversión de trioleína (OOO) y la pureza de biodiesel (EO) frente al cambio de R para régimen por lotes en la fase biodiesel utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

Los balances de masa para un reactor que opera en régimen continuo son:

Balance para la trioleína

$$\frac{S_0 - S}{\tau} = k_1' * [S] * [A]^3 - k_2 * [G] * [Bd]^3 \quad (3.17)$$

Balance del Etanol

$$\frac{A_0 - A}{\tau} = 3 * k_1' * [S] * [A]^3 - 3 * k_2 * [G] * [Bd]^3 \quad (3.18)$$

Balance de Etil Oleato

$$\frac{Bd_0 - Bd}{\tau} = -3 * k_1' * [S] * [A]^3 + 3 * k_2 * [G] * [Bd]^3 \quad (3.19)$$

Balance de la Glicerina

$$\frac{G_0 - G}{\tau} = -k_1' * [S] * [A]^3 + k_2 * [G] * [Bd]^3 \quad (3.20)$$

Donde: τ es el tiempo de residencia (h), S_0 , A_0 , Bd_0 , G_0 son los valores iniciales, que para el Bd y G son iguales a cero (Kmol/m^3). Finalmente, las constantes de la cinética de reacción están dadas por las ecuaciones 3.18 y 3.19.

Como se realizó anteriormente para régimen por lotes se realiza para continuo, se cuenta con la cinética de la reacción (ecuación de la 3.9 a la 3.12), y con el balance de masa que para este caso están descritas en las ecuaciones 3.17 a la 3.20. Se procede a calcular

el valor de R donde la conversión de trioleína o la pureza de etil oleato se hacen máximas.

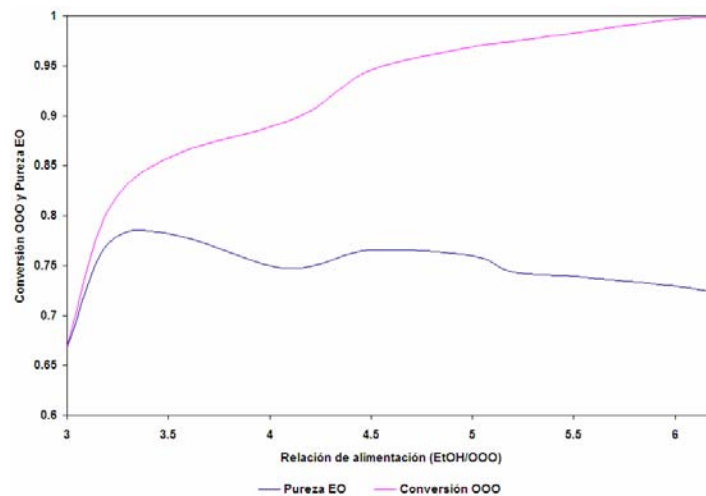


Figura 3.16 Comportamiento de la conversión de trioleína (OOO) y la pureza de biodiesel (EO) frente al cambio de R para régimen continuo en la fase biodiesel utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

En la figura 3.16 se puede observar el comportamiento de la conversión de la trioleína y de la pureza del etil oleato al variar la relación de alimentación de los reactivos (R). Se observa un máximo relacionado a la pureza del etil oleato en $R = 3.5$ (Pureza = 78%), pero la conversión de la trioleína no se hace máxima en este punto (Conversión = 86%). Para el caso de la trioleína a un aumento de R ocurre un aumento en la conversión ($R = 6.2$, Conversión = 99.8%). De lo anterior podemos decir que el proceso de reacción extracción en régimen continuo se puede llevar a cabo a un $R = 4.5$ en donde la conversión de la trioleína es del 95% y la pureza del etil oleato es del 77%. Teniendo ya el R óptimo, se procede a realizar el cálculo del reactor extractor multietapa (figura 3.17).

En las figuras 3.18 y 3.19 se pueden observar los perfiles de concentración de los reactivos y productos en la fase biodiesel y en la fase glicerina. En la etapa 1 se puede observar que se obtiene el etil Oleato y es en donde se alimenta la trioleína y en la etapa 4 se obtiene la Glicerina y es donde se alimenta el etanol con una relación de alimentación de 4.5 (figura 3.17). Las composiciones molares de salida para los reactivos y productos se muestran en la tabla 3.1. Este análisis teórico del proceso de transesterificación nos da una visión de que conversión podría ser obtenida y de las condiciones óptimas para este proceso.

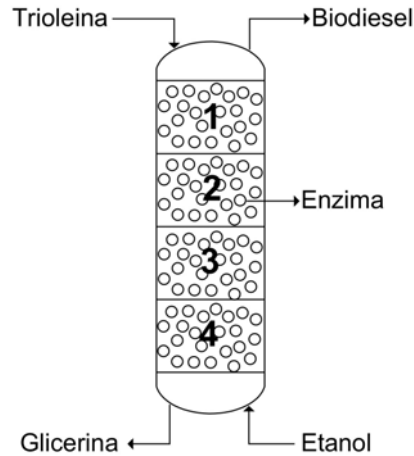


Figura 3.17 Esquema del reactor extractor multietapa para la producción de biodiesel utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

Tabla 3.1 Composiciones molares para el reactor extractor multietapa (4 etapas) utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

Etapas	Trioleina	Etanol	Biodiesel	Glicerina
Fase Biodiesel				
Flujo (Kmol/hr)	1	4.5	1,9406	1,83891
X_{OOO}	1	0	0.027826	0
X_{ETOH}	0	1	0.206122	0,543583
X_{GL}	0	0	0.000515	0,456085
X_{EO}	0	0	0.765536	0,000332

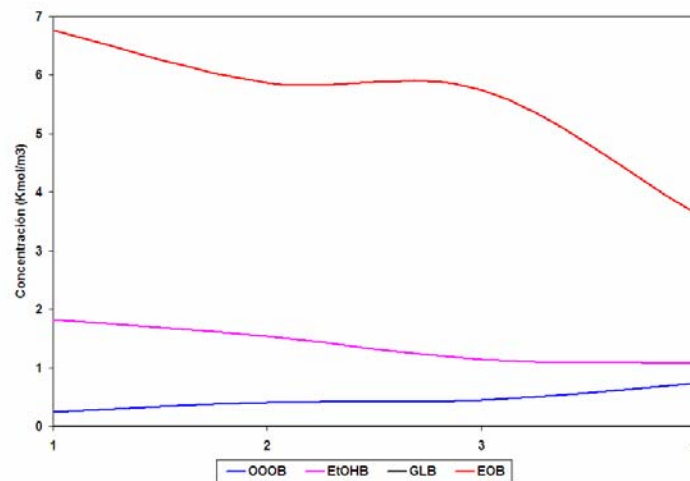


Figura 3.18 Perfil de concentración del reactor extractor multietapa en la fase biodiesel (extracto). OOOB = Trioleina, EtOHB = Etanol, GLB = Glicerina, EO = Etil Oleato, utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

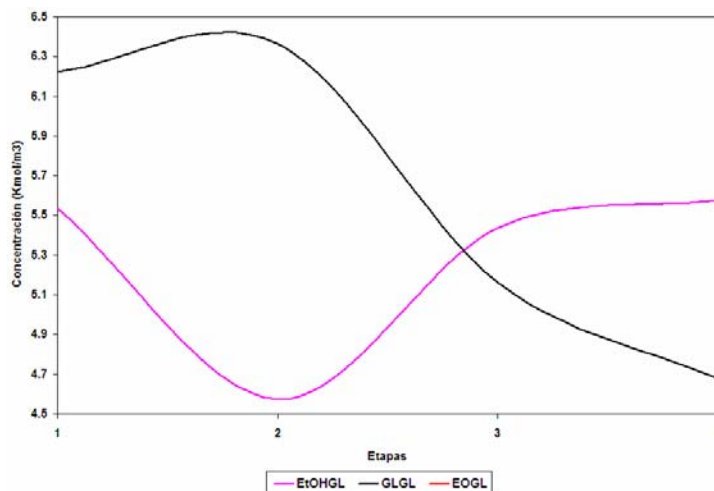


Figura 3.19 Perfil de concentración del reactor extractor multietapa en la fase glicerina (refinado).
 OOGL = Trioleina (la concentración de la trioleina es cero), EtOHGL = Etanol, GLGL = Glicerina,
 EOGL = Etil Oleato, utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

Estos resultados muestran la eficiencia del proceso extracción-reacción para la obtención de biodiesel y con una gran disminución en cuanto a gastos energéticos, debido a que este proceso la única energía que gasta está representada en los agitadores. Los procesos convencionales generan grandes gastos energéticos debidos a la etapa de separación de productos, comparados con los procesos simultáneos extracción-reacción.

Una utilización óptima del biocatalizador no sólo requiere la inmovilización de la enzima para utilizarla repetidamente sino también un diseño racional del reactor extractor que opere a condiciones de máxima estabilidad. Para un reactor extractor de 4 etapas podemos observar el perfil de la enzima (figura 3.20), este perfil puede estar relacionado con un campo magnético externo debido a que la enzima está inmovilizada sobre un soporte magnético, todo esto para estado estacionario, el cual es el estado en el que la salida toma un valor que será invariante en el tiempo. La señal no cambiará su valor mientras la entrada no varíe.

En la figura 3.17 se observa el esquema del reactor extractor multietapa, en este equipo la enzima está dispersa en todas las etapas (figura 3.20). La ventaja de mover el catalizador a lo largo de este reactor extractor multietapa es que finalmente según los perfiles de concentración en la fase biodiesel, en donde ocurre la reacción, en la etapa 3 se logra una maximización en la concentración de ambos reactivos, concluyendo así que el biocatalizador debería estar ubicado en la etapa 3. Esto puede ser fácilmente logrado aplicando un campo magnético el cual lograría ubicar la enzima inmovilizada en esta etapa.

Al ser el biocatalizador movido con un campo magnético externo este puede ser ubicado en la etapa correspondiente a la concentración máxima de reactivos, es necesario operar este proceso en estado transiente, el cual es el estado temporal en que la salida de un sistema se ajusta gradualmente, frente a un cambio en la entrada. Todo esto con el fin de optimizar la producción de biodiesel ya que la enzima inmovilizada estaría ubicada específicamente en la zona en donde existe la mayor presencia de reactivos.

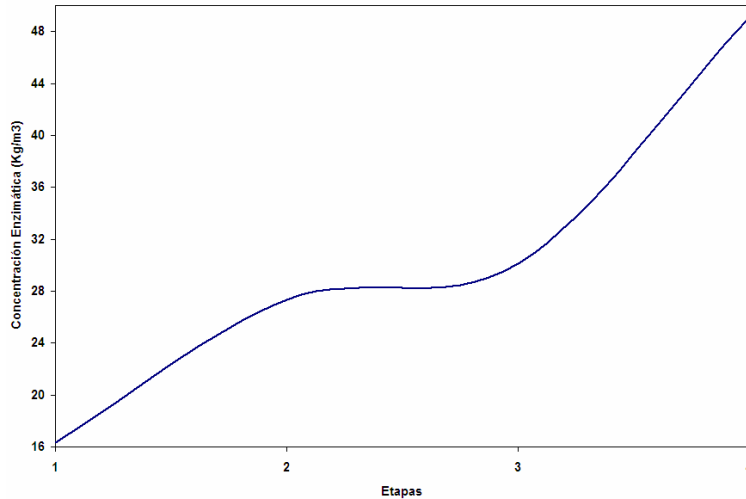


Figura 3.20 Perfil de la enzima en un reactor extractor de 4 etapas, utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

En la figura 3.21 y 3.22 se puede observar cómo sería el esquema de este reactor extractor magnético multietapa teniendo como biocatalizador una enzima inmovilizada sobre un soporte magnético y se detalla cómo sería la configuración de una etapa de este reactor extractor multietapa. Para llevar a cabo la simulación de este reactor se necesita incorporar el modelo del movimiento de la partícula magnética el cual es regido por el campo magnético.

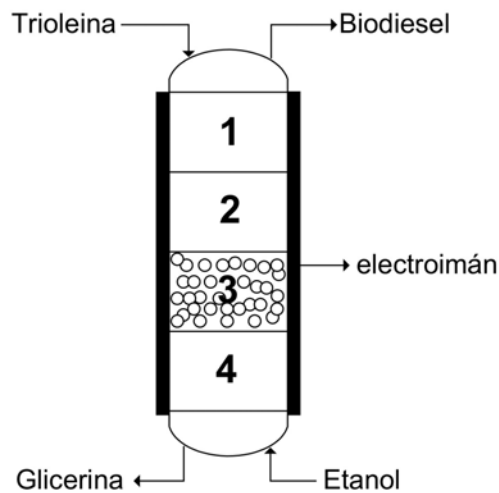


Figura 3.21 Esquema del reactor extractor multietapa con un campo magnético externo para la producción de biodiesel utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

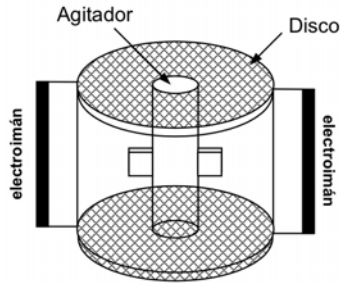


Figura 3.22 Esquema de una etapa para el reactor extractor multietapa con un campo magnético externo utilizando como biocatalizador una enzima inmovilizada en un soporte magnético.

Ecuaciones para el cálculo del campo magnético

La distribución del campo magnético cuando es uniforme está regida por las ecuaciones de Maxwell. Además de las leyes de Ampere y la de Gauss, las cuales se refieren al *flux* magnético.

$$\nabla \times H = J \quad (3.21)$$

$$\nabla \cdot B = 0 \quad (3.22)$$

Donde H es el campo magnético, J es la densidad de la corriente eléctrica y B es la densidad del flux magnético. Además se tiene que:

$$B = \mu_o * (H + M) \quad (3.23)$$

En donde, la magnetización esta expresada como:

$$M = X_m * H + M_o \quad (3.24)$$

En la cual, Xm es la susceptibilidad magnética y Mo es la magnetización permanente del material.

Reemplazando, se tiene que la densidad del flux magnético es

$$B = \mu_o * (\mu_r * H + M_o) \quad (3.25)$$

Donde μ_o es la constante de Henry y

$$\mu_r = 1 + X_m \quad (3.26)$$

Para lograr una solución numérica de estas ecuaciones, es conveniente definir un escalar magnético, ψ , como:

$$H = -\nabla \psi \quad (3.27)$$

Las ecuaciones 3.22 a 3.27 pueden ser combinadas para dar la siguiente ecuación de ψ :

$$\nabla \cdot (\mu_r \nabla \psi) - \nabla \cdot M_0 = 0 \quad (3.28)$$

Esta ecuación puede ser resuelta numéricamente para obtener la distribución del escalar magnético. El campo magnético, H , es entonces calculado de la ecuación 3.27 [28].

Finalmente, es necesario contar con datos como susceptibilidad magnética y magnetización permanente del material, entre otros, para poder desarrollar este modelo del reactor extractor multietapa magnético. Además es necesario acoplar los balances del reactor-extractor con los balances de la partícula magnética, ya que el biocatalizador se movería por toda la columna tratando de buscar la concentración máxima de reactivos, todo esto en estado transiente.

Lo primero que se debería realizar es modelar el reactor-extractor, teniendo en cuenta que solo existe una etapa de reacción en la que se encuentra ubicado el biocatalizador magnético, todo esto en estado estable. Esto debería ser comparado con el reactor-extractor simulado anteriormente, esto con el fin, de conocer que cambios ocurren y cómo influye en la pureza del etil oleato y en la conversión de trioleína.

Después de tener este modelo definido y funcionando se procede a realizar el proceso de extracción-reacción pero ahora en estado transiente, esto con el fin de optimizar aún mas variables como pureza del producto deseado y conversión. Este proceso ya sería un poco más riguroso y tedioso, pero nos daría una visión más amplia de lo que se desea, que es poder ubicar este biocatalizador en la zona correspondiente a la de máxima concentración de reactivos.

REFERENCIAS

1. Rivera, M. and Cardona, C.A., *Análisis de procesos simultáneos reacción extracción a nivel productivo. Generalidades del proceso, equilibrios físico y químicos simultáneos*. Ingeniería y Competitividad, 2004. 6(1), p. 17-25.
2. Cardona, C.A., Gutiérrez, A.I., Matallana, L.G., and López, F.E. *Amyl acetate production: comparison of two innovative integrated technologies*. in *17th International congress of chemical and process engineering*. 2006. Prague.
3. Sánchez, Ó.J., Gutiérrez, L.F., Cardona, C.A., and Fraga, E. *Analysis of extractive fermentation process for ethanol production using a rigorous model and a short-cut method*. in *Optimal Process Design - International Networking for Young Scientists 2006*. Vilnius, Lituania.
4. Gutiérrez, L.F., *Estudio y diseño de procesos reacción-extracción simultáneos*, in *Ingeniería*. 2008, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales: Manizales.
5. Gutiérrez, L.F., Sánchez, Ó.J., and Cardona, C.A. *Modeling of Batch Extractive Fermentation for the Fuel Ethanol Production*. in *8th Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction*. 2005. Giardini Naxos, Italy.
6. Dussán, K., Osorio, Ó.H., and Cardona, C.A. *Aplicación de materiales magnéticos nanoestructurados en procesos de reacción-separación*. in *II Congreso Internacional Diseño de Procesos Químicos y Biotecnológicos*. 2006. Medellín: Universidad EAFIT.
7. Malinowski, J.J., *Reactive Extraction for Downstream Separation of 1,3-Propanediol*. Biotechnology Progress, 2000. 16(1), p. 76-79.
8. Pai, R.A., Doherty, M.F., and Malone, M.F., *Design of reactive extraction systems for bioproduct recovery*. AIChE Journal, 2002. 48(3), p. 514-526.
9. Bart, H.J., *Reactive Extraction*. 2001, Germany: Springer-Verlag GmbH. 209.
10. Ospina, S., López-Munguia, A., González, R.L., and Quintero, R., *Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1992. 53(2), p. 205-213.
11. Bora, M.M., Ghosh, A.C., Dutta, N.N., and Mathur, R.K., *Reactive Extraction of 6-Aminopenicillanic Acid with Aliquat-336: equilibrium and Kinetics* The canadian journal of chemical engineering, 1997. 75(6), p. 520-526.
12. Gaidhani, H.K., Wasewar, K.L., and Pangarkar, V.G., *Intensification of enzymatic hydrolysis of penicillin G: Part 1. Equilibria and kinetics of extraction of phenyl acetic acid by Alamine 336*. Chemical Engineering Science, 2002. 57(11), p. 1979-1984.
13. Gaidhani, H.K., Tolani, V.L., Pangarkar, K.V., and Pangarkar, V.G., *Intensification of enzymatic hydrolysis of penicillin G: Part 2. model for enzymatic reaction with reactive extraction*. Chemical Engineering Science, 2002. 57(11), p. 1985-1992.
14. Hatzinikolaou, D.G. and Wang, H.Y., *Extractive Fermentation Systems for Organic Acids Production*. The canadian journal of chemical engineering, 1992. 70(6), p. 543-552.
15. Maiorella, B.L., Blanch, H.W., and Wilke, C.R., *Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes*. Biotechnology and Bioengineering, 1984. 26(9), p. 1003-1025.

16. Gutiérrez, L.F., Cardona, C.A., and Sánchez, Ó.J. *Teoría y diseño de procesos de fermentación extractiva*. in *II Congreso Internacional Diseño de Procesos Químicos y Biotecnológicos*. 2006. Medellín: Universidad EAFIT.
17. Montoya, M.I., Cardona, C.A., Orrego, C.E., and Gutiérrez, L.F. *Obtención de biodiesel por reacción extractiva*. in *II Congreso Internacional sobre el uso racional y eficiente de la energía*. 2007. Cali, Valle.
18. Gutiérrez, L.F., Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A., and Fraga, E. *Analysis of extractive fermentation process for ethanol production using a rigorous model and a short-cut method*. in *Optimal Process Design - International Networking for Young Scientists* 2006. Vilnius.
19. Zapata, C.D., Martínez, I.D., Castiblanco, E.A., and Henao, C.A., *Producción de biodiesel a partir de aceite crudo de palma: I. Diseño y simulación de dos procesos continuos*. *Dyna*, 2007. 151, p. 71-82.
20. Zhang, Y., Dube, M.A., McLean, D.D., and Kates, M., *Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment*. *Bioresource Technology*, 2003. 89(1), p. 1-16.
21. Van Gerpen, J., Shanks, B., Pruszko, R., Clements, D., and Knothe, G., *Biodiesel production technology*, N.R.E. Laboratory, Editor. 2004, Iowa State University and Renewable Products Development Laboratory: Colorado. p. 110.
22. Orrego, C.E., Cifuentes, A.D., Rojas, D., and Cardona, C.A. *Inmovilización de lipasa Candida Rugosa en soporte de quitosano*. in *II Simposio sobre Biofábricas. Avances de la Biotecnología en Colombia*. 2005. Medellín, Antioquia.
23. Restrepo, E., Herrera, M., Figueroa, J., Cardona, C.A., and Orrego, C.E. *Mejoramiento de la actividad enzimática de Lipasa de Candida rugosa en medio orgánico*. in *II Simposio sobre Biofábricas. Avances de la Biotecnología en Colombia*. 2005. Medellín, Antioquia.
24. Oliveira, D. and Alves, T.L., *A kinetic study of lipase-catalyzed alcoholysis of palm kernel oil*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000. 84-86(1-9), p. 59-68.
25. Oliveira, D. and Alves, T.L., *Enzymatic alcoholysis of palm and palm kernel oils*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999. 79(1-3), p. 835-844.
26. Batista, E., Monnerat, S., Stragevitch, L., Pina, C.G., Goncalves, C.B., and Meirelles, A.J.A., *Prediction of Liquid-Liquid Equilibrium for Systems of Vegetable Oils, Fatty Acids, and Ethanol*. *J. Chem. Eng. Data*, 1999. 44(6), p. 1365-1369.
27. Gutiérrez, L.F. and Cardona, C.A., *Software MoDELL-R para el Modelamiento del equilibrio Líquido-Líquido-Reactivo*. 2006, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.
28. Karki, K.C., Whitby, E.R., Patankar, S.V., Winstead, C., Ohara, T., and Wang, X., *A numerical model for magnetic chromatography*. *Applied Mathematical Modelling*, 2001. 25(5), p. 355-373.

CONCLUSIONES

Las nanopartículas magnéticas sin y con recubrimiento de diámetro medio 9.61 y 10 nm aproximadamente, se sintetizaron por el método de co-precipitación y fueron recubiertas con una solución de APTS-TEOS, estas partículas fueron caracterizadas por XRD, FT-IR, SEM-EDS, DSC y área BET. De los espectros FT-IR se puede concluir que la partícula magnética fue recubierta por el óxido de silicio. De los patrones XRD se sugiere que la partícula magnética es magnetita con estructura *spinel* y que con la aparición de un nuevo pico ($d = 3.9$) en el patrón de las partículas recubiertas, se confirma el recubrimiento de las mismas. Además del análisis textural se sugiere que los agregados son de tamaño homogéneo ya que el recubrimiento logra este efecto.

Aunque se esperaba obtener las partículas magnéticas recubiertas como el esquema mostrado en la figura 1.6 del capítulo 1, realmente lo que se obtuvo fue un recubrimiento de una aglomeración de partículas (figura A). Esta aglomeración está presente debido a que las partículas magnéticas no fueron dispersadas en un medio que impidiera esta aglomeración. En las imágenes SEM de estas partículas magnéticas recubiertas puede ser confirmada esta aglomeración.



Figura A Esquema de formación obtenido de las partículas magnéticas recubiertas.

Además podemos concluir, que la variación de TEOS en el recubrimiento nos aporta en cambio en el área superficial de los materiales sintetizados, teniendo una mejor área superficial la partícula magnética recubierta con 20 mL de TEOS. Este soporte fue el seleccionado para la inmovilización de la enzima.

Teniendo el soporte sintetizado, la inmovilización de enzimas se realizó por medio de la funcionalización de este soporte con glutaraldehído y su posterior inmovilización. El proceso de inmovilización logró que el biocatalizador enzima-soporte magnético quedara con un 8% de proteína. Este biocatalizador fue probado en la esterificación del ácido oleico con butanol presentando buenos resultados y también fue probado en el proceso de transesterificación del aceite de palma con etanol mostrando positivas las pruebas cualitativas de identificación de ésteres. Finalmente, se puede decir que se tiene un biocatalizador de fácil recuperación y posible reutilización.

Por otro lado, la utilización de un proceso enzimático simultáneo extracción-reacción en la producción de biodiesel, tiene una gran ventaja ya que es altamente selectivo en cuanto a los productos, en otras palabras, los productos son obtenidos con alta pureza, ya que se cuenta con la especificidad de las enzimas hacia un producto, lo que mejora la selectividad del proceso.

El método corto utilizado para procesos enzimáticos extracción-reacción basado en el análisis de la termodinámica topológica consigue dar una idea preliminar para la síntesis del diagrama del proceso, permite tener una aproximación al modelamiento riguroso, lo que disminuirá los cálculos y el número de experimentos, además ayuda a determinar qué datos son necesarios y la región del espacio de composiciones donde deben enfocarse los esfuerzos experimentales.

Este método corto nos permitió conocer la relación de alimentación etanol-aceite de palma el cual fue de 4.5, además de conocer por los perfiles de concentración de los reactivos la zona en la que se sugiere ser ubicado el catalizador, que en este caso es en la etapa 3. Esta ubicación puede ser lograda debido a que la enzima se tiene inmovilizada en un soporte magnético el cual permite ubicarlo y fijarlo en esta etapa. Se propone un esquema de este reactor-extractor magnético, detallando una etapa. Finalmente podemos decir que se hizo una aproximación al proceso, el cual nos permitió conocer en qué etapa debería estar ubicada la enzima, esto si trabajando en estado estable.

Finalmente podemos decir que este es un estudio preliminar y que de aquí en adelante queda un buen camino que recorrer y mucha experimentación para realizar para así poder tener un biocatalizador efectivo y con todas sus condiciones óptimas definidas y un reactor-extractor magnético operando en condiciones óptimas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar una sustancia para dispersar las partículas y lograr que ellas se carguen y así poder obtener unas imágenes claras y obtener lo mostrado en la figura 6 del capítulo 1, esto puede ser logrado con ácido oleico, ácido laurico, entre otros.

Además también se puede ensayar en el procedimiento de síntesis de las partículas magnéticas recubiertas variando la cantidad de APTS para ver qué cambio se presenta en la caracterización del material y en su posterior uso como soporte.

Se deberá realizar la inmovilización de la enzima en los otros dos soportes sintetizados en el Capítulo 1 (PMR10 y PMR30) para poder escoger el mejor soporte y observar si existen cambios en el proceso de inmovilización. Además de modificar condiciones como temperatura, tipo de agitación y velocidad de agitación en el momento de realizar la funcionalización del soporte magnético y su posterior inmovilización de la enzima, esto con el fin de analizar cambios y buscar una mejora al proceso.

En el proceso de medición de la actividad, se recomienda sea medida la cantidad de proteína que queda en la solución reactivos-productos al finalizar el proceso de esterificación. Con el fin de saber que tan fija quedó la enzima al soporte y sus posibles explicaciones a la disminución de actividad enzimática promedio.

En la parte experimental del proceso de producción de biodiesel se recomienda realizar un análisis cuantitativo con el fin de saber cuánto reaccionó del aceite de palma y así poder tener una cuantificación del proceso. Además, realizar experimentación para obtener la cinética para el biocatalizador de interés que en este caso es la lipasa inmovilizada en una partícula magnética.

Finalmente se propone como próximos trabajos el acoplamiento del reactor-extractor con el movimiento de la partícula, esto logrado con la aplicación de un campo magnético externo, tanto para estado estable, escogiendo una etapa en la que ocurre la reacción y en estado transiente en el que en cualquier instante el biocatalizador está ubicado en la zona deseada. Teniendo en cuenta el esquema propuesto y las características propias del biocatalizador sintetizado en este trabajo. Además de un análisis económico y ambiental del proceso para ver que tan viable es la utilización de la enzima inmovilizada en el soporte magnético en los procesos de extracción reacción y su posterior escalamiento a nivel industrial.