

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

**“Síntesis de un Catalizador Bio-nanocompósito Magnético de Ferrita
de Cobalto/ Hidroxiapatita-Lipasa: Efecto de la Interfase
Nanocompuesto-Lipasa en la Actividad Catalítica Enantioselectiva”**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN QUÍMICA

ELABORADO POR:

SAMUEL YURI SAIRE SAIRE

ASESOR:

Dr. HUGO ARTURO ALARCON CAVERO

LIMA – PERÚ

2020

DEDICACIÓN:

Al amor de mi vida, mi hijo Denzel, y a mi familia.

Una dedicación especial para mis padres por el apoyo incondicional.

Resumen

En este trabajo investigamos la influencia del método de inmovilización en la estabilidad térmica, solvente y actividad catalítica de la enzima lipasa *Burkholderia Cepacia* (BCL) presente en la superficie de un sustrato compósito nanoestructurado. Además, evaluamos la capacidad de reuso aprovechando las propiedades magnéticas de nuestro compósito.

Para ello, iniciamos con la síntesis del material nanocompósito $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$, el cual consistió en recubrir nanopartículas (NPs) de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4), sintetizadas mediante un proceso micelar, con Hidroxiapatita (HAP) sintetizadas por precipitación de los precursores. Este material fue caracterizado mediante espectroscopia FT-IR, difracción de rayos X (DRX), análisis superficial BET, microscopia electrónica SEM, análisis elemental EDS y análisis magnéticos (VSM).

Este material fue utilizado para obtener los sistemas bio-nanocompósitos magnético catalítico ($\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -Enzima), para ello se inmovilizó la enzima lipasa BCL usando dos métodos de inmovilización: adsorción y enlace covalente, en este último se usó (3-Aminopropil)trióxido de silano (APTES) como espaciador y glutaraldehído (Glu) como activador. Con estos métodos obtuvimos los sistemas bio-nanocompósito $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -BCL (SisBioN-1) y $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -APTES-Glu-BCL (SisBioN-2), respectivamente. La cantidad de proteína (enzima) inmovilizada fue cuantificada por el método de Bradford. Además, se estudió la influencia de la solución buffer de fosfato (pH= 6, 7 y 8) utilizado en el proceso de inmovilización, resultando 20.2 mg de enzima por soporte a pH 8 para el proceso por adsorción y 16.53 mg de enzima por soporte a pH 7 para el proceso por enlace covalente. Estos procesos de inmovilización ayudan a mejorar su estabilidad, actividad biocatalítica y recuperación del medio de reacción para su posterior reuso.

La actividad de los catalizadores SisBioN-1 y SisBioN-2 se estudió frente a una reacción de transesterificación enantioselectiva de una mezcla racémica de 1-feniletanol con acetato de vinilo (resolución cinética enzimática). Todas las pruebas catalíticas se cuantificaron mediante cromatografía de gases (GC) el cual presentaba

una columna quiral. A condiciones óptimas, n-heptano como solvente y a una temperatura de 35 °C, se obtuvieron porcentajes de conversión (50%) y de exceso enantiomérico (*ee*) (100%) en los primeros 60 min y 25 min para los procesos por adsorción y por enlace covalente, respectivamente. Por otro lado, se realizó el estudio del reuso del sistema catalizador-enzimático, utilizando las propiedades magnéticas para una recuperación rápida. Resultando una eficiencia de 100% en los primeros 6 y 10 ciclos de reacción para los sistemas catalíticos obtenidos por adsorción SisBioN-1 y por enlace covalente SisBioN-2, respectivamente.

Resumen Grafico:



LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

CoFe ₂ O ₄	Ferrita de cobalto
CoFe ₂ O ₄ /HAP	Nanocompósito magnético de ferrita de cobalto/hidroxiapatita
CoFe ₂ O ₄ /HAP-APTES	Nanocompósito funcionalizado con (3-aminopropil)triétoxissilano
CoFe ₂ O ₄ /HAP-APTES-Glu	Nanocompósito funcionalizado con (3-aminopropil)triétoxissilano – activada con glutaraldehído
CoFe ₂ O ₄ /HAP-Enzima	Sistemas Bio-nanocompósito magnético catalíticos (CoFe ₂ O ₄ /HAP-BCL y CoFe ₂ O ₄ /HAP-APTES-Glu-BCL)
CoFe ₂ O ₄ /HAP-BCL	Lipasa <i>Burkholderia Cepacia</i> inmovilizada por absorción directa en (CoFe ₂ O ₄ /HAP)
CoFe ₂ O ₄ /HAP-APTES-Glu-BCL	Lipasa <i>Burkholderia Cepacia</i> inmovilizada covalentemente en (CoFe ₂ O ₄ /HAP-APTES-Glu)
SisBioN-1	Sistema Bio-nanocompósito CoFe ₂ O ₄ /HAP-BCL
SisBioN-2	Sistema Bio-nanocompósito CoFe ₂ O ₄ /HAP-APTES-Glu-BCL
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetil amonio
Glu	Glutaraldehído
CPs	Fosfatos de calcio
HAP	Hidroxiapatita
MeNH ₂	Metil amina
APTES	(3-aminopropil)triétoxissilano
NPs	Nanopartículas
NPs Au	Nanopartículas de oro

% mol Au	Porcentaje molar de Au
CMC	Concentración micelar crítica
H_{ext}	Campo magnético externo
M_R	Magnetismo remanente
FCC	Cúbica centrada en las caras
FT-IR	Espectroscopía Infra-Roja
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
UV-Vis	Espectroscopía UV-Vis

Contenido

INTRODUCCIÓN	14
1. VISIÓN GENERAL.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo General.....	17
3.2. Objetivos Específicos	17
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	18
1. ÓXIDOS DE HIERRO :.....	18
1.1. Ferritas (MFe_2O_4) y magnetita (Fe_3O_4)	19
1.2. Propiedades magnéticas	20
1.3. Síntesis por Micelas Normales	23
2. BIOCERÁMICOS	27
2.1. Hidroxiapatita	28
2.2. Síntesis por Precipitación Química	29
3. MATERIALES NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICOS	30
4. ENZIMA LIPASA	32
4.1. Actividad Catalítica: Reacción de Transesterificación.....	35
4.2. Ventajas y desventajas	36
5. INMOVILIZACIÓN DE MACROMOLÉCULAS.....	36
5.2. Tipos de Inmovilización	38

5.1. Nanopartículas para Inmovilización	40
CAPITULO III. ESTADO DEL ARTE	42
1. MATERIALES COMO SOPORTE INMOVILIZANTE DE LA ENZIMA	42
1.1. Materiales nanocompuesto híbrido.....	44
2. INFLUENCIA DE LA INTERFASE EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA	47
CAPITULO IV. PARTE EXPERIMENTAL	50
1. PARTE EXPERIMENTAL.....	50
1.1. Materiales.....	50
1.1. Síntesis Ferrita de Cobalto CoFe_2O_4	50
1.2. Síntesis de Nanocompuesto $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$	51
1.3. Funcionalización de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ con APTES.....	51
1.4. Ensayos Enzimáticos	52
2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	53
CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
1. NANOPARTICULAS DE CoFe_2O_4	55
1.1. Formación de la fase sólida CoFe_2O_4 por micelas normales.....	55
1.2. Caracterización de nanopartículas CoFe_2O_4	59
2. NANOCOMPÓSITO $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$	64
2.1. Formación de la fase sólida	64

2.1. Caracterización de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$	65
3. FUNCIONALIZACIÓN DE NANOCOMPÓSITO $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$	70
4. INMOVILIZACION DE ENZIMA LIPAZA	73
4.1. Preparación de la solución acuosa de la enzima BCL	73
4.2. Cuantificación de BCL	74
4.3. Cuantificación de la enzima inmovilizada.....	75
4.4. Proceso de inmovilización por adsorción y enlace covalente.....	75
5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LIPASA INMOVILIZADA	81
5.1. Ensayo de solventes	84
5.2. Ensayo térmico	85
5.3. Ensayo cinético de reacción.....	87
5.4. Ensayo de reciclaje	88
6. CONCLUSIONES.....	91
7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	92
ANEXOS	101

FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Estructura de una estructura espinela .	19
Figura 2: Diferentes estados magnéticos por la alienación de momentos magnéticos individuales.	21
Figura 3: Alineamiento de los momentos magnéticos de los iones Fe (II) y Fe (III).	22
Figura 4: Ciclo de histéresis de materiales ferromagnéticos (izquierda) y superparamagnéticos (derecha).	22
Figura 5: Crecimiento y estabilización de NPs .	24
Figura 6: Representación de las diferentes arquitecturas micelares .	25
Figura 7:A) Morfología de solidos inorgánicos nanoparticulado, B) Modelos de poros de estructuras de sílica .	26
Figura 8: Tipos de surfactantes .	27
Figura 9: Estructura cristalina de la HAP .	29
Figura 10: Efecto de la sobresaturación en el proceso de precipitación química.	30
Figura 11: Morfologías típicas de materiales nanocompuestos magnéticos .	31
Figura 12: A) Conformación canónica de la lipasa. B) Enzima from Burkholderia cepacia. C) Centro activo de la lipasa .	34
Figura 13: Métodos de inmovilización de enzimas A) adsorción, B) covalente, C) atrapamiento, y C) entrecruzamiento.	38
Figura 14: Nanopartículas como soporte de biomoléculas .	40
Figura 15: Clasificación de nuevos materiales .	44
Figura 16: DRX de CoFe_2O_4	60
Figura 17: FTIR de CoFe_2O_4 y SDS .	61

Figura 18: Imagen SEM de CoFe_2O_4	62
Figura 19: Análisis superficial BET de CoFe_2O_4	63
Figura 20: FT-IR de CoFe_2O_4 y $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$	65
Figura 21: Difractograma de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ y CoFe_2O_4	66
Figura 22:: Imagen SEM de NPs $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$	67
Figura 23: BET de NPs $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$	68
Figura 24: Análisis VSM de CoFe_2O_4 (a) y $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ (b).....	70
Figura 25: EDS del material $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -APTES.....	72
Figura 26: Curva de Calibración para cuantificar la cantidad de proteína.....	75
Figura 27: A) Imagen SEM y B) Mapeo elemental de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -BCL.....	77
Figura 28: A) Imagen SEM y B) Mapeo elemental de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -APTES-Glu-BCL.....	79
Figura 29: Efecto del valor del pH del buffer en la eficiencia de la inmovilización por adsorción (rojo) y covalente (violeta).....	80
Figura 30: Tiempos de retención de sustratos y productos quirales.....	83
Figura 31: Efecto de solvente: A) SisBioN-1 y B) SisBioN-2.....	84
Figura 32: Efecto de la temperatura de reacción. Enzima inmovilizada: A) SisBioN-1 y B) SisBioN-2.....	86
Figura 33: Cinética de reacción de (R,S)-1-feniletanol de los sistemas catalíticos: A) SisBioN-1 y B) SisBioN-2.....	88
Figura 34: Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada SisBioN-1 (rojo) y SisBioN-2 (violeta).	89

Esquema 1: Mecanismo de transesterificación enantioselectiva catalizada por lipasa.	35
Esquema 2: Formación de micelas al alcanzar la CMC del surfactante	56
Esquema 3: Esquema de proceso de complejación.....	57
Esquema 4: Esquema de formación de NPs CoFe_2O_4	58
Esquema 5: Esquema de formación del nanocompósito $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$	65
Esquema 6: Esquema de la funcionalización de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ con APTES.....	71
Esquema 7: Mecanismo de silanización	72
Esquema 8: Preparación de solución enzimática para el proceso de inmovilización	74
Esquema 9: Esquema de inmovilización por adsorción: $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-BCL}$ (SisBioN- 1)	76
Esquema 10: Esquema de inmovilización covalente: $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-APTES-Glu-BCL}$ (SisBioN-2)	78
Esquema 11: Mecanismo de reacción de base de Schiff para APTES y Glu	78
Esquema 12: Proceso de inmovilización covalente	79
Esquema 13: Reacción enzimática de (R,S)-1-feniletanol.....	82
Esquema 14: Reacción de transesterificación enantioselectiva	82
Esquema 15: Proceso general de reciclaje..	89
Tabla 1: Propiedades física y magnéticas de los óxidos	18
Tabla 2: Comparación de las propiedades físicas y mecánicas de la HAP	28
Tabla 3: Aplicaciones industriales de la lipasa.	32
Tabla 4: Reactivos utilizados	50

Tabla 5: Valores obtenidos del análisis BET	63
Tabla 6: Valores obtenidos por análisis superficial	68
Tabla 7: Datos porcentuales elementales del análisis EDS.....	73
Tabla 8: Cantidad de enzima inmovilizada (mg) por gramo de soporte CoFe ₂ O ₄ /HAP	81
Tabla 9: Influencia del solvente en el rendimiento de reacción. 1h, 35°C.	85
Tabla 10: Estudios recientes sobre la resolución cinética de (R, S) -1-feniletanol con lipasa inmovilizada.....	90

INTRODUCCIÓN

1. VISIÓN GENERAL

Las enzimas lipasa (triacilglicerol éster hidrolasa E.C. 3.1.1.3) son macromoléculas que han suscitado un interés creciente para la industria debido a su versatilidad, estereoselectividad, estabilidad y capacidad de catalizar reacciones para la formación o degradación de innumerables compuestos químicos. Bajo determinadas condiciones, las enzimas lipasa pueden catalizar reacciones químicas distintas tales como hidrólisis, esterificación, transesterificación, entre otros. Además, se han empleado ampliamente como aditivos para detergentes, en las industrias alimentaria, papelera, química y energética, así como para la producción de cosméticos, en tratamientos ambientales y en el diseño de biosensores. Sin embargo, la utilización de la enzima libre es limitada, debido a que presenta buena actividad en condiciones específicas, caracterizándose por prolongados tiempos de reacción; y una alteración a condiciones bruscas podría dificultar su uso, siendo los procesos de recuperación para su reuso muy limitado.

Por otro lado, existen limitaciones asociadas al costo elevado de la enzima, tediosos procesos de recuperación, pobre estabilidad en medios orgánicos que dificultan la utilización de la enzima libre. Los procesos de inmovilización surgen como una alternativa para suprimir estas limitaciones; desde mejorar la estabilidad y recuperación rápida por centrifugación para su posterior reuso.

Los materiales nanoparticulados, como soportes para la inmovilización de enzimas, ofrece ventajas diversas en la aplicación de estas macromoléculas, tales como estabilidad térmica, química y biocatalítica, además de los procesos de recuperación por centrifugación que facilitan la reutilización en procesos catalíticos posteriores. La elección del soporte y el tipo de inmovilización serán de importancia para optimizar su actividad catalítica. En la actualidad se ha desarrollado un interés por la aplicación

de materiales compósito e híbridos nanoestructurados que presentan propiedades combinadas de los que lo componen, suprimiendo así las limitaciones de los materiales individuales, he incluso dotándolo de propiedades mejoradas. Particularmente, materiales compósito e híbrido conformados por materiales magnéticos recubiertos con materiales con propiedades de alta biocompatibilidad son de gran interés como soportes de biomoléculas. Nanopartículas (NPs) de óxidos magnéticos tienen amplia aplicación en biología y medicina, tales como transportadores de fármacos, portadores para la separación y purificación de productos bioquímicos o como soporte de materiales catalíticos, principalmente[1]. Particularmente, NPs de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4), presentan muchas ventajas como soporte. Así, mejora la dispersión de la especie catalizador presente en su superficie y su recuperación del medio de reacción, usando un campo magnético externo, es un protocolo mas efectivo [2] [3]. Esto es favorable debido a que reduce los gastos operacionales en la recuperación del catalizador. Sin embargo, si se pretende conseguir nuevas propiedades superficiales, una de las rutas es optar por recubrir a las NPs CoFe_2O_4 con el material deseado. La hidroxiapatita (HAP) es un conocido material cerámico bioactivo y altamente biocompatible. Por ejemplo, debido a que está presente en huesos y dientes, la HAP ha sido utilizado como reparador óseo, implante y regenerador [4]. Es por ello que presenta características aceptables para su uso como material soporte de biomoléculas, tales como ADN, enzimas, etc.

El desarrollo de un nanocompósito de estos dos materiales, que facilite una superficie biocompatible y propiedades magnéticas para su recuperación y reuso, es de mucha ventaja en la utilización como soporte de biomoléculas, entre ellas las enzimas.

2. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo sostenible tiene como objetivo satisfacer las necesidades humanas sin socavar la integridad y la salud ambiental del sistema natural. La química verde tiene como objetivo definir procesos de síntesis que eviten la creación de tóxicos y maximicen el uso eficiente de los recursos naturales, que sin duda es un camino clave hacia la sostenibilidad.[1]

Entonces, la biotecnología enzimática puede permitir traducir reacciones químicas que ocurren *in vivo* a estrategias de fabricación sintéticas a nivel industrial [2,3]. El uso de enzimas surge como una alternativa sostenible desde los puntos de vista tecnológico y ambiental. La enzima lipasa cataliza, en condiciones leves, reacciones de interés en la síntesis quimioselectiva con un alto grado de regioselectividad y estereoselectividad [4,5] en un marco limpio y respetuoso con el medio ambiente. Siendo una alternativa sostenible para catalizadores de costo basados en metales nobles y tierras raras. Sin embargo, la recuperación de la enzima después de una reacción para su reutilización sigue siendo un desafío para la aplicación industrial.

La inmovilización de enzimas en soportes puede brindar la oportunidad de superar el desafío principal en la recuperación del catalizador [11,12] al tiempo que mejora su estabilidad, tolerancia a los disolventes orgánicos y cinética de reacción [13-15]. Los nanomateriales surgen como excelentes soportes debido a su gran área superficial y son biocompatibles con enzimas [16].

Por ello, el diseño de nanoingeniería de los soportes de nanocompuestos puede proporcionar características multifuncionales adicionales. Las nanopartículas de óxido magnético, como la ferrita de cobalto (CoFe_2O_4), pueden impedir la aglomeración y mejorar su dispersión en solución [17,18]. Además, la recuperación de nanocatalizadores enzimáticos mediante la aplicación de un campo magnético externo es un protocolo muy eficiente [19-21]. Mientras tanto, la hidroxiapatita (HAP) es un mineral de fosfato de calcio no tóxico, inocuo e insoluble ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) con una excelente biocompatibilidad con las enzimas [22].

En suma, nosotros proponemos implementar nano recubrimientos de HAP en NPs de CoFe_2O_4 para anclar enzimas a través de procesos de inmovilización por adsorción y/o enlace covalente y estudiar su performance catalítico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Estudiar la influencia de los métodos de inmovilización covalente y de adsorción de la enzima *Burkholderia Cepacia* (BCL) en su actividad catalítica, utilizando al material nanocompuesto $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ como soporte.

3.2. Objetivos Específicos

- i. Sintetizar un nanocompuesto $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ por el método de micelas normales y precipitación química.
- ii. Funcionalizar el material $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ con APTES, seguido de activación con glutaraldehído (Glu).
- iii. Inmovilizar la enzima BCL mediante dos métodos: por adsorción y por enlace covalente, obteniéndose los sistemas bio-nanocompuestos magnéticos catalíticos ($\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -Enzima)
- iv. Estudiar la influencia del método de inmovilización en la actividad y selectividad catalítica de la enzima BCL mediante la reacción de transesterificación enantioselectiva de una mezcla racémica ((R,S)-1-feniletanol).
- v. Estudiar la estabilidad de la enzima en sucesivos ciclos de reacción (reciclaje).

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

1. ÓXIDOS DE HIERRO [5] [6]:

La magnetita (Fe_3O_4), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) son los óxidos más comunes y de aplicación tecnológica. La hematita, también conocido como óxido férrico es de color rojo sangre, si esta finamente dividido, o negro-gris si está en rocas minerales, siendo a menudo, el producto final de las transformaciones de los otros óxidos, presentando estabilidad a temperatura ambiente. La maghemita está presente en los suelos por la oxidación de la magnetita (formando soluciones sólidas) o como producto del calentamiento de otros óxidos (metaestable con hematita). La magnetita es un óxido de color negro el cual presenta fuerte magnetismo en comparación a los otros óxidos de metales de transición. Las aplicaciones son diversas; pigmentantes, catalizadores, sensores, adsorbentes, así como uso tecnológico en dispositivos de almacenamiento magnético y aplicaciones médicas, tales como transporte de fármacos, agente de contraste en imágenes por resonancia magnética (MRI), hipertermia magnética en el tratamiento de cáncer, entre otros. [6]

Un resumen de las propiedades de estos óxidos magnéticos se presenta en la siguiente tabla (**Tabla 1**):

Tabla 1: Propiedades física y magnéticas de los óxidos [6].

PROPIEDADES	ÓXIDOS		
	Hematita	Magnetita	Maghemita
FÓRMULA MOLECULAR	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Fe_3O_4	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
DENSIDAD (G/CM ³)	5.26	5.18	4.87
P. fusión (°C)	1350	1583-1597	-
	6.5	5.5	5
TIPO DE MAGNETISMO	Ferromagnético o antiferromagnético (bajo)	Ferrimagnético	Ferrimagnético
TEMP. DE CURIE (K)	956	850	820-986

MS A 300 K (A.M2/KG)	0.3	92-100	60-80
$\Delta G^\circ F$ (KJ/MOL)	-742.7	-1012.6	-711.1
SISTEMA CRISTALOGRÁFICO	Romboedro, hexagonal	Cúbico	Cúbico o tetraedro
TIPO DE ESTRUCTURA	Corundum	Espinela inversa	Espinela mixta
GRUPO ESPACIAL	R3c (hexagonal)	Fd3m	P4 ₃ 32 (Cúbico); P4 ₁ 2 ₁ 2 (tetraedro)
PARÁMETRO DE RED (nm)	a= 0.5034, c= 1.375 (hexagonal) a _{Rh} = 0.5427, α = 55.3° (romboedro)	a= 0.8396	a= 0.83474 (cúbico) a= 0.8347, c= 2.501 (tetragonal)

1.1. Ferritas (MFe_2O_4) y magnetita (Fe_3O_4)

La magnetita y las ferritas pertenecen a la familia de las espinelas, específicamente son espinelas inversas, los cuales presentan una estructura cubica centrada en las caras (FCC). La espinelas inversas presenta una celda unidad (**Figura 1**) en la cual los iones oxígeno (32 átomos) forman un arreglo empaquetado cerrado cubico y los iones M (II) (M: Co, Ni, Fe, Cu, etc.) y Fe(III) ocupan los sitios intersticiales: los iones Fe(III) (16 átomos) están presentes tanto en sitios octaédricos y tetraédricos mientras que los cationes M(II) (8 átomos) están presentes solo en sitios octaédricos [7].

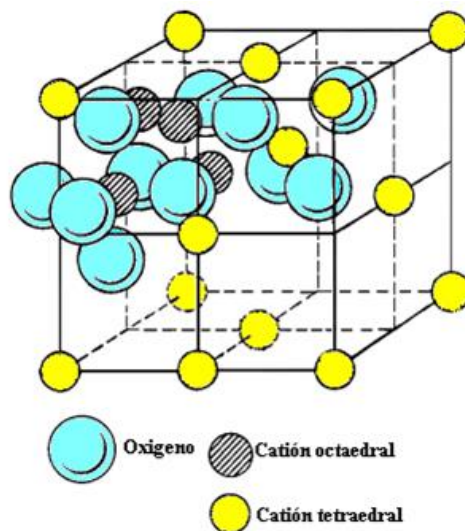


Figura 1: Estructura de una estructura espinela [7].

1.2. Propiedades magnéticas

Los materiales magnéticos son clasificados en relación con la respuesta frente a un campo magnético externo (H_{ext}) aplicado. Entonces, la descripción de las orientaciones de los momentos magnéticos en el material nos ayudaran a clasificar las diferentes formas de magnetismo [7]. Existen 5 tipos básicos de magnetismo: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, ferrimagnetismo y antiferromagnetismo (**Figura 2**).

En un estado paramagnético los momentos magnéticos atómicos individuales están alineados en forma aleatoria y por ellos el momento magnético total es cero, pero bajo la presencia de un campo magnético algunos de estos momentos magnéticos se alinean y aparece un pequeño momento magnético neto. En un estado ferromagnético, en el cristal todos los momentos individuales esta alineados incluso sin la intervención de un campo magnético externo. En un estado ferrimagnético tiene un momento magnético neto de dos tipos de átomos con momentos de diferente intensidad que se alinean de forma antiparalela, y en un estado antiferromagnético, el momento magnético neto de la alineación antiparalela es el mismo, resultando de momento neto igual a cero.

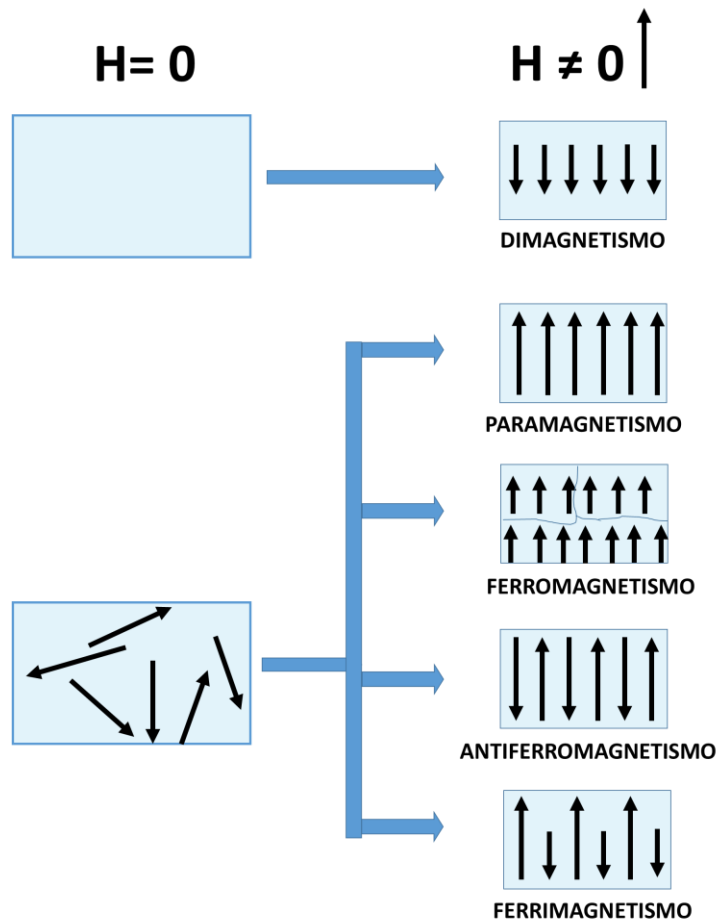


Figura 2: Diferentes estados magnéticos por la alienación de momentos magnéticos individuales.

La magnetita y las ferritas presentan propiedades ferrimagnéticas, ya que presentan dos átomos de diferente momento magnético MFe_2O_4 . Como los iones Fe (III) ocupan tanto los sitios tetraédricos y octaédricos; los momentos magnéticos del Fe (III) en estas dos posiciones están alineados en forma antiparalela, cancelándose mutuamente. Entonces, el momento magnético neto dependerá de los iones M(II) que ocupan la mitad restante de los sitios octaédricos (**Figura 3**).

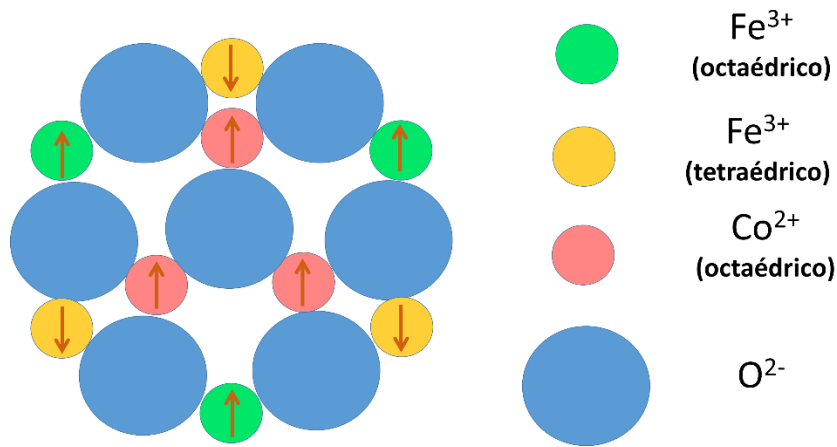


Figura 3: Alineamiento de los momentos magnéticos de los iones $\text{Fe}(\text{II})$ y $\text{Fe}(\text{III})$.

En un material ferromagnético *bulk*, la magnetización M es la suma de todos los vectores de todos los momentos magnéticos de los átomos en el material por unidad de volumen, siendo el material *bulk* compuesto por dominios con propio vector de magnetización. Debido a ello, los materiales ferromagnéticos presentan histéresis por presentar remanencia magnética al retirar el campo magnético externo (H_{ext}) (**Figura 4**)

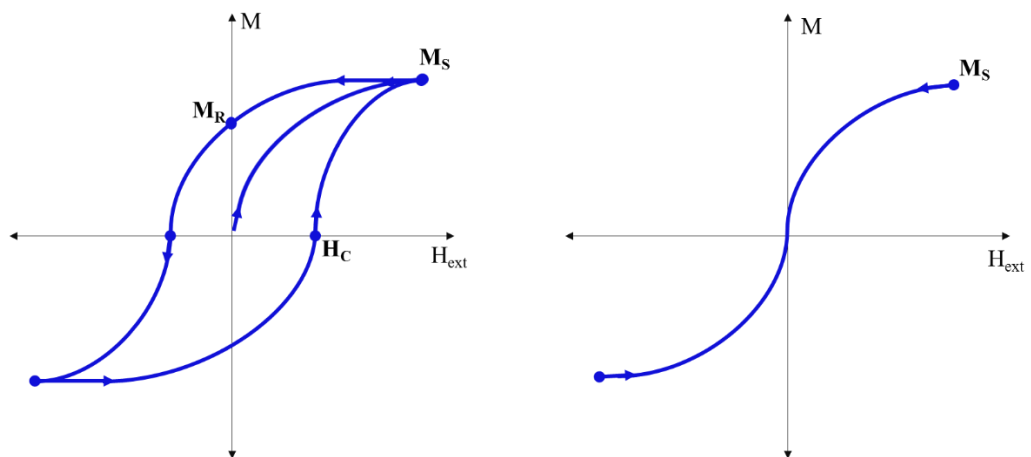


Figura 4: Ciclo de histéresis de materiales ferromagnéticos (izquierda) y superparamagnéticos (derecha).[8]

El método de síntesis influye en las propiedades magnéticas del material obtenido, ya que influirá el tamaño, forma, defectos superficiales, composición química y, además, la modificación de la superficie. Así, nanopartículas de magnetita menores a 10 nm pueden presentar superparamagnetismo, sin embargo esta propiedad va a depender de nivel de cristalinidad. Por ejemplo, Margulies et al. [9] reportó que la coercitividad (intensidad de campo magnético aplicado a un material para reducir su magnetización a cero, luego de que la muestra ha sido magnetizada hasta saturación, es afectada por la forma tridimensional del cristal en el siguiente orden: < esfera < cubo < octaedro.

1.3. Síntesis por Micelas Normales [10] [11] [12]

Los surfactantes, tensoactivos o agentes de superficie activa son compuestos anfífilos o anfipáticos, los cuales tienen una parte que presenta afinidad por el medio polar y otra que es afín al medio apolar. En medio acuoso se define como aquella molécula que presenta una parte hidrofílica (cabeza polar) y cadena hidrofóbica (cola apolar) que generalmente es una cadena de carbono. Esta parte hidrofílica interacciona con el medio acuoso ya sea por solvatación vía dipolo-dipolo o ion-dipolo, por lo cual alteran la tensión superficial y/o interfacial de este medio [11].

Las aplicaciones de estas moléculas son diversas, por ejemplo son utilizadas en diversas industrias tales como detergentes, alimentos, bebidas, farmacéutica, cosméticos, aire acondicionado, formulaciones para inhibidores de corrosión, etc. [13]. En la síntesis de nanopartículas se utilizan surfactantes específicos, ya sea en síntesis acuosa, orgánica o por microemulsión. Por ejemplo, los tipos no iónicos tales como Span 80, Triton X-100, NP-5, NP-9, etc.; entre los tipos aniónicos tenemos NaAOT, Dodecilsulfato sódico (SDS), Oleato de sodio y entre los tipos catiónicos los alquilamonio cuaternario, principalmente el Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) es el más ampliamente usado para síntesis.

La función de los surfactantes en la síntesis de óxidos nanoparticulados dependerá principalmente de la concentración de ella. A concentraciones menores a la concentración micelar crítica (CMC) el surfactante no formará micelas, con lo cual actuará como estabilizante y controlador de tamaño (**Figura 5**).

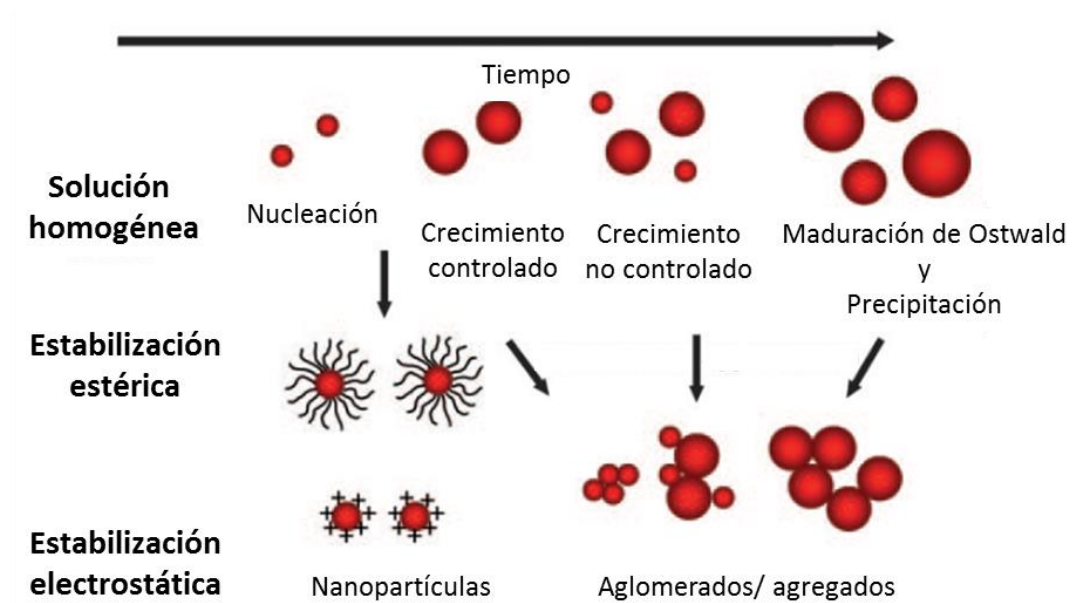


Figura 5: Crecimiento y estabilización de NPs [14].

A concentraciones por encima de la CMC, el sistema cambia abruptamente de propiedades. Los cambios en las propiedades del sistema son atribuidos a la agregación de las moléculas cuando pasan una concentración umbral, formando *clusters* con organización específica llamadas ‘micelas’ y la concentración umbral es denominada CMC. Tales micelas son llamadas *normales* cuando son formados en medio acuoso e *inversas* cuando son formadas en medio orgánico. Cabe recalcar que la CMC de un surfactante no necesariamente será el mismo en medio acuoso que en medio orgánico, y en este último es difícil un cálculo preciso. En la **Figura 6** presentamos las arquitecturas ordenadas:

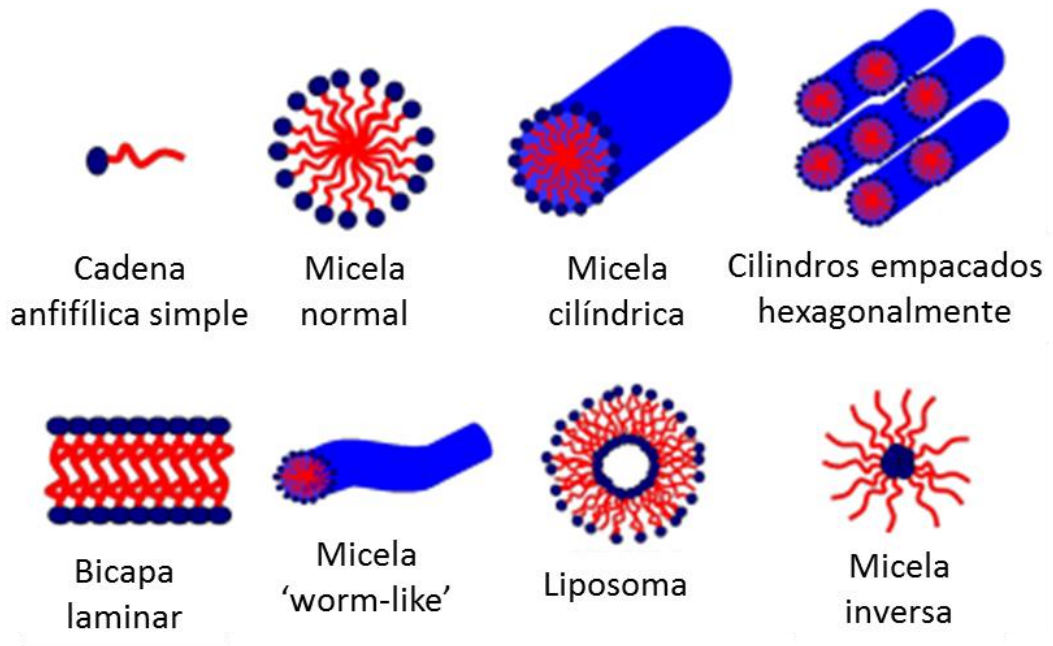


Figura 6: Representación de las diferentes arquitecturas micelares [15]

Un cambio en la arquitectura del agregado molecular o *cluster* hacia la formación de geometrías mucho más complejas, está relacionado con muchos factores, tales como concentración del surfactante, variación de la CMC, variación del número de agregación y naturaleza química del sistema micelar. Con estas variaciones estas micelar sirven como modelo para direccionar la formación de NPs con morfología (**Figura 7-A**) y porosidad (microporo, mesoporo y macroporo) (**Figura 7-B**) definidas.

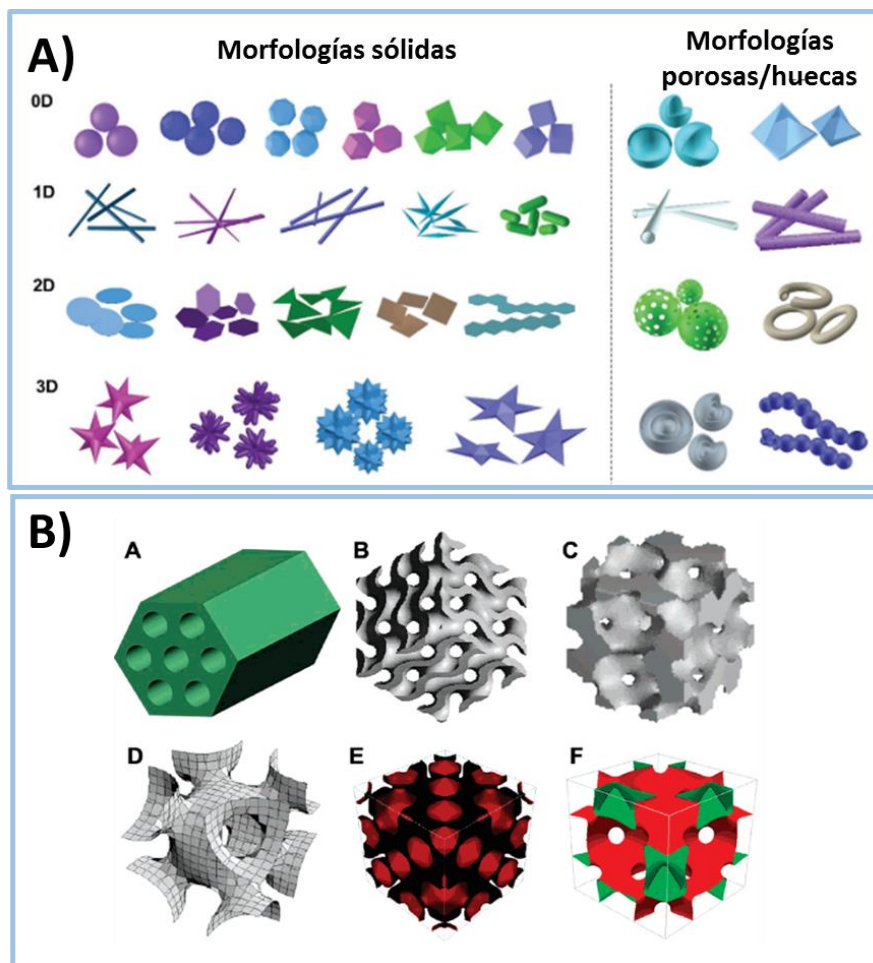


Figura 7:A) Morfología de sólidos inorgánicos nanoparticulado,[16] B) Modelos de poros de estructuras de sílica [17]

1.3.1. Clasificación de surfactantes [10]

Los surfactantes se clasifican en cuatro tipos que principalmente se diferencian en la parte polar o cabeza. Entre ella tenemos a los surfactantes catiónicos, aniónicos, no-iónicos y anfóteros o zwitteriónicos. Este último presenta, en la cabeza hidrofílica, fragmento aniónico y catiónico a la vez, y sus propiedades son sensibles al pH del medio u otras que no se alteran con una variación del pH. En la **Figura 8** se presenta ejemplos de las estructuras moleculares de cada tipo.

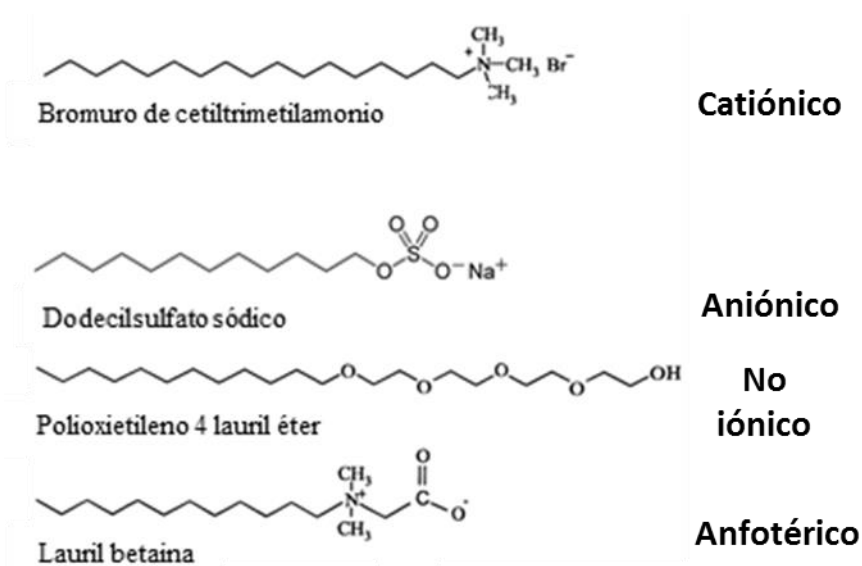


Figura 8: Tipos de surfactantes [10].

Podemos afirmar que un surfactante aniónico o catiónico son llamados así, debido a que en solución acuosa se disocian de sus contraiones catiónicos y aniónicos, respectivamente. Sin embargo, la disociación de este contraión no es cuantitativa cuando esta disuelta. Esta disociación está relacionada a un parámetro α que representa la fracción de contraión disociado en una micela. En el caso del surfactante SDS, con concentraciones cercanas a CMC, el valor de α está entre 0.14 a 0.7. Bunton *et al.* describió la región interfacial (capa de Stern) entre el surfactante iónico y el medio acuoso con la presencia de tres componentes i) cabeza hidrofílica del surfactante, ii) una fracción de contraiones, y iii) moléculas de agua.

2. BIOCERÁMICOS [18]

Los materiales biocerámicos está siendo usados ampliamente en aplicaciones ortopédicas debido a sus excepcionales propiedades de biocompatibilidad y resistencia a la corrosión, estabilidad química, fuerza mecánica, y no toxicidad en condiciones fisiológicas. Esos cerámicos pueden ser clasificados en: bioinertes (Al_2O_3 y ZrO_2), biodegradables (β -TCP) y bioactivos (HAP).

2.1. Hidroxiapatita

La Hidroxiapatita (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), pertenece a la familia de los fosfatos de calcio (CPs), es el principal cerámico bioactivo, siendo el principal constituyente de los tejidos duros (huesos y dientes). La comparación de las propiedades físicas y mecánicas se presentan en la **Tabla 2**. Este compuesto tiene la capacidad de inducir nueva generación de hueso y apoyar su crecimiento, mientras se enlaza químicamente al hueso natural. Este material difiere de los otros tipos de CPs debido a la relación Ca/P, el cual tiene un valor de 1.67. Esta relación (Ca/P) es un importante parámetro que determina la acidez y solubilidad del CPs. Así, la HAP presenta poca solubilidad ($K_{ps} = 2.34 \cdot 10^{-59}$) y es un CPs básico, siendo termodinámicamente estable a condiciones fisiológicas.[4]

Tabla 2: Comparación de las propiedades físicas y mecánicas de la HAP

PROPIEDADES FÍSICAS Y MECÁNICAS	HAP	HUESO NATURAL
Módulo de Young (GPa)	40-120	7-30
Resistencia a la compresión (MPa)	300	10-230
Resistencia a la flexión (MPa)	110-200	200
Tenacidad a la fractura ($\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$)	<1	2-12
Coefficiente de Poisson`s	0.27	0.30

La HAP presenta dos tipos de fases cristalinas: monoclinica (grupo espacial P21/b) y hexagonal (grupo espacial P63/m). Siendo la fase hexagonal de mayor importancia por su estabilidad (**Figura 9**). En la estructura cristalina, el grupo PO_4^{3-} forma un tetraedro

con el ion fosforo (P^{5+}) como centro, los grupos OH^- son enlazados iónicamente y el ion calcio (Ca^{+2}) está presente en dos posiciones: de columna y hexagonal.

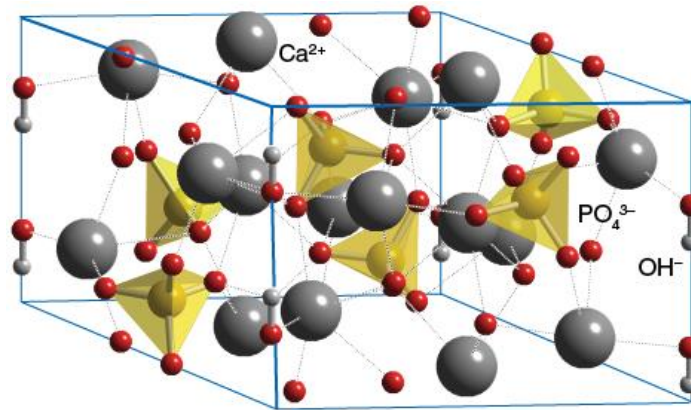


Figura 9: Estructura cristalina de la HAP

2.2. Síntesis por Precipitación Química [4]

La HAP puede ser obtenido por diferentes rutas, tales como síntesis hidrotérmal, sol-gel, ultrasonido, precipitación, entre otros. Siendo la precipitación química de menor costo, escalable y de fácil implementación, debido a que no requiere algún equipo sofisticado. Sin embargo, generalmente se podrá obtenerse partículas con tamaños por debajo de 1 μm . Por ello, el uso de moléculas capaces de controlar y direccionar el tamaño y la forma de la partícula final es de suma importancia.

El método de precipitación se basa en la presencia de una solución sobresaturada que lleva a la precipitación de los iones fosfato y calcio para formar la HAP. La formación de material amorfo o cristalino se relaciona con el control de la solución saturada, el cual dependerá de la velocidad con que se llegue a este estado. El modelo de LaMer (**Figura 10**) ofrece un marco de referencia en la formación de nanopartículas. El proceso inicia por la formación de precursores, llegando hasta un nivel de sobresaturación. Cuando este proceso sobrepasa el umbral crítico de nucleación, se da paso al proceso de nucleación (estado II). Aquí se produce una competencia entre el proceso de nucleación y la formación de precursores. Cuando la velocidad del primero sobrepasa al segundo, la concentración de este caerá por debajo del umbral crítico de nucleación. En esta etapa el proceso de crecimiento tomaría lugar mediante adición de

unidades precursoras en los núcleos preformados. El proceso de Ostwald es otra ruta de crecimiento por el que núcleos pequeños, desfavorecidos energéticamente, se redisuelven y depositan en núcleos más grandes, favorecidos termodinámicamente.

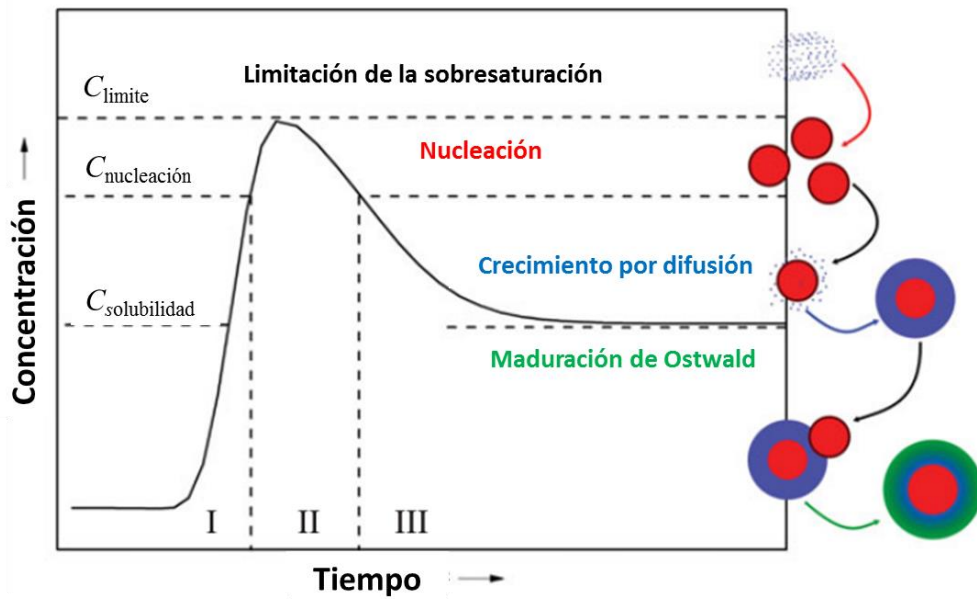
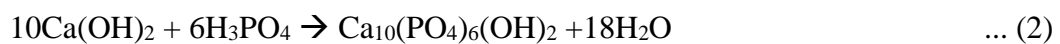


Figura 10: Efecto de la sobresaturación en el proceso de precipitación química.[19]

Dos formas de obtener HAP son usadas: por la reacción de sales de calcio y fosfato (1); y por neutralización de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y H_3PO_4 (2). Además, una combinación de ellas es usada para fines precisos.



3. MATERIALES NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICOS [20]

Se define a los materiales nanocompósito a aquellos materiales que están constituidos por varios componentes o fases, y que al menos uno de sus componentes sólidos presente una estructura en escala nanométricas (<100 nm) en una o sus tres

dimensiones. Una clasificación más precisa de los nanocompuestos magnético son los llamados **nanocompuesto híbrido magnético**, están constituidos por nanopartículas magnéticas (NPs Fe, Co o óxidos) y materiales inorgánicos u orgánicos (polímeros orgánicos, matrices de sílica, semiconductores y NPs metálicas). Las formas de estos nanocompuestos magnéticos son variadas (**Figura 11**) y van a depender del método de síntesis y de las propiedades que se quiera tener.

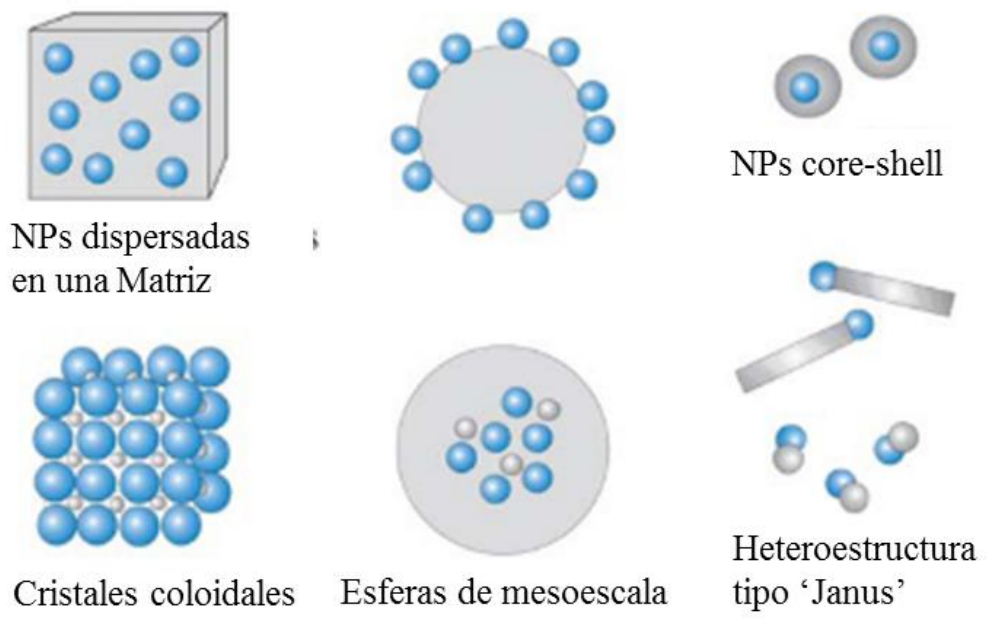


Figura 11: Morfologías típicas de materiales nanocompuestos magnéticos [20]

En la actualidad, los materiales nanocompuesto híbrido magnéticos, presentan mucho interés debido a que se combinan las propiedades de cada componente en un solo sistema, introduciendo características multifuncional (sinergia), así como nuevas propiedades físicas, químicas y biológicas.[21][22]. Recientes avances en la síntesis buscan controlar el tamaño, forma, morfología, composición y estructura, además de uniformidad, estas características influyen directamente en las propiedades finales. [20][23][24]

4. ENZIMA LIPASA

La enzima lipasa (triacilglicerol éster hidrolasa E.C. 3.1.1.3) es una macromolécula soluble en medio acuoso que actúa sobre sustratos insolubles. Su principal función es la de catalizar la hidrólisis de triacilgliceroles a los correspondientes ácidos grasos y glicerol.[25] Estas enzimas son clasificadas y codificadas por la NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Biology) de acuerdo a la reacción catalizada. La nomenclatura utiliza la abreviación E.C seguida de hasta 4 dígitos referentes a clases y subclases.

A continuación, se presenta la **Tabla 3** que resume la acción y uso de estas enzimas en diversos productos:

Tabla 3: Aplicaciones industriales de la lipasa.[25]

INDUSTRIA	ACCIÓN	APLICACIÓN EN PRODUCTOS
Hidrólisis de alimentos lácteos	Hidrólisis de la leche, grasa, maduración del queso, modificación de la grasa de la mantequilla	Desarrollo de agente aromatizante en leche, Queso y mantequilla.
Comida de panadería	Mejora del sabor	Prolongación de la vida útil
Bebidas	Aroma mejorado	Bebidas alcohólicas, (vino de sake)
Aderezo de comida	Mejora de la calidad	Aderezo de mayonesa y azotes
Comida saludable	Transesterificación	Alimentos saludables
Carne y pescado	Desarrollo del sabor	Eliminación de grasa de carne y pescado.
Lavandería	Reducción de cepas biodegradables	Tropos de limpieza

Productos cosméticos	Esterificación	Cremas descremadas, bronceadoras, aceites de baño, etc.
Surfactantes	Reemplaza a las fosfolipasas en la producción de lisofosfolípidos	Ésteres de ácidos grasos de poliglicerol y carbohidratos: Detergentes industriales y como emulsionantes en la formulación de alimentos (salsas y helados)
Agroquímicos	Esterificación	Herbicidas como el fenoxipropionato.
Farmacéutico	Hidrólisis de los alcoholes	Producir diversos productos intermedios utilizados en la fabricación de la medicina.
Industrias de combustible	Transesterificación	Producción de biodiesel
Control de polución	Hidrólisis, transesterificación de aceites y grasas	Para eliminar manchas duras, hidrolizar aceite y grasas.

En general, las enzimas lipasas comparten un patrón conformacional común, denominado conformación canónica α/β de hidrolasa (**Figura 12-A**). Teniendo una arquitectura compuesta por una secuencia de α -hélice y β -plegada o laminar. La actividad de la enzima se fundamenta en la triada de aminoácidos Serina (nucleófilo)-histidina-acido aspártico (o glutámico) presentes en ciertos puntos de la conformación canónica α/β .

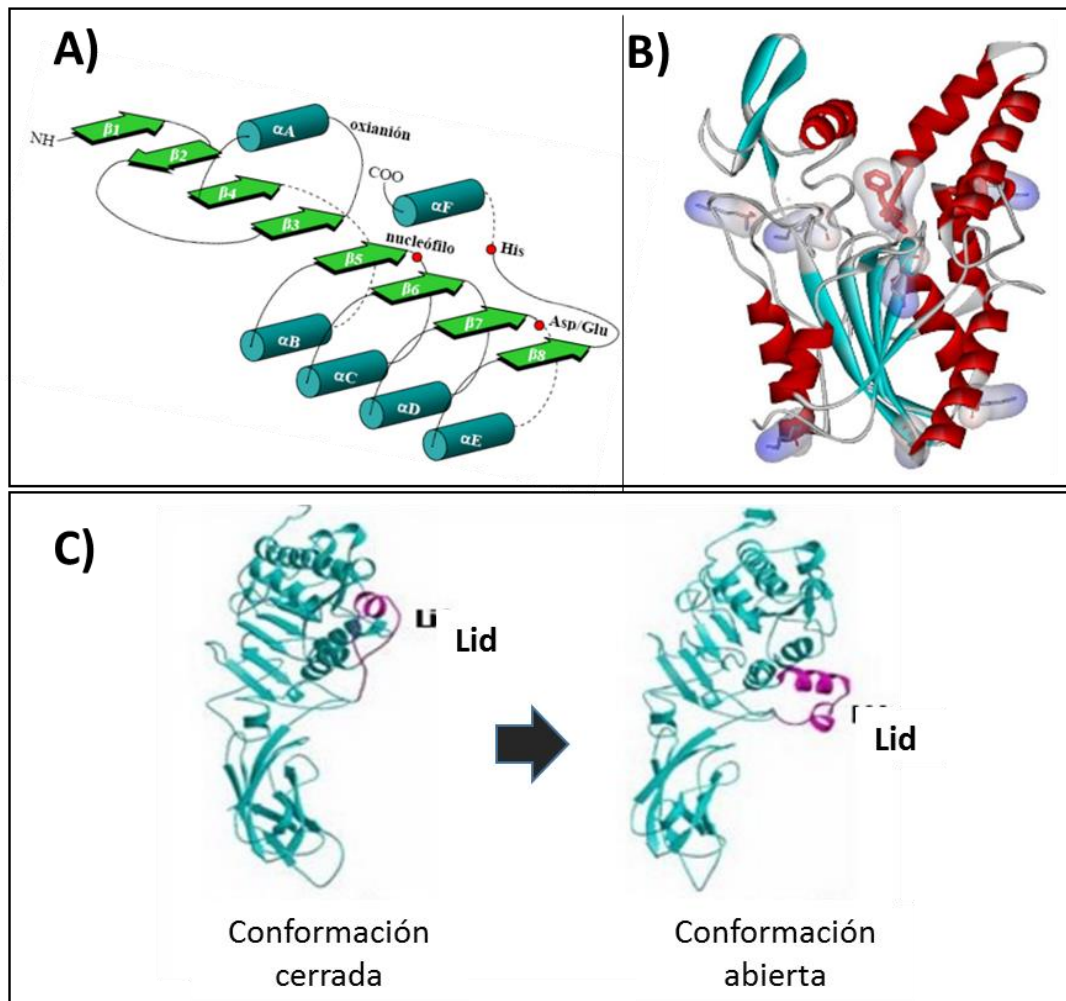


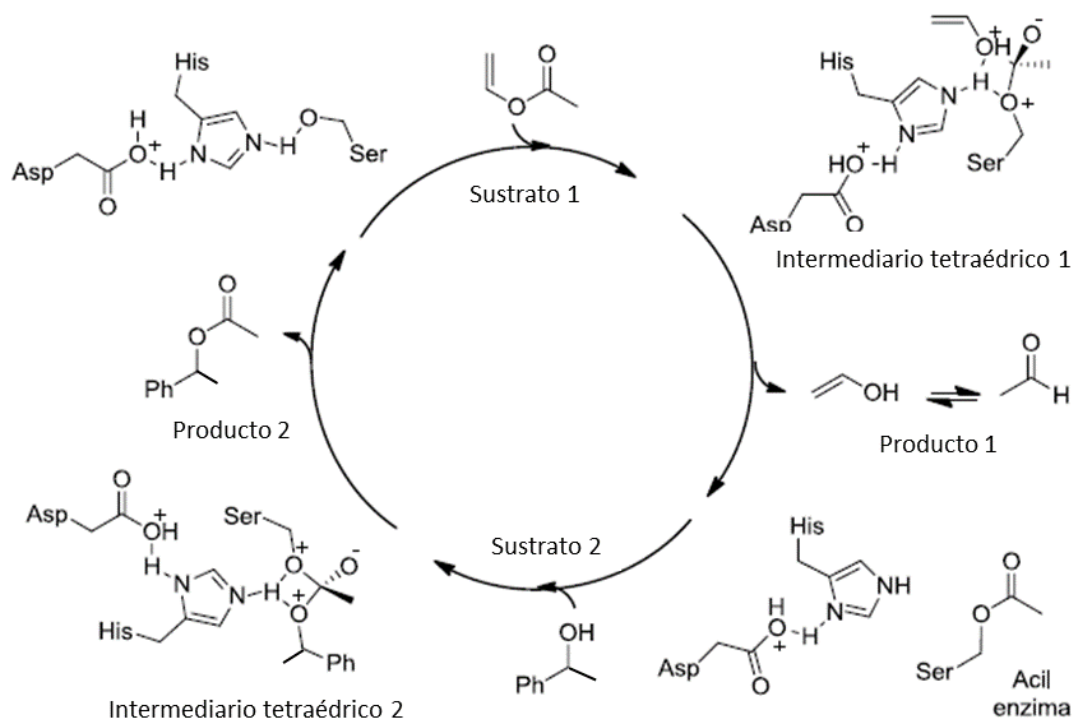
Figura 12: A) Conformación canónica de la lipasa [26]. B) Enzima from *Burkholderia cepacia*. C) Centro activo de la lipasa

[27].

En la **Figura 12-B** podemos observar la representación de la estructura tridimensional de la enzima lipasa from *Burkholderia cepacia* (BCL). Esta enzima presenta la triada catalítica (centro activo) conformada por Ser87-His286-Asp264. El centro activo de estas enzimas está protegido por una cubierta hidrofóbica denominada *lid*, que al interactuar con la interfase, mediante un mecanismo de activación interfacial, sufre un cambio conformacional (conformación activa) (**Figura 12-C**).

4.1. Actividad Catalítica: Reacción de Transesterificación

El mecanismo de reacción de transesterificación enantioselectiva de (*R,S*)-1-feniletanol con acetato de vinil catalizada por la enzima lipasa es mostrada en el **Esquema 1**. Este mecanismo inicia con el ataque del grupo hidróxido de la serina al acetato de vinil, formando un *intermediario tetraédrico 1*. Este intermediario presenta una deslocalización de electrones del grupo carbonilo que ocasiona un desprendimiento de los productos intermedios *acil-enzima* formada y un *enol* que es convertido a acetaldehído para estabilizarse. Finalmente, la especie *acil-enzima* sufre un ataque por el alcohol secundario (1-feniletanol) para la formación del *intermediario tetraédrico 2*, el cual presenta una deslocalización de electrones del grupo carbonilo que ocasiona finalmente la formación de un éster como producto y la restauración del catalizador.



Esquema 1: Mecanismo de transesterificación enantioselectiva catalizada por lipasa.[28]

4.2. Ventajas y desventajas [29]

Las principales ventajas que presentan la enzima lipasa, en comparación a otros tipos de catalizadores, son:

- ✓ Consumo de energía moderada
- ✓ Bajas temperaturas de reacción,
- ✓ Mínima influencia de H₂O en el proceso catalítico,
- ✓ No se presenta envenenamiento del sitio activo,
- ✓ Rendimientos comparables a los otros tipos de catalizadores, y
- ✓ Quimioselectivo, regioselectivo y estereoselectivo

Las desventajas que presentan son;

- velocidades de reacción bajas,
- dificultad en la recuperación de la enzima para su re-uso.
- Costo elevado
- Inestabilidad térmica, solvente, pH.

Estas dificultades pueden ser superadas por procesos de inmovilización en materiales soporte adecuados que mejorarían su cinética de reacción, estabilidad, tolerancia a solventes y pH, y principalmente facilitarían su recuperación mediante centrifugación o atracción magnética usando soportes magnéticos. Así, procesos de reuso de la enzima inmovilizada reducirían los costos de operación en síntesis de compuestos químicos de interés.

5. INMOVILIZACIÓN DE MACROMOLÉCULAS

La inmovilización de macromoléculas son procedimientos o técnicas que consisten en limitar el desplazamiento de estas macromoléculas mediante la utilización de, por ejemplo, algún material sólido (soporte) que sea capaz de alojar y anclar estas macromoléculas en su superficie. Materiales poliméricos que en conjunto podrían formar redes tridimensionales podrían alojar a las macromoléculas. Por otro lado, la

unión entre las mismas macromoléculas por enlace covalente podría formar un agregado y facilitaría su inmovilización.

El proceso de inmovilización busca mejorar las características de la enzima frente a su uso: Velocidades de reacción, estabilidad, reuso, versatilidad, entre otros. [30] Sin embargo existen inconvenientes a solucionar luego del proceso de inmovilización, como por ejemplo la alteración de la conformación estructural de la macromolécula del que está compuesto la enzima, provocando, en muchos casos, que el sitio activo esté menos expuesto para el cumplimiento de su función. Por otro lado, la elección de un buen material soporte es importante ya que este tiene que presentar biocompatibilidad. Por último, la poca efectividad en la retención, por parte del material soporte, de la enzima disminuiría su rendimiento.

Varios materiales son usados como soporte, tales como resinas poliméricas, sílica, cerámicos, nanotubos de carbón, partículas magnéticas y microesferas. Todos estos materiales deben ser capaces de permitir que la enzima sea inmovilizada en la estructura interna, por ello los materiales altamente porosos son favorables. Estos poros deben cumplir dos funciones; permitir el acceso del sustrato hacia los sitios activos de la enzima, y permitir la salida del producto hacia el *bulk* [31]. La retención de la actividad lipolítica es favorable en matrices que presenten características hidrofóbicas en su superficie para una mayor selectividad con compuestos hidrofóbicos como las grasas y aceites, y por otra parte alejar las moléculas hidrofílicas de la vecindad de la enzima [32].

5.1.1. Ventajas [33]

El uso de materiales nano estructurados para la inmovilización de enzima se abre paso debido a sus innumerables propiedades fisicoquímicas. Nanomateriales como nanopartículas, nanofibras, nanotubos, nanoporos o nanocompósitos presentan muchas aplicaciones en la industria biotecnológica. Se deben tener consideraciones de algunos factores para la elección adecuada del material:

- ✓ Relación área/volumen.

- ✓ Capacidad de carga de la enzima: Al presentar una alta área superficial, ofrece mayor capacidad de carga, ya sea por adsorción física o por unión covalentemente, usando moléculas funcionales como anclajes.
- ✓ Velocidad de flujo: Nanopartículas mono-dispersas en suspensión acuosa presentan movimiento *browniano* que ayuda a la difusión.
- ✓ Transferencia de masa: En comparación con matrices de escala macro, los materiales nanométricos presentan, alta transferencia del sustrato [34].
- ✓ Fácil separación: Nanomateriales magnéticos pueden facilitar la separación luego de finalizado la reacción, ya que se puede dar una separación efectiva con la utilización centrifugación o un campo magnético, lo cual ayuda a la reutilización y mejor separación del catalizador-soporte.
- ✓ Diseño de reactor: la eficiencia del proceso en un reactor estará regido por su diseño y las condiciones de operación.

5.2. Tipos de Inmovilización

La elección del tipo de inmovilización es crucial para mantener o mejorar la actividad enzimática. Los procedimientos más comunes de inmovilización de enzimas son: la adsorción, enlace covalente, atrapamiento y reticulación (**Figura 13**).[35]

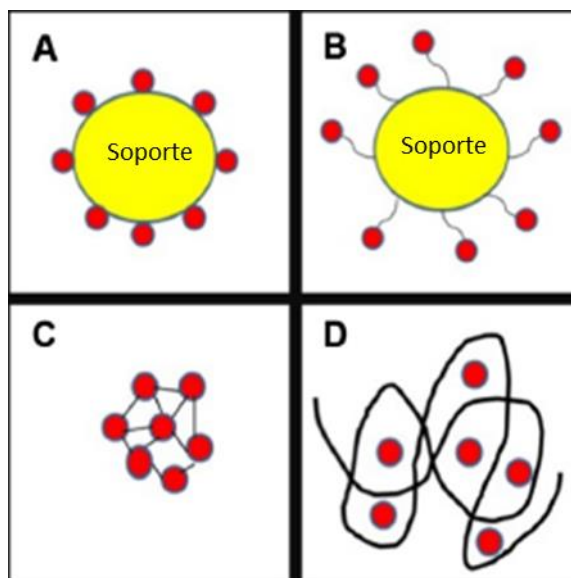


Figura 13: Métodos de inmovilización de enzimas A) adsorción, B) covalente, C) atrapamiento, y D) entrecruzamiento.[36]

5.2.1. Adsorción

Es un proceso que consiste en mezclar la enzima y el material adsorbente, en condiciones apropiadas de pH y fuerza iónica [37]. Se fundamentan en las interacciones Van der Waals, iónica, puente de hidrogeno y dipolo-dipolo. Con el fin de evitar la modificación química y la débil unión entre el material adsorbente con la enzima, se deben tener en cuenta las propiedades superficiales de ambos, los cambios inusuales en el pH y fuerza iónica. Este tipo de adsorción, generalmente, conduce a cambios en el microambiente de la proteína debido a que generalmente implica la unión mediante varios puntos de la superficie de inmovilización. La temperatura, cambios en el sustrato y concentración iónica son factores que influyen en la desorción de la enzima [38] .

5.2.2. Unión Covalente

Implica la formación de enlace químico entre la enzima y el material de soporte. Los grupos funcionales superficiales que presenta la enzima se pueden unir covalentemente con otros grupos funcionales de moléculas presentes en la superficie del material soporte, unidos por reacción química, denominados espaciadores. Los grupos funcionales de la enzima son cadenas laterales de aminoácidos como arginina, ácido aspártico, histidina, imidazol, hidróxido fenólico, etc. [39]. La unión entre el soporte y la enzima se puede lograr ya sea por interacción directa entre los componentes espaciador-grupo funcional (enzima) o a través de una previa activación del espaciador. Esto le puede conferir mayor movilidad al biocatalizador, influyendo en su actividad y estabilidad

5.2.3. Atrapamiento

Se define como un tipo de enjaulado de la enzima en un gel poroso o fibra, este atrapamiento puede ser física o química, sin embargo, esto no impide la libertad de la enzima, ya que en solución se mantiene como molécula libre. Este tipo de inmovilización es efectiva para moléculas de bajo peso molecular, ya que moléculas de alto peso molecular no son capaces de acercarse a la enzima para interactuar con

los sitios activos. Se utilizaron polímeros naturales como agar, agarosa gelatina, alginato, quitosano y polímeros sintéticos como poliacrilamida.

5.2.4. Reticulación o entrecruzamiento

Este método implica la unión de las enzimas a través de ligando mono o multifuncionales, formándose un agregado de altos pesos moleculares y muchas veces insoluble, sin embargo, este proceso disminuye la actividad del catalizador debido a la alteración de su conformación estructural. El agente bifuncional más comúnmente utilizado es el glutaraldehído (Glu) por su bajo costo, alta eficiencia y estabilidad [40].

5.1. Nanopartículas para Inmovilización

Las nanopartículas han sido ampliamente estudiadas para el uso como materiales soporte, para inmovilizar diversas biomoléculas (**Figura 14**). Las aplicaciones de estos sistemas son diversas en el campo de la biotecnología y biomedicina, con particular énfasis en el diagnóstico clínico y en terapia.[41]

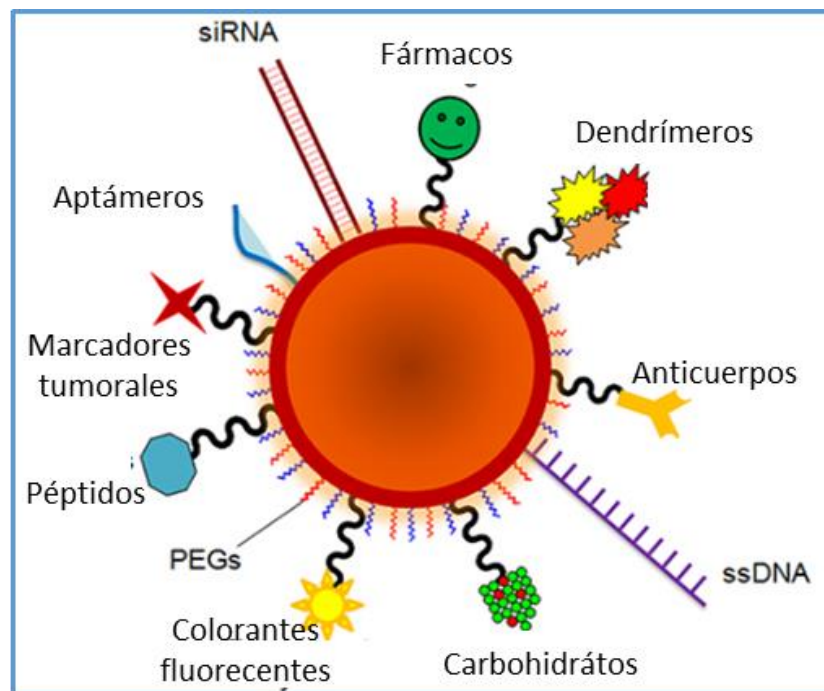


Figura 14: Nanopartículas como soporte de biomoléculas [41]

La inmovilización de enzimas en nanopartículas es una estrategia viable para mejorar el desempeño en la actividad catalítica que presenta esta enzima [42]. Debido a que presenta mayor área disponible, lo que permitiría trabajar a pH's diferentes, mejoraría la estabilidad térmica, facilitar la recuperación de la enzima, reutilización de la enzima, entre otros.[43]

Diversos soportes han sido estudiados para tal objetivo, más aún los nanomateriales presentan propiedades fisicoquímicas tales como una alta área superficial, resistencia a la transferencia de masa y como conjunto de estas dos propiedades; la capacidad de inmovilización de especies en su superficie, permitiendo en muchos casos la mayor apertura del sitio activo, mejorando así la capacidad de catálisis.

Diversos soportes nanoparticulados se han estudiado para la inmovilización de enzimas mediante procesos químicos [44] y físicos (adsorción y encapsulamiento).[45] Entre estas, las nanopartículas de HAP y los óxidos magnéticos presentan grandes ventajas como material soporte ya que presentan como principal propiedad la biocompatibilidad, propiedad magnética y su capacidad de funcionalización superficial. Un compósito de estos dos materiales ensamblados en forma nanométrica proporcionaría propiedades mejoradas o nuevas que se espera mejoren el desempeño de la enzima.

CAPITULO III. ESTADO DEL ARTE

1. MATERIALES COMO SOPORTE INMOVILIZANTE DE LA ENZIMA [46]

Actualmente, el objetivo de mejorar la actividad catalítica de las enzimas se ha centrado en los procesos de inmovilización en innumerables materiales.[46] Es decir, que las macromoléculas enzimáticas se confinen o localicen, de alguna manera, en la superficie de un material con el propósito de modificar la estructura conformacional de esta enzima, el cual está directamente relacionado con su actividad catalítica.[47] Estos materiales utilizados como soporte deben presentar propiedades que aseguren una biocompatibilidad con la enzima en tanto no repercuta en su desnaturalización.[48] Por otro lado, los materiales seleccionados deben presentar una elevada superficie de contacto que asegure una mayor capacidad de carga (adsorción) de la enzima. Una amplia variedad de materiales orgánico e inorgánicos han sido analizados como soportes compatibles para biocatalizadores. Entre los materiales inorgánicos tenemos óxidos metálicos, minerales y materiales carbonosos. Mientras que los materiales orgánicos comprenden polímeros sintéticos y biopolímeros.

Actualmente, el crecimiento en la investigación lleva a la utilización de nuevos materiales, compósitos e híbridos con propiedades físicas y químicas excepcionales que maximizan sus ventajas. Mas aun, estos materiales son producidos con forma morfología y tamaño definidos (**Figura 15**). [46]. Entre los materiales inorgánicos se encuentran las partículas magnéticas, materiales mesoporosas y las nanopartículas. Las membranas poliméricas y materiales electro-hilados se encuentran entre los materiales orgánicos de mayor relevancia. Detallemos algunos materiales:

i) Partículas magnéticas: Son materiales muy versátiles principalmente por sus propiedades magnéticas que facilitan la recuperación del sistema biocatalítico usando un campo magnético externo[3]. Por otro lado, la abundancia de grupos hidroxilo superficiales facilita su modificación y fuerte enlace covalente con la enzima[2].

Además, la estabilidad mecánica y baja porosidad, que minimiza el impedimento estérico, son relevantes para el sistema biocatalítico sea mas estable.[46]

Un estudio para ver la influencia de las características del material soporte en la enzima inmovilizada fue realizada por Chen 2016 [2] que desarrollo una estrategia para la formación de NP's Fe_3O_4 poliedros; cubo truncado, dodecaedro rómbico y octaedros con fase expuesta {100}/{110}, {110} y {111}, respectivamente. La dependencia de la actividad catalítica y estabilidad del óxido dependerá de la fase expuesta que presente en mayor proporción, así la fase {110} para Fe_3O_4 presenta mayor actividad catalítica. Una medida de la actividad revela optimas condiciones a pH 7,4 y 37 °C, con 85.1%, 84.4% y 84.6% (respecto a la lipasa libre), respectivamente.

ii) Materiales mesoporosos: La principal característica de estos materiales es que mediante los procedimientos de síntesis se puede diseñar la forma y tamaño de la estructura porosa, el cual influye en las propiedades del material. El tamaño del diámetro de poro varía entre 2 nm y 50 nm, obteniéndose hasta un área superficial de 1500 m²/g. Las enzimas pueden ser inmovilizadas por enlace covalente o por encapsulación.[31] Los materiales, tales como zeolitas, carbones y matrices sol-gel. Por ejemplo, el óxido mesoporoso de mayor estudio es la sílica.[39]

iii) Nanopartículas: Aquí se agrupan los materiales inorgánicos así como también los orgánicos.[49] En general estos nanomateriales poseen alta área superficial que dirigen a una considerable carga de la enzima. Por ello, su principal ventaja radica en minimizar las limitaciones difusionales. Esto es debido a que, al unirse a la superficie de las nanopartículas, sus sitios activos presentan una mayor exposición al sustrato, mejorando su actividad catalítica. Los materiales en extensa investigación son los materiales cerámicos y alótopos del carbón a escala nanométrica tales como nanotubos de carbón, grafeno, fullerenos.[50]

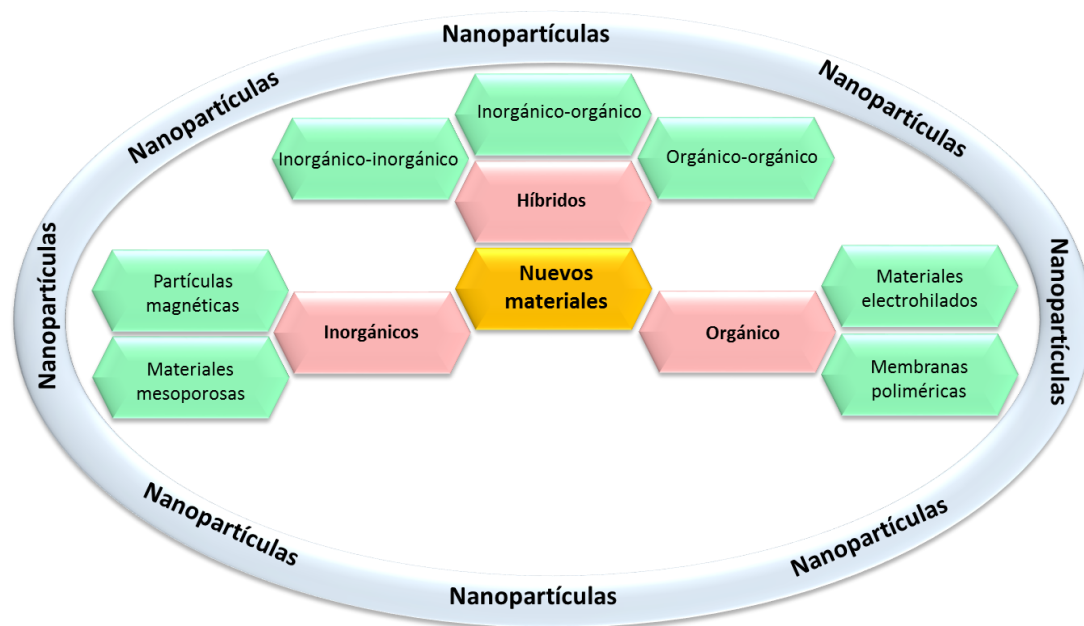


Figura 15: Clasificación de nuevos materiales[46]

Finalmente, debido a las propiedades únicas de los materiales revisados, viene la necesidad de combinar estas propiedades en un solo material. Así se han desarrollado en los últimos años procedimientos de síntesis para la formación de compósito e híbridos que maximicen las propiedades individuales.[51] Esta combinación dirige a una mejor interacción con la enzima, haciendo del sistema catalítico más estable y con mayor resistencia mecánica en las reacciones.[52] Además, se considera que los materiales compósito e híbridos confieren un entorno biocompatible que posibilitan una mayor retención de la actividad catalítica y le confiere de cambios conformacionales bruscos en su almacenamiento.[53] Tanto para los compósitos y materiales híbridos las conjugaciones que se puede dar son: (i) orgánico-orgánico; (ii) inorgánicos-inorgánicos, o (iii) precursores orgánicos-inorgánicos.

1.1. Materiales nanocompósito híbrido[46]

Las características mencionadas anteriormente de los materiales nanocompósito híbrido despiertan un interés como soportes potenciales. Esto es debido a que generalmente presentan estabilidad térmica, estabilidad al pH del medio, resistencia

mecánica y son químicamente inertes. Además, de acuerdo al procedimiento de síntesis, la configuración superficial resultante determinará los grupos funcionales como grupos hidroxilo, principalmente, que interaccionaran con la enzima o su posterior funcionalización.

Por ejemplo, Mehrasbi et al. 2017 [54] estudiaron la inmovilización de *candida antártica* lipasa en nanopartículas *core-shell* ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) para la síntesis catalítica de biodiesel a partir de aceite residual de cocina. Se obtienen nanopartículas de tamaño promedio de 34 nm. Un estudio de la eficiencia en la inmovilización con el pH sugiere óptimos rendimientos a pH 7, proveyendo una estabilidad térmica y tolerancia al metanol comparada con la enzima libre. En la reacción de transesterificación se obtiene 84% de conversión y 100% de su actividad después de seis ciclos de reacción.

Xie et al. 2017 [55] sintetizaron un material compuesto por la conjugación de Fe_2O_3 e hidroxiapatita (HAP). La enzima lipasa se inmovilizó covalentemente en su superficie para la interesterificación de aceite de soya. Para el proceso de inmovilización se utilizó aminopropiltriétoxissilano (APTES) dispersado en tolueno anhidro. Así, en un proceso de reciclaje se obtuvieron $48.6\pm 1.3\%$, $46.7\pm 1.5\%$, $45.3\pm 1.1\%$ and $43.4\pm 1.4\%$ cuando el sistema biocatalizador fue utilizado para los ciclos 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Por otro lado, Zhao et al. 2013 [52] reúne las propiedades mesoporosas de sílica, magnéticas de la magnetita y la alta biocompatibilidad de la hidroxiapatita para formar un material compuesto con respuesta al pH en el proceso de transporte de fármacos. En un estudio de la liberación del fármaco el cual depende del pH del medio (buffer de acetato) se concluyó que en un rango de pH 4-8 el mayor proceso de liberación fue cercano a pH 4.5.

Un material compuesto compuesto por nanopartículas Fe_3O_4 soportadas en nanotubos de carbón de pared múltiple fue sintetizado por Tan et al. 2012. El principal aporte de este trabajo radica en el estudio del cambio estructural o conformacional de la enzima inmovilizada en su actividad catalítica en la resolución de (*R,S*)-1- fenil etanol. Por otro lado, el efecto de la sonicación en los procesos de lavado del sistema biocatalizador fueron relevantes. Debido a la presencia del material magnético, su

capacidad de recuperación es mejorada. Además, el rendimiento de la reacción catalítica (91 %) se mantiene en un rango de temperatura de 35-60 °C.

Chen et al. [56] investigaron el uso de un compuesto core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ sintetizados via solvotermal. La funcionalización superficial para obtener grupos funcionales amino facilita la inmovilización de la enzima lipasa. Un estudio de la actividad hidrolítica reveló una retención del 93% frente a la actividad de la enzima libre a un pH del medio cercano a 8. Por otro lado, en un estudio del reuso de la enzima se determinó que retiene hasta el 68% de la inicial actividad después de 10 ciclos de reuso. Sin embargo, la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada no presenta una considerable mejora, frente a la enzima libre, teniendo una mayor actividad a 40 °C, mientras que a temperaturas cercanos a 30 °C y 65 °C presenta 40% y 50% de rendimiento, respectivamente.

Por su parte Li et al. [57] diseñó un biosensor de H_2O_2 a base de peroxidasa inmovilizada en un compuesto híbrido inorgánico compuesto por láminas de carbonato de calcio decoradas con NPs de oro ($\text{CaCO}_3\text{-Au}$). La inmovilización se dio por el método de adsorción mediante interacción electrostática. El sistema biosensor resultante mostró alta actividad electrocatalítica hacia la reducción de H_2O_2 , el cual lo atribuyen a la favorable orientación de la peroxidasa y la alta conductividad eléctrica del compuesto híbrido inorgánico $\text{CaCO}_3\text{-Au}$, logrando una buena respuesta lineal sobre un amplio rango de concentración de H_2O_2 y un límite de detección relativamente baja.

En otro caso Shang et al. [58] muestra un soporte prometedor formado por nano-hojas de óxido de grafeno decorado con nanopartículas de óxido de zinc (GO/ZnO) para una eficiente inmovilización de enzima lipasa *Candida rugosa* (CRL). Además de demostrar una buena estabilidad térmica y reusabilidad, la actividad catalítica de GO/ZnO@CRL alcanzó 63% por encima de los obtenidos por la enzima libre, GO@CRL o ZnO@CRL . Además, luego de 14 ciclos de reuso el sistema biocatalizador mostró una retención del 90% de la actividad inicial.

En esta misma línea Zhang et al. [59] nano-alambres de ZnO se incorporaron de macroporos de óxido de silicio mediante crecimiento hidrotérmal *in situ* SiO_2/ZnO . La

inmovilización de la enzima CRL se llevó a cabo mediante adsorción. La CRL inmovilizada exhibió una mejor estabilidad térmica, reutilización y adaptabilidad al pH en comparación con la CRL libre. En la actividad catalítica, se logró una conversión molar máxima del 96,5% en condiciones óptimas. Después de doce reciclados, la lipasa inmovilizada retuvo el 89.9% de su actividad inicial.

Wang 2017 et al. [60] combinaron las propiedades magnéticas de Fe_3O_4 y la alta área superficial de los entramados orgánico-metálicos (MOFs). El compuesto resultante presenta buenas propiedades magnéticas y alta área superficial, cualidades que aplicaron en la inmovilización de la enzima CRL. Un estudio de la hidrólisis del aceite de oliva retuvo una actividad por encima de 65% a 65 °C durante 6 h. Mientras que la actividad se mantuvo hasta por 10 ciclos de reuso con un 60% de la actividad inicial.

2. INFLUENCIA DE LA INTERFASE EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA

La elección del tipo de inmovilización, y por consecuencia las especies moleculares que unirán a la enzima y el material soporte, determinarán las propiedades catalíticas, estabilidad térmica, mecánica y tolerancias al pH del sistema biocatalítico en los procesos de reacción y reuso. Se ha investigado especies moleculares con grupos funcionales específicos para este fin. Todas estas especies mejoran la actividad catalítica con referencia a la enzima libre.

Un proceso propuesto por Wang et al. 2009 [43] para la inmovilización de tres tipos de lipasa *porcine páncreas* (L1), *candida rugosa* (L2) y *pseudomonas cepacia* (L3) en nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 . Un estudio de la actividad de la enzima en comparación a la enzima libre y la adsorbida físicamente indica la alta actividad catalítica remanente de la enzima después de ser inmovilizada, presentando un rendimiento de 95.7, 70.1 y 82.6% para L1, L2 y L3, respectivamente.

Raita et al. 2015 [61] estudiaron la inmovilización de *thermomyces lanuginosus* lipasa (LIP) en Fe_3O_4 con 3 diferentes diseños en el ensamblaje para ello utilizaron 3-

aminopropil trietoxisilano (APTES) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisucinimida (NHS) y glutaraldehido (GA), siendo el sistema Fe₃O₄-AP-EN-LIP el que mostro alta actividad catalítica en la transesterificación de aceite de palma refinado, obteniéndose una conversión del 97.2% y una retención de su actividad mayor al 80% después de 5 ciclos de conversión. Ellos proponen un mecanismo para la inmovilización de la enzima, por ejemplo, en la Fe₃O₄-E-lipasa los grupos hidroxilo de las nanopartículas de Fe₃O₄ se activaron mediante EDC y posteriormente reaccionaron con los grupos carboxilo de la lipasa, y las moléculas de enzima sobre la superficie del biocatalizador se reticularon adicionalmente mediante glutaraldehido (GA) para obtener Fe₃O₄-E/G.

La lipasa *Burkholderia Cepacia* (BCL) fue inmovilizada en nanopartículas *core-shell* Fe₃O₄@SiO₂, [62], estas nanopartículas fueron funcionalizadas con Dimetiloctadecil [3-(trimetoxisilil) propil] amonio. Se obtiene un rendimiento de reacción de 90% para la conversión de aceite de oliva, reportándose también una retención de la actividad hasta 10 ciclos de conversión.

Mukherjee and Gupta 2016 [63] logran precipitar a *thermomyces lanuginosus* lipasa (TLL) en cluster de Fe₃O₄ con la ayuda de N-octil-b-D-glucopiranosido para la obtención de biodiesel a partir de aceite de soya. Obteniéndose rendimientos de reacción del 96% de conversión en 7 h.

Kisukuri et al. [64] empleó moléculas con grupo funcional tiol para la funcionalización de un compuesto *core-shell* Ag@Au y realizar un estudio de la influencia de la naturaleza y tamaño de estas moléculas en la actividad catalítica de la enzima lipasa. Los resultados concluyeron que la enzima inmovilizada con cisteína (menor longitud) presentó una mayor actividad en comparación a la enzima libre y que la enzima inmovilizada usando ácido mercapto undecanoico (mayor longitud). En el análisis del reuso, hubo una retención de la actividad catalítica hasta en tres ciclos. Sin embargo, la completa reacción ocurre hasta 12 horas de iniciada la reacción.

Si bien los sistemas catalíticos presentados aquí poseen ventajas que los convierte en potenciales catalizadores de aplicación industrial, aun faltan mejorar algunas propiedades, tales como soportes baratos, procediemitno de síntesis sencillos,

velocidades de conversión rápidos, así como mayores ciclos de reuso sin la pérdida considerable de su actividad catalítica. Estas características, favorecerían al sistema catalítico para convertirse en alternativas tecno-económicos.

CAPITULO IV. PARTE

EXPERIMENTAL

1. PARTE EXPERIMENTAL

1.1. Materiales

Tabla 4: Reactivos utilizados

REACTIVO	NOMENCLATURA	GRADO DE PUREZA	MARCA
Cloruro de hierro anhidro	FeCl ₂	98 %	Sigma-Aldrich
Metilamina	CH ₃ NH ₂	40% w/w	Sigma-Aldrich
(3-aminopropil) trietoxisilano	APTES	99%	Sigma-Aldrich
Lipasa <i>burkholderia cepacia</i>	BCL	≥30,000 U/g	Sigma-Aldrich
Ac. Glutámico	C ₅ H ₉ NO ₄	Analítico	Sigma-Aldrich
Hidróxido de calcio	Ca(OH) ₂	Técnico	Sigma-Aldrich
Glutaraldehído	C ₅ H ₈ O ₂	50%	Sigma-Aldrich
(R,S)-1-feniletanol	C ₈ H ₁₀ O	98%	Sigma-Aldrich
Vinil acetato	C ₄ H ₆ O ₂	99%	Sigma-Aldrich
Cloruro de cobalto hexa-hidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	ACS reagent	Merck
Fosfato de amonio dibásico	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Analítico	Merck
Dodecilsulfato sódico	SDS	Técnico	Alfa Aesar

Los materiales de vidrio fueron lavados con una solución de agua regia para eliminar todo residuo inorgánico. Para todos los procesos se usó agua ultra-pura (18.2 MΩ).

1.1. Síntesis Ferrita de Cobalto CoFe₂O₄

El óxido CoFe₂O₄ fue obtenido siguiendo un proceso de síntesis micelar.[65], [66] Se mezclaron dos soluciones acuosas acidificadas (HCl, 200 uL); 5 mL Fe (II) (FeCl₂, 1mmol), y 5mL Co (II) (CoCl₂.6H₂O, 0.5 mmol), en una relación molar de 2:1, con

18 mL de una solución de dodecilsulfato sódico (SDS, 4.5 mmol) por agitación magnética continua, a temperatura ambiente por 30 min. Esta nueva solución micelar se llevó hasta 80 °C, y se agregó 1.8 mL de solución de metilamina (CH_3NH_2 , 8.3M). La solución se tornó rápidamente de color verde, y a los pocos minutos (7-10 min) cambia a marrón. La agitación continúa por 3h manteniendo la temperatura (80 °C). Finalizada la reacción, el producto obtenido se separa magnéticamente y es lavado por 10 tiempos con agua y solución 5% NH_3 . Finalmente, las nanopartículas fueron dispersadas en etanol.

1.2. Síntesis de Nanocompósito $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

La formación del nanocompósito se realizó por un método de precipitación.[67] Para ello, 200 mg de CoFe_2O_4 se disolvió en 10 mL de agua destilada, se adiciona 15ml de una solución de ácido glutámico (500mg), con agitación constante, regulando el pH a 6. La mezcla se llevó a una temperatura de 80 °C por dos horas. Finalmente, se procedió a la separación y lavado del material sólido.

A 100 mL de una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.09 mmol) se le adicionó al material CoFe_2O_4 , con el ácido glutámico adsorbido, con agitación constante. Pasados 30 min de reacción es adicionado, gota a gota, una solución (H_2O :etanol, 1:1) de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (1.5 mmol). Esta solución presenta un pH de 8, y es agitado por 40 min. Por último, se ajusta el pH a 11, y se deja reaccionando por 24 h a temperatura ambiente.

1.3. Funcionalización de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ con APTES

Se utilizó una masa de 150 mg de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$, el cual fue dispersado en 8mL de tolueno mediante sonicación por 10 min. Una solución conteniendo 3mL de APTES se adicionó rápidamente a la dispersión de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ en sonicación continua por 10 min. La mezcla resultante se llevó a 120 °C en agitación mecánica por 12 h. Finalizada la reacción, el producto obtenido se separó magnéticamente y se lavó 6 veces con etanol y se secó a 80 °C por 12 h.

1.4. Ensayos Enzimáticos

1.4.1. Solución enzimática

Se adicionó 100 mg de enzima lipasa a 1 mL de solución buffer de fosfato de pH (6, 7 y 8) (PBS, 20mM). Esta solución fue agitada y centrifugada a 800 rpm durante 10 min y 10°C. Se descartó el precipitado y se tomó 50 uL de la solución para su cuantificación por el método de Bradford.

1.4.2. Inmovilización de BCL por adsorción

Se disolvió 3 mg de CoFe₂O₄/HAP en 1 mL de solución enzimática con pH (6, 7 y 8) de la solución tampón a fin de determinar el pH óptimo que presente mayor inmovilización de la enzima. Se mezcló en un equipo de agitación *thermomixer*® a 800 rpm y 15 °C y 12 h de reacción. La enzima inmovilizada (SisBioN-1) fue determinada por el método de Bradford.

1.4.3. Inmovilización de BCL por enlace covalente

Se procedió con un proceso de activación de CoFe₂O₄/HAP-APTES con glutaraldehído (Glu). Para ello, se disolvió 3 mg de CoFe₂O₄/HAP-APTES en 1 mL de solución etanólica conteniendo 50 uL de H₂O y 60 uL de glutaraldehído y se dejó agitando en un *thermomixer*® a 800 rpm y 40 °C y 2 h de reacción. Luego, se desecha el sobrenadante y se adiciona 1 mL de solución enzimática con pH (6, 7 y 8) de la solución tampón a fin de determinar el pH óptimo que presente mayor inmovilización de la enzima. Esta mezcla fue colocada en un equipo de agitación *thermomixer*® a 800 rpm y 15 °C y 12 h de reacción. La enzima inmovilizada (SisBioN-2) fue determinada por el método de Bradford.

1.4.4. Ensayo de Actividad Enzimática de BCL

Se tomó 3 mg del material con la enzima inmovilizada, previamente secada, y se adicionó a un microtubo (*ependorf*®, 2 mL) juntamente con 1 mL de solvente

orgánico conteniendo 0.002 mmol de (*R,S*)-1-feniletanol y 0.007 mmol de vinil acetato. Esta mezcla se colocó en un equipo de agitación *thermomixer*® a 800 rpm y 35 °C. Los productos de reacción fueron cuantificados con un cromatógrafo GC-FID.

2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

El análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM), fueron obtenidos usando un equipo JEOL FEG-SEM JSM 6330F, operado a 5kV. Las muestras para análisis por SEM fueron preparados por goteo (2 uL) de una solución de la dispersión de NPs en una placa (1 cm²) y secado a temperatura ambiente.

Se determinó las características superficiales de las muestras nanoparticuladas, tales como área, tamaño y volumen de poro, por análisis superficial BET (Brunauer-Emmett-Teller). Para ello, 100 mg de material se secó durante toda la noche. Luego, se trituró el material para separar las partículas más pequeñas con el uso de una malla de 100 um. Previo al análisis, se pesó 50 mg del material y se desgasificó a 200 °C por 2h. El análisis fue hecho con un equipo micromeritics GEMINI VII.

Las medidas de las curvas de magnetización fueron llevadas a cabo usando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) a temperatura ambiente. Se trituró el material para separar las partículas más pequeñas con el uso de una malla de 100 um. Finalmente, se introdujo el material fino en una porta muestra de plástico de 10mm de longitud y 4 mm de ancho hasta cubrir la mitad del volumen.

Los difractogramas fueron obtenidos usando un equipo difractómetro de rayos-X Bruker D2 Phaser, equipado con una fuente de Cu K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), con una ventana de 20-90° (2 θ), usando un paso de escaneo de 0.05°.

Los espectros IR fueron obtenidos usando un equipo espectrofotómetro Bruker Alpha FT-IR-DRS con pastilla, entre 400 cm⁻¹ hasta 4000 cm⁻¹ de longitud de onda.

Para la cuantificación de los productos de la reacción enzimática, se utilizó un cromatógrafo de gases GC-17A, equipado con detector FID, usando hidrógeno como

gas de arrastre (100 kPa). La columna utilizada para la determinación de exceso enantiomérico fue Chirasil-Dex CB β -cyclodextrin (20 m x 0.25 mm).

CAPITULO V. RESULTADOS Y

DISCUSIONES

1. NANOPARTICULAS DE CoFe_2O_4

1.1. Formación de la fase sólida CoFe_2O_4 por micelas normales

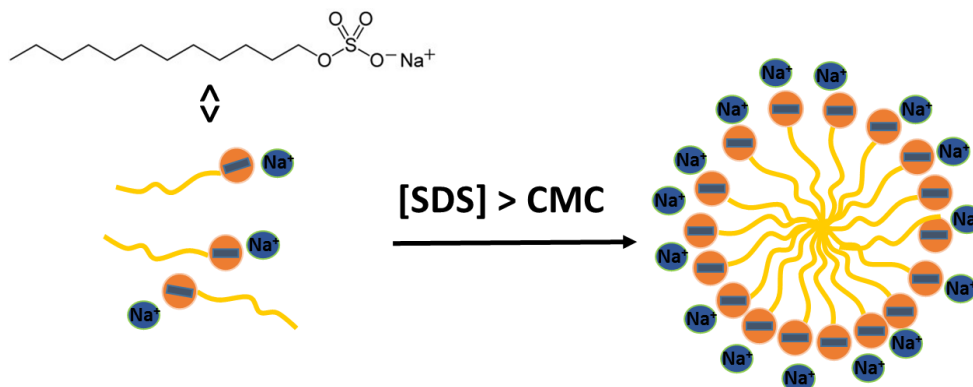
El proceso por el cual se da la formación de la fase sólida CoFe_2O_4 se divide en tres etapas. Cada etapa cubre la importancia necesaria para obtener la fase sólida final con las características físicas y químicas esperadas. Los parámetros usados se establecieron de acuerdo a ensayos en el laboratorio y referencias ya mencionadas. Estas partes son:

1. Formación de micelas
2. Interacción micelas-precursores en solución
3. Formación de la fase solida

1.1.1. Formación de micelas

La primera etapa es la formación de micelas a partir del surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) (**Esquema 2**) en medio acuoso. Este proceso ocurre por el ordenamiento espacial de varios monómeros, de acuerdo con la polaridad del medio, hacia la formación de micelas esféricas (**Esquema 2**). La parte polar del dodecil sulfato iónico (DS^-) se orienta hacia el exterior y la cadena carbonada apolar, hacia el centro de este conjunto esférico. Sin embargo, no se produce la ionización completa de los monómeros, es decir el contraión sodio Na^+ sigue interaccionando con el monómero, al igual que moléculas de agua, estabilizando a las micelas, $\text{Na}_x\text{Fe}_y\text{Co}_z(\text{DS})_n$. La forma y presencia de las micelas van a depender del tipo de surfactante y de su concentración micelar crítica (CMC), para el SDS la CMC es de 8.25 mM [12]. Se trabajó por encima de esta concentración (1.5 veces la CMC) para favorecer la formación de micelas. Sin embargo, la formación de micelas se ve alterada por factores externos, tales como la temperatura de reacción (80 °C) que decrece la concentración a la cual el surfactante

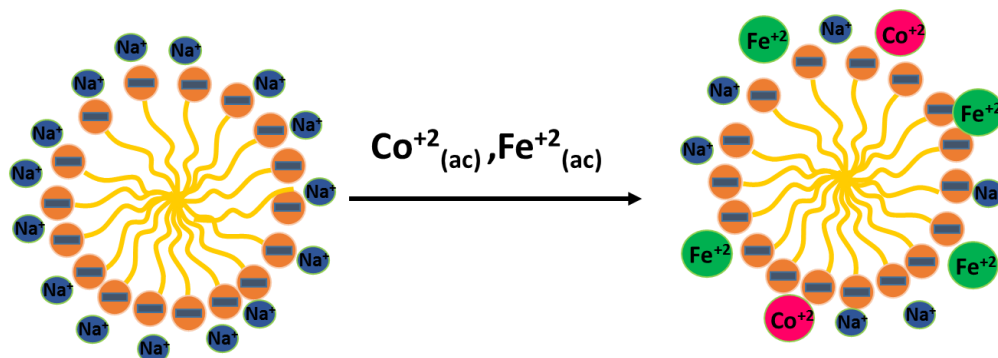
pueda formar micelas, la presencia de iones hierro (Fe (II)) y cobalto (Co (II)) que también producirían una disminución de la CMC. [10]



Esquema 2: Formación de micelas al alcanzar la CMC del surfactante

1.1.2. Interacción micelas-precursores en solución

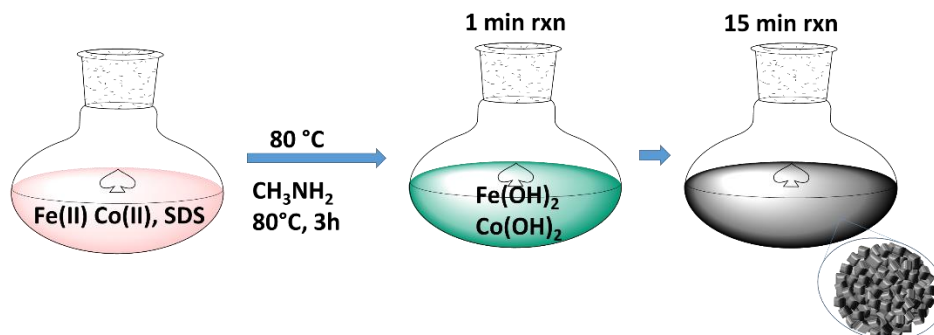
Al mezclar las soluciones ácidas de Fe (II) y Co (II) con la solución micelar, estas interaccionan para formar un nuevo sistema micelar. En este proceso de formación del nuevo sistema, existe competencia entre acuo complejos, $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_N]^{2+}$ y $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_N]^{2+}$, frente a los iones $\text{Na}(\text{I})$ y moléculas de H_2O presentes en la esfera de coordinación de la micela, dando paso a un proceso de complejación de los acuo-complejos metálicos con las cabezas aniónicas de la micela [68]. La acidez inicial de la solución de Fe (II) y Co (II) es importantes para la presencia de ligandos acuo ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}$) capaz de sustituirse (ligando lábil) en el proceso de complejación con el anión SD^- de la micela (**Esquema 3**).



Esquema 3: Esquema de proceso de complejación

1.1.3. Formación de la fase sólida

El proceso de formación de las NPs de CoFe_2O_4 (**Esquema 4**), se inicia con el calentamiento de la mezcla micela-Fe (II)-Co (II) a $80\text{ }^\circ\text{C}$. La adición rápida de una solución básica de metilamina (CH_3NH_2) a $80\text{ }^\circ\text{C}$ provoca un aumento de pH a 11 y un cambio brusco en la coloración de la mezcla (rosado pastel) hacia un verde esmeralda. Esta coloración se debería a la formación de un hidróxido doble laminar (LDH) llamada *Green rust* [69], el cual está compuesta de láminas de hidróxido de Fe(II), Co(II) y una fracción de Fe(III), que genera carga positiva. Presenta estructura brucita y la carga positiva de estas laminas se puede estabilizar con aniones interlaminares (Cl^- , NO_3^- , ClO_4^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-}) [70]. En nuestra mezcla de reacción se encuentra el anión cloruro (Cl^-) que formaría parte del compuesto laminar. Por otro lado, la presencia del surfactante SDS formando micelas e interactuando con los acuo-complejos de Fe(II) y Co(II), nos sugeriría la formación rápida de nanocristales de CoFe_2O_4 . Sin embargo, estudios realizados por Cannas et al. [71] observaron la presencia de platos hexagonales de tamaño promedio en el rango de 100-250 nm con espesor de 7-9 nm del hidróxido doble laminar, además de la presencia de pequeños conjuntos de nanocristales en los bordes o esquinas de los platos hexagonales. Esto sugiere la separación del enlace inicial Fe(II), Co(II)-(DS⁻) presente en la micela, debido a que DS⁻ es un nucleófilo débil en comparación con los iones hidróxido formados [68]. Sin embargo, las micelas con carga negativa y en exceso pueden alojarse entre las láminas por intercambio con Cl^- [72]. Sin embargo, las micelas al tener diámetros mayores al Cl^- provocan la inestabilidad de la estructura del *Green rust*.



Esquema 4: Esquema de formación de NPs CoFe_2O_4 .

Por otro lado, la formación de *Green rust* ocurre alrededor de pH 7. Pasado este pH, surge la formación de oxi-hidróxidos u óxidos. Específicamente, al alcanzar el pH 11 se favorece la formación del óxido doble de Fe-Co (CoFe_2O_4) mediante la oxidación total de Fe(II) a Fe(III), el cual es conducido por el oxígeno gaseoso ($\text{O}_{2(g)}$) presente en el aire. El uso de metilamina (CH_3NH_2), compuesto básico ($\text{pK}_b = 3.36$), usado para aumentar el pH del medio de reacción es elegido en lugar de las bases comunes como el hidróxido de sodio (NaOH) o amoníaco (NH_3 , $\text{pK}_b = 7.74$). Esto debido a que la CH_3NH_2 es una base que controla la reacción de hidrolisis y condensación en una velocidad menor al OH^- pero mayor que el NH_3 .

Por otro lado, el surfactante SDS, además de cumplir con la función de estabilizar las NPs al final de la reacción, evitando la aglomeración entre ellas mediante una barrera estérica; también cumple con contralar los procesos de nucleación y crecimiento. Este surfactante en su forma micelar se coordina a los precursores formados en el proceso de condensación de las unidades acuo-complejos $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_N]^{2+}$ que dirigen a una nucleación controlada. Por otro lado, en el proceso de crecimiento, el surfactante influye directamente en la formación del sólido por la variación de la energía superficial. Para una partícula esférica, la energía libre de Gibbs está relacionada directamente con la tensión superficial (γ) del medio que la rodea.

A medida que transcurre el tiempo la coloración verdosa se torna a un color marrón, lo cual evidencia de la formación de la ferrita CoFe_2O_4 . En referencia a la formación de las NPs (conjunto de nanocristales), al inicio de la reacción no se observaron cristales individuales o conjuntos de nanocristales aislados de los platos hexagonales, por lo que concluyeron que la formación de los primeros conjuntos de nanocristales provienen del ‘desgaste’ de los platos hexagonales [71]. En esta parte, la presencia de las micelas favorecen la formación de los nanocristales individuales y su agrupación, debido a la interacción con los iones Fe(II) y Co(II) . Por ello, los análisis TEM hasta 30 min de iniciada la reacción, hechos por Cannas et al. [71], se observa el desgaste de los platos hexagonales para la formación de conjuntos esféricos de nanocristales. La reacción prosigue por 3h para que la etapa de crecimiento y cristalización, en las cuales los conjuntos de las NPs formen tamaños más estrechos en promedio y alcance una distribución más ordenada de los átomos que lo constituyen, esto favorecida por la temperatura. Obteniéndose así, NPs esféricas formadas por nanocristales.

1.2. Caracterización de nanopartículas CoFe_2O_4

1.2.1. Difracción de rayos X (DRX)

En la **Figura 16** se muestra el difractograma de rayos X de CoFe_2O_4 , donde se muestran los picos cristalinos de la estructura cubica centrada en las caras (FCC) de espinela inversa (PDF Card 22-1086). Los principales picos 2θ son: 30.1° (220), 35.4° (311), 43.1° (400), 56.9° (511) y 62.5° (440). De acuerdo con la ecuación Debye-Scherrer el tamaño promedio de la cristalita es de 15 nm, este valor es calculado a partir de la amplitud de la mitad del pico más intenso (311). Esto concuerda con el ensanchamiento de la amplitud de los picos cristalinos resultantes. Es decir, el ensanchamiento del pico de difracción se relaciona con una disminución del tamaño de cristalita de las NPs. Esto nos sugiere que la nanopartícula está formada por agrupación de cristalitas como lo sugiere el método de micelas normales en la que el surfactante dodecil sulfato de sodio (SDS) juega un papel importante de acuerdo con su concentración y acción, lo cual se discutió previamente.

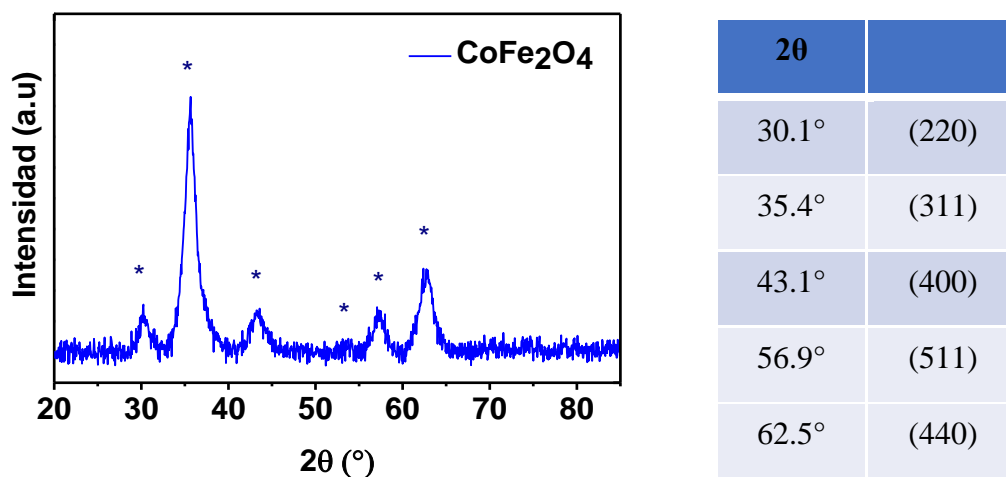


Figura 16: DRX de CoFe_2O_4

Cannas et.al [73] estudiaron la influencia de la temperatura en el tamaño de cristalita, los resultados de DRX mostró que los picos se vuelven progresivamente más amplios en las muestras sintetizadas a temperaturas más bajas, y los picos menos intensos desaparecen a 50 °C. La ecuación de Debye-Scherrer para cada una de estas difracciones corrobora el descenso de tamaño de cristalita con el descenso de la temperatura. Nosotros elegimos la temperatura de reacción a 80 °C debido a que aún se aprovecha la formación total de la ferrita deseada con una buena estabilidad para evitar la oxidación a otras fases de los respectivos iones metálicos y una mayor cristalinidad de las muestras que influyen en las propiedades magnéticas.[73]

1.2.2. Espectroscopía infrarrojo (FTIR)

Una etapa muy importante, posterior a la síntesis de nanopartículas, es la remoción del surfactante adsorbido en la superficie de la NP sintetizada, más aún si en la siguiente etapa nosotros requerimos anclar una molécula que controlará la morfología y el crecimiento de la HAP en esta superficie. Se requiere entonces, una superficie libre de materiales orgánicos, sales o surfactantes que dificulten la funcionalización eficiente del material nanoparticulado.

Se presentaron dos dificultades para la rápida remoción del surfactante, la primera es la concentración, ya que se utilizó 3 veces la cantidad molar de SDS con respecto a las moles de los iones Fe(II) y Co(II), y la segunda dificultad es la afinidad de los cationes de Fe(III) y Co(II), presentes en el óxido, con la parte polar del SDS ($R-SO_4^-$). Debido a la fuerte afinidad que se presenta, un simple lavado con agua destilada no es suficiente. Se procedió entonces con intensos lavados y el uso de sonicación. Se utilizó amoníaco diluido para una mejor remoción del SDS mediante saturación del sistema con iones amonio que interactúan con el ión (SD^-) del surfactante presente en la superficie de las NPs. El proceso de sonicación se utilizó para permitir una mayor difusión del amoníaco en su objetivo de retirar el surfactante, tanto en la superficie mas expuesta, así como en las cavidades de los poros formados.

La **Figura 17** muestra la comparación del surfactante utilizado SDS y la muestra de ferrita $CoFe_2O_4$; las principales bandas del SDS están alrededor de 2915, 2848 y 1220 cm^{-1} que corresponden los enlaces C-H y S=O de la parte polar $-SO_3^-$, y C-H de la cadena carbonada, respectivamente. Estos picos no se observan en el espectro de la muestra de $CoFe_2O_4$, el cual presenta un pico alrededor de 595 cm^{-1} de la vibración por tensión de M-O presentes en los sitios tetraedros y octaedros de la fase ferrita [73][74].

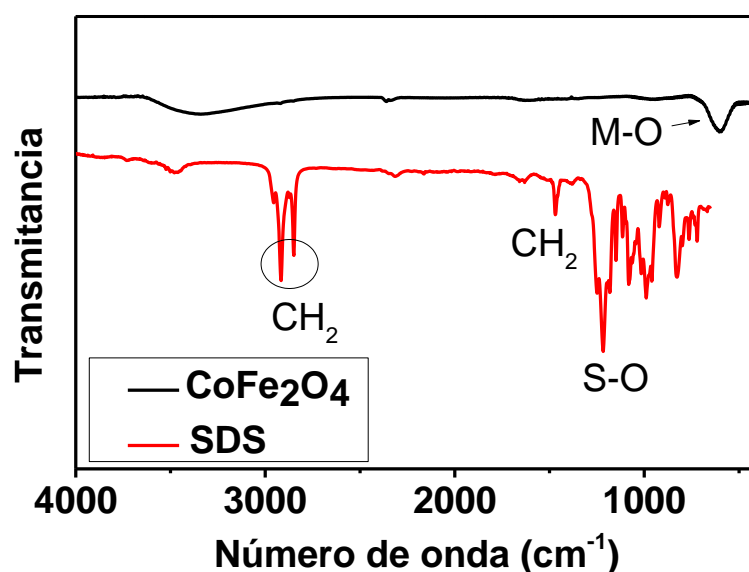


Figura 17: FTIR de $CoFe_2O_4$ y SDS

1.2.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Se observa en las imágenes SEM, las NPs con tamaño promedio de 100 nm (**Figura 18**) conformado por nanocristales agrupados, según lo sugiere el método de síntesis y nuestros análisis de difracción de rayos X. La estabilidad estructural de estas NPs se evidencia claramente, ya que para este análisis se procedió con procesos intensos de lavado y sonicación. Además, el proceso de lavado para la eliminación del surfactante SDS se evidencia porque no se observa algún contraste ocasionado por la presencia de algún otro material.

Se evidencia una morfología diferente al de una NP esférica uniforme compacto. Esto favorece a una mayor área superficial, ya que para un mismo diámetro de NP esférica uniforme presentará menor área superficial que una NP esférica con una superficie irregular. En este sentido, el surfactante SDS cumple con la función de definir la morfología de la NP final, debido a que evita la formación uniforme superficialmente, por impedimento estérico de las micelas en el proceso de crecimiento y formación de la NP final en el proceso de agrupación de las cristalitas.

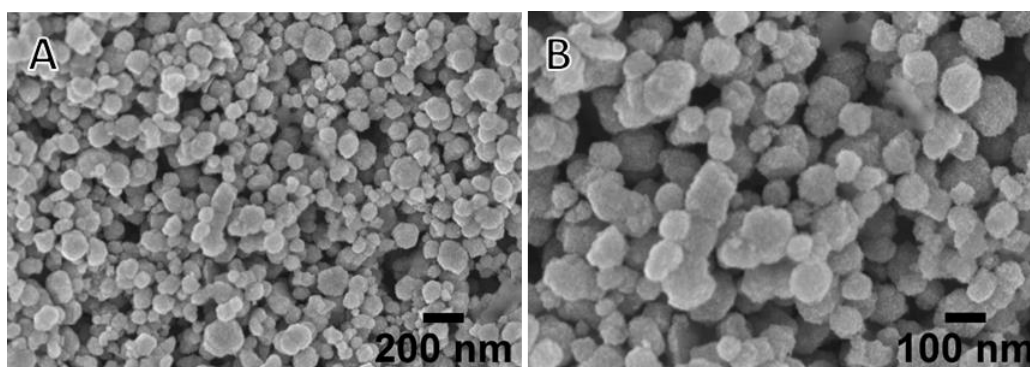


Figura 18: Imagen SEM de CoFe_2O_4

1.2.4. Análisis superficial BET

El análisis superficial fue obtenido mediante técnica de adsorción de nitrógeno usando la teoría de Brunauer-Emmett-Teller. La **Figura 19** muestra la isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno y la distribución del tamaño de poro para CoFe_2O_4 . Las

partículas muestran una isoterma tipo II, de acuerdo con la clasificación IUPAC, además de no presentarse fenómeno de histéresis. El área superficial obtenido fue de 227.20 m²/g, un valor relativamente alto para estos materiales. Por otro lado, el tamaño y volumen de poro obtenido por la BJH-desorción fue de 4.79 nm y 0.118 cm³/g, respectivamente.

Los valores obtenidos se resumen en la **Tabla 5**. Estos valores sugieren que las nanopartículas presentan poros de tipo mesoporos, además de no presentan agregación en las etapas de síntesis o en los procesos de lavado o secado.

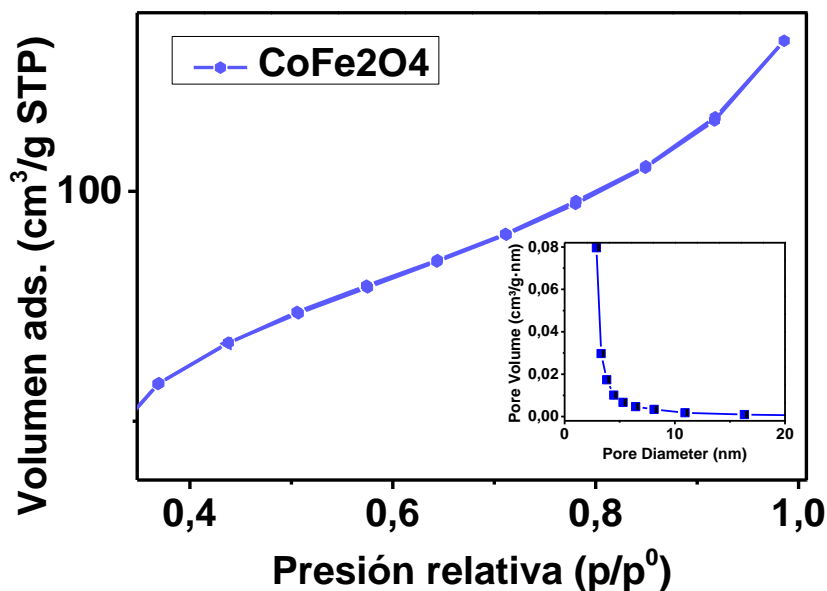


Figura 19: Análisis superficial BET de CoFe₂O₄

Tabla 5: Valores obtenidos del análisis BET

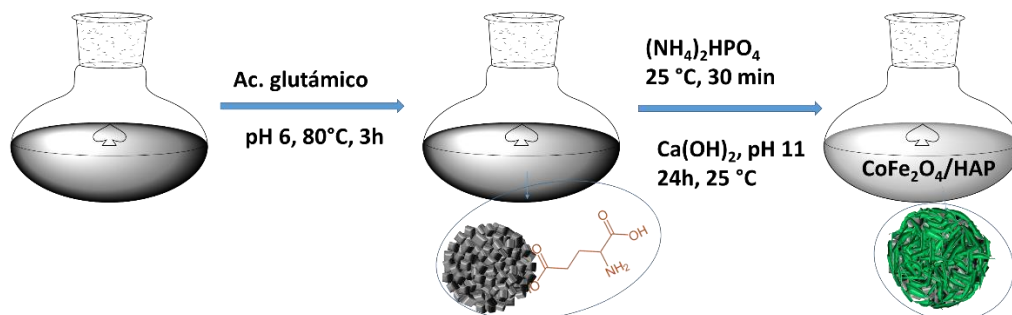
	Área superficial BET (m ² /g)	Volumen poro BJH (cm ³ /g)	Tamaño poro BJH (nm)
CoFe ₂ O ₄	227.20	0.118	4.79

Tal como vimos en las discusiones anteriores, la elevada área superficial obtenida de CoFe_2O_4 se debe principalmente a la función que cumple el surfactante SDS en el proceso de agrupación de las cristalitas que componen a la NP. A medida que la partícula se va formando, el impedimento estérico por parte de las micelas adsorbidas en ciertas áreas de la superficie evita el crecimiento uniforme, en términos de la morfología. Así, luego de eliminar el SDS adsorbido mediante procesos de lavado, se obtiene cavidades (poros) que aumentan el área superficial.

2. NANOCOMPÓSITO $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

2.1. Formación de la fase sólida

El proceso de formación HAP en la superficie de las NPs de CoFe_2O_4 se da en cuatro (04) etapas (**Esquema 5**): i) En primer lugar, la adsorción de moléculas de ácido glutámico en la superficie de las NPs del ácido. Esto, con el fin de controlar el proceso de formación de la HAP, específicamente en la morfología. ii) En medio ácido la adsorción de los iones hidrogeno fosfato (HPO_4^{2-}) provenientes de la sal disuelta de fosfato de amonio dibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), se da por interacción directa con Fe(III) y Co(II) superficiales, y por interacción electrostática entre los grupos funcionales $-\text{NH}_2$ del ácido glutámico adsorbidos en la superficie de las NPs. iii) El agregado de una solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ lleva al sistema a un $\text{pH}=8$ en el cual se inicia la formación de la HAP por precipitación química, a este pH la reacción se torna favorablemente lenta para que el proceso de nucleación se vea favorecida en la superficie de las NPs [4]. Este proceso continuo por 40 min. iv) Por último, se da el aumento de pH con una solución de amoníaco hasta alcanzar un pH de 11, esto con la finalidad de mejorar la cristalinidad de las NPs. Otro factor que favorece la cristalinidad es la temperatura de reacción, sin embargo se elige la temperatura ambiente con la finalidad de favorecer la obtención de mayor área superficial [75].



Esquema 5: Esquema de formación del nanocompuesto $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

2.1. Caracterización de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

2.1.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

La **Figura 20** muestra una comparación de los espectros IR de CoFe_2O_4 y $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$. Las bandas de absorción de la HAP en el espectro IR son observadas. Una absorción en 558 y 608 cm^{-1} son atribuidos a la vibraciones de flexión de O-P-O (PO_4^{3-}) y alrededor de 1035 cm^{-1} es debido a la vibración por tensión asimétrica del grupo (PO_4^{3-}) [76]. Por otro lado, se presenta una mayor banda de absorción del grupo OH que se atribuye al H_2O adsorbido y al OH presente en la estructura de la HAP.

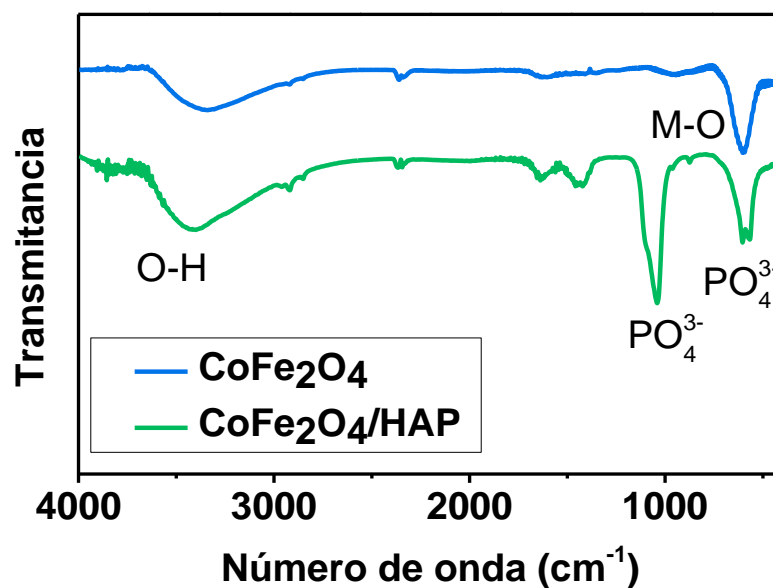


Figura 20: FT-IR de CoFe_2O_4 y $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

Además, se presentan un pequeño pero amplio pico alrededor de 1454 cm^{-1} , el cual es característico del NH_4^+ , que puede provenir del ácido glutámico presente en el nanocompósito formado.

2.1.2. Difracción de rayos-X (DRX)

Un análisis de DRX (**Figura 21**) del compósito nos confirma la presencia de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que cristaliza con estructura hexagonal y pertenece al grupo de simetría P63/m, el cual presenta los siguientes picos de difracción: 25.9° (002), 31.8° (211), 46.7° (222) y 49.5° (213).

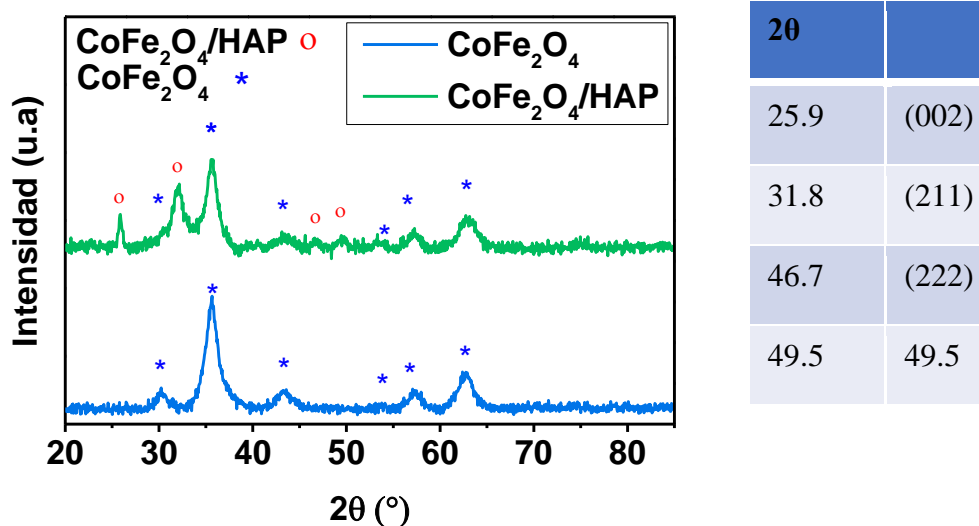


Figura 21: Difractograma de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ y CoFe_2O_4

Una comparación con el difractograma de la muestra de ferrita CoFe_2O_4 corrobora la permanencia de los picos de difracción en el compósito $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$, con lo cual podemos afirmar que no se presentaron cambios de fase del óxido CoFe_2O_4 . Por otro lado, se observa una disminución en la intensidad del pico de CoFe_2O_4 , correspondiente al plano (311) lo cual sugiere un efecto de blindaje por parte de la HAP.[76]

2.1.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La **Figura 22** muestra la imagen SEM del compuesto $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$. Una comparación de las imágenes SEM entre $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ y CoFe_2O_4 nos da la posibilidad de inferir que la HAP se encuentra cubriendo la superficie del óxido, esto debido a que no se observa algún contraste que nos sugiera el crecimiento de HAP aislada o CoFe_2O_4 sin recubrir.

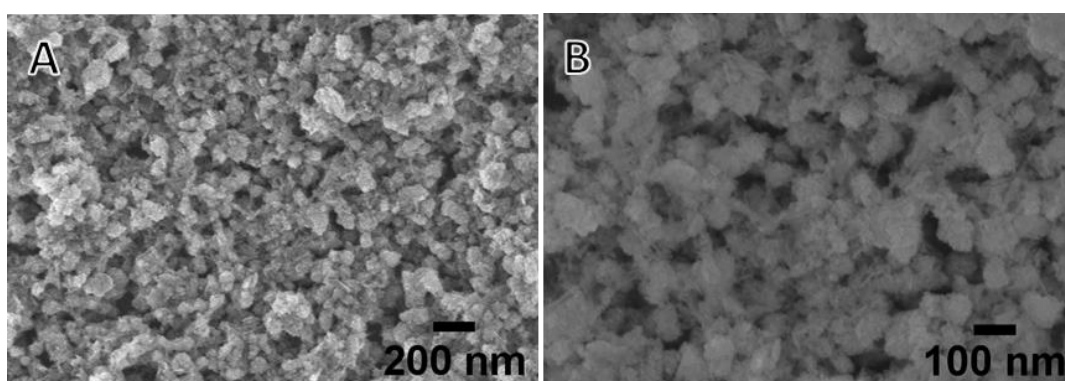


Figura 22:: Imagen SEM de NPs $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

Por otro lado, se observa que la superficie de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ presenta una forma cuasi esférica y morfología irregular, esto se podría deber a la utilización del ácido glutámico que sirve como direccionador del crecimiento [76] [77]. Esto se confirmará con un análisis BET. Esta posible porosidad favorece al aumento del área superficial, el cual es de suma importancia en materiales utilizados como soportes porque permite la funcionalización y/o adsorción de mayor cantidad de unidades químicas o bioquímicas. Para nuestro propósito, la funcionalización con moléculas de anclaje y la adsorción directa de las enzimas se multiplicaría con la presencia de la elevada área superficial obtenida. Mas aun, el proceso de formación de la cubierta (*shell*) de HAP asegura un entorno superficial biocompatible que necesita las enzimas a fin de evitar su desnaturalización o sufrir una disminución de las propiedades catalíticas.

Para confirmar las características superficiales como área superficial, tamaño y volumen de poro del nanocompuesto, se procedió a realizar un análisis superficial BET.

2.1.4. Análisis Superficial BET

La **Figura 23** muestra la isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno y la distribución del tamaño de poro para $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$. Las partículas muestran una isoterma tipo IV, de acuerdo con la clasificación IUPAC, además se observa el fenómeno de histéresis. El área superficial obtenido fue de $161.47 \text{ m}^2/\text{g}$. Por otro lado, el tamaño y volumen de poro obtenido por la desorción BJH (Barrett-Joyner-Halenda) fue de 6.23 nm y $0.143 \text{ cm}^3/\text{g}$, respectivamente. Los valores obtenidos se resumen en la **Tabla 6**. Estos valores sugieren que las nanopartículas presentan poros de tipo mesoporos con tipo de histéresis H4 y forma de poro tipo rendijas.

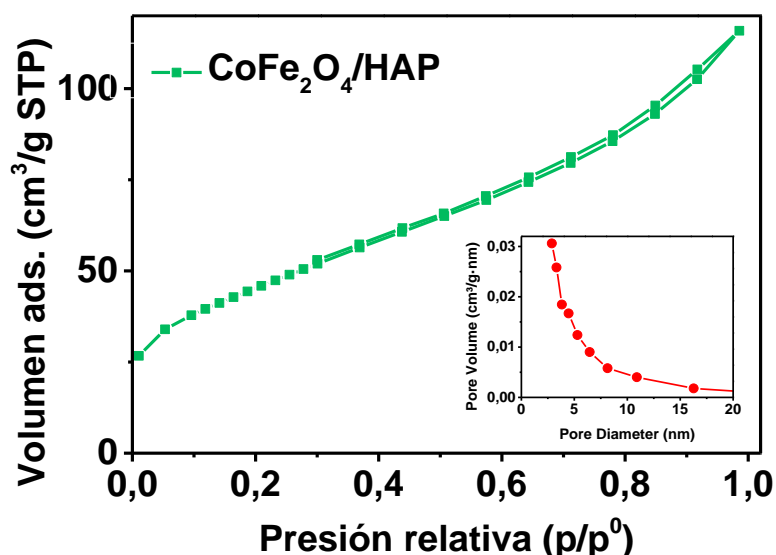


Figura 23: BET de NPs $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

Tabla 6: Valores obtenidos por análisis superficial

	Área superficial BET (m^2/g)	Volumen poro BJH (cm^3/g)	Tamaño poro BJH (nm)
<u>$\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$</u>	161.47	0.143	6.23

Si bien el nanocompósito $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ ($161.47 \text{ m}^2/\text{g}$) presenta un valor menor que el de las NPs de CoFe_2O_4 ($227.20 \text{ m}^2/\text{g}$), aun es un valor relativamente alto para este

tipo de materiales. Por otro lado, el tamaño de poro obtenido permite alojar en su interior unidades enzimáticas, consiguiendo mayor adsorción en la superficie mas expuesto. Entonces, la relación masa enzimática/gramo de soporte ($\text{mg/g}_{\text{material}}$) que se obtendrá mediante la inmovilización, permitiría el uso de menor masa de los sistemas bio-nanocompósito catalíticos ($\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-Enzima}$). Esto resultaría de suma importancia desde el punto de vista tecno-económico y ambiental, al reducir costos en la producción del material nanocompósito.

2.1.5. Medidas magnéticas VSM

La **Figura 24** muestra las medidas de las curvas de magnetización. Los valores de saturación magnética (M_s) cuantificadas para CoFe_2O_4 y $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ son 45.09 emu/g y 12.04 emu/g, respectivamente. Además, se observa el fenómeno de histéresis, lo cual corresponde a materiales ferrimagnéticos como CoFe_2O_4 . Para una mayor claridad, presentamos un panel con el aumento de una zona específica de las curvas de magnetización. Observamos que el compuesto $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ retiene el fenómeno de histéresis, pero en menor medida. La disminución de M_s del compuesto se debe a la presencia de la HAP en la superficie, debido a que disminuye la interacción dipolar entre las nanopartículas magnéticas (CoFe_2O_4) del compuesto. [78]

Aunque el nanocompuesto $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ presenta un M_s 4 veces menor de que de las NPs CoFe_2O_4 (45.09 emu/g), aún conserva excelentes propiedades para la recuperación magnética después de su uso, con la aplicación de campos magnéticos externos.

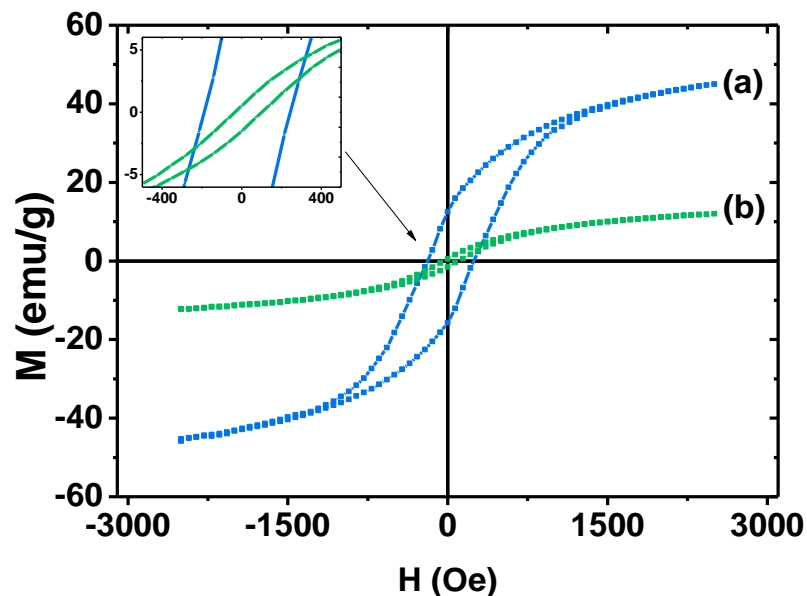


Figura 24: Análisis VSM de CoFe_2O_4 (a) y $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ (b)

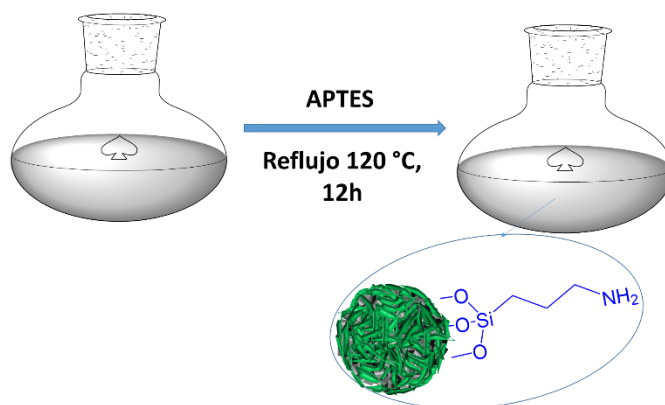
Por otro lado, la disminución de la histéresis favorece los procesos de recuperación y catálisis en las etapas de reuso de los sistemas $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -Enzima. Una amplia histéresis produce la retención de señal magnética luego de retirar el campo magnético externo, llamada magnetismo remanente (M_R). Esto lleva a la aglomeración de las nanopartículas, que a su vez ocasiona la restricción de algunas enzimas para cumplir la función de catalizar, disminuyendo la velocidad en el proceso catalítico. Sin embargo, el nanocompósito $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ presentaría un valor mínimo de magnetismo remanente, el cual no ocasionaría dicha aglomeración y, en consecuencia, la totalidad de las enzimas inmovilizadas podrían actuar en el proceso de catálisis.

3. FUNCIONALIZACIÓN DE NANOCOMPÓSITO $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

La funcionalización de la superficie del material nanoparticulado, con especies moleculares, se da con la finalidad de inmovilizar covalentemente a la enzima lipasa. El uso de una molécula que se enlace covalentemente a la superficie del material

nanoparticulado se denomina ‘espaciador’, debido a que está presente en la interfase uniendo a la superficie de la nanopartícula y la enzima.

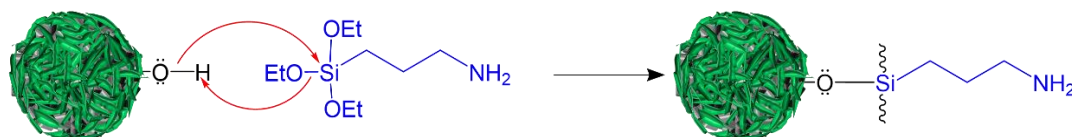
Una molécula ampliamente utilizada es el (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES), un organosilano que presenta un grupo propil con grupo funcional amino y tres grupos etóxidos. El enlace Si-(OC₂H₅) es de fácil hidrolización en medio acuoso con la eliminación de alcohol CH₃CH₂OH y formación del enlace Si-OH el cual condensa a una forma mas estable para la formación de un siloxano Si-O-Si, formando finalmente un oligómero ramificado.[79] Por otro lado, en presencia de un sólido con grupos OH superficiales, se da la competencia entre la oligomerización de APTES y la formación de enlace con la superficie hidrolizada (funcionalización), formando el enlace (sólido-O-Si(OH)₂R). Esta reacción es llamada silanización. Sin embargo, muchas veces esta competencia no lleva a una buena funcionalización de la superficie del sólido, promoviéndose la oligomerización en mayor medida. Por ello, solventes orgánicos anhidros son una buena alternativa para el control del proceso dirigiendo la reacción a la funcionalización de la superficie.



Esquema 6: Esquema de la funcionalización de CoFe₂O₄/HAP con APTES

La hidroxiapatita (HAP) presenta grupos OH superficiales, los cuales son candidatos a la funcionalización. Para ello, usamos tolueno como solvente y condiciones de reflujo (**Esquema 6**). Completándose la reacción en 12h. El mecanismo de silanización se explica por la policondensación de APTES debido a la presencia de

una superficie hidratada y por la unión covalente con los oxígenos de los hidróxidos presentes en la estructura de la HAP (**Esquema 7**). [79]



Esquema 7: Mecanismo de silanización

Con el fin de determinar la funcionalización de la superficie del material nanocompuesto $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ realizamos un análisis por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) (**Figura 25**). El cual muestra, además de la presencia de los elementos pertenecientes al nanocompuesto, a los elementos Si, C y N con porcentajes atómicos de 3.02, 16.87% y 6.00%, respectivamente (**Tabla 7**). Confirmando la presencia de APTES en el producto final por la funcionalización de la superficie del material nanoparticulado.

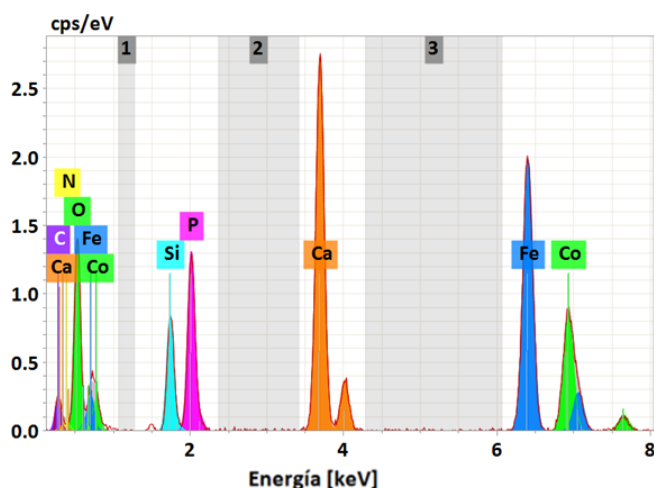


Figura 25: EDS del material $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-APTES}$

Tabla 7: Datos porcentuales elementales del análisis EDS

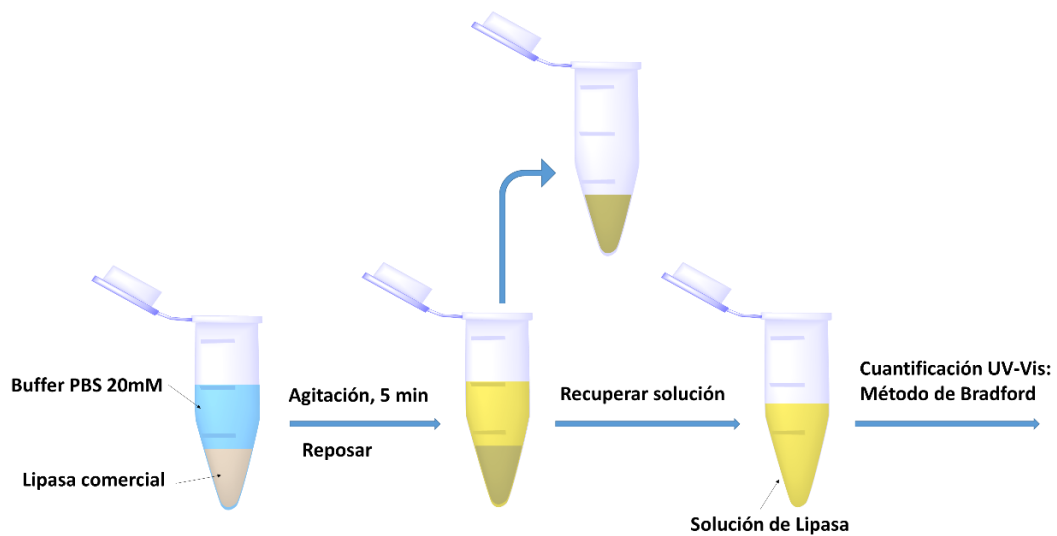
<i>Elemento</i>	<i>Masa normal (%)</i>	<i>% Atómico</i>	<i>Error abs. (%)</i>
<i>Ca</i>	14.93	9.46	0.46
<i>C</i>	7.98	16.87	1.43
<i>O</i>	27.2	43.17	3.56
<i>Fe</i>	24.16	10.98	0.66
<i>Co</i>	13.19	5.68	0.38
<i>Si</i>	3.34	3.02	0.17
<i>P</i>	5.89	4.82	0.25
<i>N</i>	3.31	6.00	0.84
<i>suma</i>	100.00	100.00	

Para la etapa de anclaje de las enzimas mediante enlace covalente, cabe mencionar que el APTES no se enlazar  directamente a la enzima ya que precisa de una previa reacción con glutaraldehído (Glu), un proceso que llamaremos activación de la nanop rticula funcionalizada. Esta reacción es llamada: reacción de Base de Schiff. El mecanismo de esta reacción se detallar  más adelante.

4. INMOVILIZACION DE ENZIMA LIPAZA

4.1. Preparación de la solución acuosa de la enzima BCL

El proceso de inmovilización de la enzima *Burkholderia cepacia* (BCL) sobre el nanocompósito de CoFe₂O₄/HAP fue realizado por la reacción de este material soporte con una solución enzimática previamente extraída de la enzima comercial (BCL, *Sigma-Aldrich*) (**Esquema 8**). El proceso de extracción consistió en tomar 100mg de la enzima comercial y disolverla en una solución tampón de fosfato (20mM) a un cierto pH (6, 7 y 8). La mezcla fue agitada por 5 min a temperatura ambiente, y la solución se separó por centrifugación de material orgánico no disuelto. Esta solución enzimática fue usada para el proceso de inmovilización. Se procedió de esta manera a fin de evitar posible interferencia de los sólidos remanentes no disueltos en la etapa de inmovilización.



Esquema 8: Preparación de solución enzimática para el proceso de inmovilización

La cuantificación de proteína en esta solución enzimática fue medida por análisis UV-Vis mediante el método de Bradford, que detallamos a continuación.

4.2. Cuantificación de BCL

Las soluciones enzimáticas pueden ser cuantificadas mediante el método Bradford. El reactivo de Bradford contiene el colorante Azul brillante de Coomassie G-250, el cual presenta un máximo de absorción de 465 nm. Al mezclar este reactivo de Bradford con la solución proteica (enzimática) se torna a un color azul que presenta una máxima absorción en 595 nm. Al incrementar la concentración proteica (enzima), en la solución a medir, se observa un aumento de absorción que presenta linealidad en un rango de 0.02mg/mL - 1.20 mg/mL.[80] Este aumento de absorción será medido mediante un espectrofotómetro UV-Vis.

Para cuantificar una solución enzimática realizamos una curva de calibración diluyendo una solución de albumina de suero bovino (BSA) 20 mg/ml en el rango de 0.02 mg/mL -1.0 mg/mL en tampón de fosfato (20mM, pH 7). A estas soluciones se adicionaron el reactivo de Bradford: se deja reposar por 2 min; y la absorbancia fue medida a 595 nm. La ecuación lineal obtenida (**Figura 26**) presenta un r^2 de 0.9956, el cual es un valor aceptable para determinar las concentraciones de las soluciones enzimáticas.

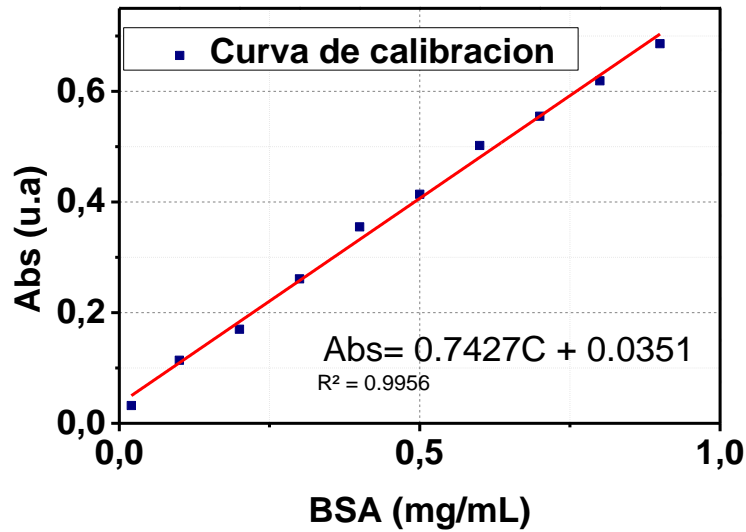


Figura 26: Curva de Calibración para cuantificar la cantidad de proteína

4.3. Cuantificación de la enzima inmovilizada

La cuantificación de la enzima lipasa se realizó por diferencia de las medidas de las cantidades proteicas entre la solución enzimática inicial y la solución enzimática restante del proceso de inmovilización:

$$C_{inmov.} = \left[(C_{inicial} - C_{final}) * \frac{V}{W_{mat}} \right]$$

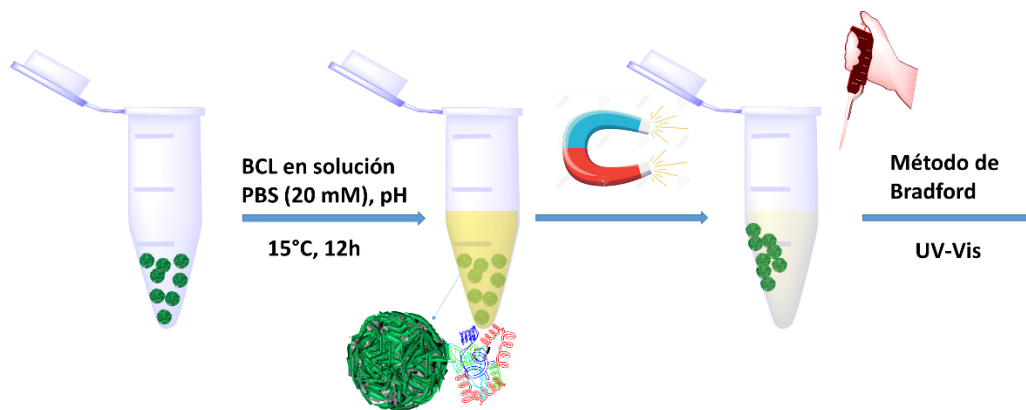
Donde, V es el volumen de las soluciones enzimáticas, W_{mat} es el peso del material soporte (CoFe₂O₄/HAP y CoFe₂O₄/HAP-APTES-Glu) utilizado para la inmovilización, $C_{inicial}$ es la concentración de la solución enzimática medida al inicio (mg/mL), C_{final} es la concentración de la solución enzimática remanente, luego del proceso de inmovilización y $C_{inmov.}$ es la concentración de enzima presente en la superficie del material nanoparticulado (mg/g_{material}).

4.4. Proceso de inmovilización por adsorción y enlace covalente

Estudiamos dos procesos de inmovilización para obtener los sistemas bio-nanocompósito catalíticos (CoFe₂O₄/HAP-Enzima): el sistema **SisBioN-1** obtenido

por **adsorción** en la superficie del material $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ y el sistema **SisBioN-2** obtenido por enlace **covalente**, en la superficie del nanocompuesto, con el uso de un espaciador molecular (APTES) y glutaraldehido (Glu) como activador, $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -APTES-Glu. Para ello, se debe tener en cuenta algunos factores que optimicen la cantidad de enzima inmovilizada. Entre ellas tenemos la concentración de la solución enzimática, pH de la solución buffer, tiempo de proceso de inmovilización, principalmente. Para reducir estos factores, nosotros utilizamos una solución enzimática concentrada (0.55 mg/mL) y 12h de proceso de inmovilización, esto con el propósito de que el parámetro a estudiar sea la influencia del pH del buffer de fosfato (PBS, 20mM).

El proceso de **inmovilización por adsorción**, obteniendo el sistema SisBioN-1, ocurre a través de la interacción directa entre las superficies de la enzima, a través de grupos funcionales superficiales, y la superficie del material $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$. El esquema del proceso de inmovilización seguirá de esta manera:



Esquema 9: Esquema de inmovilización por adsorción: $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -BCL (SisBioN-1)

La HAP con fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, presenta tres tipos de grupos funcionales: Ca^{+2} quelantes, llamados C-sitios, ii) PO_4^{-3} , llamados P-sitios con oxígenos cargados negativamente, y iii) grupos hidroxilo (OH). Por otro lado, la enzima presenta grupos funcionales tales como grupos amino $-\text{NH}_2$ y carboxílicos $-\text{COOH}$. Por ello, las posibles interacciones que podrían ocurrir en la interface entre la

superficie de la enzima y la de nuestro material $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ son: grupos $-\text{NH}_2$ con P-sitios por intercambio catiónico, grupos $-\text{COOH}$ con los C-sitios y $-\text{OH}$ por quelación y puente hidrogeno, respectivamente.[81][82]

Un estudio composicional mediante un mapeo elemental del catalizador $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-BCL}$ (**Figura 27**) confirma la presencia del elemento carbono, elemento principal de la enzima lipasa BCL. Además, se observa una distribución uniforme de todos los elementos que conforman el catalizador $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-BCL}$.

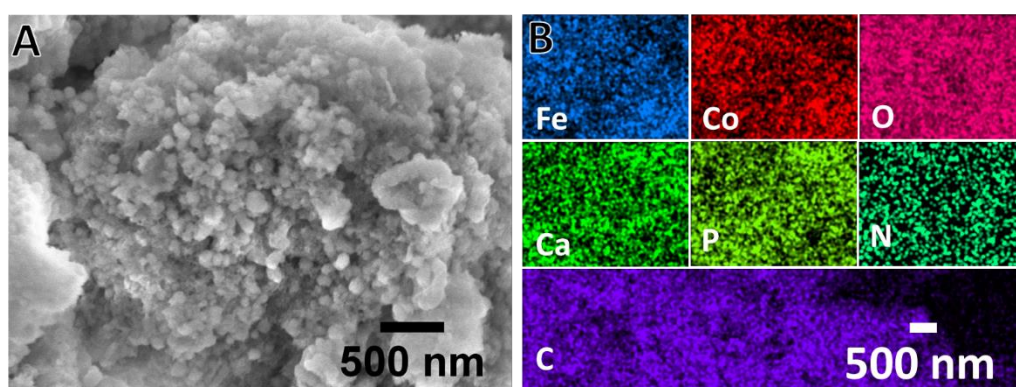
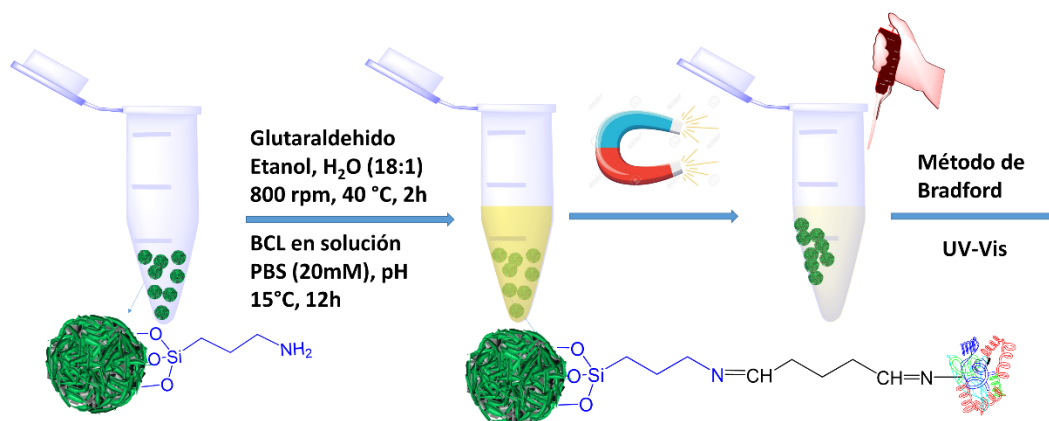


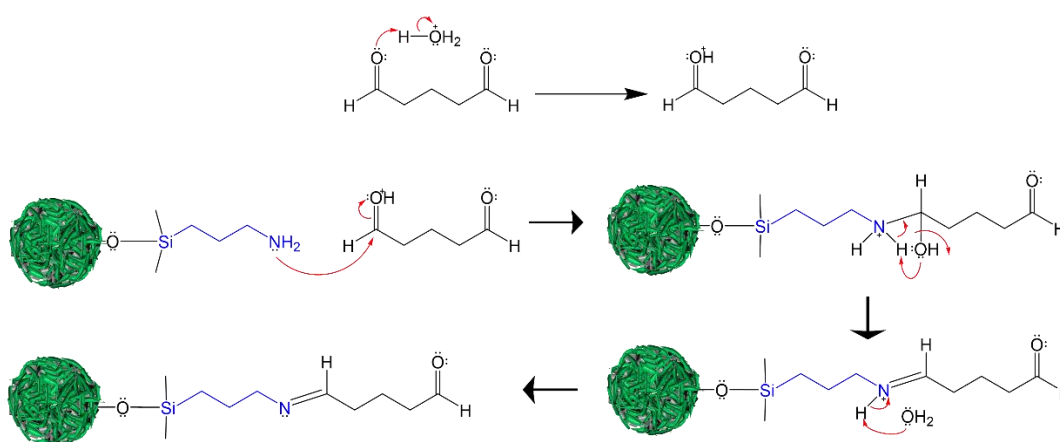
Figura 27: A) Imagen SEM y B) Mapeo elemental de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-BCL}$.

Por otro lado, estudiamos el proceso de **inmovilización por enlace covalente**, obteniendo el sistema SisBioN-2, mediante dos etapas: i) activamos el sistema $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-APTES}$ con glutaraldehído y ii) inmovilizamos a la enzima BCL a través de sus grupos funcionales $-\text{NH}_2$ superficiales. El procedimiento es como sigue:



Esquema 10: Esquema de inmovilización covalente: CoFe₂O₄/HAP-APTES-Glu-BCL (SisBioN-2)

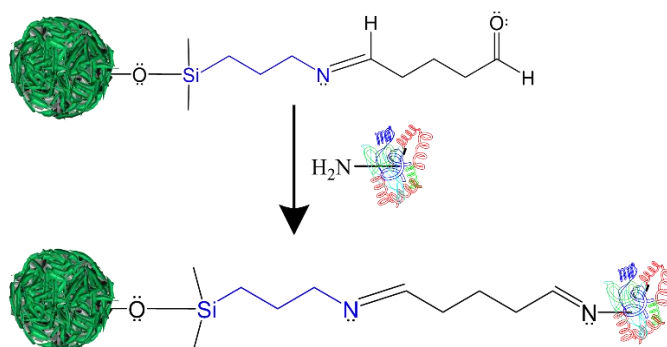
La obtención de SisBioN-2 se da mediante una reacción de **base de Schiff** entre un grupo carbonilo y amina. El mecanismo de reacción propuesto es la siguiente:



Esquema 11: Mecanismo de reacción de base de Schiff para APTES y Glu

La reacción puede proceder ya sea en medio ligeramente ácido o neutro.[83] Debido a la presencia de protones (H⁺) provenientes de la solución de glutaraldehído (25%, pH=2.9), este tiende a protonarse para la formación de una especie intermediaria. Seguidamente, el carbono del grupo aldehído protonado es atacado por el par electrónico del grupo -NH₂ del sistema CoFe₂O₄/HAP-APTES. Esta reacción provoca la eliminación de agua y formación del enlace imina (C=N).

De igual manera ocurre el enlace del nuevo sistema ($\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-APTES-Glu}$) con la enzima, a través de sus grupos funcionales aminos externas, sin embargo, el medio ya no es ácido, por lo cual la reacción inicia por el ataque directo del grupo amino al carbono del grupo aldehído, seguido de una protonación del oxígeno correspondiente, para seguidamente proseguir con el mecanismo explicado líneas arriba:



Esquema 12: Proceso de inmovilización covalente

Un estudio composicional mediante un mapeo elemental del catalizador $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-APTES-Glu-BCL}$ (**Figura 28**) confirma la presencia del elemento carbono y silicio (Si), elementos principales de la enzima lipasa BCL y de la molécula espaciadora APTES, respectivamente. Además, se observa una distribución uniforme de todos los elementos que conforman el catalizador $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-APTES-Glu-BCL}$.

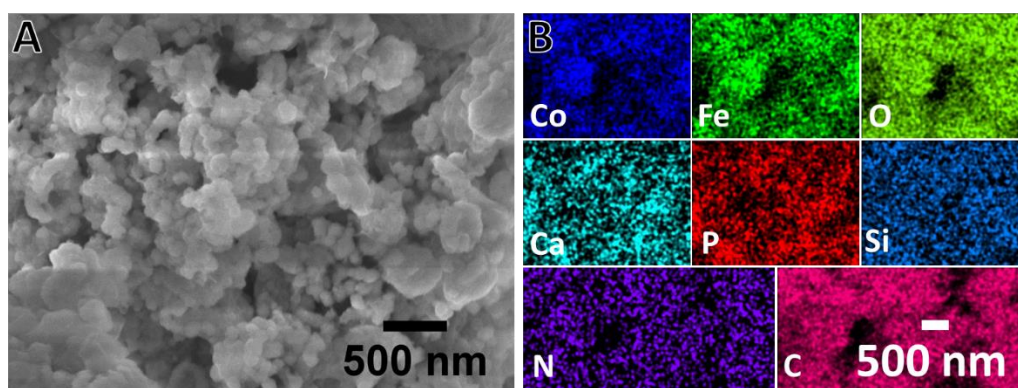


Figura 28: A) Imagen SEM y B) Mapeo elemental de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP-APTES-Glu-BCL}$.

4.4.1. Dependencia de pH

Para optimizar el proceso de inmovilización realizamos un estudio de la dependencia de la cantidad (mg) inmovilizada en el material (g) con respecto al pH del buffer. La enzima comercial es recomendable disolverla en tampón de fosfato con pH 7. Además, no se recomienda utilizar pH's extremos debido a que la enzima podría sufrir desnaturalización. Por ello, elegimos los pH 6, 7 y 8 de buffer de fosfato (PBS, 20 mM) con el fin de determinar el pH con la cual podemos inmovilizar la mayor cantidad de enzima.

Para la **inmovilización por adsorción (Figura 29-A)** se observa una mayor cantidad de enzima inmovilizada en el soporte $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ cuando el medio de reacción tiene un pH 8, presentando un valor de 21.2 mg de enzima/soporte frente a 14.42 y 11.35 mg correspondiente a los buffer's de pH 6 y 7, respectivamente (**Tabla 10**). Los grupos de aminoácidos presentes en las cadenas laterales de los pentapéptidos bloqueados de la enzima son cargadas alrededor de dicho pH, lo que favorece la unión con los grupos de interacción presentes en el HAP. Por lo tanto, el grupo imidazol de histidina y -SH de cisteína pueden coordinarse con los lados Ca^{+2} . Por otro lado, $-\text{NH}_3^+$ de lisina y arginina tienen carga positiva por encima de su pK_{int} , [84] favoreciendo la coordinación con los sitios de fosfato.

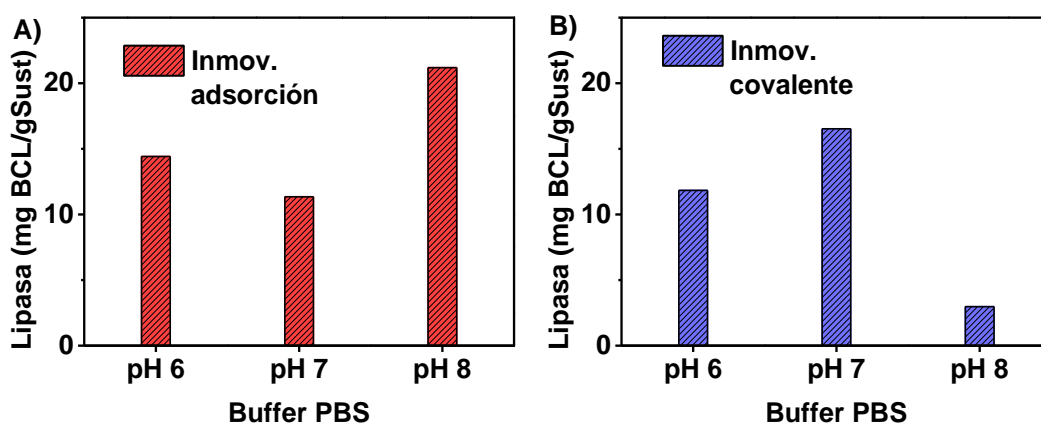


Figura 29: Efecto del valor del pH del buffer en la eficiencia de la inmovilización por adsorción (rojo) y covalente (violeta)

Tabla 8: Cantidad de enzima inmovilizada (mg) por gramo de soporte $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

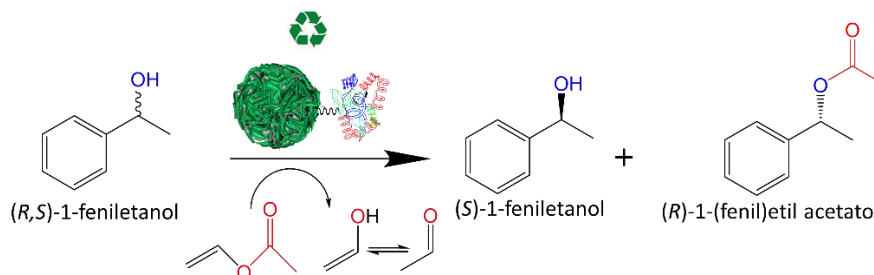
Método de inmovilización	Cantidad de enzima inmovilizada (mg), 12h, Buffer de PBS (20mM)		
	pH 6	pH 7	pH 8
Adsorción	14.42	11.35	21.2
Covalente	11,84	16,53	2,97

En el proceso de **inmovilización por enlace covalente (Figura 29-B)** se obtiene una mayor cantidad de enzima inmovilizada en el soporte $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -APTES-Glu cuando el medio de reacción tiene un valor de pH 7, presentando un valor de 16.53 mg/g desoporte frente a 11.84 mg/g y 2.97 mg/g correspondiente a los buffer's de pH 6 y 8, respectivamente (**Tabla 8**). La inmovilización de la enzima en el soporte funcionalizado ocurre a través de una reacción de base de Schiff, por lo cual la inmovilización de la enzima solo se limita a un medio ligeramente ácido o neutro. Tenga en cuenta que un medio altamente alcalino competirá con el grupo $-\text{NH}_2$ durante el ataque nucleofílico en la posición de carbono aldehído reduciendo el rendimiento.[55] De hecho, la enzima cargada en $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ disminuyó drásticamente de 16.53 mg/g a 2.97 mg/g.

5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LIPASA INMOVILIZADA

Las enzimas son biocatalizadores que pueden usarse potencialmente para mejorar el rendimiento y la selectividad en procesos sintéticos en la industria, especialmente en química fina. Una de las posibles aplicaciones para los bio-nanocompuestos magnético catalíticos es el acceso a ambos enantiómeros desde una mezcla racémica a través de la transesterificación enantioselectiva seguida de la separación de mezclas de alcohol y éster a través de una simple cromatografía en columna, solventes eutécticos profundos o (DES *por sus siglas en inglés*) [31] o cromatografía de fluidos supercríticos. [32] Sin embargo, el desafío es controlar la transformación enantioselectiva de solo uno de los enantiómeros en la mezcla racémica. Aquí,

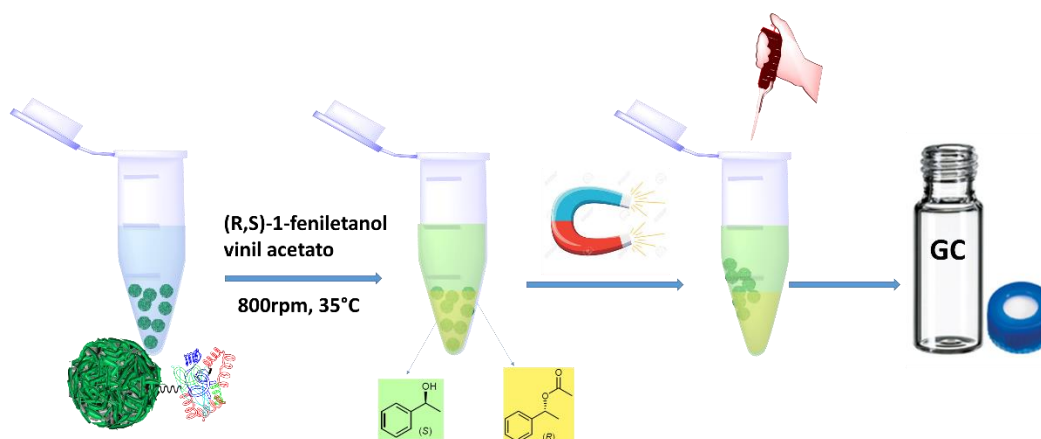
evaluamos el rendimiento catalítico y la selectividad de las enzimas inmovilizadas (SisBioN-1 y SisBioN-2) hacia la reacción de transesterificación de (*R,S*)-1-feniletanol según el **esquema 13**.



*Esquema 13: Reacción enzimática de (*R,S*)-1-feniletanol*

El enantiómero (*S*)-1-feniletanol es relevante debido a su aplicación como componente básico en la síntesis de productos farmacéuticos bioactivos y productos naturales ampliamente utilizados como antidiabéticos y antidepresivos. [33] Además, se explota (*S*)-1-feniletanol como precursor en la preparación de cristales líquidos y polímeros ópticamente activos. [33]

En la mezcla racémica inicial, la enzima es selectiva a la reacción del sustrato enantiomérico *R* para dar su forma acetilada: acetato de (*R*)-1-feniletilo. El esquema general para la reacción enzimático de los sistemas catalíticos es como sigue:



Esquema 14: Reacción de transesterificación enantioselectiva

La identificación de los productos de reacción fue realizada por cromatografía de gases con GC-FID con una columna capilar quiral. Se identificó los tiempos de retención del sustrato racémico y sus correspondientes formas acetiladas, que se muestra a continuación:

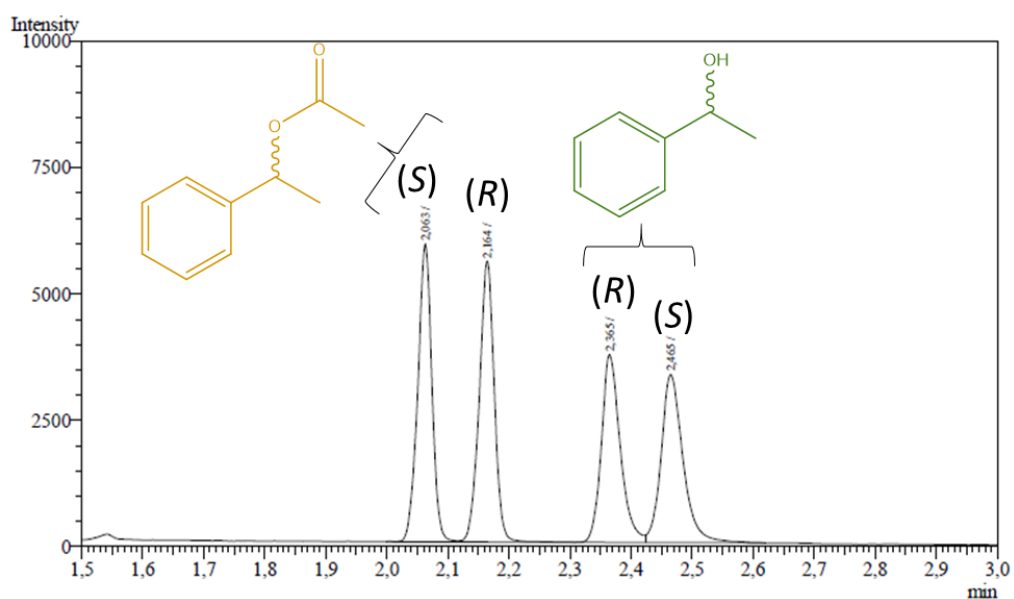


Figura 30: Tiempos de retención de sustratos y productos quirales

Los picos en el cromatograma son asociados, respecto al tiempo de retención, de la siguiente manera: 2.465 min ((S)-1-feniletanol), 2.365 min ((R)-1-feniletanol), 2.164 min (acetato de (R)-1-feniletilo) y 2.063 min (acetato de (S)-1-feniletilo).

Con el fin de optimizar la reacción enzimática, nosotros estudiamos dos parámetros: El solvente orgánico y la temperatura de reacción. Luego de obtener los valores óptimos de estos parámetros, realizamos un estudio cinético en el tiempo. Por último, evaluamos la capacidad de reuso de los sistemas bio-nanocompuesto catalíticos. Los resultados se dan en porcentajes de conversión, con un máximo de 50% y el valor *ee* que representa el exceso enantiomérico, con un valor del 100%. Estos valores se calculan de la siguiente manera:

$$ee_s = \frac{S - R}{S + R}$$

$$C = \frac{S_0 + R_0 - (S + R)}{S_0 + R_0}$$

Donde, S_0 y R_0 representan la concentración de los enantiómeros (*S*)-1-feniletanol y (*R*)-1-feniletanol, antes de la reacción; S y R representan la concentración de los enantiómeros (*S*)-1-feniletanol y (*R*)-1-feniletanol, después de la reacción.

5.1. Ensayo de solventes

La selección del solvente adecuado es de suma importante debido a que debemos evitar alterar bruscamente la conformación estructural de la enzima que está estrechamente ligada a la actividad enzimática. Es decir, se alteraría la estructura conformacional de la enzima, el cual conlleva a cambios en sus propiedades catalíticas (enantioselectividad) ya sea de manera positiva o negativa. Con este fin, se seleccionó tres solventes orgánicos ampliamente estudiados en la literatura: tolueno, n-hexano y n-heptano (**Figura 31**).

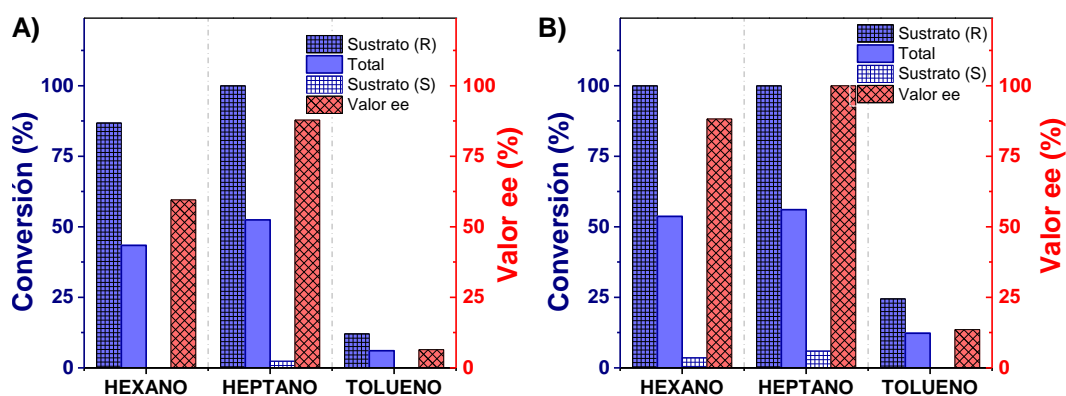


Figura 31: Efecto de solvente: A) SisBioN-1 y B) SisBioN-2

Evaluando los resultados, el n-heptano así como el n-hexano presentan mayores prestaciones como solvente que el tolueno en la reacción de acetilación enantioselectiva. Para una hora de reacción y 35°C, el rendimiento de la conversión

total en la reacción, utilizando el sistema catalítico **SisBioN-1 (Figura 31-A)**, en hexano, heptano y tolueno son 43.39%, 52.45% y 6.05%, respectivamente, mientras que el valor *ee* son 59.52%, 87.84% y 6.48%, respectivamente. Mientras que, la conversión total de la reacción utilizando el sistema catalítico **SisBioN-2 (figura 31-B)** en heptano, hexano y tolueno son 53.67%, 56.09% y 12.25%, respectivamente, mientras que el valor *ee* son 88.21%, 100% y 13.56%, respectivamente. Se observa además que el sustrato (*R*)-1-feniletanol presenta mayor conversión en el solvente heptano. Los valores obtenidos se resumen en la **Tabla 9**:

Tabla 9: Influencia del solvente en el rendimiento de reacción. 1h, 35°C.

Catalizador	Rendimiento de la reacción (%)					
	<i>Hexano</i>		<i>Heptano</i>		<i>Tolueno</i>	
	Conversión total	<i>ee</i>	Conversión total	<i>ee</i>	Conversión total	<i>ee</i>
<i>SisBioN-1</i>	43,39	59,52	52,45	87,84	6,05	6,48
<i>SisBioN-2</i>	53,67	88,21	56,09	100	12,25	13,56

La eficiencia como solvente de n-hexano y n-heptano están fuertemente ligados a sus propiedades físicas y estructurales. El n-hexano y n-heptano son lineales, lo cual favorecería a una mayor área de contacto por la interacción de Van der Waals, la que estabilizaría a la enzima. Mientras que, el tolueno con estructura cíclica presenta el grupo fenil, al igual que el sustrato, que competiría en la interacción con el sitio activo de la enzima, provocando la deficiente interacción para el proceso de formación del producto.

5.2. Ensayo térmico

Se realizó un estudio del efecto de la temperatura en el rendimiento de la reacción, ya que influye directamente en la estabilidad y el equilibrio de reacción [85]. Tomando una hora de reacción con n-heptano como solvente y agitación 800 rpm, se estudiaron las temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C y 60 °C (**Figura 32**).

Para las reacciones con el sistema catalítico **SisBioN-1 (Figura 32-A)** las conversiones totales fueron 46%, 51%, 52%, 51%, 49%, 50.2% y 50,9 %, en orden creciente a las temperaturas estudiadas, mientras que para el valor *ee* presenta 67.9%, 82.5%, 87.8%,

82.8%, 76.4%, 78.8%, 80.9%, en orden creciente a las temperaturas estudiadas. Con ello, podemos concluir que todos presentan buena conversión. Mas aun, la prueba a 35 °C presenta mejor valor *ee*, dando mayor rapidez en la conversión del sustrato (*R*)-1-feniletanol. Por otro lado, el aumento de temperatura (60 °C) no disminuye la velocidad de formación del producto enantiomérico, por posible desnaturalización de la enzima, esto debido a la estabilidad que le confiere la superficie de la NP CoFe₂O₄/HAP. Esta mejora en la velocidad de reacción, al aumentar la temperatura, se puede atribuir a un mayor movimiento, y por lo tanto, un aumento en el número de colisiones energéticas entre la enzima y el sustrato, promoviendo la formación del complejo ‘enzima-sustrato’ para favorecer una reacción rápida, y por lo tanto una mejor conversión [85].

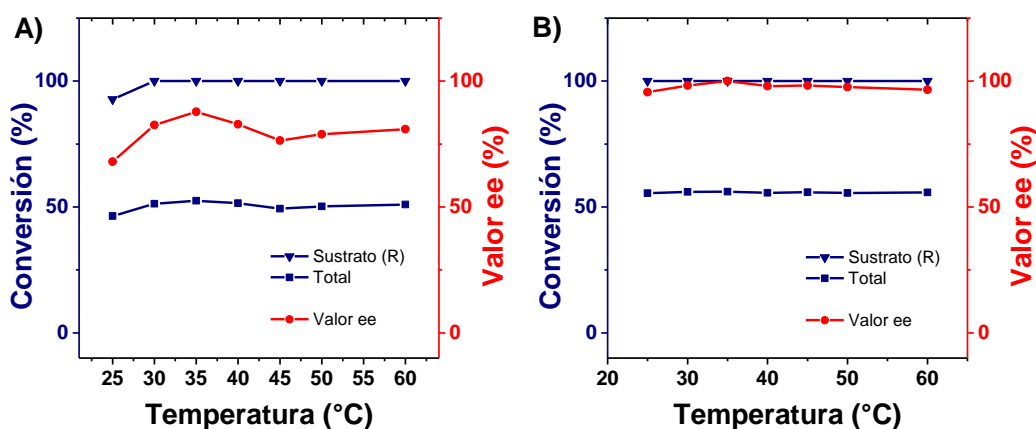


Figura 32: Efecto de la temperatura de reacción. Enzima inmovilizada: A) SisBioN-1 y B) SisBioN-2

Para las reacciones con el sistema catalítico **SisBioN-2** (Figura 32-B), tanto los porcentajes de conversión total y valor *ee* son superiores a las obtenidas por la reacción con la enzima inmovilizada por adsorción. Esto se puede explicar por la mayor libertad de la enzima debido a la presencia del espaciador (APTES), sin pérdida de la interacción interfacial, que permite un adecuado cambio de su conformación inicial, el cual repercute en su actividad y que es evidenciado por los rendimientos observados. En todas las temperaturas estudiadas la conversión total se encuentra en torno a 50%, con un ligero aumento debido a la conversión del sustrato *S* (*S*-1-feniletanol) a la forma *R* del producto. Por su parte el valor *ee* alcanza hasta un 100% en 35 °C.

5.3. Ensayo cinético de reacción

Con los valores óptimos de solvente (n-heptano) y temperatura de reacción (35 °C). Una reducción significativa de la reacción de 30 h por la enzima libre nos dará una referencia para comparar el rendimiento de nuestro catalizador bio-nanocompuesto. realizamos un estudio cinético en función del tiempo, para ello realizamos un seguimiento de los productos de reacción cada 15 min (**Figura 33**), observando un aumento progresivo en el porcentaje de conversión total y el valor *ee*.

Haciendo una comparación con la eficiencia de las enzimas BCL inmovilizadas, utilizadas en reacciones catalíticas de trabajos de otros autores [64] [86] [85], podemos inferir la buena estabilidad y rapidez en la reacción de transesterificación enantioselectiva. El sistema catalítico **SisBioN-1 (Figura 33-A)** completa en 60 min la conversión de (*R*)-1-feniletanol, mientras que el sistema catalítico **SisBioN-2 (Figura 33-B)** completa la reacción en los primeros 25 min. Esto afirma en mayor medida la importancia de las propiedades estructurales y superficiales del soporte en la mejora de la actividad de la enzima BCL. Una vez que la conversión de (*R*)-1-feniletanol alcanza el 100%, la enzima puede reaccionar con el enantiómero (*S*)-1-feniletanol, pero siguiendo una cinética más baja probablemente debido a la repulsión estérica de la configuración *S* que no es termodinámicamente favorable para la formación del complejo enzima-sustrato activado. Esta reacción explica los valores de conversión total sobre 50% que son más altos que el contenido de *R*-1-feniletanol en la mezcla racémica (50:50 de *R*-1-feniletanol: *S*-1-feniletanol). Por otro lado, es importante señalar que esta conversión tardía no afectará el valor de *ee* de (*S*)-1-feniletanol, que permanece dentro de un 100% de pureza.

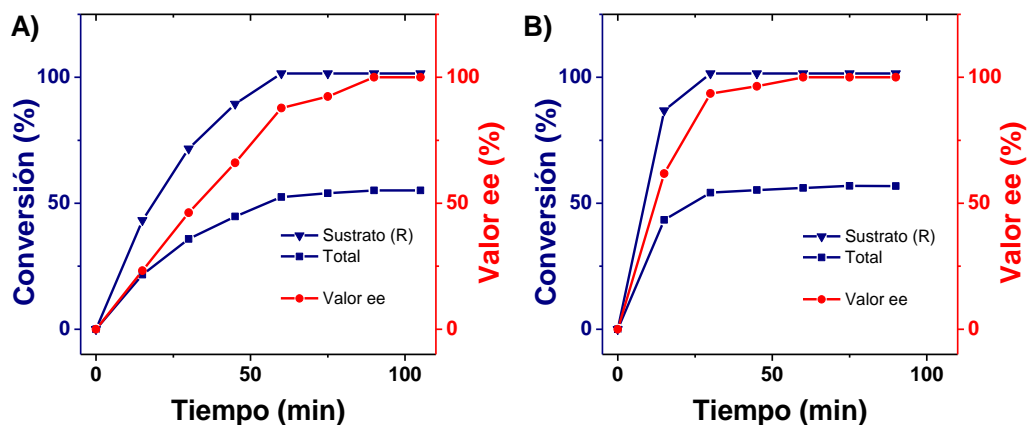


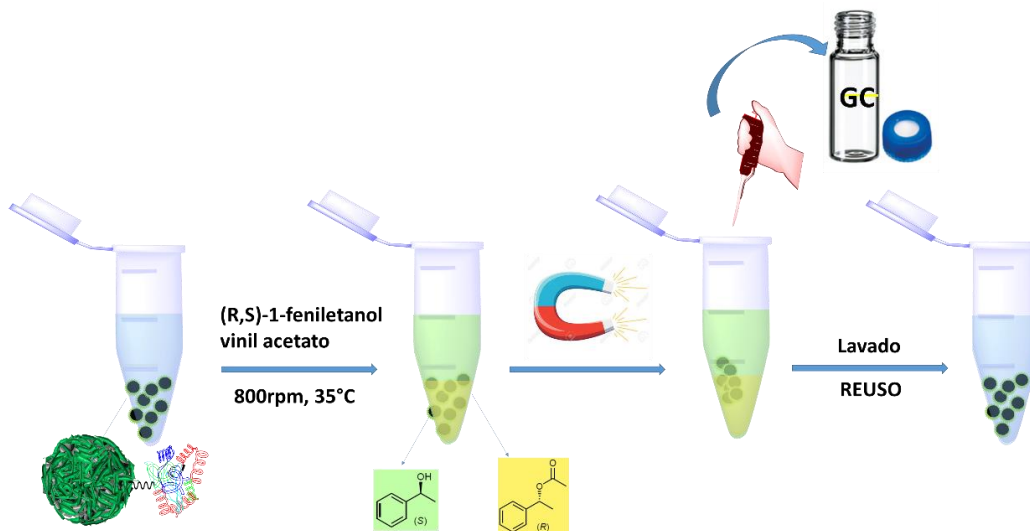
Figura 33: Cinética de reacción de (R,S)-1-feniletanol de los sistemas catalíticos: A) SisBioN-1 y B) SisBioN-2

5.4. Ensayo de reciclaje

Una de las ventajas de nuestros sistemas catalíticos enzimáticos radica en las propiedades magnéticas que ofrece, y que nos favorece en la utilización de un imán para atraerla y recuperarla de una dispersión. Realizamos el ensayo de reciclaje (**Figura 34**).

Para la reacción con el sistema catalítico **SisBioN-1**, se tomó 90 min de tiempo de reacción y se prosiguió con los procesos de recuperación y reuso, utilizando un imán de neodimio para separar la enzima inmovilizada. Realizamos 10 ciclos de reuso, observando que a partir del sexto (6^{to}) reuso, la actividad va disminuyendo en pequeño porcentaje (~15%).

Mientras que, para la reacción con el sistema catalítico **SisBioN-2** se tomó 60 min de reacción. La conversión se mantiene en un ~100% hasta el décimo (10^o) ciclo, lo cual es concordante con los ensayos catalíticos anteriores que definen mayores conversiones para este tipo de inmovilización.



Esquema 15: Proceso general de reciclaje..

Para descartar un proceso de lixiviación de la enzima inmovilizada como uno de los factores por la cual disminuye la actividad, cuantificamos mediante el método de Bradford la cantidad de enzima presente de las soluciones remanentes de cada etapa de reciclaje. No se observa la presencia de enzima lixiviada, por lo que se descarta el desprendimiento de la enzima de la superficie del soporte, descartando un proceso de lixiviación. Sin embargo, esta disminución se podría deber a una desactivación ocasionada por el propio reuso e interacción constante con el solvente y los sustratos.

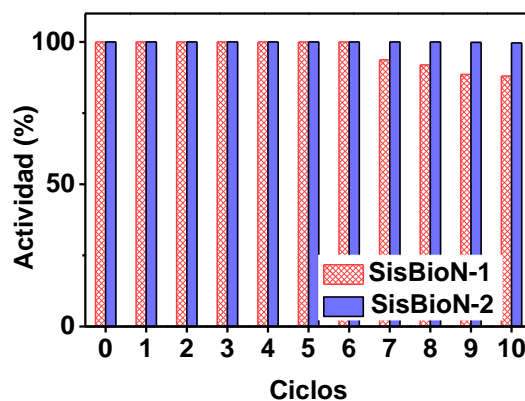


Figura 34: Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada SisBioN-1 (rojo) y SisBioN-2 (violeta).

Con todo, nuestros sistemas bio-nanocompósito magnético catalíticos presentan cualidades excepcionales para competir con los sistemas ya estudiados (**Tabla 10**). El tiempo de reacción favorece la aplicación a escalas mayores a los hechos en el laboratorio, abaratando costos desde las etapas iniciales hasta la aplicación catalítica, especialmente para reacciones enantioselectivas dirigidas a la producción sintética de productos farmacéuticos y/o de belleza.

Tabla 10: Estudios recientes sobre la resolución cinética de (R, S) -1-feniletanol con lipasa inmovilizada

Tipo de soporte	Inmovilización	T (°C)	Tiempo de reacción (min)	Conversión/ <i>ee_s</i> (%)	Reuso	Ref.
<i>CoFe₂O₄/HAP</i>	Covalente	35	25	50 / >99	10 (~98%)	Este trabajo
	Adsorción	35	60	50 / >99	10 (~80%)	
Enzima libre	-	35	1800	50 / 99.2	-	Este trabajo
<i>Pullulan polysaccharide Sílica mesoporosa</i>	Adsorción	55	180	50 / 99.2	10 (80%)	[86]
	Adsorción	30	360	50 / ni ^a	6 (~80%)	[87]
<i>Pd-MCF</i>	Covalente	50	360	50 / 99.89	ni ^a	[88]
<i>Zn/Al-Cl LDH</i>	Covalente	35	60	50 / >99	30 (<50%)	[89]

^a no informado por el autor

6. CONCLUSIONES

- i. Obtuvimos un nanocompósito $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ a partir de la formación *in situ* de la hidroxiapatita en la superficie del óxido CoFe_2O_4 .
- ii. Se caracterizó cada nanomaterial obtenido en las etapas previas mediante medidas espectroscópicas, superficiales, estructural, magnéticas y de imagen; los cuales corroboran la presencia del material deseado, sin la presencia de alguna otra fase.
- iii. Este biomaterial fue utilizado para la inmovilización de la enzima lipasa *Burkholderia cepacia* (BCL), obteniéndose los sistemas bio-nanocompósito catalíticos; por adsorción $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -BCL (SisBioN-1) en una solución buffer de fosfato y pH 8, el cual presentó una carga de 22.1 mg de enzima por soporte; y por enlace covalente $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ -APTES-Glu-BCL (SisBioN-2) en una solución buffer de fosfato y pH 7, el cual presentó 16.53 mg de enzima por soporte.
- iv. Los resultados de los ensayos enzimáticos demostraron una eficiente actividad de la enzima inmovilizada $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ con solvente n-heptano, temperatura de 35 °C. Además, el tiempo para la completa reacción fue 60 min y 25 min para las reacciones con enzima inmovilizada por adsorción (SisBioN-1) y por enlace covalente (SisBioN-2), respectivamente. Podemos afirmar que las NPs $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ son buenos soporte para la enzima BCL, presentando el SisBioN-2 actividad superior.
- v. Los ciclos de reuso de los sistemas bio-nanocompósito catalíticos evidencia una buena estabilidad en el tiempo, y una mínima disminución de su eficiencia. Presentando ≈ 88 y ≈ 99 % de actividad en el décimo ciclo de uso de la enzima inmovilizada por adsorción (SisBioN-1) y por enlace covalente (SisBioN-2), respectivamente. La recuperación magnética reduciría considerablemente los costos de separación mediante procesos de filtración convencionales a mayor escala.

7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] S.-N. Sun, C. Wei, Z.-Z. Zhu, Y.-L. Hou, S. S. Venkatraman, and Z.-C. Xu, “Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications,” *Chinese Phys. B*, vol. 23, no. 3, p. 037503, 2014.
- [2] Z. Chen *et al.*, “Controllable synthesis of amine-functionalized Fe₃O₄ polyhedra for lipase immobilization,” *CrystEngComm*, vol. 18, no. 17, pp. 3124–3129, 2016.
- [3] C. Liu, J. Yuan, H. Gao, and C. Liu, “Biodiesel production from waste cooking oil by immobilized lipase on superparamagnetic Fe₃O₄ hollow sub-microspheres,” *Biocatal. Biotransformation*, vol. 34, no. 6, pp. 283–290, 2016.
- [4] K. Fox, P. A. Tran, and N. Tran, “Recent Advances in Research Applications of Nanophase Hydroxyapatite,” *ChemPhysChem*, vol. 02903, pp. 1–13, 2012.
- [5] A. Goldman, *Miscellaneous Ferrite Application*. 2006.
- [6] A. S. Teja and P. Y. Koh, “Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles,” *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, vol. 55, no. 1–2, pp. 22–45, 2009.
- [7] D. S. Mathew and R. S. Juang, “An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions,” *Chem. Eng. J.*, vol. 129, no. 1–3, pp. 51–65, 2007.
- [8] C. R. Warren, “Synthesis, Characterization, and Functionalization of Magnetic Iron Nanoparticles for Enhances Biological Applications,” p. 189, 1990.
- [9] D. T. Margulies *et al.*, “Origin of the anomalous magnetic behaviour in single crystal Fe₃O₄ films,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 79, no. 25, pp. 5162–5165, 1997.
- [10] D. Ganguli and M. Ganguli, *Inorganic Particle Synthesis via Macro and Microemulsions: A Micrometer to Nanometer Landscape*. 2003.
- [11] L. L. Schramm, E. N. Stasiuk, and D. G. Marangoni, “Surfactants and their applications,” *Annu. Reports Prog. Chem. - Sect. C*, vol. 99, pp. 3–48, 2003.
- [12] Y. Moroi, K. Motomura, and R. Matuura, “The Critical Micelle Concentration of Sodium Dodecyl Sulfate-Bivalent Metal Dodecyl Sulfate Mixtures in Aqueous Solutions,” vol. 46, no. 1, 1974.

- [13] J.-L. Salager, “Surfactantes: tipos y usos,” *Cuad. FIRP S300-A. Módulo enseñanza en ...*, vol. 2, p. 54, 2002.
- [14] H. Goesmann and C. Feldmann, “Nanoparticulate Functional Materials Angewandte,” pp. 1362–1395, 2010.
- [15] R. Nisticò, P. Avetta, P. Calza, D. Fabbri, G. Magnacca, and D. Scalarone, “Selective porous gates made from colloidal silica nanoparticles,” *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 2105–2112, 2015.
- [16] Z. Wu, S. Yang, and W. Wu, “Shape control of inorganic nanoparticles from solution,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 3, pp. 1237–1259, 2016.
- [17] Y. Wan and D. Zhao, “On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates,” *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 7, pp. 2821–2860, 2007.
- [18] L. L. Hench, J. Wilson, M. McLaren, and D. Niesz, *AN INTRODUCTION TO BIO CERAMICS*. 1993.
- [19] P. W. Dunne, A. S. Munn, C. L. Starkey, T. A. Huddle, and E. H. Lester, “Continuous-flow hydrothermal synthesis for the production of inorganic nanomaterials,” *Phil. Trans. R. Soc. A*, vol. 373, no. 2057, p. 0015, 2015.
- [20] S. Behrens, “Preparation of functional magnetic nanocomposites and hybrid materials: recent progress and future directions,” *Nanoscale*, vol. 3, pp. 877–892, 2011.
- [21] C. Xu *et al.*, “Au–Fe₃O₄ Dumbbell Nanoparticles as Dual-Functional Probes,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 47, no. 1, pp. 173–176, Jan. 2008.
- [22] S. A. Corr, Y. P. Rakovich, and Y. K. Gun’ko, “Multifunctional Magnetic-fluorescent Nanocomposites for Biomedical Applications,” *Nanoscale Res Lett*, vol. 3, pp. 87–104, 2008.
- [23] Y. Deng, D. Qi, C. Deng, X. Zhang, and D. Zhao, “Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Superparamagnetic high-magnetization composite microspheres with Fe₃O₄@SiO₂ core and highly crystallized mesoporous TiO₂ shell,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, pp. 28–29, 2008.
- [24] Y. Deng *et al.*, “Multifunctional mesoporous composite microspheres with well-designed nanostructure: A highly integrated catalyst system,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 24, pp. 8466–8473, 2010.

- [25] N. Verma, S. Thakur, and A. K. Bhatt, "Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review)," *Int. Res. J. Biol. Sci.*, vol. 01, no. 08, pp. 88–92, 2012.
- [26] M. Salleh, A.B., Rahman, R.N., Basri, *New Lipases and Proteases*. 2006.
- [27] B. Rubin, *methods in enzymology-lipase- parte A* .
- [28] L. Bellucci, T. Laino, A. Tafi, and M. Botta, "Metadynamics Simulations of Enantioselective Acylation Give Insights into the Catalytic Mechanism of Burkholderia cepacia Lipase," *J. chem. Theory Comput.*, vol. 6, no. 4, pp. 1145–1156, 2010.
- [29] A. E. Ghaly, D. Dave, M. S. Brooks, and S. Budge, "Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review," *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, vol. 6, no. 2, pp. 54–76, 2010.
- [30] X. Zhao, F. Qi, C. Yuan, W. Du, and D. Liu, "Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 44, pp. 182–197, 2015.
- [31] R. M. Blanco, P. Terreros, M. Fernández-Pérez, C. Otero, and G. Díaz-González, "Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 30, no. 2, pp. 83–93, 2004.
- [32] F. X. Malcata, H. R. Reyes, H. S. Garcia, C. G. Hill, and C. H. Amundson, "Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 14, no. 6, pp. 426–446, 1992.
- [33] M. L. Verma, C. J. Barrow, and M. Puri, "Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 1, pp. 23–39, 2013.
- [34] J. Kim, H. Jia, and P. Wang, "Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells," *Biotechnol. Adv.*, vol. 24, no. 3, pp. 296–308, 2006.
- [35] S. Cantone *et al.*, "Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6262–76, 2013.
- [36] Z. Amini, Z. Ilham, H. C. Ong, H. Mazaheri, and W. H. Chen, "State of the art

- and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production,” *Energy Convers. Manag.*, 2016.
- [37] T. Jesionowski, J. Zdarta, and B. Krajewska, “Enzyme immobilization by adsorption: A review,” *Adsorption*, vol. 20, no. 5–6, pp. 801–821, 2014.
- [38] S. V. Rao, K. W. Anderson, and L. G. Bachas, “Oriented immobilization of proteins,” *Mikrochim. Acta*, vol. 128, no. 3–4, pp. 127–143, 1998.
- [39] M. Hartmann and X. Kostrov, “Immobilization of enzymes on porous silicas-- benefits and challenges.,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6277–89, 2013.
- [40] R. a Sheldon, “Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts.,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. Pt 6, pp. 1583–1587, 2007.
- [41] J. Conde, J. T. Dias, V. Grazú, M. Moros, and P. V Baptista, “Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine,” *Front. Chem.*, vol. 2, no. July, pp. 1–27, 2014.
- [42] D. Brady and J. Jordaan, “Advances in enzyme immobilisation,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 31, no. 11, pp. 1639–1650, 2009.
- [43] X. Wang, P. Dou, P. Zhao, C. Zhao, Y. Ding, and P. Xu, “Immobilization of lipases onto magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for application in biodiesel production,” *ChemSusChem*, vol. 2, no. 10, pp. 947–950, 2009.
- [44] H. Dong, J. Li, Y. Li, L. Hu, and D. Luo, “Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite,” *Chem. Eng. J.*, vol. 181–182, pp. 590–596, 2012.
- [45] J. Sun *et al.*, “Ultrafast enzyme immobilization over large-pore nanoscale mesoporous silica particles.,” *Chem. Commun. (Camb).*, vol. 1, no. 12, pp. 1322–4, 2006.
- [46] J. Zdarta, A. Meyer, T. Jesionowski, and M. Pinelo, “A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility,” *Catalysts*, vol. 8, no. 2, p. 92, 2018.
- [47] H. Tan, W. Feng, and P. Ji, “Lipase immobilized on magnetic multi-walled carbon nanotubes,” *Bioresour. Technol.*, vol. 115, pp. 172–176, 2012.
- [48] J. Trbojević Ivić *et al.*, “Design of biocompatible immobilized *Candida rugosa* lipase with potential application in food industry,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 96, no. 12, pp. 4281–4287, 2016.

- [49] S. A. Ansari and Q. Husain, "Potential applications of enzymes immobilized on / in nano materials : A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 512–523, 2012.
- [50] J. Barkauskas *et al.*, "Single-walled carbon nanotube based coating modified with reduced graphene oxide for the design of amperometric biosensors," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 98, no. 2018, pp. 515–523, 2019.
- [51] P. Sricharoen, N. Limchoowong, Y. Areerob, P. Nuengmatcha, S. Techawongstien, and S. Chanthai, "Fe₃O₄/hydroxyapatite/graphene quantum dots as a novel nano-sorbent for preconcentration of copper residue in Thai food ingredients: Optimization of ultrasound-assisted magnetic solid phase extraction," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 37, pp. 83–93, 2017.
- [52] C.-X. Zhao, L. Yu, and A. P. J. Middelberg, "Magnetic mesoporous silica nanoparticles end-capped with hydroxyapatite for pH-responsive drug release," *J. Mater. Chem.*, no. 207890, 2013.
- [53] X. Y. Yang, G. Tian, N. Jiang, and B. L. Su, "Immobilization technology: A sustainable solution for biofuel cell design," *Energy Environ. Sci.*, vol. 5, no. 2, pp. 5540–5563, 2012.
- [54] M. R. Mehrasbi, J. Mohammadi, M. Peyda, and M. Mohammadi, "Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil," *Renew. Energy*, vol. 101, pp. 593–602, 2017.
- [55] W. Xie and X. Zang, "Covalent immobilization of lipase onto aminopropyl-functionalized hydroxyapatite-encapsulated- γ -Fe₂O₃ nanoparticles: A magnetic biocatalyst for interesterification of soybean oil," *Food Chem.*, vol. 227, pp. 397–403, 2017.
- [56] Z. Chen *et al.*, "Synthesis of amine-functionalized Fe₃O₄@C nanoparticles for lipase immobilization," *J. Mater. Chem. A*, vol. 2, no. 43, pp. 18339–18344, 2014.
- [57] F. Li, Y. Feng, Z. Wang, L. Yang, L. Zhuo, and B. Tang, "Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on the layered calcium carbonate-gold nanoparticles inorganic hybrid composite," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 10, pp. 2244–2248, 2010.

- [58] C. Y. Shang, W. X. Li, and R. F. Zhang, "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on ZnO nanowires/macroporous silica composites for biocatalytic synthesis of phytosterol esters," *Mater. Res. Bull.*, vol. 68, pp. 336–342, 2015.
- [59] S. Zhang *et al.*, "Preparation of Carriers Based on ZnO Nanoparticles Decorated on Graphene Oxide (GO) Nanosheets for Efficient Immobilization of Lipase from *Candida rugosa*," *Molecules*, vol. 22, no. 7, 2017.
- [60] J. Wang, G. Zhao, and F. Yu, "Facile preparation of Fe₃O₄@MOF core-shell microspheres for lipase immobilization," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 69, pp. 139–145, 2016.
- [61] M. Raita, J. Arnthong, V. Champreda, and N. Laosiripojana, "Modification of magnetic nanoparticle lipase designs for biodiesel production from palm oil," *Fuel Process. Technol.*, vol. 134, pp. 189–197, 2015.
- [62] D. T. Tran, C. L. Chen, and J. S. Chang, "Immobilization of *Burkholderia sp.* lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production," *J. Biotechnol.*, vol. 158, no. 3, pp. 112–119, 2012.
- [63] J. Mukherjee and M. N. Gupta, "Lipase coated clusters of iron oxide nanoparticles for biodiesel synthesis in a solvent free medium," *Bioresour. Technol.*, vol. 209, pp. 166–171, 2016.
- [64] C. M. Kisukuri, A. Macedo, C. C. S. Oliveira, P. H. C. Camargo, and L. H. Andrade, "Investigating the Influence of the Interface in Thiol-Functionalized Silver–Gold Nanoshells over Lipase Activity," *Langmuir*, vol. 29, pp. 15974–15980, 2013.
- [65] C. Cannas, A. Ardu, A. Musinu, D. Peddis, and G. Piccaluga, "Spherical Nanoporous Assemblies of Iso-Oriented Cobalt Ferrite Nanoparticles: Synthesis, Microstructure, and Magnetic Properties," *Chem. Mater.*, vol. 20, no. 9, pp. 6364–6371, 2008.
- [66] S. Saire-Saire *et al.*, "Green synthesis of Au decorated CoFe₂O₄ nanoparticles for catalytic reduction of 4- nitrophenol and dimethylphenylsilane oxidation," *RSC Adv.*, vol. 9, pp. 22116–22123, 2019.
- [67] H. Yang, S. Masse, H. Zhang, C. Hélarly, L. Li, and T. Coradin, "Surface reactivity of hydroxyapatite nanocoatings deposited on iron oxide magnetic spheres toward toxic metals," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 417, pp. 1–8, 2014.

- [68] J. P. Jolivet, "Metal-Oxide-Chemistry-and-Synthesis-3ed-1994-Jolivet 11.pdf." p. 336, 2000.
- [69] U. Schwertmann and R. M. Cornell, *Iron Oxides in the Laboratory*, 2da editio. Weinheim, Federal Republica of Germany: WILEY-VCH, 2000.
- [70] A. Géhin, C. Ruby, M. Abdelmoula, O. Benali, and J. Ghanbaja, "Synthesis of Fe (II-III) hydroxysulphate green rust by coprecipitation," vol. 4, pp. 61–66, 2002.
- [71] C. Cannas *et al.*, "Hierarchical Formation Mechanism of CoFe₂O₄ Mesoporous Assemblies," *ACS Nano*, vol. 9, no. 7, pp. 7277–7286, 2015.
- [72] Z. P. Xu and P. S. Braterman, "Competitive Intercalation of Sulfonates into Layered Double Hydroxides (LDHs): the Key Role of Hydrophobic Interactions," pp. 4021–4026, 2007.
- [73] C. Cannas, A. Ardu, D. Peddis, C. Sangregorio, G. Piccaluga, and A. Musinu, "Journal of Colloid and Interface Science Surfactant-assisted route to fabricate CoFe₂O₄ individual nanoparticles and spherical assemblies," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 343, no. 2, pp. 415–422, 2010.
- [74] G. V. M. Jacintho, A. G. Brolo, P. Corio, P. A. Z. Suarez, and J. C. Rubim, "Monodisperse MFe₂O₄ (M) Fe , Co , Mn) Nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 1, pp. 7684–7691, 2009.
- [75] L. El Hammari, H. Merroun, T. Coradin, S. Cassaignon, A. Laghizil, and A. Saoiabi, "Mesoporous hydroxyapatites prepared in ethanol – water media : Structure and surface properties," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 104, pp. 448–453, 2007.
- [76] C. Huang, Y. Zhou, Z. Tang, X. Guo, Z. Qian, and S. Zhou, "Synthesis of multifunctional Fe₃O₄ core/hydroxyapatite shell nanocomposites by biomineralization," *Dalt. Trans.*, vol. 40, no. 18, p. 5026, 2011.
- [77] M. Tanahashi and T. Matsuda, "Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid," vol. 34, pp. 305–315, 1997.
- [78] H. L. Ding, Y. X. Zhang, S. Wang, J. M. Xu, S. C. Xu, and G. H. Li, "Fe₃O₄@SiO₂ core/shell nanoparticles: The silica coating regulations with a single core for different core sizes and shell thicknesses," *Chem. Mater.*, vol.

- 24, no. 23, pp. 4572–4580, 2012.
- [79] A. Michelot *et al.*, “Spectroscopic characterisation of hydroxyapatite and nanocrystalline apatite with grafted aminopropyltriethoxysilane: nature of silane–surface interaction,” *J. Mater. Sci.*, vol. 50, no. 17, 2015.
- [80] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- [81] M. J. Gorbunoff and S. N. Timasheff, “The interaction of proteins with hydroxyapatite. III. Mechanism,” *Anal. Biochem.*, vol. 136, no. 2, pp. 440–445, 1984.
- [82] J. T. Ivić *et al.*, “Assessment of the interacting mechanism between *Candida rugosa* lipases and hydroxyapatite and identification of the hydroxyapatite-binding sequence through proteomics and molecular modelling,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 41, pp. 34818–34824, 2016.
- [83] J. McMurry, *Organic Chemistry*, 8th ed., vol. 1, no. August 2005. Belmont, CA, 2006.
- [84] C. N. Pace, G. R. Grimsley, and J. M. Scholtz, “Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 20, pp. 13285–13289, 2009.
- [85] M. P. Kamble, S. A. Chaudhari, R. S. Singhal, and G. D. Yadav, “Synergism of microwave irradiation and enzyme catalysis in kinetic resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol by cutinase from novel isolate *Fusarium ICT SAC1*,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 117, pp. 121–128, 2016.
- [86] L. Xu, G. Cui, C. Ke, Y. Fan, and Y. Yan, “Immobilized *Burkholderia cepacia* Lipase on pH-Responsive Pullulan Derivatives with Improved,” *catalysts*, vol. 8, 2018.
- [87] J. Liu, S. Bai, Q. Jin, H. Zhong, C. Li, and Q. Yang, “Improved Catalytic Performance of Lipase Accommodated in the Mesoporous Silicas with Polymer-Modified Microenvironment,” *Langmuir*, vol. 28, no. 25, pp. 9788–9796, Jun. 2012.
- [88] D. B. Magadum and G. D. Yadav, “Design of tandem catalyst by co-immobilization of metal and enzyme on mesoporous foam for cascaded

synthesis of (*R*)-phenyl ethyl acetate,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 129, pp. 96–105, 2018.

- [89] G. Silva Dias *et al.*, “Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on layered double hydroxide of Zn/Al-Cl for kinetic resolution of rac-1-phenylethanol,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 130, p. 109365, 2019.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Magnetic bio-nanocomposite catalysts of CoFe₂O₄/hydroxyapatite-lipase for enantioselective synthesis provide a framework for enzyme recovery and reuse



Samuel Saire-Saire^{a,*}, Sergi Garcia-Segura^b, Clemente Luyo^a, Leandro H. Andrade^{c,*}, Hugo Alarcon^a

^a Center for Development of Advanced Materials and Nanotechnology, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Tupac Amaru 210, Rimac, 15333 Lima, Peru

^b Nanosystems Engineering Research Center for Nanotechnology-Enabled Water Treatment, School of Sustainable Engineering and the Built Environment, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-3005, United States

^c Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2019
Received in revised form 14 January 2020
Accepted 14 January 2020
Available online 15 January 2020

Keywords:

Hydroxyapatite
Magnetic nanoparticles
Nano-biocatalysis
Enantioselective synthesis
Enzymatic synthesis

ABSTRACT

Enzymatic catalysis is a sustainable alternative for cost-prohibitive catalysts based on noble metals and rare earths. Enzymes can catalyze selective reactions under mild conditions. Enzyme recovery after a reaction for its reuse is still a challenge for industrial application. Herein, a biocompatible magnetic nanocomposite is presented as alternative for enzyme stabilization and easy recovery. The magnetic core of CoFe₂O₄ provides capabilities for magnetic recovery. Two different functionalization methods based on adsorption of enzyme onto biocompatible hydroxyapatite (HAP) and through covalent bonding using a molecular spacer based on 3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) have been evaluated. Both enzymatic bio-nanocomposites presented high selectivity for the transesterification reaction of racemic mixtures of (*R,S*)-1-phenylethanol, with complete conversion of (*R*)-1-phenylethanol enantiomer. Studies with different solvent and temperature had demonstrated high range of operation conditions due to enzyme stabilization provided by surface attachment. Meanwhile, magnetic properties allowed easy recovery through application of an external magnetic field for enzyme reuse. Results showed high stability of lipase covalently bond to CoFe₂O₄/HAP over several reaction cycles.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sustainable development aims to fulfill human needs without undermining the integrity and environmental health of the natural system. Green chemistry aims to define synthesis processes that avoid creation of toxics while maximizing the efficient use of natural resources, which is undoubtedly a key pathway towards sustainability. [1] Enzymatic biotechnology may allow translating chemical reactions that occur *in vivo* to synthetic manufacturing strategies at industrial level [2,3]. The use of enzymes emerges as sustainable alternative from techno-economic and environmental points of view. Lipase enzyme (also known as triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) catalyzes under mild conditions reactions of interest in chemoselective synthesis with high degree of regioselectivity and stereoselectivity [4,5]. Lipase has been studied to selectively catalyze reactions of hydrolysis [6], esterification/transesterification [7], alcoholysis [8], and acidolysis [9] under an environmental-friendly and clean framework. However, the main barrier for implementation of enzymatic synthesis at industrial

scale is associated to the difficult recovery from the reaction media after use [10].

Enzyme immobilization on supports can provide opportunity to overcome the major challenge on catalyst recovery [11,12] while improving its stability, tolerance to organic solvents, and reaction kinetics [13–15]. Nanomaterials arise as excellent supports due to their high surface area and are biocompatible with enzymes [16]. Nano-engineering design of nanocomposite supports can provide additional multifunctionalities. Magnetic oxide nanoparticles, such as cobalt ferrite (CoFe₂O₄), can preclude agglomeration and enhance their dispersion in solution [17,18]. Also, enzymatic nanocatalyst recovery by the application of an external magnetic field is a very efficient protocol [19–21]. Magnetic recovery noticeable reduces the operational expenditures on catalyst recovery. Meanwhile, hydroxyapatite (HAP) is a non-toxic, innocuous and insoluble calcium phosphate mineral (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) with an excellent biocompatibility with enzymes [22]. Nanocoatings of HAP can be implemented to anchor enzymes through covalent bonds [23].

In this work we describe a synthesis of lipase supported on magnetic nanocomposite (CoFe₂O₄/HAP). A magnetic core of CoFe₂O₄ was synthesized and coated with HAP as biocompatible interface for enzymatic

* Corresponding authors.

E-mail addresses: ssaires@uni.pe (S. Saire-Saire), leandroh@iq.usp.br (L.H. Andrade).

functionalization. Lipase from *Burkholderia cepacia* was attached to the nanocomposite (CoFe₂O₄/HAP) using two different methods: (i) direct adsorption and (ii) covalent bonding mediated by (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde (Glu). The aim of this study is to understand the influence on performance, selectivity and stability of the bio-enabling method to fix the enzyme onto the biocompatible magnetic nano-composite. Then, the influence of the CoFe₂O₄/HAP and lipase interface on the catalytic response was evaluated.

2. Experimental section

2.1. Chemicals

Enzyme activity for the bio-nanocomposite was evaluated on the enantioselective transesterification reaction of (*R,S*)-1-phenylethanol (C₈H₁₀O, 99%) purchased from Sigma-Aldrich. *Burkholderia cepacia* lipase (Amano Lipase PS) was also purchased from Sigma-Aldrich. Nanoparticle support core center of magnetic (CoFe₂O₄) was formed using ACS reagent quality cobalt (II) chloride hexa-hydrated and iron (II) chloride salts supplied by Merck and Sigma-Aldrich, respectively. Acid glutamic, ammonium hydrogen phosphate ((NH₄)₂HPO₄) and calcium hydroxide (Ca(OH)₂) of analytical grade were from Merck. They were used as received in the synthesis of the HAP coating onto the magnetic nanoparticle cores. Other chemicals used in nano-synthesis processes such as glutaraldehyde (25%), methylamine (40% w/w), (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES), and sodium dodecyl sulfate (SDS) were of analytical grade supplied by Sigma-Aldrich. All solutions were prepared with ultrapure water obtained from a Millipore Milli-Q system with resistivity >18.2 MΩ cm at 25 °C.

2.2. Synthesis of magnetic nanocomposite (CoFe₂O₄/HAP)

CoFe₂O₄ nanoparticles of homogeneous size were prepared according to a micelle synthetic process [20,24]. A micellar solution of Fe:Co (2:1; molar ratio) was prepared from the dropwise addition of 5 mL of 0.5 mM CoCl₂·6H₂O (ca. pH 1.5) and 5 mL of 1 mM FeCl₂ (ca. pH 1.5) on 18 mL of 4.5 mM SDS solution. The mixture was kept under continuous mechanical stirring for 30 min at 25 °C. After attaining micellar solution, temperature was increased up to 80 °C, followed by addition of 1.8 mL of 8.3 M methylamine. Thereafter, the solution was kept under mechanical stirring for 3 h at 80 °C. Finally, CoFe₂O₄ nanoparticles were recovered using a magnetic field and washed with aqueous NH₃ solution (5%) and milliQ water.

The HAP coating was obtained by *in situ* crystal growth on CoFe₂O₄ nanoparticles. Initially, the CoFe₂O₄ nanoparticles were complexed with glutamic acid in order to control growth and morphology of HAP. CoFe₂O₄-glutamate complex was obtained from the addition of 15 mL of 225 mM glutamic acid solution on a 10 mL slurry of CoFe₂O₄ (200 mg) suspended in milliQ water adjusted at pH 6.0. The solution was stirred at 80 °C for 2 h, then after magnetic separation, the resulting CoFe₂O₄-glutamate complex was washed with milliQ water. The complexed nanoparticles were re-suspended in 100 mL of 0.09 mM (NH₄)₂HPO₄ and, kept under mechanical stirring to ensure the formation of a homogeneous slurry. Then, 100 mL of 15 mM Ca(OH)₂ in 1:1 ethanol:water solution was added dropwise to ensure supersaturation conditions for HAP crystal nucleation and growth on nanoparticle. Finally, the solution pH was adjusted to 10 by addition of solution of aqueous NH₃ solution (5%) and kept under stirring at ambient temperature for 24 h.

2.3. Enzyme immobilization on magnetic nanocomposite (CoFe₂O₄/HAP)

Lipase from *Burkholderia cepacia* was immobilized onto CoFe₂O₄/HAP nanoparticles by adsorption and covalent bonding. Enzyme solutions were prepared with 100 mg of lipase in 1 mL of 20 mM phosphate buffer solution (PBS) of pH 6.0, 7.0, or 8.0 at 10 °C.

Enzyme immobilization by adsorption: 3 mg of CoFe₂O₄/HAP nanoparticles and 1 mL of enzyme solution was stirred with an equipment *thermomixer*® at 800 rpm for 12 h at room temperature. Adsorption study was conducted at different pH to identify the optimum condition for lipase enzyme adsorption. Quantification of the immobilized enzyme was determined by Bradford protein assay.

Enzyme immobilization by covalent bonding: A pre-treatment of the magnetic nanocomposite (CoFe₂O₄/HAP) with (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) was performed. The magnetic nanocomposite CoFe₂O₄/HAP (150 mg) was dispersed with ultrasound in 10 mL of toluene. Then, pure 3 mL of APTES were added to the dispersion. The solution was kept under mechanical stirring for 12 h at 120 °C. CoFe₂O₄/HAP-APTES nanoparticles was magnetically recovered, washed with ethanol, and dried at 80 °C for 12 h.

CoFe₂O₄/HAP-APTES nanoparticles (3 mg) were dispersed in 1 mL of ethanolic solution with 50 μL of water and 60 μL of 0.15 mmol glutaraldehyde (with a molar ratio with APTES of ~3:2) and kept under stirring (800 rpm) at 40 °C for 2 h. After magnetic separation, the supernatant was discarded. Then, 1 mL of enzyme solution in PBS was added to the CoFe₂O₄/HAP-APTES nanoparticles and, the solution was stirred (800 rpm) for 2 h at 40 °C. Quantification of the immobilized enzyme was determined by Bradford protein assay.

Enzyme activity assay

Enzyme activity was evaluated in the enantioselective transesterification reaction of (*R,S*)-1-phenylethanol with vinyl acetate. Vinyl acetate was selected as acyl donor to allow benchmarking and comparison with literature, since this acyl donor is the most commonly reported. Future works should consider the influence of acyl donor selection on the transesterification performance in terms of selectivity and kinetics. Experiments were performed with 3.0 mg of magnetic bio-nanocomposite catalyst (CoFe₂O₄/HAP/Lipase or CoFe₂O₄/HAP-APTES-Lipase), (*R,S*)-1-phenylethanol (0.002 mM) and vinyl acetate (0.007 mM) in 1 mL of heptane. The resulting mixture was stirred (800 rpm) using a *thermomixer*® at for 1 h at 35 °C. This mass was selected since it allows comparative evaluation of the kinetic performance of the magnetic bio-nanocomposites, note that higher catalyst dose may result in higher conversion due to the higher availability of catalytic active sites with increasing loading. A blank assay was conducted with the free enzyme under identical experimental conditions as the immobilized enzyme to benchmark performance. The product content and selectivity were quantified by chromatography.

The purity of the resulting chiral mixture was determined in terms of the enantiomeric excess (*ee*). The *ee* was calculated from Eq. (1) where R is the concentration of the (*R*)-enantiomer and S is the concentration of the (*S*)-enantiomer. The values obtained were compared to the performance of free enzyme with conversion of 12% after 6 h of reaction [25].

$$\%ee = \frac{(R-S)}{(R+S)} \times 100 \quad (1)$$

2.4. Analytical procedures and instruments

The reaction content were analyzed by gas chromatograph (GC-FID) GC 17A-Shimadzu with a flame ionization detector (FID) and equipped with a chiral column Chirasil-Dex CB β-cyclodextrin (20 m × 0.25 mm) using H₂ as carrier gas (100 kPa). The chromatogram for standard samples revealed: 2.36 min for (*R*)-1-phenylethanol, 2.46 min for (*S*)-1-phenylethanol, 2.16 min for (*R*)-1-(phenyl)ethyl acetate and 2.06 min for (*S*)-1-(phenyl)ethyl acetate (see chromatogram in Fig. S1).

Scanning electron microscopy (SEM) images were recorded using a JEOL FEG-SEM JSM 6330F at 5 kV. SEM samples were prepared by drop-casting an aqueous suspension of the particles on a Si wafer (1 cm²) with ambient temperature drying. Specific surface area was quantified by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method with a GEMINI VII

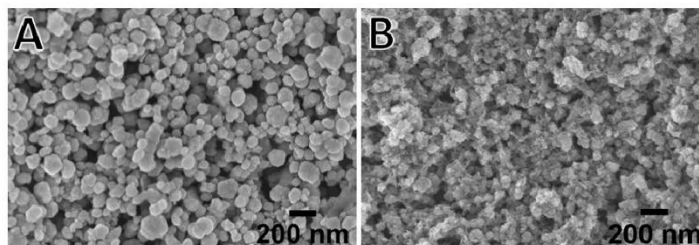


Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) images of (A) pristine CoFe_2O_4 nanoparticles and (B) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ core-shell nano-composite.

Surface Area Analyzer from Micromeritics, and the Barret-Joyner-Halenda method (BJH) was applied to determine pore size distribution. Crystalline phase analysis was conducted by X-Ray diffractometry (XRD) using a Bruker D2 Phaser using $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) radiation source with a scanning window of $20\text{--}90^\circ$. The IR spectra were obtained employing a Bruker Alpha FT-IR-DRS spectrophotometer in transmittance mode within a wavenumber ranging from 400 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ support characterization

The SEM images of Fig. 1 show pristine CoFe_2O_4 nanoparticles and nano-composite $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$. As can be seen in Fig. 1A and Fig. S2A, the micellar synthesis allowed obtaining a spheroidal structure of CoFe_2O_4 with an average size of $90 \pm 23 \text{ nm}$. Meanwhile, the nano-composite micrograph of Fig. 1B and Fig. S2B allow identifying a core-shell structure in which HAP crystals were formed on the CoFe_2O_4 nanoparticle cores, as embrace a nanoneedle morphology.

The FTIR spectra of CoFe_2O_4 in Fig. 2A depicts a well-defined peak at 600 cm^{-1} associated to M-O stretching of tetrahedral and octahedral sites characteristic of cobalt ferrite [26]. The absence of signals related to C—C (1075 cm^{-1}), S—O (1220 cm^{-1}), or C—H (2943 , 2915 and 2848 cm^{-1}) indicates that the nanoparticle surface is free of organic surfactant SDS used during the micellar synthesis [27]. Fig. 2A also depicts the FTIR spectra of the $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ nano-composite that corroborates the formation of HAP crystals. It can be observed the overlapping of M-O bands with the characteristic bending vibration of O-P-O of phosphate at 558 and 608 cm^{-1} . Furthermore, it can be observed a new band at 1035 cm^{-1} due to the asymmetric tension of PO_4^{3-} . The

wider band at 3500 cm^{-1} is explained by the OH present in the crystalline structure of HAP.

Fig. 2B illustrates the X-ray diffractogram of CoFe_2O_4 and $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$, which present cubic spinel crystallographic structure observed in ferrites [20]. Characteristic peaks at 2θ of 30.1° , 35.4° , 43.1° , 56.9° and 62.5° were associated to crystallographic planes (220), (311), (400), (511), and (440), respectively. They align well with the iron spinel planes described in the JCPDS cards (PDF 22-1086). However, the XRD diffractogram of the $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ nano-composite presents additional peaks at 2θ of 25.9° , 31.8° , 46.7° , and 49.5° that correspond to the crystallographic planes (002), (211), (222), and (213). These crystallographic planes are ascribed to the presence of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) of hexagonal structure within the symmetry group P63/m (PDF 9-0432). Note the reduction on the CoFe_2O_4 peaks intensity of the nano-composite core, which is commonly observed for core-shell structures [20].

The analysis of the magnetic properties of Fig. 3A provides valuable insight on the potential recoverability after use. The magnetization curve obtained under different magnetic field intensity at 25°C denotes a ferrimagnetic behavior for CoFe_2O_4 with a quantified magnetic saturation (M_s) of 45.09 emu g^{-1} . Note that magnification shown in the inset panel of Fig. 3A shows that magnetic hysteresis is retained in the core-shell structure. However, it can be observed in Fig. 3 that the HAP coating induces a loss in magnetic hysteresis, this is explained by the diminution of the dipolar interaction between magnetic nanoparticles due to the ceramic shell [28]. Even though the nano-composite $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ presents a 4-fold lower M_s of 45.09 emu g^{-1} , it still retains excellent properties for magnetic recovery after use.

The isotherm of nitrogen adsorption-desorption CoFe_2O_4 and $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ materials (see Fig. 3B) present a characteristic isotherm of type II and IV, respectively, according to the IUPAC classification. The HAP coating reduced the surface area from $227.20 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ observed

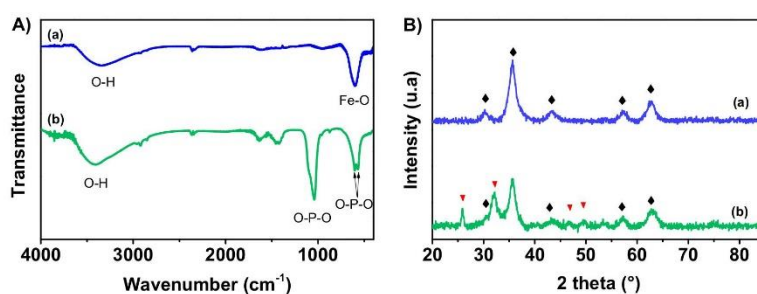


Fig. 2. A) FTIR spectra and B) X-ray diffractogram of (a) pristine CoFe_2O_4 nanoparticles and (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ core-shell nano-composite. Crystallographic planes associated to (♦) CoFe_2O_4 cubic spinel and (▼) hexagonal HAP.

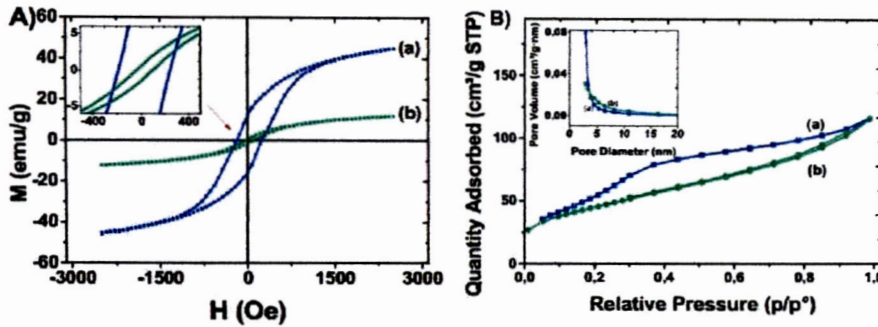


Fig. 3. A) Vibrating sample magnetometer analysis at 25 °C and B) Nitrogen adsorption-desorption isotherm of (a) pristine CoFe_2O_4 nanoparticles and (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ core-shell nanocomposite. The inset panel shows the BJH pore size distribution.

for the pristine CoFe_2O_4 down to $161.47 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for the $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ nanocomposite. The BJH analysis identified mesoporous structure of CoFe_2O_4 with average pore size of 4.79 nm and pore volume of $0.118 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Whereas the HAP coating presents a larger pore size of 6.23 nm and pore volume of $0.143 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

3.2. Optimization of lipase immobilization on $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$

Lipase enzyme was immobilized on the support surface by two methods summarized in the scheme of Fig. 4A as direct adsorption and covalent bonding. The attachment to the surface by adsorption takes place through the interaction between functional groups at the $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ nanocomposite surface and the enzyme. The biocompatible HAP coating presents three interacting groups: (i) chelating centers of Ca^{2+} , (ii) electrostatic interaction with phosphate sites, and (iii) hydroxyl groups [29]. Meanwhile, lipase enzyme has amino ($-\text{NH}_2$) and carboxylate groups ($-\text{COO}^-$). The surface adsorption occurs through chelation of carboxylate groups with Ca^{2+} metallic centers, hydrogen bonds with surface hydroxyl groups, and electrostatic interaction

between enzyme positively charged amino groups and support negatively charged phosphate groups [30].

Immobilization by covalent bonding is attained by surface modification in two steps. First, the nanocomposite $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ is silanized with APTES, an organofunctional alkoxy silane molecule with an amino functional group. Afterwards glutaraldehyde is used to covalently bond amino-terminated APTES with amino functional groups of the enzyme through a Schiff base cross-linking reaction that forms imine bonds (see scheme of Fig. 4A).

Table 1 summarizes the amount of the immobilized enzyme on the magnetic nanocomposite surface quantified by the Bradford protein assay. The effect of pH was evaluated within the pH range between 6 and 8 to avoid protein denaturation. In general, a remarkable influence of pH on protein loading on the surface $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}$ through both, adsorption and covalent protocols was observed. Higher protein content was determined for adsorption at higher alkaline pH 8.0. Several functionalities present in the side chain of amino acids are partially or mainly deprotonated at $\text{pH} = 8.0$ such as carboxylic groups, imidazole group of histidine (pK_a -5.6), or even the thiol functionality in cysteine (pK_a -6.8) which contribute to an improved coordination to Ca^{2+}

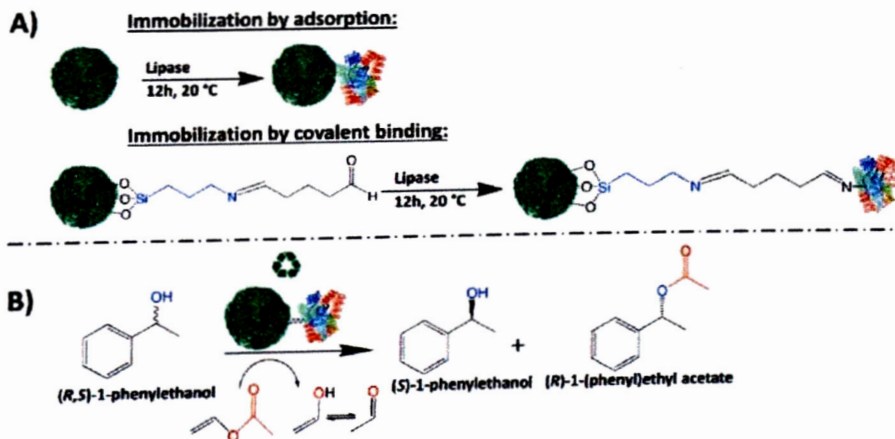


Fig. 4. A) Enzyme immobilization indicating temperature and time of reaction. B) Enantioselective transesterification reaction of (R,S) -1-phenylethanol catalyzed by the nanocomposite $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}/\text{Lipase}$ and $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{HAP}/\text{APTES}/\text{Lipase}$. The green spikes the needle-shaped hydroxyapatite coating.

Table 1
Enzyme immobilization per gram of CoFe_2O_4 /HAP support.

Immobilization method	Enzyme immobilized (mg g^{-1})		
	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
Adsorption	14.42	11.35	21.2
Covalent	11.84	16.53	2.97

centers of HAP [31]. The higher attachment to the surface by adsorption may be explained by the higher availability of ionized groups at higher pH. [30] However, a completely different trend was observed for the covalent bonding functionalization. This is explained by the pH-sensitivity of the Schiff base cross-linking reaction that may result in varied yields and optimum pH of reaction depending on reagents involved [32,33]. Note that a highly alkaline media slows down the Schiff base cross-linking reaction of glutaraldehyde and enhances the rate of competing reactions (e.g. self-condensation, hemiacetals formation) reducing the yield of successfully cross-linked lipase protein [34,35]. Indeed, the loaded enzyme on the CoFe_2O_4 /HAP was dramatically diminished from 16.53 mg g^{-1} down to 2.97 mg g^{-1} . Both methods allowed a similar order of magnitude of enzymatic loading, therefore performance and stability of both magnetic bio-nanocomposite catalyst CoFe_2O_4 /HAP/Lipase and CoFe_2O_4 /HAP-APTES-Lipase was evaluated.

3.3. Evaluation of enzyme activity for the magnetic bio-nanocomposites catalyst

Enzymes are biocatalysts that can be potentially used to improve yield and selectivity in synthetic processes in industry, especially in fine chemistry. One of the possible applications for the bio-nanocomposites is the access to both enantiomers from a racemic mixture through selective transesterification followed by separation of alcohol-ester mixtures through, a simple column chromatography, Deep-Eutectic-Solvents (DES) [36] or supercritical fluid chromatography [37]. However, the challenge is to control the enantioselective transformation of solely one of the enantiomers in the racemic mixture. Herein, we evaluate the catalytic performance and selectivity of the immobilized enzymes (magnetic bio-nanocomposites) towards the transesterification reaction of (*R,S*)-1-phenylethanol according to the scheme of Fig. 4B. Note that blank experiments with free enzyme attained complete conversion solely after 30 h of reaction, which suppose a faster enantioselective transesterification reaction of ca 20-fold by the bio-nanocomposite catalysts. The enantiomer (*S*)-1-phenylethanol is of relevance due to its application as building block in the synthesis of bioactive pharmaceuticals and natural products widely used as antidiabetics and antidepressants [38]. Furthermore,

(*S*)-1-phenylethanol is exploited as precursor in the preparation of liquid crystals and optically active polymers [38].

3.4. Effect of solvent on enzyme activity

Solvent environment may affect the structural conformation of the enzyme, which is tightly related to its catalytic activity [39,40]. Therefore, three solvents commonly used in industrial processes were evaluated for enantioselective transesterification of (*R,S*)-1-phenylethanol. The bar graphs of Fig. 5 summarize the total conversion and the *ee* percentage attained after 1 h of reaction at 35°C in hexane, heptane, and toluene. These solvents were selected for this study since are the most conventional solvents used in synthesis. It is important to remark the low conversion achieved in toluene media when compared to hexane and heptane. This can be explained due to the aromatic structure of toluene which is similar to the substrate structure. Toluene may compete for catalytic sites with 1-phenylethanol, which result in a deficient interaction between enzyme and substrate with a conversion of 12%.

Linear organic solvents hexane and heptane enhanced catalytic activity due to the stabilization of the enzyme quaternary structure and no competition for catalytic sites. Enzymatic conversion showed similar enantioselectivity in both solvents with preference to (*R*)-1-phenylethanol, allowing the ester production with high *ee* values. However, it can be deduced from Fig. 5 a higher catalytic performance in heptane was achieved, >99% *ee* for the product. Based on these results, heptane was selected as appropriate solvent for further studies.

Fig. 5 also compares the performance of bio-nanocomposites obtained by lipase adsorption and through covalent bonding. Despite the solvent, it was observed a higher enzyme activity when it was covalently bonded to the support. Considering that both nanocomposites contain similar enzyme loading (Table 1), this trend could be explained by the slight structural conformation change of adsorbed lipase that may be induced through surface/protein interactions.

3.5. Influence of temperature on enzymatic activity and selectivity

Temperature is known to be a relevant parameter for enzyme activity, since it will clearly affect enzyme stability and structure [41]. Fig. S3A depicts the effect of temperature between 25°C – 60°C on the enantioselective conversion of (*R,S*)-1-phenylethanol by the lipase bio-nanocomposites. It can be observed that high conversion ratios for (*R*)-1-phenylethanol were attained at temperatures over 35°C . This is explained by the thermal activation that provides higher probabilities of formation of the transition complex enzyme-substrate [41]. Nevertheless, higher temperatures tend to denature proteins ($>50^\circ\text{C}$) [39], but this was not observed herein probably due to the conformational stabilization provided due to the attachment to the CoFe_2O_4 /HAP

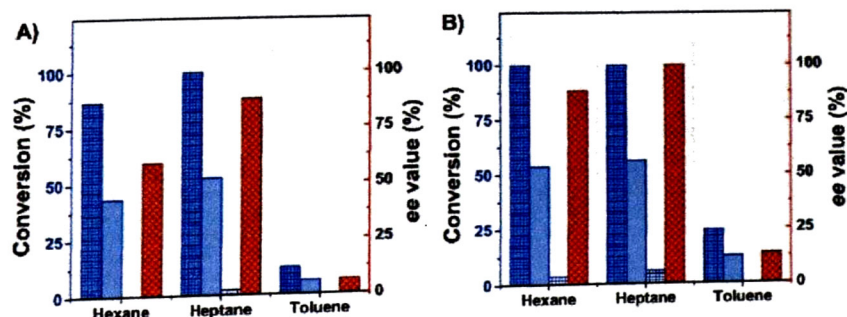


Fig. 5. Effect of solvent on the transesterification reaction (1 h, 35°C): (a) lipase adsorbed to CoFe_2O_4 /HAP and (b) lipase covalently bonded to CoFe_2O_4 /HAP-APTES. The graph shows the overall conversion of 1-phenylethanol, (*R*)-1-phenylethanol selective conversion, (*S*)-1-phenylethanol selective conversion, and the enantiomeric excess of (*S*)-1-phenylethanol in solution.

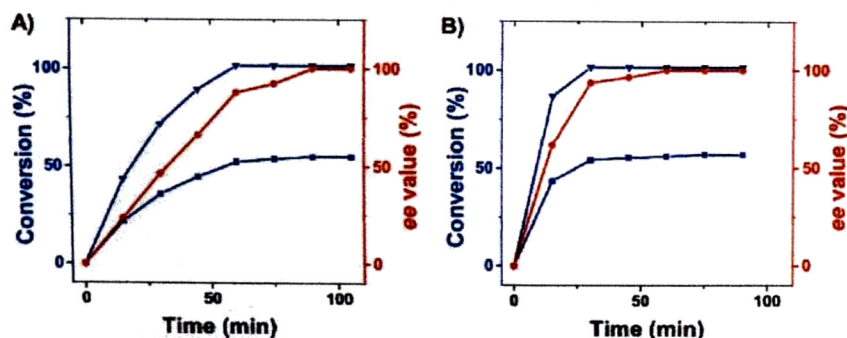


Fig. 6. Conversion of (R,S)-1-phenylethanol through enzymatic transesterification (35 °C): (a) Lipase adsorbed to CoFe₂O₄/HAP and (b) Lipase covalently bonded to CoFe₂O₄/HAP-APTES. The graph shows the (■) overall conversion of 1-phenylethanol, (▼) (R)-1-phenylethanol selective conversion, and (●) the enantiomeric excess of (S)-1-phenylethanol in solution.

nanoparticles. Similar trends on enzyme stabilization have been observed in literature [42]. In terms of enantioselectivity it can be observed a volcano shape with a maximum ee percentage at 35 °C (see Fig. S3A) for both CoFe₂O₄/HAP/Lipase adsorbed and CoFe₂O₄/HAP-APTES-Lipase covalently bonded. Thus, 35 °C was selected as optimum temperature.

3.6. Kinetics of transesterification reaction under optimized conditions

Fig. 6 shows the conversion profile of the transesterification reaction of (R,S)-1-phenylethanol. It is clearly observed a high selectivity and fast kinetics towards the (R)-enantiomer. A quick comparison between the performance of both catalysts clearly indicates the higher enzyme activity of CoFe₂O₄/HAP-APTES-Lipase covalently bonded. The complete conversion of the (R)-1-phenylethanol only after 25 min, meanwhile over 60 min was required by CoFe₂O₄/HAP-Lipase adsorbed catalyst. The use of the molecular spacer APTES-glutaraldehyde that forms the covalent bonding with the lipase enzyme contributes to maintain the structural conformation as well as providing a major accessibility to the catalytic sites of the enzyme [43].

Fig. 6 also provides an additional insight on the transesterification reaction. It can be observed the preferential reaction of (R)-1-phenylethanol until its complete consumption from the reaction media.

3.7. Magnetic recovery, reuse and stability of magnetic bio-nanocomposites

The magnetic core of the bio-nanocomposite CoFe₂O₄/HAP functionalized with enzyme lipase has as main advantage the easy operational recovery through the application of an external magnetic field. Fig. 7 illustrates the selective enzymatic conversion of (R)-1-phenylethanol through the catalyzed transesterification reaction (see Fig. 4B) after several cycles of recovery and reuse. Noteworthy is the high reproducibility and the maintained catalytic activity for the covalently bonded lipase (CoFe₂O₄/HAP-APTES-Lipase bio-nanocomposite). The reutilization assays gave improved results that those reported to date (Table 2). Noteworthy are the lower times of bio-catalytic reaction required of 25 min for covalent attached lipase respect to the 60 min of adsorption modifications. One of the cutting edge contributions of this novel attachment procedure is the capability to reuse the bio-catalysts with no losses in selectivity (high purity product) or catalytic conversion. Note that the magnetic recovery would reduce considerably costs of separation by conventional filtration processes at larger scale.

However, it can be observed a small decay on catalytic activity of the adsorbed CoFe₂O₄/HAP/Lipase catalyst after 10 cycles. Reaction mixture was analyzed after each cycle using the Bradford method to quantify possible leached enzymes. Bradford analyses were negative allowing to infer a good attachment of lipase using both methods of catalyst

preparation (adsorption and covalent bonding). However, the decay on catalytic activity for the adsorbed CoFe₂O₄/HAP/Lipase may be explained by enzymatic deactivation due to protein denaturalization promoted by the loss of conformation rearrangement capability due to the adsorption on catalyst surface. In contrast, the molecular spacer APTES-glutaraldehyde that forms the covalent bonding with the lipase enzyme allows the structural re-conformation due to the major lability of the enzyme (see scheme of Fig. 5) which seems to ensure a major stability with retaining of catalytic activity over time [48,49]. It can be concluded that the formation of a covalent bond enhances enzymatic stability and ensures the bio-nanocomposite reusability. The magnetic properties of the CoFe₂O₄ core enable easy recoverability, which will impact positively the cost of this methodology, providing niche market competitiveness.

4. Conclusion

Enzymatic catalysis emerges as sustainable alternative in enantioselective synthetic methods, however cost and lack of reusability are major barriers of implementation. In this work, stabilization of enzymes on magnetic biocompatible nano-supports are studied as a game changing platform for enzyme stabilization, recovery and reuse. The magnetic properties core of CoFe₂O₄ provides capabilities for easy magnetic recovery after use, while the biocompatible hydroxyapatite

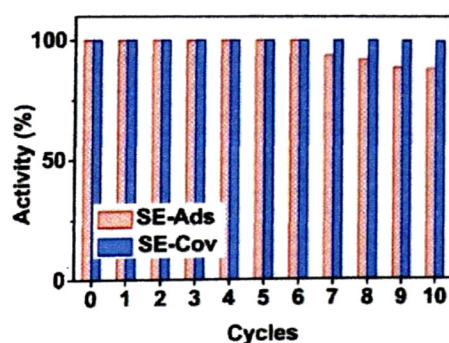


Fig. 7. Enzyme activity on the transesterification of (R,S)-1-phenylethanol in heptane at 35 °C after several cycles of catalyst recovery and reuse: (■) Lipase adsorbed to CoFe₂O₄/HAP and (■) Lipase covalently bonded to CoFe₂O₄/HAP-APTES.

Table 2
Recent studies on kinetic resolution of (R,S)-1-phenylethanol with lipase immobilized.

Type of support	Immobilization	Temperature (°C)	Reaction time (min)	Yield conv/ee, (%)	Reuse	Ref.
CoFe ₂ O ₄ /HAP	Covalent	35	25	50/-99	10 (-98%)	This work
	Adsorption	35	60	50/-99	10 (-80%)	
Free	-	35	1800	50/99.2	-	This work
Pullulan polysaccharide	Adsorption	55	180	50/99.2	10 (80%)	
Mesoporous Silica	Adsorption	30	360	50/m ^a	6 (-80%)	[44]
Pd-MCF	Covalent	50	360	50/99.89	n ^a	[45]
Zn/N-CI LDH	Covalent	35	60	50/-99	30 (-50%)	[47]

^a Not informed by authors.

coating enables lipase enzyme attachment. Core-shell CoFe₂O₄/HAP nanoparticles were functionalized with lipase enzyme through direct adsorption and by covalent bonding using a molecular spacer. The second option demonstrated to provide a more stable and long term operational bio-nanocatalyst that can be reused several cycles without decay on catalytic activity. Evaluation of the catalytic activity showed high selectivity on the transesterification for racemic mixtures of (R,S)-1-phenylethanol with complete conversion of (R)-1-phenylethanol enantiomer. This enhances the enantiomeric excess of (S)-1-phenylethanol that can be separated from the media to obtain a 100% pure enantiomer of high added value in synthesis. Evaluation of solvent allowed identifying heptane as suitable media for reaction with high conversion and catalytic activity. Optimum temperature was found at mild conditions (35 °C) allowing to achieve the product with >99% ee in a fast reaction. Kinetic studies demonstrated higher catalytic activity of CoFe₂O₄/HAP-APTES-Lipase covalently bonded that was associated to the major lability and availability of catalytic sites due to the molecular spacer APTE-gutaraldehyde that allows surface attachment while maintaining conformational freedom. Finally, magnetic recovery and reuse evidenced high stability of magnetic bio-nanocomposite catalysts (CoFe₂O₄/HAP-Lipase and CoFe₂O₄/HAP-APTES-Lipase) that maintain their catalytic activity over several cycles.

Acknowledgment

This work was supported by the Ministerio de Educación (MINEDU) of Peru through the agreement "Inter-institutional Cooperation Agreement between the Ministerio de Educación and the Universidad Nacional de Ingeniería" (No. 401-2017-MINEDU) and through the Master of Science Program (N° 208-2015-FONDECYT). L. H. Andrade thanks National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant #312751/2018-4), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant #2017/02854-8) for financial support.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2020.01.137>.

References

- [1] M. Poliakoff, P. Licence, M.W. George, UN sustainable development goals: how can sustainable green chemistry contribute? By doing things differently, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 13 (2018) 146–149, <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.04.011>.
- [2] V.L. Sirisha, A. Jain, A. Jain, Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes, *Adv. Food Nutr. Res.* 79 (2016) 179–211, <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>.
- [3] N. Sarmah, D. Revathi, G. Sheela, K.Y. Rani, S. Sridhar, V. Mehtab, C. Sunana, Recent advances on sources and industrial applications of lipases, *Biotechnol. Prog.* 34 (1) (2017) <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>.
- [4] K. Jaeger, T. Eggert, Lipases for biotechnology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 390–397.
- [5] S. Akai, K. Tanimoto, Y. Kanao, M. Egi, T. Yamamoto, Y. Kita, A dynamic kinetic resolution of allyl alcohols by the combined use of lipases and [VO(OSiPh₃)₂], *Angew. Chem.* 118 (2006) 2645–2657, <https://doi.org/10.1002/ange.200503765>.
- [6] P. Urrutia, R. Arrieta, L. Alvarez, C. Cardenas, M. Mesa, L. Wilson, Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: the impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability, *Int. J. Biol. Macromol.* 108 (2018) 674–686, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.12.062>.
- [7] A.A. Mehde, W.A. Mehdi, O. Severgin, S. Çakar, M. Özakar, Lipase-based on starch material as a development matrix with magnetic cross-linked enzyme aggregates and its application, *Int. J. Biol. Macromol.* 120 (2018) 1533–1543, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2018.09.141>.
- [8] D. Remonato, J.V. de Oliveira, J. Manuel Guisan, D. de Oliveira, J. Ninow, G. Fernandez-Lorente, Production of FAME and FAEE via alcoholysis of sunflower oil by *Yersinia* lipases immobilized on hydrophobic supports, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 185 (2018) 705–716, <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2683-1>.
- [9] M.R. Kavadia, M.G. Yadav, A.A. Odaneth, A.M. Lali, Synthesis of designer triglycerides by enzymatic acidolysis, *Biotechnol. Rep.* 18 (2018) e00246, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00246>.
- [10] C.H. Tan, P.L. Show, C.W. Ooi, E. Ng, J.C. Lan, T.C. Ling, Novel lipase purification methods – a review of the latest developments, *Biotechnol. J.* 10 (2015) 1–14, <https://doi.org/10.1002/biot.201400301>.
- [11] Z. Chen, Y. Sun, W. Zhang, T. Yang, L. Chen, R. Yang, N. Zhou, Controllable synthesis of amine-functionalized Fe₃O₄ polyhedra for lipase immobilization, *Cryst. Eng. Comm.* 18 (2016) 3124–3129, <https://doi.org/10.1039/C6CE00269B>.
- [12] X.N. Zhao, H.C. Hu, F.J. Zhang, Z.H. Zhang, Magnetic CoFe₂O₄ nanoparticle immobilized N-propyl diethylenetriamine sulfonic acid as an efficient and recyclable catalyst for the synthesis of amides via the Ritter reaction, *Appl. Catal. A Gen.* 482 (2014) 258–265, <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.06.006>.
- [13] S. Datta, L.R. Christena, Y.R. Sriramulu Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *Biotech.* 3 (3) (2013) 1–9, <https://doi.org/10.1007/s12005-012-0071-7>.
- [14] D. Liu, J. Chen, Y. Shi, Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 332–342, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>.
- [15] A. Kumar, K. Dhar, S.S. Kanwar, P.K. Arora, Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications, *Biol. Proced. Online.* 18 (2016) 1–11, <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0033-2>.
- [16] E.P. Cipolatti, A. Valério, R.O. Henriques, D.E. Moritz, J.L. Ninow, D.M.G. Freire, E.A. Manoel, R. Fernandez-Lafuente, D. De Oliveira, Nanomaterials for biocatalyst immobilization: state of the art and future trends, *RSC Adv.* 6 (2016) 104673–104692, <https://doi.org/10.1039/c6ra22047a>.
- [17] S. Behrens, Preparation of functional magnetic nanocomposites and hybrid materials: recent progress and future directions, *Nanoscale* 3 (2011) 877–892, <https://doi.org/10.1039/c0nr00634c>.
- [18] M. Nasrollahzadeh, M. Bagherzadeh, H. Karimi, Preparation, characterization and catalytic activity of CoFe₂O₄ nanoparticles as a magnetically recoverable catalyst for selective oxidation of benzyl alcohol to benzaldehyde and reduction of organic dyes, *J. Colloid Interface Sci.* 465 (2016) 271–278, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.074>.
- [19] A.A. Mehde, Development of magnetic cross-linked peroxidase aggregates on starch as enhancement template and their application for decolorization, *Int. J. Biol. Macromol.* 131 (2019) 721–733, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2019.03.052>.
- [20] S. Saire-Saire, E.C.M. Barbosa, D. Garcia, L.H. Andrade, S. Garcia-Segura, P.H.C. Camargo, H. Alarcon, Green synthesis of Au decorated CoFe₂O₄ nanoparticles for catalytic reduction of 4-nitrophenol and dimethylphenylsilane oxidation, *RSC Adv.* 9 (2019) 22116–22123, <https://doi.org/10.1039/c9ra04222a>.
- [21] M.N. Chen, L.P. Mo, Z.S. Cui, Z.H. Zhang, Magnetic nanocatalysts: synthesis and application in multicomponent reactions, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 15 (2019) 27–37, <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.08.008>.
- [22] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials* 29 (2008) 2941–2953, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>.
- [23] A. Dimitrijević, V. Dušan, F. Biheleović, D. Bezbradica, R. Jankov, N. Milosavić, One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite, *Bioresour. Technol.* 107 (2012) 358–362, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.077>.

- [24] C. Cannas, A. Ardu, A. Musinu, D. Peddis, G. Piccaluga, Spherical nanoporous assemblies of iso-oriented cobalt ferrite nanoparticles: synthesis, microstructure, and magnetic properties, *Chem. Mater.* 20 (2008) 6364–6371.
- [25] C.M. Kisukuri, A. Macedo, C.C.S. Oliveira, P.H.C. Camargo, I.H. Andrade, Investigating the influence of the interface in thiol-functionalized silver–gold nanoshells over lipase activity, *Langmuir* 29 (2013) 15974–15980, doi:10.1021/la404081n.
- [26] H. Hou, G. Xu, S. Tan, S. Xiang, A facile hydrothermal synthesis of nanoscale CuFe_2O_4 spinels with enhanced infrared radiation performance, *J. Alloys Compd.* 735 (2017) 2205–2211, https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.11.370.
- [27] M.K. Singh, A. Agarwal, R. Gopal, R.K. Swarnikar, R.K. Kotnala, Dumbbell shaped nickel nanocrystals synthesized by a laser induced fragmentation method, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 11074–11079, https://doi.org/10.1039/c1jm12320c.
- [28] H.L. Ding, Y.X. Zhang, S. Wang, J.M. Xu, S.C. Xu, G.H. Li, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}90_2$ core/shell nanoparticles: the silica coating regulations with a single core for different core sizes and shell thicknesses, *Chem. Mater.* 24 (2012) 4572–4580, https://doi.org/10.1021/cm302828d.
- [29] Z. Lin, R. Hu, J. Zhou, Y. Ye, Z. Xu, C. Lin, A further insight into the adsorption mechanism of protein on hydroxyapatite by FTIR-ATR spectrometry, *Spectrochim. Acta A* 173 (2017) 527–531, https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.050.
- [30] J.T. Ivčić, A. Dimitrijević, N. Milosavić, D. Bezbradica, B.J. Drakulić, M.G. Janjukić, M. Pavlović, H. Rogonjux, D. Veličković, Assessment of the interacting mechanism between *Candida rugosa* lipases and hydroxyapatite and identification of the hydroxyapatite-binding sequence through proteomics and molecular modeling, *RSC Adv.* 6 (2016) 34818–34824, https://doi.org/10.1039/C6RA07521E.
- [31] C.N. Pace, G.R. Grimsley, J.M. Schultz, Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 13285–13289, https://doi.org/10.1074/jbc.R800082000.
- [32] P.N. Scheller, M. Lenz, S.C. Hammer, B. Hauer, B.M. Nestl, Imine reductase-catalyzed intermolecular reductive amination of aldehydes and ketones, *ChemCatChem* 7 (2015) 3239–3242, https://doi.org/10.1002/cssc.201500764.
- [33] N. Reddy, R. Reddy, Q. Jiang, Crosslinking biopolymers for biomedical applications, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 362–369, https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008.
- [34] S. Faris, J. Song, Q. Huang, Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 998–1003, https://doi.org/10.1021/jf9011603.
- [35] R.C. Rodrigues, J.J. Virgen-Ortiz, J.C.S. dos Santos, A. Berenguer-Murcia, A.R. Alcantara, O. Barbosa, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 746–770, https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003.
- [36] Z. Mauger, W. Leitner, P. Dominguez De Maria, Practical separation of alcohol-ester mixtures using deep-eutectic-solvents, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 6968–6971, https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.10.044.
- [37] A. Parva, P. Vidinha, M. Angelova, S. Rebelo, S. Barreiros, G. Brunner, Biocatalytic separation of (R,S)-1-phenylethanol enantiomers and fractionation of reaction products with supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 55 (2011) 963–970, https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.09.037.
- [38] A.R. Chanyshva, G.V. Yunusova, T.E. Vorobyeva, V.V. Zorin, Enantioselective synthesis of (S)-1-phenylethanol, a precursor to low-molecular-weight bioregulators, *Russ. J. Gen. Chem.* 86 (2016) 3021–3024, https://doi.org/10.1134/S107036321613017X.
- [39] H. Tan, W. Feng, P. Ji, Lipase immobilized on magnetic multi-walled carbon nanotubes, *Bioresour. Technol.* 115 (2012) 172–176, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.066.
- [40] P. Hanokian, C.T. Liu, S. Hammes-Schiffer, S. Benkovic, Perspectives on electrostatics and conformational motions in enzyme catalysis, *Acc. Chem. Res.* 48 (2015) 482–489, https://doi.org/10.1021/ac500390c.
- [41] M.P. Kamble, S.A. Chaudhari, R.S. Sirghal, G.D. Yadav, Synergism of microwave irradiation and enzyme catalysis in kinetic resolution of (R,S)-1-phenylethanol by cutinase from novel isolate *Fusarium KT SACT*, *Biochem. Eng. J.* 117 (2016) 121–128, https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.007.
- [42] L.H. Andrade, L.P. Rebelo, C.G.C.M. Netto, H.E. Toma, Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 66 (2010) 55–62, https://doi.org/10.1016/j.jmcatb.2010.03.002.
- [43] D. Nady, A.H. Zaki, M. Raslan, W. Hozayen, Enhancement of microbial lipase activity via immobilization over sodium titanate nanotubes for fatty acid methyl esters production, *Int. J. Biol. Macromol.* (2019) https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2019.09.240.
- [44] L. Xu, G. Cui, C. Ke, Y. Fan, Y. Yan, Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on pH-responsive pullulan derivatives with improved enantioselectivity in chiral resolution, *Catalysts* 8 (2018) https://doi.org/10.3390/catal810013.
- [45] J. Liu, S. Bai, Q. Jin, H. Zhong, C. Li, Q. Yang, Improved catalytic performance of lipase accommodated in the mesoporous silicas with polymer-modified microenvironment, *Langmuir* 28 (2012) 9788–9796, https://doi.org/10.1021/la301330s.
- [46] D.B. Magadam, G.D. Yadav, Design of tandem catalyst by co-immobilization of metal and enzyme on mesoporous foam for cascaded synthesis of (R)-phenyl ethyl acetate, *Biochem. Eng. J.* 129 (2018) 96–105, https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.10.011.
- [47] G. Silva Dias, P.T. Bandeira, S. Jaeger, L. Piován, D.A. Mitchell, F. Wypych, N. Krieger, Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on layered double hydroxide of Zn/Al-Cl for kinetic resolution of rac-1-phenylethanol, *Enzym. Microb. Technol.* 130 (2019) 109365, https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109365.
- [48] B.J. Johnson, W. Russ Algar, A.P. Malanoski, M.G. Ancona, L.L. Medintz, Understanding enzymatic acceleration at nanoparticle interfaces: approaches and challenges, *Nano Today* 9 (2014) 102–131, https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.005.
- [49] S. Ding, A.A. Carpi, L.L. Medintz, J.C. Clausen, Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation, *Curr. Opin. Biotechnol.* 34 (2015) 242–250, https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.04.005.