

Síntesis y caracterización de materiales mesoporosos ordenados y su aplicación como soportes en la inmovilización de lipasa

Elías Serra, Rosa M. Blanco e Isabel Díaz

Resumen: Los materiales mesoporosos ordenados se aplican en catálisis, como fase activa y como soportes. En el presente trabajo se estudia la influencia de varios parámetros estructurales y químicos en la capacidad de inmovilización de Lipasa de *Candida antarctica* B (CaLB) en materiales mesoporosos ordenados (MMO). Se han preparado estructuras con poros tipo cilíndrico (SBA-15, KIT-6) así como tipo caja (SBA-16, FDU-12). Además, cada material se prepara en dos composiciones: puramente silíceos y funcionalizados con un pequeño porcentaje (5-10%) de grupos metilo. Los biocatalizadores finales se evaluaron en la reacción catalítica de hidrólisis de tributirina, y se analizó el lixiviado de la enzima en medio acuoso.

Palabras clave: Materiales mesoporosos ordenados, Materiales mesoporosos funcionalizados, inmovilización, enzimas soportadas, biocatalizadores.

Abstract: Ordered mesoporous materials are widely used both as catalyst or support. In the present work, the role of various structural and chemical parameters in the immobilization capacity of *Candida antarctica* B (CaLB) enzyme on OMM (Ordered Mesoporous Materials) was studied. Two types of porous structures were prepared: cylinder (SBA-15, KIT-6) and cage (SBA-16, FDU-12) type. Additionally, each material was synthesized in pure silica and methyl functionalized forms. Finally, the resulting catalysts were evaluated for the tributyrin hydrolysis reaction, and the leaching of enzyme in aqueous media was tested.

Keywords: Ordered mesoporous materials, Functionalized mesoporous materials, immobilization, supported enzymes, biocatalysts.

Introducción

Sin duda una de las familias de materiales porosos más importantes académica e industrialmente son las zeolitas, aluminosilicatos cristalinos microporosos de amplia aplicación en campos tan diversos como la petroquímica, procesos de intercambio iónico, separación de gases, etc.^[1] Sin embargo, el reducido tamaño de poro de estos materiales (generalmente inferior a 1,2 nm) supone una importante limitación en la difusión de moléculas voluminosas, involucradas en procesos tan importantes como el craqueo de gasoil de vacío u otros en química fina o industria farmacéutica, donde necesariamente se requiere porosidad en el rango del mesoporo.^[1] Hasta 1992 la mayoría de los materiales mesoporosos inorgánicos de que se disponía eran sólidos amorfos con distribución de diámetros relativamente ancha, y por tanto dudosa aplicabilidad en procesos en los que se requiera elevada selectividad por tamaños.

Materiales Mesoporosos Ordenados

Es en ese año cuando un grupo de investigadores de la empresa Mobil Oil patenta y publica una familia de materiales bautizada como M41S.^[2] Estos silicatos y aluminosilicatos se caracterizan por poseer un sistema poroso ordenado con una estrecha distribución de diámetros, acompañados de elevada área superficial y volumen de poro. Aunque dos años antes ya se había descrito la síntesis de un MMO, el FSM-16, a partir de un silicato laminar (kanemita),^[3,4] el mayor impacto posterior tanto de los materiales de la familia M41S como de su ruta de síntesis hacen que generalmente se los considere erróneamente los primeros de su clase.



E. Serra

R. M. Blanco

I. Díaz

Instituto de Catálisis y Petroquímica, CSIC,

C/Marie Curie 2, 28049 Madrid.

C-e: idadiaz@icp.csic.es

Recibido: 29/06/2007. Aceptado: 19/10/2007.

La estrategia de síntesis supone un importante salto en el concepto de agente director de estructura (ADE), que pasa de ser una molécula orgánica (zeolitas y zeotipos) a un agregado de moléculas anfífilas en los MMO. Estas moléculas, también llamadas surfactantes o agentes tensioactivos, se caracterizan por agregarse formando micelas esféricas cuando en disolución acuosa se supera una concentración denominada concentración micelar crítica (*cmc*) y siempre que se esté por encima de la temperatura de Kraft. Así se minimiza el contacto de las colas apolares, que están protegidas en el núcleo de la micela, con el medio exterior acuoso, hacia el que se orientan las cabezas polares. A concentraciones más elevadas, algunos tensioactivos evolucionan hacia un grado superior de ordenación, en el que a su vez las micelas se deforman y asocian generando supraestructuras a las que se denomina cristales líquidos. Éstos pueden adquirir muy diversas simetrías en función de factores como concentración, temperatura y la naturaleza específica de la molécula anfífila.

En el caso de la familia M41S, se utilizan surfactantes catiónicos de tipo alquiltrimetilamonio. Dentro del grupo, el material más estudiado y utilizado es el MCM-41 (siglas derivadas del acrónimo *Mobile Composition of Matter*), formado por un empaquetamiento de canales unidireccionales en geometría hexagonal que satisfacen la simetría impuesta por el grupo plano *p6mm*. Posee áreas superficiales próximas a los 1000 m²/g, volúmenes de poro mayores a 0,8 cm³/g y un diámetro muy uniforme y fácilmente ajustable entre 1,5-10 nm, aunque típicamente en torno a 4 nm. Pese a la preponderancia del material MCM-41, distintas condiciones de síntesis permiten obtener otras simetrías, como es el caso de la red tridimensional cubica bicontinua *1a3d* (MCM-48) o la fase laminar MCM-50.

En 1998, un grupo de investigadores de la Universidad de Santa Bárbara liderado por el profesor G. D. Stucky logró sintetizar MMO en medio fuertemente ácido utilizando, entre otros, surfactantes del grupo de los copolímeros de tres bloques, generalmente conocidos por su nombre comercial Pluronic.^[5] Se trata, al contrario de las sales de amonio cuaternarias usadas para el grupo M41S, de tensioactivos no iónicos, formados generalmente por un fragmento central de óxido de polipropileno (OPP), que actúa como cola apolar, y

dos cadenas laterales de óxido de polietileno (OPE), que actúan como cabezas polares. De entre ellos, el más utilizado es el de nombre comercial P123, que responde a la fórmula genérica $(\text{OPE})_{20}(\text{OPP})_{70}(\text{OPE})_{20}$.

Dentro de los materiales denominados SBA (siglas derivadas de la universidad de procedencia, *Santa Barbara University*), el caso más representativo es el SBA-15, análogo del MCM-41 sintetizado con el pluronic P123.^[6] En general, se trata de materiales con paredes de óxido de silicio más gruesas que los del grupo M41S (de hasta 60 Å), lo que les confiere mayor estabilidad hidrotérmica. Además, y lo que es más importante en nuestro caso, presentan mayores tamaños de poro, típicamente en torno a 9 nm en el caso de la SBA-15, aunque en teoría puede ampliarse hasta 30 nm. Otro ejemplo importante de esta serie es el SBA-16, preparado con el Pluronic F127 $(\text{OPE})_{106}(\text{OPP})_{70}(\text{OPE})_{106}$. Se trata de un material cúbico de simetría *Im3m* que tiene la particularidad de presentar un sistema de poros del tipo caja y ventana, con grandes cavidades conectadas entre sí por aberturas de menor tamaño, que se disponen en estructura cúbica centrada en el cuerpo.^[5]

Estos dos grupos de materiales son sin duda los más importantes dentro del mundo de los MMO y constituyen el punto de partida de la mayoría de los desarrollos ulteriores. Con el tiempo, la investigación en este campo se ha desarrollado y ramificado siguiendo diversos caminos, alcanzándose un considerable grado de refinamiento que continuamente lleva al hallazgo de nuevas estructuras y a un mejor control de las propiedades de los materiales. Sería imposible hacer aquí un análisis exhaustivo de todos los hitos en este campo, por lo que simplemente se señalan los hallazgos más relevantes para el presente estudio.

Desarrollos posteriores

La muestra SBA-16 sintetizada originalmente presentaba un tamaño de caja relativamente reducido (5,4 nm), lo que unido a la dimensión bastante menor de las ventanas que las interconectan entre sí, hace difícil su aplicación como soportes enzimáticos, para lo que requerirían tamaños algo mayores. Con el tiempo, sin embargo, se han desarrollado estrategias que permiten expandir y controlar de forma precisa ambos parámetros de forma independiente. Primero, varios grupos demostraron que tanto el aumento de la temperatura durante el tratamiento hidrotérmico (hasta unos 150°C) como su prolongación en el tiempo conducían, en diversos materiales con poros del tipo caja, a mayores diámetros de ventana.^[7-9] En el caso extremo, ambos diámetros llegan a igualarse, produciéndose una transición a estructuras de poro cilíndrico. Algo más tarde, el grupo de Ryoo combinó estas técnicas con el empleo de mezclas de surfactantes, añadiendo al F127 empleado en la síntesis tradicional de SBA-16 proporciones crecientes de P123, lo que provoca el hinchado de las cajas hasta tamaños que pueden llegar a los 9 nm.^[10] De este modo, combinando ambas técnicas se pueden modular ambas dimensiones de forma muy precisa e independiente.

Casi todos los nuevos grupos de materiales que han ido apareciendo se basan en variaciones sobre las síntesis ya descritas, introduciendo aditivos o manipulando las condiciones sobre la base de los surfactantes co-poliméricos en medio ácido. Por ejemplo, el grupo del profesor D. Zhao, de la *Fudan University*, ha desarrollado una nueva batería de materiales bajo las siglas FDU, generalmente sintetizados con

copolímeros de tres bloques como agentes directores. Así se llega, por ejemplo, al material FDU-12, sintetizado empleando el pluronic F127, mediante la adición de sales y de una molécula fuertemente hidrofóbica como trimetilbenceno (TMB), que se inserta en el núcleo de las micelas propiciando su hinchado y provocando una transformación de fase de *Im3m* a *Fm3m*.^[9] Se trata, al igual que la SBA-16, de una estructura formada por cajas, pero esta vez en disposición cúbica centrada en las caras en lugar en el cuerpo, es decir, una red con un empaquetamiento más compacto y mejor conectividad. Además, tanto el tamaño de las cajas como el de las ventanas es mayor que en la SBA-16. Estas características llevaron a que, ya en el propio artículo en que se describía su síntesis, se remarcara su enorme potencial como soporte de enzimas inmovilizadas, mostrando un comportamiento mucho más ventajoso en la adsorción de lisozima que la SBA-16. Además, como en el caso de la SBA-16, la modificación de las condiciones en el tratamiento hidrotérmico (temperatura y tiempo) permiten variar las propiedades texturales del sólido.

Otro grupo de MMO con propiedades interesante es el de la serie KIT, desarrollada por el grupo del profesor R. Ryoo en el *Korean Institute of Technology*. La síntesis de este tipo de materiales se basa en el empleo de concentraciones de ácido menores a las habituales (generalmente en torno a 0,5 M, aunque puede reducirse en algunos casos hasta 0,1 M). Esto ralentiza la cinética de formación de la mesofase, permitiendo un mejor control del proceso. De especial interés en nuestro caso es la KIT-6, preparada con el surfactante P123.^[11] Gracias al empleo de butanol y KCl se obtiene una fase cúbica bicontinua *Ia3d*, análoga del MCM-48 pero con tamaños de poro mayores y un rango de condiciones de síntesis mucho más amplio. La obtención de este tipo de fases es especialmente problemática y suele conducir a materiales de pequeño tamaño de poro, como es el caso del MCM-48, o bien presentan distorsiones estructurales, como en el FDU-5.^[12] El KIT-6, sin embargo, es un MMO de síntesis reproducible en un amplio rango de condiciones, y presenta elevados tamaños de poro que pueden llegar hasta los 12 nm (aunque se mantienen generalmente en torno a 8) y que se pueden controlar mediante simples variaciones en el proceso. Las ventajosas características de conectividad de este material, con una red tridimensional muy abierta y la presencia simultánea de dos sistemas de canales no conectados entre sí, lo hacen un candidato idóneo para la inmovilización de enzimas.

Inmovilización de lipasa en MMO

Los MMO suponen una mejora sobre las sílices amorfas preparadas por métodos sol-gel gracias a sus propiedades texturales. Además, la funcionalización de las paredes internas se puede realizar de forma sencilla con una amplia variedad de grupos funcionales, incluyendo cadenas hidrofóbicas. Desde su descubrimiento, los MMO se han postulado como excelentes soportes de inmovilización de biomoléculas, y desde los pioneros trabajos de Balkus y Díaz en 1996^[13] se han probado con una gran variedad de enzimas.^[14,15]

En el caso concreto de las lipasas, aunque se han logrado algunos resultados prometedores, aún queda mucho camino por recorrer. El tamaño habitual de este tipo de enzimas (con diámetros en torno a los 4 nm) les permite entrar en los canales de los MMO más comunes, aunque la difusión en un medio de espacio tan restringido puede ser problemática y

reducir la eficiencia del proceso.^[16] Esta restricción hace especialmente difícil la aplicación de las uniones covalentes, pues el anclaje irreversible de una enzima en canales poco mayores que su propio diámetro bloquearía los poros, provocando que la mayor parte de la superficie interna del material sea inaccesible. Además, en el único ejemplo de inmovilización covalente de lipasas en MMO, (realizada mediante la activación de SBA-15 con glutaraldehído), aunque no se ofrecen datos sobre la cantidad de enzima retenida, sí se describe una baja actividad hacia sustratos voluminosos (trioleína) en comparación con el derivado preparado mediante adsorción, lo que indica un bloqueo de los poros en el primer caso.^[17] Como señaló P. A. Wright en una reciente revisión, se necesitan poros al menos tres veces mayores que el diámetro de la enzima para poder aplicar este tipo de anclaje.^[14] Es decir, suponiendo un tamaño de la enzima de unos 4-5 nm, se requerirían canales de 12 a 15 nm para afrontar la unión por enlaces covalentes con garantías. A día de hoy estos tamaños, aunque alcanzables, siguen siendo poco habituales, especialmente en materiales con poros cilíndricos.

El anclaje de lipasas mediante interacciones más débiles, como atracción electrostática o enlaces de hidrógeno se ha probado con buenos resultados de carga enzimática, mostrando el esperado efecto estabilizador frente a la temperatura consustancial al confinamiento en espacios reducidos.^[18] Sin embargo, el lixiviado y la consiguiente pérdida de actividad en sucesivos ciclos de reacción parecen difíciles de evitar.^[19] Algunas estrategias como bloquear la entrada de los poros mediante sililación muestran cierto éxito en evitar la salida de la enzima, pero también reducen drásticamente su actividad, debido a la severidad de las condiciones del proceso de sililación.^[20,21] En todos los casos, el mecanismo de atracción postulado es una combinación de interacciones de van der Waals y atracciones electrostáticas. Esto provoca que, generalmente, la eficiencia del proceso disminuya al aumentar el pH,^[17] debido a que la sílice, por encima de pH 2, presenta una carga global negativa, mientras que el punto isoeléctrico de las lipasas suele ser bastante mayor (habitualmente se encuentra en torno a 6-8).

Como era de esperar, los mejores resultados hasta la fecha se han logrado mediante el empleo de fuerzas hidrofóbicas. La funcionalización con grupos octilos de muestras de FDU-12, sumada a la aplicación de altas presiones, permite obtener cargas enzimáticas elevadas y muy buenos resultados de actividad catalítica.^[22] El mantenimiento de esta actividad a lo largo de sucesivos ciclos de reacción indica ausencia de lixiviado debido al confinamiento de las biomoléculas en el interior de las cajas. Sin embargo, el proceso es en sí demasiado complejo (implica la compactación del MMO en forma de columna cromatográfica) y parece difícilmente generalizable, además de que sólo resulta eficiente en materiales con poros del tipo caja. Además, el material FDU-12 resulta difícil de reproducir y da lugar a muchos defectos estructurales que hacen difícil controlar su conectividad. Es más, su estructura ni siquiera está unívocamente resuelta.

El anclaje con grupos butilo, sin embargo, resultó menos efectivo y conduce a cargas aún menores que su análogo silíceo, aunque probablemente se deba al hecho de haberse realizado en muestras de MCM-41 con tamaño de poro bastante pequeño (menor de 4 nm) con lo que la reducción adicional por la presencia de la cadena hidrocarbonada resulta más importante que el aumento del carácter hidrófobo del material.^[23]

En el presente trabajo se ha elegido el método de funcionalización *in-situ* para, mediante la co-condensación de TEOS y metil-trietoxisilano (MTEOS) generar MMO tapizados con pequeños porcentajes de grupos metilo, que confieran a las paredes una cierta naturaleza hidrofóbica. Seguidamente, se inmoviliza la lipasa de *Candida antarctica* B, procedente de un extracto crudo suministrado por Novozymes. Como todas las lipasas posee el dominio hidrofóbico en su superficie y su inmovilización por este tipo de interacciones está bien documentada.^[24]

Discusión de resultados

MMO silíceos y metilados

Se han sintetizado cuatro tipos de materiales distintos, dos con poros de forma cilíndrica (SBA-15 y KIT-6) y dos con poros del tipo caja (SBA-16 y FDU-12). En la figura 1 se muestran reconstrucciones tridimensionales de las cuatro estructuras.

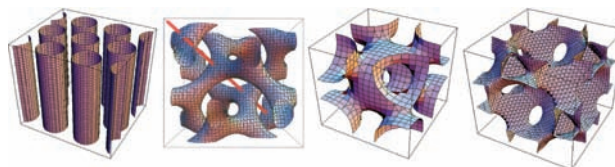


Figura 1. Estructura de los materiales mesoporosos sintetizados. De izquierda a derecha: SBA-15 ($p6mm$), KIT-6 ($Ia3d$), SBA-16 ($Im3m$), FDU-12 ($Fm3m$).

De los dos materiales con poros cilíndricos, el SBA-15 presenta una estructura plana hexagonal de canales mesoporosos unidireccionales (grupo espacial $p6mm$), que están a su vez conectados por microporos de mucho menor tamaño. Estos microporos no son útiles para la difusión de lipasa debido a sus reducidas dimensiones, pero pueden jugar un papel en la difusión de sustratos y productos a la hora de realizar las pruebas catalíticas. El material KIT-6, por su parte, posee una estructura cúbica (grupo espacial $Ia3d$) formada por dos sistemas de canales independientes, disponiendo cada uno de ellos de codos o interconexiones en los que conectan tres canales. En cuanto a los materiales con poros del tipo caja, ambos poseen estructura cúbica. En el SBA-16 las cajas están ordenadas en disposición cúbica centrada en el cuerpo, mientras que en el caso del FDU-12 la estructura cúbica está centrada en las caras.

Todas las estructuras se han preparado puramente silíceas y con un 5% de grupos metilo. Para demostrar la incorporación de los grupos metilo a la estructura de la mesofase, recurrimos a resonancia magnética nuclear de ^{29}Si . De acuerdo con esta técnica, podemos identificar y cuantificar las distintas especies de silicio: Q^4 (átomos de silicio enlazados a cuatro grupos $-\text{OSi}$), Q^3 (átomos de silicio enlazados a tres grupos $-\text{OSi}$ y un grupo $-\text{OH}$ u $-\text{O}^-$, resultando en una condensación parcial que genera un defecto) y T^3 (átomos de silicio enlazados a tres grupos $-\text{OSi}$ y a un grupo orgánico mediante un enlace Si-C). La existencia de especies de esta clase en los materiales funcionalizados denota la presencia de los grupos metilo.^[25]

La caracterización estructural de esta batería de materiales mesoporosos ordenados se realiza por difracción de rayos X de polvo y microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).^[26] En la Figura 2 se muestran, a modo de

ejemplo, las imágenes de microscopía electrónica y los difractogramas de rayos X de algunos materiales preparados para este estudio.

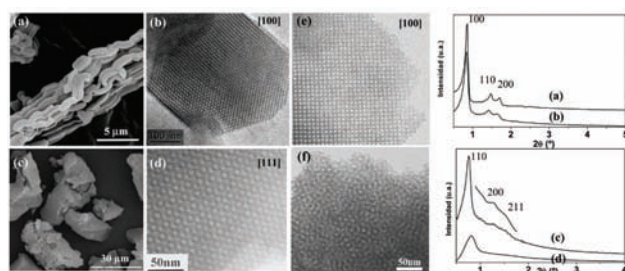


Figura 2. Imágenes de SEM (a y c) y de TEM (b y d) de las muestras Me-SBA-15 (a y b) y Me-KIT-6 (c y d). Imágenes de TEM de las muestras (e) Me-SBA-16, y (f) Me-FDU-12. Difractogramas de rayos X de las muestras SBA-15 (a), Me-SBA-15 (b), SBA-16 (c), Me-SBA-16 (d)

Por otra parte, el estudio de la porosidad de los materiales finales se realiza mediante isothermas de adsorción/desorción de N_2 . Usando el método BET se obtienen los valores de área superficial y volumen de poro. Las elevadas áreas superficiales y volúmenes de poro son típicas de este tipo de MMO, y confirman la buena relación pared/sólido y la alta porosidad de la red (Tabla 1).

Para calcular el diámetro de los poros y su distribución de tamaños, el modelo tradicionalmente empleado es el BJH aplicado a la rama de adsorción. Está ampliamente demostrado que este método infraestima el tamaño de poro, debido a que la ecuación de Kelvin, en la que se basa el modelo, no tiene en cuenta las interacciones adsorbente-adsorbato. Los desarrollos más recientes para corregir esta desviación se basan en la teoría funcional de la densidad no local (NLDFT).^[27,28] Si bien, en el presente estudio, nos hemos limitado a aplicar la metodología tradicional mediante el método BJH, que pese a dar tamaños algo inferiores a los reales, permite tener una idea aproximada para los diferentes materiales.

Además, aunque en el caso de las estructuras formadas por cajas el método BJH produce resultados aún menos satisfactorios que para los sistemas de poros cilíndricos, con errores que pueden ser de hasta el 100%, se sigue empleando con fines comparativos. Por otra parte, la correcta evaluación de ambas dimensiones es necesaria para poder desarrollar una discusión rigurosa sobre la influencia del tamaño de las ventanas/cavidades en la inmovilización de lipasa. Es por ello que, en colaboración con el doctor Yasuhiro Sakamoto, de la Universidad de Estocolmo, se ha aplicado el método de reconstrucción tridimensional desarrollado en su grupo a las muestras SBA-16 y Me-SBA-16.^[29] Mediante este método se extraen las fases y amplitudes de las ondas a partir de las imágenes de TEM, que junto con algunos datos adicionales como el volumen de poro o el tamaño de la celda unidad llevan a un modelo matemático que representa las cavidades del material. Las reconstrucciones así obtenidas de las dos muestras se presentan en la Figura 3.

El método de reconstrucción tridimensional facilita los tamaños de las cavidades y de las conexiones entre ellas, tamaños que esta vez sí que se pueden considerar "reales", y no tan sólo útiles a efectos comparativos. Estas dimensiones se indican en las reconstrucciones de ambas muestras. Los tamaños de poro medidos por el método BJH de todas las muestras son grandes, por encima de 8,8 nm (Tabla 1). En las

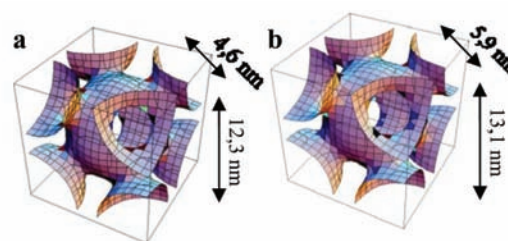


Figura 3. Reconstrucciones tridimensionales de las muestras SBA-16 (a) y Me-SBA-16 (b).

muestras en las que se dispone de las reconstrucciones tridimensionales, se observa una considerable discrepancia entre ambos valores. No sólo se obtienen valores casi un 50% mayor mediante la reconstrucción (confirmando la infravaloración de tamaños del método clásico), sino que el orden se invierte, resultando finalmente la muestra Me-SBA-16 mayor que la SBA-16. Gracias a este método podemos también apreciar que la técnica de ensanchamiento de las ventanas mediante tratamiento hidrotermal prolongado ha sido un éxito, resultando en tamaños de hasta casi 6 nm en la muestra metilada.

Resultados de inmovilización y actividad enzimática

Una vez sintetizados y caracterizados, todos estos materiales han sido probados como soportes para la inmovilización de la lipasa (CaLB). Se han utilizado además otros dos materiales: MCM-41 con tamaño de poro 4,7 nm;^[30] y una muestra de sílice mesoporosa de tamaño de poro grande (27,9 nm) y estructura desordenada, donada por la empresa Silica PQ Corporation. La caracterización de esta sílice amorfa (denominada a partir de ahora SA) se describe en la referencia 24.

Una serie de experimentos preliminares indicaron que el pH óptimo para la inmovilización, tanto en los materiales silíceos como en los metilados, era de 5. En esas condiciones, la sílice, que tiene un punto isoeléctrico (pI) de alrededor de 2,^[31] se encuentra cargada negativamente, mientras que la enzima, con un pI de 6,^[32] tiene carga neta positiva. De este modo se puede visualizar la interacción soporte-enzima como una atracción electrostática deslocalizada. Este mecanismo ya ha sido descrito y utilizado con éxito en el caso de otras enzimas, como citocromo c, papaína o tripsina^[13] o cloroperoxidasa,^[33] y a él se unen, en el caso de las muestras metiladas, las posibles fuerzas hidrofóbicas.

La enzima se caracteriza, como todas las lipasas, por poseer en su superficie un dominio fuertemente hidrofóbico capaz de interactuar con interfases. En presencia de residuos muy hidrofóbicos, como por ejemplo cadenas alifáticas largas, se pueden llegar a formar uniones intensas. En el caso de cadenas cortas como metilos, se espera tan sólo una mayor afinidad de la enzima por las paredes del material tapizado.

Teniendo todo esto en cuenta, se estudiaron varios tipos de efectos sobre los resultados de inmovilización de la enzima, de su lixiviado en medio acuoso una vez incluida en el interior de los materiales y de la actividad catalítica final de los biocatalizadores soportados.

Lo primero que se observa es que la máxima carga, 45 mg/g, se obtiene en la muestra de sílice amorfa (SA). Se pone así de manifiesto la crucial importancia del tamaño de los poros en el comportamiento de los soportes, algo que ya se había observado en los primeros estudios realizados sobre inmovilización de enzimas en MMO.^[13] Según los estudios

Síntesis y caracterización de materiales mesoporosos ordenados funcionalizados con grupos metilo...

Tabla 1.

Material	Diámetro de poro (nm)	S _{BET} (m ² /g)	Volumen de poro (cm ³ /g)	Tiempo de contacto (min)	Carga (mg/g)
MCM-41	4,7	595	0,82	1440	10
SA	27,9	305	2,70	120	45
SBA-15	8,8	890,3	1,31	120	44
Me-SBA-15	7,9	793,7	1,01	200	23
KIT-6	8,4	917,2	1,20	280	37
Me-KIT-6	7,7	983,6	1,29	50	35
SBA-16	10,2	658,5	0,73	1440	5
Me-SBA-16	8,8	507,8	0,85	1440	30
FDU-12	10,4	261,2	0,38	1440	28
Me-FDU-12	9,7	627,6	0,98	10	37

realizados con vidrios de tamaño de poro controlado, las restricciones al acceso de la enzima al interior de los canales sólo desaparecen completamente cuando el tamaño de poro es al menos 4 ó 5 veces superior al diámetro de la enzima.^[16] Como la dimensión mayor de la CaLB es de unos 5 nm, el material SA representa la inmovilización en ausencia de restricciones por tamaños de poro, mientras que en el resto de MMO este factor limita la eficiencia. Al aumentar el tamaño de poro, la difusión de la lipasa por el interior de los canales se ve facilitada, lo que acelera el proceso y se manifiesta en menores tiempos de contacto. A la vez, un poro mayor se bloquea con más dificultad, permitiendo entrar mayor cantidad de lipasa, de modo que la carga final aumenta. Esto sucede hasta que se alcanza un determinado tamaño crítico. Mientras que ambas tendencias se manifiestan en los materiales de poro creciente MCM-41 (4,7 nm), KIT-6 (8,4 nm) y SBA-15 (8,8 nm), apenas hay diferencia entre esta última muestra y SA (27,9 nm) pese a poseer poros más de tres veces mayores. Sorprende, además, la independencia de estos resultados respecto a la estructura de los sistemas porosos. El único factor que parece afectar es el diámetro, mientras que la mejor conectividad ofrecida por el sistema cúbico tridimensional de la muestra KIT-6 no supone una mejora respecto a los canales monodimensionales de la SBA-15. Los microporos que comunican los canales principales son en general demasiado pequeños, por lo que no influyen en la inmovilización.

Vemos por tanto que, en ausencia de interacciones específicas, la restricción del tamaño de poro en sistemas cilíndricos desaparece en torno a los 9 nanómetros, aproximadamente el doble del tamaño de la enzima, no siendo necesario contar con esos diámetros 4 ó 5 veces superiores. La explicación a esta diferencia con el dato bibliográfico está en los tamaños de partícula. Mientras que en su artículo Bosley y Clayton trabajan con partículas de entre unos 50 y 500 μm de diámetro, el análisis por SEM reveló que las de los MMO son de entre 1 y 10 μm . Esto prácticamente elimina el problema de la difusión interna, que ahora sólo se hace patente cuando los poros son tan pequeños que la enzima apenas cabe. Por tanto, en ausencia de funcionalización y de uniones intensas, ni aumentar el tamaño por encima de dos veces el diámetro de la enzima ni tratar de mejorar la conectividad logrará una inmovilización más eficiente.

Los dos materiales metilados de este tipo (Me-SBA-15 y Me-KIT-6) muestran una carga menor que sus análogos

silíceos. Entre los factores que pueden contribuir a la reducción en la carga de enzima destacamos el menor carácter hidrofóbico de los grupos metilo comparado con otros tales como octilo^[22, 24] o butilo^[23] utilizados por otros autores y la reducción en el volumen y tamaño de poro debido a la funcionalización de la superficie con grupos metilos.

Respecto a las dos estructuras formadas por cajas (SBA-16 y FDU-12), lo primero que se observa es un salto cualitativo en los tiempos de contacto: mientras que casi todas las muestras de poro cilíndrico alcanzaban su carga máxima en un tiempo de en torno a dos horas, ahora se precisan 24 para llegar al equilibrio en la mayoría de los casos. La razón está en el reducido tamaño de las ventanas que dan acceso a las cajas, con dimensiones muy parecidas al diámetro medio de la lipasa. De hecho, y aunque sólo disponemos de datos fiables del diámetro de la ventana para dos de las muestras, es muy probable que en muchas ese tamaño sea inferior a una o varias de las dimensiones de la enzima (3 x 4 x 5 nm), pues ventanas de más de 5 nm de diámetro son inusuales. Debido a esto, la enzima debe orientarse en la dirección adecuada para poder difundir a través de la estructura y avanzar de una caja a otra, lo que provoca la ralentización del proceso.

En cuanto a las muestras metiladas, la Me-SBA-16 presenta un comportamiento mucho mejor que su análogo silíceo. Sin embargo, esta mejora puede ser más debida al ensanchamiento de sus dimensiones que al agente funcionalizante en sí, que ya mostró tener poco efecto en la inmovilización en materiales cilíndricos. Además, los espectros de RMN de ²⁹Si revelaron que la incorporación de metilos en esa muestra concreta no había sido completa, con lo que su influencia es aún menos probable.

La muestra Me-FDU-12, por su parte, ofrece resultados sorprendentes. Sufre una inmovilización rapidísima, en unos pocos minutos, hasta valores próximos a 40 mg/g, bastante por encima del resto de MMO con poros del tipo caja. Este fenómeno aún no ha podido ser explicado completamente. Es posible que el tamaño de las ventanas sea mucho mayor que en el resto de las muestras, aunque en este caso no es posible aplicar el método de reconstrucción dada la naturaleza no ordenada de la red porosa (Figura 2f). Además, la isoterma de este material presentaba un gran volumen adsorbido en la región del macroporo, lo que podría estar indicando la presencia de algunas cavidades de gran tamaño, aunque es más probable que se deba a la porosidad entre partículas.

Al poner en contacto de nuevo los biocatalizadores con un medio acuoso para estudiar el lixiviado, nos encontramos de forma general que ciertos factores que no influían en la inmovilización, como la tortuosidad, la presencia de grupos metilo o el tamaño de poro por encima de 9 nm, sí que lo hacen en el lixiviado. El motivo de este comportamiento no está claro, aunque podría estar relacionado con la estabilización de la enzima en el interior de los canales. Dentro del sólido seco puede que la enzima, con el tiempo, pueda ir aumentando la intensidad de su interacción con la pared de la sílice, volviendo el proceso más sensible a variaciones en esos factores.

La actividad de los biocatalizadores preparados fue probada en la reacción de hidrólisis de la tributirina. Se trata de comprobar si la enzima mejora o al menos mantiene su actividad cuando se encuentra confinada en espacios apenas mayores que sus propias dimensiones. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 4. Hablamos de actividad en términos de eficiencia catalítica, que es la relación entre la actividad del catalizador (μ moles de tributirina hidrolizados por minuto y por gramo de catalizador) y la carga enzimática que contiene. La eficiencia catalítica se expresa por tanto en unidades de actividad por miligramo de enzima que contiene el biocatalizador. Para cada tipo de material (SBA-15 y KIT-6) se muestran los datos de la muestra sílicea y de la metilada, además de la muestra de SA en todos los casos, para facilitar la comparación.

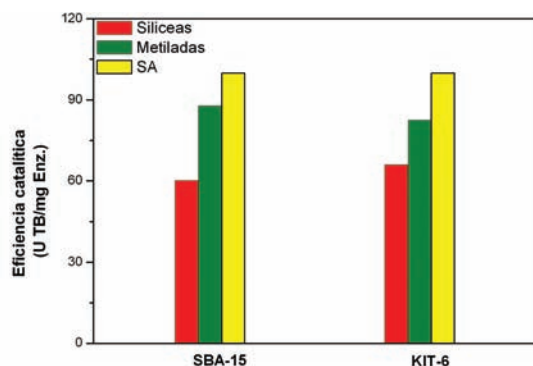


Figura 4. Eficiencia catalítica de los materiales de poro cilíndrico en la reacción de hidrólisis de tributirina.

Las dos muestras de MMO síliceas (KIT-6 y SBA-15) presentan actividades alrededor de un 40% menores que la SA, siendo algo mayores (un 10%) en el caso de la KIT-6. Efectivamente, es de esperar que el menor tamaño de poro de las muestras KIT-6 no influya en la difusión del sustrato, mucho menor que la enzima, mientras que la mayor conectividad que ofrece sí que supone una ventaja. En comparación con la SA, sin embargo, el espacio en ambos MMO es mucho más reducido, y la flexibilidad de la enzima menor, lo que causa esa considerable reducción de actividad. En el artículo de Bosley y Clayton con vidrio de tamaño de poro controlado,^[16] además de lo ya expuesto, se concluía que, para que la difusión interna no influyera en la velocidad de reacción ni por tanto en la actividad catalítica, los poros debían tener al menos 100 nm de diámetro. Para explicar la diferencia con respecto a la difusión de la enzima (siendo, sin embargo, los sustratos de reacción mucho menores) alegaban el menor tiempo de contacto aplicado en las reacciones con respecto al contacto con la lipasa en los experimentos de inmovilización. Esto también podría explicar la actividad inferior de los MMO con respecto a la SA, cuando, sin embargo, los

tamaños de partícula son mucho menores. Por otro lado, los derivados obtenidos a partir de los MMO metilados exhiben una actividad mayor que las muestras sin funcionalizar. Probablemente, este efecto viene provocado por dos motivos. Por un lado, la naturaleza hidrofóbica de las paredes metiladas del material hace que la enzima se acomode con el bolsillo hidrofóbico orientado hacia ellas. Esto dificulta que las lipasas se agreguen a través de sus respectivos bolsillos hidrofóbicos, un fenómeno muy típico en disoluciones concentradas y que conduce a pérdida de actividad. Además, el sustrato de la reacción (tributirina) es una molécula muy hidrofóbica, lo que favorece su entrada y difusión en los poros por la presencia de los grupos metilo, y permite también que se alcancen altas concentraciones locales de sustrato en el microentorno del enzima, mientras que el glicerol resultante es muy hidrofílico, lo que facilita su salida. Todo ello resulta en un aumento de la velocidad de reacción global.

En la Figura 5 se resumen los resultados de actividad hacia la hidrólisis de tributirina de los materiales del tipo caja SBA-16 y FDU-12 síliceos y metilados, junto con los datos de SA en ambos casos.

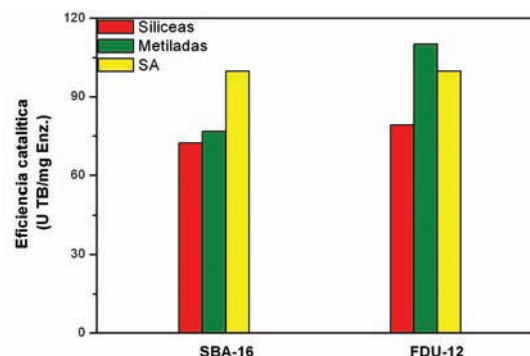


Figura 5. Eficiencia catalítica de los materiales de poro tipo caja en la reacción de hidrólisis de tributirina.

En el caso de las muestras con simetría *Im3m* (SBA-16), el material metilado presenta de nuevo una actividad mayor a la del material sin funcionalizar, probablemente por los mismos motivos que en los MMO de poro cilíndrico: la reducción de la agregación enzimática, aumento local de concentración de sustrato y la mejora en la difusión de sustratos y productos. Sin embargo, esta mejora es menor que la que mostraban los materiales metilados cilíndricos respecto a sus análogos síliceos. La razón está, probablemente, en la incorporación incompleta de la función orgánica, que hace que su hidrofobicidad sea aún menor que en las demás muestras metiladas.

La muestra Me-FDU-12 tiene de nuevo un comportamiento diferente al resto. Su actividad es mucho mayor que la de su análogo FDU-12, e incluso superior a la de la sílice amorfa SA. Esto es una nueva prueba de que el tamaño tanto de sus cavidades como de sus ventanas es, probablemente, mayor que el del resto de materiales, lo que unido a un porcentaje mayor de grupos metilo (10%) provocaría esta notable mejora.

Resumen y Conclusiones

En muestras mesoporosas síliceas de poro cilíndrico y pequeño tamaño de partícula, las restricciones a la difusión interna desaparecen cuando el diámetro de los canales es aproximadamente el doble que el de la enzima. Diámetros mayores no suponen una mejora del proceso, ni en cantidad

de enzima retenida ni en tiempo de contacto. El pequeño tamaño de partícula de estos MMO (por debajo de las 10 μm) explica que las limitaciones por tamaño desaparezcan tan pronto, al contrario de lo publicado en estudios anteriores. Por otro lado, para aprovechar la hidrofobicidad de la lipasa habría que usar residuos más hidrofóbicos. La mayor tortuosidad o conectividad de la red porosa tampoco conlleva diferencias importantes. Sin embargo, ambos factores (presencia de metilos y conectividad de la red) sí que parecen influir positivamente en evitar el lixiviado de la enzima cuando el soporte se suspende en medio acuoso, quizá debido a una cierta estabilización de la lipasa dentro del canal.

Como era de esperar, el acceso de la enzima está más dificultado en los materiales con poros del tipo caja, debido al reducido tamaño de las ventanas que dan acceso a las cavidades. Es más, se ha podido comprobar cómo materiales con un poro cilíndrico del mismo tamaño que la ventana de un material de tipo caja logran mayores cargas enzimáticas en el mismo tiempo. Sin embargo, una vez en su interior (gracias a la prolongación del tiempo de contacto), la enzima está atrapada mucho más eficazmente, y como consecuencia el lixiviado en medio acuoso es mucho menor. La muestra Me-FDU-12, por el contrario, presenta un comportamiento más parecido al de una sílice amorfa, probablemente debido a la naturaleza desordenada de la red porosa. Las muestras metiladas presentan actividades algo superiores a las síliceas.

Todos los criterios generales establecidos en este trabajo pueden ser aplicados en el futuro en cualquier estudio sobre inmovilización de enzimas en MMO, y se espera que sean una herramienta útil para dirigir y explicar una gran variedad de resultados.

Este trabajo supone tan sólo una aproximación genérica a un tema tan amplio como la encapsulación de lipasas en MMO. A partir de aquí, la investigación se puede ramificar siguiendo diversos caminos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de A. Mayoral y Dr. Y. Sakamoto, de la Universidad de Estocolmo, y de la Dra. T. Blasco, del Instituto de Tecnología Química. También la financiación a través de los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia MAT2006-04107 y de la Comunidad de Madrid GR/MAT/0694/2004. E. Serra agradece a la CAM por su beca predoctoral.

Bibliografía

- [1] F. Rey, J. L. Jordá, *Materiales Zeolíticos: Síntesis, Propiedades y Aplicaciones* (García Martínez, J.; Pérez-Pariente, J. eds.); **2002**; Publicaciones Universidad de Alicante; pp. 42.
- [2] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T-X. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, J. L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834–10843.
- [3] T. S. Yanagisama, T. Shimizu, K. Kuroda, Ch. Kato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 988–992.
- [4] S. Inagaki, Y. Fukushima, K. Kuroda, *Chem. Común.* **1993**, 680–682.
- [5] D. Y. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 6024–6036.
- [6] D. Y. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* **1998**, *279*, 548–552.
- [7] F. Kleitz, D. Liu, G. M. Anilkumar, I. S. Park, L. A. Solovyov, A. N. Shmakov, R. Ryoo, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 1429–14300.
- [8] J. R. Matos, M. Kruk, L. P. Mercuri, M. Jaroniec, L. Zhao, T. Kamiyama, O. Terasaki, T. J. Pinnavaia, Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 821–829.
- [9] J. Fan, C.Z. Yu, T. Gao, J. Lei, B.Z. Tian, L.M. Wang, Q. Luo, B. Tu, W.Z. Zhou, D.Y. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3146–3150.
- [10] T.W. Kim, R.Ryoo, M. Kruk, K. P. Gierszal, M. Jaroniec, S. Kamiya, O. Terasaki *J. Phys. Chem. B* **108** **2004**, 11480–11489.
- [11] T. W. Kim, F. Kleitz, B. Paul, R. Ryoo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7601–7610.
- [12] X. Liu, B. Tian, C. Yu, F. Gao, S. Xie, B. Tu, R. Che, L. M. Peng, D. Y. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3876–3878.
- [13] J. F. Díaz, K. J. Balkus Jr., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1996**, *2*, 115–126.
- [14] H. P. Yiu, P. A. Wright, *J. Mat.Chem.* **2005**, *15*, 3690–3700.
- [15] M. Hartmann, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4577–4593.
- [16] J. A. Bosley, J. C. Clayton, *Biotech. Bioeng.* **1994**, *43*, 934–938.
- [17] A. Salis, D. Meloni, S. Ligas, M.F. Casula, M. Monduzzi, V. Solinas, E. Dumitriu, *Langmuir* **2005**, *21*, 5511–5516.
- [18] K. Kato, R. Irimescu, T. Saito, Y. Yokogawa, H. Takahashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 203–206.
- [19] A. Macario, V. Calabrò, S. Curcio, M. De Paola, G. Giordano, G. Iorio, A. Katovic, *Stud. Surf. Sci. Catal.* **2002**, *142*, 1561–1568.
- [20] H. Ma, J. He, D. G. Evans, X. Duan, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2004**, *30*, 209–217.
- [21] J. He, Y. Xu, H. Ma, D. G. Evans, Z. Wang, X. Duan, *Micropor. Mesopor. Mater.* **2006**, *94*, 29–33.
- [22] Y. Han, S. S. Lee, J. Y. Ying, *Chem Mater.* **2006**, *18*, 643–649.
- [23] A. Galarneau, M. Mureseanu, S. Atger, G. Renard, F. Fajula, *New J. Chem.* **2006**, *30*, 562–571.
- [24] R. M. Blanco, P. Terreros, M. Fernandez-Perez, C. Otero, G. Diaz-Gonzalez, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2004**, *30*, 83–93.
- [25] I. Díaz, J. Pérez-Pariente, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 4641–4646.
- [26] E. Serra, A. Mayoral, Y. Sakamoto, R. M. Blanco, I. Díaz, *Chem. Mater.* enviado
- [27] P. I. Ravikovitch, D. Wei, W. T. Chueh, G. L. Haller, A. V. Neimark, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3671–3679.
- [28] P. I. Ravikovitch, G. L. Haller, A. V. Neimark, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, *76–77*, 203–226.
- [29] Y. Sakamoto, M. Kaneda, O. Terasaki, D. Y. Zhao, J. M. Kim, G. Stucky, H. J. Shin, R. Ryoo, *Nature* **2000**, *408*, 449–453.
- [30] M. Boveri, J. Agúndez, I. Díaz, J. Pérez-Pariente, E. Sastre, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2003**, *68*, 1914–1926.
- [31] C. J. Brinker., *Sol-gel Science. The physics and chemistry of sol-gel processing* (C. J. Brinker, G. W. Scherer; **1990**; Academic Press, London; pp. 103.
- [32] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* **1994**, *2*, 293–308.
- [33] Y. J. Han, J. T. Watson, G. D. Stucky, A. Butler, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2002**, *17*, 1–8.