Desarrollo de un método para la inmovilización de lipasas sobre superficies silíceas mediante spin coating

Danilo Cárdenas Moreno

Trabajo de para optar al título de Químico

Asesor
Yessika Galeano Duque, Ph.D.
Co-asesor
Monica Mesa Cadavid, Ph.D.

Universidad de Antioquia
Facultad de ciencias exactas y naturales, instituto de Química
Química
Medellin UdeA
2025

Cita	(Cardenas Moreno, 2025)
Referencia **Estilo APA 7 (2020)**	Cardenas Moreno Danilo. (2025). *Desarrollo de un método para la inmovilización de lipasas sobre superficies silíceas mediante spin coating, 2024–2025* [Trabajo de pregrado]. Universidad de Antioquia, Medellín.



Grupo de Investigación Ciencia de los Materiales Cienmate
Sede de investigación universitaria (SIU).



Repositorio Institucional: http://bibliotecadigital.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mi familia, por ser mi fuente constante de apoyo, amor y motivación en cada paso de mi vida.

A mis amigos, por acompañarme en los momentos más retadores y celebrar conmigo cada logro.

Y a todas las personas que, de alguna manera, me inspiraron a seguir adelante en este camino de aprendizaje y descubrimiento.

Agradecimientos

A mi familia, por su amor, comprensión y fe en mí, incluso en los momentos más difíciles.A mis directoras de tesis, por su guía, paciencia y valiosos aportes durante el desarrollo de este trabajo. A la Universidad de Antioquia y al grupo de investigación, por brindarme los espacios y recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación. A la Vicerrectoría de Investigación de la UdeA por la financiación mediante el programa de jóvenes investigadores con el convenio pasantía número 2023614050. Al Comite para el desarrollo de la investigación(CODI) que con el contrato numero 229090 permitio la financiación del proyecto.A todos mis amigos, cuyo apoyo incondicional me permitió superar los desafíos y continuar avanzando con determinación hacia mis metas.

Índice

Resumen 13

Abstract 14

Introducción 15

1 Planteamiento del problema 17

2 Objetivos 19

2.1 Objetivo general 19

2.2 Objetivos especificos 19

3 Hipótesis 20

4 Marco teórico 21

4.1 Fundamentos de la inmovilización enzimática 21

4.2 Ventajas y aplicaciones de la inmovilización enzimática 22

4.3 Metodologías de inmovilización 23

4.3.1 Inmovilización mediante unión física 25

4.3.2 Inmovilización mediante unión química 26

4.3.3 Estrategia de inmovilización covalente utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante 26

4.3.4 Tipos de superficies para la inmovilización enzimática 27

4.4 Superficies funcionalizadas para la inmovilización enzimática 28

4.5 Métodos de funcionalización de superficies 29

4.5.1 Modificación con silanos 29

4.5.2 Deposición química en fase vapor (CVD, por sus siglas en inglés) . . 30
4.5.3 Tratamiento con plasma 31
4.6 Técnica del *"spin coating"* 33
4.6.1 "spin coating" como técnica de recubrimiento 33
4.6.2 Ventajas del spin coating en la preparación de superficies 35
4.6.3 Aplicaciones del *"spin coating"* en la fabricacion de bioreactores . . . 36
4.7 Lipasas 37
4.8 Características principales de las lipasas 39
4.9 Mecanismos de acción de la Lipasa de *Aspergillus oryzae* en la hidrólisis de lípidos 41
4.10 Estudios previos sobre la inmovilización de Lipasas 42
5 Metodología 44
5.1 Determinación de las condiciones óptimas de funcionalización de la superficie de vidrio utilizando agentes silanizante 44
5.2 Caracterización del extracto enzimático comercial de lipasa de *Aspergillus oryzae* 45
5.3 Protocolo de inmovilización enzimática 47
5.3.1 Inmovilización por adsorción 47
5.3.2 Inmovilización covalente 47
5.4 Medición de la actividad y reusabilidad de las superficies con enzima inmovilizada 48
5.4.1 Hidrólisis de *p*-NPB con los biotacalizadores 48
5.4.2 Hidrólisis de triglicéridos con los biotacalizadores 48
5.4.3 Reusabilidad de los biocatalizadores 50

5.5 Ensayos de lixiviación de proteina 51

5.6 Caracterización fisico-quimica 53

5.6.1 Análisis termogravimétrico 53

6 Resultados y discusión 54

6.1 Determinación de las condiciones óptimas de funcionalización de la superficie de vidrio utilizando agentes silanizante 54

6.2 Caracterización del extracto enzimático comercial de lipasa de *Aspergillus oryzae* 63

6.3 Protocolos de inmovilización enzimática 64

6.3.1 Inmovilización por adsorción 64

6.3.2 Estrategia de inmovilización covalente utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante 70

6.4 Ensayos de lixiviación de proteina 77

7 Caracterización fisico-quimica 80

7.1 Análisis termogravimétrico 80

8 Conclusiones 82

9 Recomendaciones 83

Referencias 84

Lista de tablas

1 Comparación de métodos de funcionalización de superficies 32

2 Comparación de métodos de recubrimiento para la formación de películas delgadas 34

3 Variables evaluadas en la funcionalización con silano 44

4 Nomenclatura empleada para la identificación de las superficies funcionalizadas con 3-Aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) o 3-Glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS) con y sin prehidrólisis. 45

5 Actividad enzimática calculada para diferentes diluciones de la enzima, utilizando el método con p-NPB. 64

6 Resultados de la hidrólisis de triglicéridos para diferentes diluciones de enzima. 64

7 Actividad enzimática obtenida a diferentes concentraciones del funcionalizante durante la inmovilización. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. 69

8 Concentración de proteína determinada a distintas diluciones. 78

9 Masa de enzima inmovilizada en diferentes condiciones del medio. 78

Lista de figuras

1 Configuraciones típicas de biorreactores para utilizar enzimas o células inmovilizadas (panel superior). Panel inferior: modos de inmovilización de enzimas o células adecuados para la configuración respectiva del biorreactor. Tomado de (Dorau et al., 2021) 23

2 Diagrama que ilustra los principales métodos de inmovilización de enzimas. Los métodos reversibles son la adsorción, la unión iónica y la unión por afinidad. Los métodos irreversibles incluyen la unión covalente, el atrapamiento, la encapsulación y la reticulación. Tomado y adapatado de (Maghraby et al., 2023). 24

3 Principales mecanismos de funcionalización superficial con APTMS propuestos en la literatura. (a) Unión covalente mediante enlace siloxano; (b) adsorción física a través de enlace de hidrógeno con el grupo amino; (c) interacción intramolecular por formación de enlace de hidrógeno con la superficie adyacente; (d) enlace intramolecular con un grupo silanol. Adaptado (D'Sa et al., 2011). 28

4 Reacción de funcionalización de una superficie con silanoles mediante APTES. 30

5 Esquema del proceso de *"spin coating"*.Tomado de (Mustafa & Jameel, 2021). 36

6 Estructura cristalina de la lipasa de *Aspergillus oryzae* (PDB ID: 5XK2). Los residuos de la tríada catalítica aparecen en colores específicos: serina (azul), ácido aspártico (rojo) e histidina (verde). 39

7 Reacciones catalizadas por lipasas, incluyendo hidrólisis, esterificación y transesterificación. Tomado de((B. D. Ribeiro et al., 2011)). 40

8 Representación esquemática de la activación interfacial en lipasas. A la izquierda, la enzima se encuentra en su forma cerrada, con la tapa (*lid*) cubriendo el sitio activo, impidiendo el acceso del sustrato. A la derecha, en presencia de una interfase hidrofóbica, la tapa se desplaza, exponiendo el sitio catalítico y permitiendo la interacción con el sustrato(Brzozowski et al., 2000). 41

9 Representación esquemática del método de recubrimiento por giro (spin coating) e inmersión utilizado para fabricar la película de PS-b-P4VP, seguido por la adsorción de CALB (estructura en forma de cinta de CALB obtenida del PDB 1TCB ()(Pazol et al., 2019)) 42

10 Reacción de hidrólisis de *p*-NPB. Representación esquemática del proceso catalítico mediante el cual la lipasa hidroliza el *p*-nitrofenil butirato (p-NPB), liberando *p*-nitrofenol como producto detectable espectrofotométricamente. . 46

11 Reacción de hidrólisis de triglicéridos presentes en el aceite de aguacate usando lipasa de *Aspergillus oryzae*. Representación esquemática de la reacción catalizada por lipasas, en la cual los triglicéridos presentes en el aceite de aguacate son hidrolizados en presencia de agua, generando glicerol y ácidos grasos libres como productos principales. 49

12 Relación entre la concentración de proteína y el valor promedio de absorbancia obtenido experimentalmente, mostrando la línea de regresión lineal ajustada y su tendencia. 52

13 Estructuras químicas representativas del y (a) (3-Aminopropil) trimetoxisilano (APTMS) y (b) (3-Glicidoxipropil) trimetoxisilano (GPTMS). 55

14 Estructuras químicas representativas del y (a) (3-Aminopropil) trimetoxisilano (APTMS) y (b) (3-Glicidoxipropil) trimetoxisilano (GPTMS) prehidrolizado. 55

15 Mecanismos de reacción de la apertura del anillo epóxido. 57

16 Comparación de la morfología superficial entre el APTMS sin prehidrolizar y el GPTMS sin prehidrolizar, en todas las concentraciones y muestras. 58

17 Comparación de la morfología superficial entre el APTMS y el GPTMS sin prehidrolizar en una muestra específica. 58

18 Recubrimientos obtenidos con APTMS prehidrolizados, a diferentes concentraciones y tiempos de spin coating. 60

19 Imágenes representativas de las películas obtenidas mediante funcionalización con GPTMS prehidrolizado, a diferentes concentraciones y tiempos de spin coating. 61

20 Películas seleccionadas para la inmovilización enzimática con diferentes concentraciones. 62

21 A, la superficie hidrofóbica de CALB unida a películas hidrofóbicas en orientación top-on; B, la superficie hidrofóbica de CALB unida a películas en orientación side-on; y C, la superficie hidrofílica de CALB unida a películas en orientación side-on.(Chen et al., 2008). 66

22 Distribución de carga de la proteína obtenida mediante Coulombic Surface Coloring en Chimera. Las zonas rojas corresponden a regiones con carga negativa (usualmente debidas a residuos de Asp, Glu y grupos fosfato). Las zonas azules indican regiones con carga positiva (usualmente debidas a residuos de Lys, Arg y His). Las zonas blancas o grisáceas representan potenciales cercanos a neutro. 67

23 Gráfico de absorbancia relativa vs. reuso de los biocatalizadores obtenidos al inmovilizar la lipasa de *Aspergillus oryzae* mediante el método de adsorción . 69

24 Porcentaje de actividad enzimática en función del número de uso de los biocatalizadores obtenidos al inmovilizar la lipasa de *Aspergillus oryzae* mediante el método de adsorción. 70

25 Comparación de la reactividad del glutaraldehído a pH 7 y pH 10 durante el proceso de entrecruzamiento. 72

26 Conformaciones del glutaraldehído en función del pH. Imagen tomada y adaptada de (Migneault et al., 2004). 73

27 Mecanismo de utilización de APTMS y glutaraldehído para funcionalizar una superficie de celulosa. El APTMS puede reaccionar con los hidroxilos de la superficie mediante una reacción SN2 que da lugar a la pérdida de etanol. El glutaraldehído reacciona con la amina primaria para formar una base de Schiff dejando un extremo aldehído disponible para una reacción posterior con una amina primaria en una biomolécula. 75

28 Distribución de los residuos de lisina en la estructura de la lipasa de *Aspergillus oryzae*. 76

29 Porcentaje de actividad recuperada durante los ocho ciclos de reutilización de los biocatalizadores. 77

30 Cuantificación de proteína lixiviada bajo diferentes condiciones de fuerza iónica. 79

31 Termograma correspondiente a la superficie funcionalizada con APTMS al 60 % de concentración. 81

Siglas, acrónimos y abreviaturas

APA	American Psychological Association
APTMS	3-aminopropiltrimetoxisilano
GPTMS	3-glicidoxipropiltrimetoxisilano
MOFs	Soportes metal-orgánicos
APTES	3-aminopropiltrietoxisilano
CVD	Deposición química en fase vapor
CALB	lipasa de *Candida antarctica*
PhD	Philosophiae Doctor
PS-b-PVP	Poliestireno-bloque-poli(4-vinilpiridina)
pNPA	4-nitrofenilo
pNPB	p-nitrofenil butirato
PA-40-45	Muestras donde se varía Silanizante-concentración-rotación
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
TGA	Análisis termogravimétrico
UV-vis	Espectroscopía con rayo UV-visible
UdeA	Universidad de Antioquia

Resumen

El empleo de enzimas como herramienta catalítica ha cobrado creciente relevancia en el desarrollo de procesos más sostenibles y eficientes. En particular, las hidrolasas como la lipasa proveniente de *Aspergillus oryzae* han demostrado un alto potencial en aplicaciones que van desde la catálisis heterogénea en la industria química hasta el diseño de biosensores en el ámbito biomédico, gracias a su especificidad, eficiencia y capacidad de operar bajo condiciones suaves.

Para ampliar su aplicabilidad, es fundamental implementar estrategias de inmovilización enzimática que mejoren su estabilidad estructural y funcional, así como su posibilidad de reutilización. No obstante, los métodos convencionales de inmovilización, como la adsorción física, la unión covalente directa o la encapsulación en matrices poliméricas, presentan diversas limitaciones. Entre ellas destacan los altos costos de implementación, problemas de difusión del sustrato hacia el sitio activo de la enzima, y una distribución irregular del biocatalizador sobre la superficie soporte, lo cual afecta negativamente la eficiencia catalítica.

Frente a estas limitaciones, la técnica de "*spin coating* " ha emergido como una alternativa versátil para la deposición uniforme de enzimas sobre superficies sólidas. Este método permite aplicar películas delgadas de manera controlada, favoreciendo la inmovilización y la distribución homogénea de la enzima, además de facilitar su recuperación y reutilización. Cuando se combina con superficies funcionalizadas mediante agentes silanizantes, como el 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS) o el 3-aminopropiltrietoxisilano (APTMS), se habilita la formación de enlaces covalentes o interacciones específicas que estabilizan la enzima sin comprometer su actividad.

En el presente proyecto se planteó evaluar la interacción de lipasa con superficies de vidrio modificadas químicamente con GPTMS o APTMS, utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante. La inmovilización se llevará a cabo mediante "*spin coating* ", con el objetivo de obtener una biopelícula delgada, estable y catalíticamente activa. Esta estrategia busca superar las limitaciones de los métodos tradicionales, promoviendo un sistema inmovilizado más eficiente, con mayor estabilidad operativa y potencial de aplicación en distintos entornos industriales y biomédicos.

Palabras clave: Lipasa, silanizante,"*spin coating* ", estabilidad, inmovilización.

Abstract

The use of enzymes as catalytic tools has gained increasing relevance in the development of more sustainable and efficient processes. In particular, hydrolases such as lipase from Aspergillus oryzae have demonstrated high potential in applications ranging from heterogeneous catalysis in the chemical industry to the design of biosensors in the biomedical field, thanks to their specificity, efficiency, and ability to operate under mild conditions.

To broaden their applicability, it is essential to implement enzyme immobilization strategies that enhance their structural and functional stability, as well as their potential for reuse. Nevertheless, conventional immobilization methods, such as physical adsorption, direct covalent bonding, or encapsulation in polymeric matrices, present various limitations. Among these are high implementation costs, substrate diffusion issues toward the enzyme's active site, and an irregular distribution of the biocatalyst on the support surface, which negatively affects catalytic efficiency.

In response to these limitations, the spin coating technique has emerged as a versatile alternative for the uniform deposition of enzymes onto solid surfaces. This method allows for the controlled application of thin films, promoting enzyme adhesion and homogeneous distribution, as well as facilitating recovery and reuse. When combined with surfaces functionalized using silanizing agents, such as 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) or 3-aminopropyltriethoxysilane (APTMS), it enables the formation of covalent bonds or specific interactions that stabilize the enzyme without compromising its activity.

In the present project, the interaction of lipase with chemically modified glass surfaces using GPTMS or APTMS will be evaluated, employing glutaraldehyde as a crosslinking agent. Immobilization will be carried out via spin coating, with the objective of obtaining a thin, stable, and catalytically active biofilm. This strategy aims to overcome the limitations of traditional methods, promoting a more efficient immobilized system with greater operational stability and potential applications in various industrial and biomedical settings.

Keywords: Lipase, silanizing agent, spin coating, stability, immobilization

Introducción

El uso de enzimas como biocatalizadores ha cobrado gran importancia en las últimas décadas debido a su alta especificidad, eficiencia catalítica y capacidad para operar bajo condiciones suaves de reacción, lo que las convierte en alternativas sostenibles frente a los catalizadores químicos convencionales (Datta et al., 2013; Sheldon, 2007). Entre ellas, las lipasas se destacan por su versatilidad y estabilidad, posee varias aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, energética y ambiental (Hasan et al., 2006; Schmid et al., 2001).

Sin embargo, el empleo de enzimas libres presenta limitaciones asociadas a su inestabilidad estructural, pérdida de actividad en condiciones extremas y dificultades en su recuperación y reutilización, lo que incrementa los costos de los procesos industriales (Mateo et al., 2007; Sheldon & van Pelt, 2013). Para superar estos, se han desarrollado diversas estrategias de inmovilización enzimática, las cuales buscan mejorar la estabilidad, actividad y reusabilidad del biocatalizador. Dichas estrategias incluyen métodos físicos como la adsorción y el atrapamiento, así como métodos químicos, entre los que sobresale la inmovilización covalente mediante agentes entrecruzantes. (Barbosa et al., 2014; Migneault et al., 2004).

El éxito de estas metodologías depende en gran medida de las características del soporte empleado. En este sentido, los materiales silíceos, tales como el vidrio y la sílica, ofrecen ventajas por su estabilidad térmica y química, además de la facilidad para ser funcionalizados con agentes silanos como el (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES) o el (3-glicidoxipropil)trimetoxisilano (GPTMS), que permiten la introducción de grupos reactivos para la formación de enlaces covalentes con la enzima (Rahman & Padavettan, 2012; Sypabekova et al., 2022).

Uno de los principales retos en la inmovilización enzimática sigue siendo lograr una distribución homogénea de la enzima sobre la superficie, evitando problemas difusionales y pérdidas de actividad catalítica. Frente a esta limitación, la técnica de *spin coating* se presenta como una alternativa eficiente y reproducible para la formación de películas delgadas y uniformes, capaces de mejorar la interacción entre la enzima y el soporte (Mendhe, 2023; Mustafa & Jameel, 2021). Estudios recientes han demostrado que el *spin coating* no solo favorece la distribución homogénea del biocatalizador, sino que además reduce costos y facilita la escalabilidad hacia aplicaciones industriales y biomédicas (Bodade et al., 2017; Pazol et al., 2019).

El presente trabajo se centra en el desarrollo de un método de inmovilización de

lipasa de *Aspergillus oryzae* sobre superficies silíceas funcionalizadas, utilizando *spin coating* como técnica de recubrimiento y glutaraldehído como agente entrecruzante. Con ello, se busca obtener biocatalizadores más estables, reutilizables y eficientes, que puedan contribuir al diseño de sistemas sostenibles para su aplicación en la industria química, alimentaria y biomédica.

1 Planteamiento del problema

En las últimas décadas, el uso de enzimas en procesos industriales, biomédicos y ambientales ha obtenido gran importancia debido a su alta especificidad, eficiencia catalítica y funcionamiento bajo condiciones suaves de reacción (temperatura y pH) (Sheldon & van Pelt, 2013). Entre estos biocatalizadores, las lipasas se destacan por su versatilidad y estabilidad y amplia participación en diversas reacciones quimicas, siendo aplicadas en síntesis orgánica, producción de biocombustibles, industria alimentaria y desarrollo de bioreactores.(Patel et al., 2019),(Hasan et al., 2006) .

No obstante, uno de los principales desafíos en su aplicación a gran escala es la inestabilidad y la difícil recuperación del biocatalizador cuando se encuentra en solución libre, lo cual limita su reutilización, elevando costos aumentando los procesos de purificación para retirar la enzima de la reacción (Mateo et al., 2007). Para superar estas limitaciones, se han desarrollado diferentes estrategias de inmovilización enzimática, con el objetivo de mejorar la estabilidad estructural y operativa de las enzimas, disminuyendo la inhibicion mediantes estas técnicas y facilitando la recuperación del biocatalizador la cambiarlo de fase y tener un catalizador heterogeneo en el medio de reacción (Datta et al., 2013).

Los métodos convencionales de inmovilización, tanto físicos como químicos como la adsorción física, la unión covalente a soportes sólidos o la encapsulación, a pesar de ser ampliamente empleados, presentan diversas limitaciones. Una de las más relevantes, y en la que se enfoca este proyecto, es la distribución heterogénea de la enzima sobre la superficie de inmovilización. Esta distribución irregular puede generar gradientes de concentración y provocar problemas difusionales tanto para los sustratos como para los productos de reacción, afectando negativamente la eficiencia catalítica del sistema(Seenuvasan et al., 2020) (Malar et al., 2019).

En este contexto, el desarrollo de nuevas metodologias para obtener soportes funcionalizados y técnicas de deposición más controladas se vuelve una necesidad. El uso de superficies de vidrio funcionalizadas con agentes silanizantes, como el (3-Aminopropil) trimetoxisilano (APTMS) y (3-Glicidoxipropil) trimetoxisilano (GPTMS), permite la creación de enlaces covalentes entre la superficie y la enzima, mejorando la estabilidad y la fijación del biocatalizador (Taylor et al., 2005). A su vez, la técnica de spin coating ofrece una forma eficiente, reproducible y económica de aplicar películas delgadas y homogéneas de enzima sobre dichas superficies(Engelmann et al., 2020).

No obstante, existen pocos estudios que combinen simultáneamente estas dos estrategias (superficies funcionalizadas y "*spin coating* ") aplicadas a la inmovilización de lipasas, especialmente en matrices inorgánicas como el vidrio. Por tanto, resulta pertinente explorar cómo la selección del agente silanizante y la modificacion de los parametros de la tecnica de *"spin coating"* influye en la estabilidad, fijación y actividad catalítica de lipasas inmovilizadas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Desarrollar un método para la inmovilización de lipasas sobre superficies silíceas, con el fin de mejorar la estabilidad y reutilización de las enzimas para aplicaciones industriales en biocatálisis.

2.2 Objetivos especificos

- Optimizar la funcionalización de superficies de vidrio, evaluando el efecto de la concentración de los agentes silanizantes, el tiempo de *"spin coating"* y la prehidrolización del agente silanizante, para obtener recubrimientos con mayor uniformidad y estabilidad.
- Determinar la solución óptima del extracto enzimático para la inmovilización,con el fin de maximizar la retención de actividad enzimática.
- Evaluar el efecto del método de inmovilización (adsorción vs. covalente) sobre la estabilidad y actividad de las lipasas inmovilizadas,para identificar la estrategia más eficiente.
- Cuantificar la cantidad de proteína inmovilizada y lixiviada mediante el método de Bradford, para evaluar la eficiencia y estabilidad del proceso de inmovilización enzimática.
- Analizar la actividad catalítica y la reusabilidad de las lipasas inmovilizadas en superficies funcionalizadas mediante reacciones de hidrólisis en ciclos consecutivos,para determinar su viabilidad en aplicaciones repetitivas.

3 Hipótesis

La aplicación de la técnica de *"spin coating"* en la inmovilización de lipasas sobre superficies funcionalizadas con agentes silanizantes mejora la distribución homogénea de las enzimas, reduciendo los efectos difusionales y aumentando la eficiencia de las reacciones catalíticas.

4 Marco teórico

4.1 Fundamentos de la inmovilización enzimática

La inmovilización enzimática ha evolucionado desde mediados del siglo XX como una estrategia fundamental para mejorar la eficiencia y reutilización de las enzimas en diversos procesos (Sheldon, 2007). Originalmente, las enzimas solubles presentaban un uso limitado en aplicaciones industriales debido a su baja estabilidad frente a condiciones extremas de temperatura, pH y presencia de disolventes orgánicos. Sin embargo, con el desarrollo de técnicas de inmovilización, se logró ampliar considerablemente su campo de aplicación, permitiendo su implementación en escenarios cada vez más exigentes (Datta et al., 2013).

La inmovilización consiste en confinar o anclar las enzimas sobre un soporte sólido, manteniendo su actividad catalítica y permitiendo su recuperación y reutilización. Al inmovilizar una enzima, se busca principalmente aumentar su estabilidad estructural y operativa, minimizar la inhibición por productos, y facilitar la separación del catalizador al final del proceso. Como resultado, se ha incrementado su uso en distintas áreas de investigación científica, y especialmente en aplicaciones industriales, donde las enzimas inmovilizadas pueden actuar como biocatalizadores eficientes, con mayor especificidad de sustrato, estereoselectividad y regioselectividad en comparación con los catalizadores químicos convencionales (Tischer & Wedekind, 1999).

Existen diversos métodos de inmovilización enzimática, entre los cuales se destacan:

- **Adsorción**: unión física reversible sobre superficies como sílica, carbón activado o polímeros.
- **Enlace covalente**: fijación permanente mediante enlaces químicos entre grupos funcionales de la enzima y el soporte.
- **Entrampamiento**: encapsulación de la enzima dentro de una matriz polimérica (como alginato o geles de sílice).
- **Encapsulación**: confinamiento de la enzima dentro de una membrana semipermeable.
- **Reticulación (cross-linking)**: formación de agregados enzimáticos insolubles mediante enlaces intermoleculares.

Cada método presenta ventajas y limitaciones particulares en términos de actividad residual, facilidad de recuperación y costo de implementación (Mateo et al., 2007). Las aplicaciones de la inmovilización enzimática son diversas y continúan expandiéndose. En la industria alimentaria, se emplean enzimas inmovilizadas para producir productos sin lactosa, jarabes de glucosa, o mejorar el sabor y la textura de alimentos(Hasan et al., 2006). En el sector farmacéutico, se utilizan para síntesis de compuestos quirales con alta pureza enantiomérica. En la industria energética, son clave en la producción de biocombustibles a través de la conversión de aceites vegetales en biodiésel (Schmid et al., 2001). Asimismo, en el área medioambiental, se aplican en la biorremediación de contaminantes y tratamiento de aguas residuales (Hasan et al., 2006). Pese a estos avances, uno de los principales desafíos que persisten es la adecuada selección de las condiciones y materiales para la inmovilización, ya que muchas enzimas pierden actividad o no toleran bien la reutilización en ambientes industriales. Por ello, se continúa investigando en el diseño de nuevas superficies funcionalizadas y métodos de inmovilización más eficientes, como el *spin coating*, una técnica que permite el recubrimiento uniforme de enzimas sobre superficies sólidas a través de un proceso de rotación controlada. Esta metodología ofrece ventajas significativas en términos de control del espesor de la película, adherencia y reproducibilidad, posicionándose como una solución prometedora para aplicaciones a gran escala (Andreescu et al., 2008).

4.2 Ventajas y aplicaciones de la inmovilización enzimática

La inmovilización enzimática ofrece múltiples ventajas, entre las que destacan el aumento en la estabilidad estructural y funcional de la enzima, la posibilidad de reutilización del biocatalizador y la implementación de sistemas de reacción más eficientes y fácilmente controlables. Como se muestra en la Figura 1, los diseños de reactor comunes incluyen reactores de lecho empacado, lecho fluidizado, retentostato o reactores de membrana, utilizando enzimas entre cruzadas (CLEAs),adsorción o unión a un soporte sólido. La inmovilización puede mejorar el rendimiento de la lactasa, por ejemplo, aumentando su estabilidad o reduciendo la inhibición por galactosa. Por ejemplo, la β-galactosidasa *Lactobacillus plantarum* fue más de 20 veces más estable cuando fue inmovilizada en comparación con su forma libre (Benavente et al., 2015)

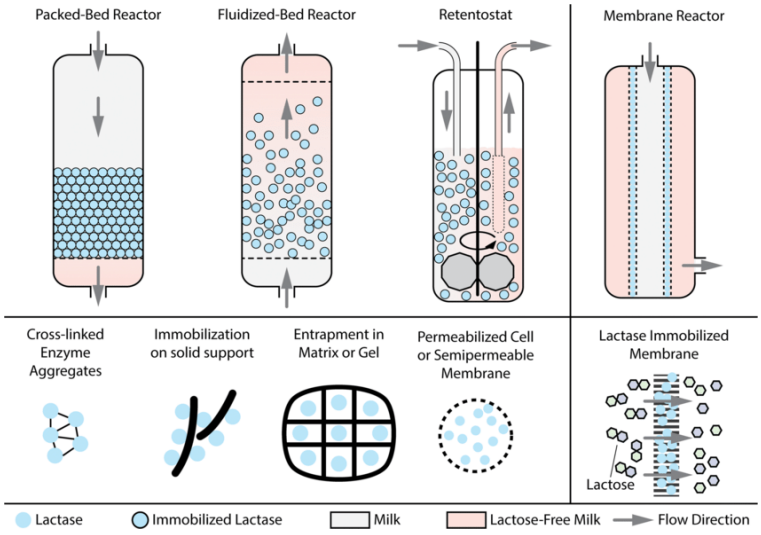


Figura 1

Configuraciones típicas de biorreactores para utilizar enzimas o células inmovilizadas (panel superior). Panel inferior: modos de inmovilización de enzimas o células adecuados para la configuración respectiva del biorreactor. Tomado de (Dorau et al., 2021)

No obstante, esta técnica también presenta algunas limitaciones. La inmovilización puede inducir alteraciones en la conformación tridimensional de las enzimas, comprometiendo su estructura terciaria o cuaternaria y, en consecuencia, su actividad catalítica. Adicionalmente, el uso de biocatalizadores inmovilizados puede incrementar los costos de operación, debido al precio elevado de los soportes y métodos de inmovilización en comparación con las enzimas libres, lo que representa un desafío económico tanto en procesos industriales como en investigación científica.

4.3 Metodologías de inmovilización

Existen múltiples metodologías, tanto físicas como químicas, para llevar a cabo la inmovilización de enzimas. La principal diferencia entre estas radica en el tipo de interacción que se establece entre la enzima y el soporte o matriz de inmovilización, que puede variar desde fuerzas físicas débiles hasta enlaces covalentes estables (Juarez, 2013).

Las matrices utilizadas para este fin presentan una notable heterogeneidad en cuanto a su naturaleza química, porosidad, hidrofobicidad, tamaño de partícula y compatibilidad con las enzimas, lo cual puede dificultar la selección del método más adecuado y afectar

la eficiencia del proceso. Como se muestra en la Figura 2, los métodos de inmovilización se pueden clasificar en técnicas físicas, como la adsorción y el atrapamiento, y químicas, como el entrecruzamiento y el enlace covalente. Es importante señalar que no todos los métodos requieren la presencia de un soporte sólido, ya que algunas estrategias se basan en la autoaglomeración o en el uso de polímeros solubles.

La elección del método más apropiado depende del tipo de enzima, de las condiciones operativas y del objetivo del proceso, ya sea industrial o experimental. Cada técnica ofrece ventajas particulares, como mayor estabilidad o facilidad de implementación, pero también presenta limitaciones, como pérdida de actividad o dificultades en la recuperación del biocatalizador. Por tanto, la selección debe realizarse con base en un análisis detallado de los requerimientos específicos del sistema.

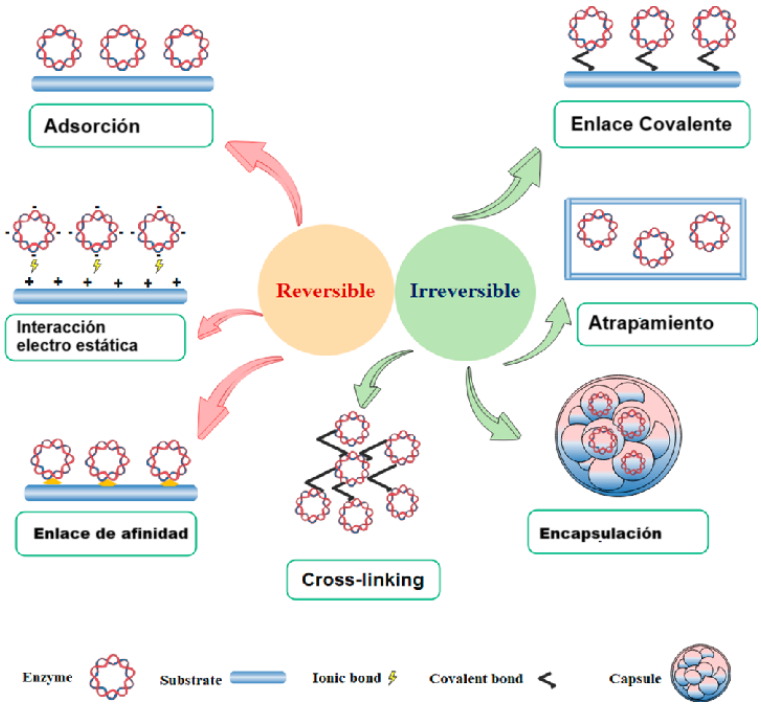


Figura 2

Diagrama que ilustra los principales métodos de inmovilización de enzimas. Los métodos reversibles son la adsorción, la unión iónica y la unión por afinidad. Los métodos irreversibles incluyen la unión covalente, el atrapamiento, la encapsulación y la reticulación. Tomado y adapatado de (Maghraby et al., 2023).

4.3.1 Inmovilización mediante unión física

La inmovilización de enzimas por unión física comprende un conjunto de técnicas en las que la enzima no forma enlaces covalentes con el soporte, sino que queda retenida o asociada a este mediante interacciones físicas o confinamiento estructural. Entre estas estrategias se encuentran el confinamiento, la microencapsulación, el uso de reactores de membrana y la adsorción. Estas metodologías presentan la ventaja de preservar, en gran medida, la conformación nativa de la enzima, lo que favorece su actividad catalítica. Sin embargo, su estabilidad puede verse comprometida por la desorción o la fuga del biocatalizador durante el proceso.

- **Confinamiento:** Este método se basa en la retención física de la enzima dentro de una matriz polimérica, como polímeros orgánicos o sílica gel. La red polimérica permite el libre paso de sustratos y productos, pero impide la salida de la enzima, la cual no se encuentra unida químicamente a la matriz. La efectividad del confinamiento depende del tamaño de poro de la red y de su estabilidad durante el proceso catalítico (Maghraby et al., 2023)..
- **Microencapsulación:** Técnica utilizada para proteger compuestos activos, incluyendo enzimas y nutracéuticos. Consiste en recubrir ingredientes funcionales con una película polimérica para formar cápsulas de tamaño micrométrico. Se aplica ampliamente en tratamientos médicos y en la liberación dirigida de medicamentos (Espinoza-Espinoza et al., 2024; Ozkan et al., 2019; J. S. Ribeiro & Veloso, 2021).
- **Reactores de membrana:** Son una innovación en biocatálisis que permite extender la vida útil de las enzimas y reducir los costos operativos. Estos sistemas también facilitan la separación continua de productos durante la reacción (Staniszewski et al., 2007).
- **Adsorción:** Es uno de los métodos más simples y se basa en la unión de la enzima al soporte mediante fuerzas físicas como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o interacciones iónicas (Juarez, 2013). Las principales variables que afectan este proceso son (Sheldon, 2007):

  1. **pH del medio:** Influye en la carga de la superficie proteica y del soporte.
  2. **Fuerza iónica:** Un aumento puede provocar la desorción de la enzima debido a la competencia de los iones del medio.
  3. **Diámetro de poro del soporte:** Debe ser al menos el doble del eje mayor de la enzima.

4. **Presencia de iones cofactores:** Algunos iones pueden mejorar la unión o la estabilidad de la enzima inmovilizada.

Aunque este método es fácil de aplicar y generalmente conserva la actividad catalítica, la naturaleza débil de las interacciones puede provocar la lixiviación de la enzima en el medio de reacción, comprometiendo así la estabilidad del sistema.

4.3.2 Inmovilización mediante unión química

La inmovilización enzimática por unión química se basa en la formación de enlaces covalentes entre la enzima y un soporte o entre las propias moléculas enzimáticas. Este enfoque incluye técnicas como la reticulación o entrecruzamiento, en la que se emplean reactivos bifuncionales.

Reticulación (entrecruzamiento): En este método, se utilizan reactivos bifuncionales como glutaraldehído o diiminoésteres que forman enlaces covalentes entre enzimas, generando agregados insolubles y resistentes a variaciones de pH y temperatura. Esta técnica, ampliamente usada en investigación, proporciona estabilidad estructural, aunque algunos agentes como el glutaraldehído presentan citotoxicidad. Por este motivo, se han desarrollado alternativas más biocompatibles como el genipín o agentes silanizantes (Sheldon, 2007).

4.3.3 Estrategia de inmovilización covalente utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante

Consiste en la activación de los grupos funcionales del soporte para formar un enlace estable con grupos nucleofílicos presentes en la enzima, como lisina, cisteína, tirosina, metionina, triptófano, arginina, así como los ácidos aspártico y glutámico (Juarez, 2013). Una ventaja significativa de este método es que, debido a la alta estabilidad de los enlaces covalentes, la enzima no se libera en la disolución, garantizando una mayor durabilidad en su aplicación.

Sin embargo, la principal limitación de esta técnica radica en la necesidad de una abundante presencia de dichos aminoácidos en zonas alejadas del sitio activo de la enzima. Si los grupos nucleofílicos participan directamente en la catálisis, el proceso de inmovilización

puede comprometer la actividad enzimática.

En resumen, no existe un método universal aplicable a todos los casos. Por esta razón, es útil disponer de una tabla comparativa que sintetice las principales características, ventajas y desventajas de cada metodología. Esto permite seleccionar el método más adecuado para cada aplicación específica.

4.3.4 Tipos de superficies para la inmovilización enzimática

La elección del soporte sólido es un factor determinante en la eficiencia y estabilidad de un sistema enzimático inmovilizado. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie, como su composición química, morfología, área superficial y naturaleza de los grupos funcionales disponibles, influyen directamente en la actividad catalítica, la resistencia a la desnaturalización y la capacidad de reutilización de la enzima (Datta et al., 2013; Sheldon, 2007).

En términos generales, los soportes pueden clasificarse en:

- **Superficies inorgánicas:** Incluyen materiales como vidrio, sílice, alúmina, óxidos metálicos y materiales cerámicos. Destacan por su alta estabilidad térmica y química, así como por su facilidad para ser modificados mediante agentes silanizantes.(Mateo et al., 2007).
- **Superficies poliméricas:** Comprenden polímeros naturales (quitosano, alginato, celulosa) y sintéticos (polimetacrilatos, poliestireno, poliuretanos). Estos materiales ofrecen flexibilidad estructural y pueden diseñarse con diferentes porosidades, lo que facilita el ajuste de la difusión de sustratos y productos.
- **Superficies metálicas:** Principalmente acero inoxidable, oro o aleaciones especiales. Se emplean en biosensores y sistemas microfluídicos, ya que permiten funcionalización química mediante capas autoensambladas o deposiciones controladas.
- **Materiales híbridos y nanomateriales:** Incluyen compuestos como sílice recubierta de polímeros, soportes metal-orgánicos (MOFs), nanopartículas magnéticas y materiales compuestos. Ofrecen combinaciones de propiedades mecánicas, químicas y magnéticas que permiten una inmovilización más selectiva y, en algunos casos, una fácil recuperación del biocatalizador mediante separación magnética.

La selección de la superficie adecuada debe basarse en el balance entre estabilidad mecánica, compatibilidad química con la enzima, facilidad de funcionalización y costos de implementación.

4.4 Superficies funcionalizadas para la inmovilización enzimática

El vidrio se puede usar como soporte de inmovilización de enzimas por *"spin coating"*. Para lograr una inmovilización eficiente, se requiere su activación y funcionalización. La activación con ácidos o bases fuertes deja disponibles grupos silanol (Si–OH) en la superficie. Estos grupos permiten el anclaje de moléculas funcionalizadoras, como los silanos.

Con base en la revisión bibliográfica, se seleccionaron estas moléculas porque pueden emplearse para funcionalizar superficies y otorgarles nuevas propiedades. Por ejemplo, propiedades de mojabilidad o reactividad para incorporar polímeros posteriormente (Contreras, 2015).

Uno de los compuestos más utilizados es el (3-Aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) . Como se muestra en la Figura 3, las reacciones de funcionalización entre el APTMS y las superficies con grupos silanol son bastante comunes. Esto se debe a la alta reactividad del APTMS, asociada a la presencia del grupo amino en su cadena.

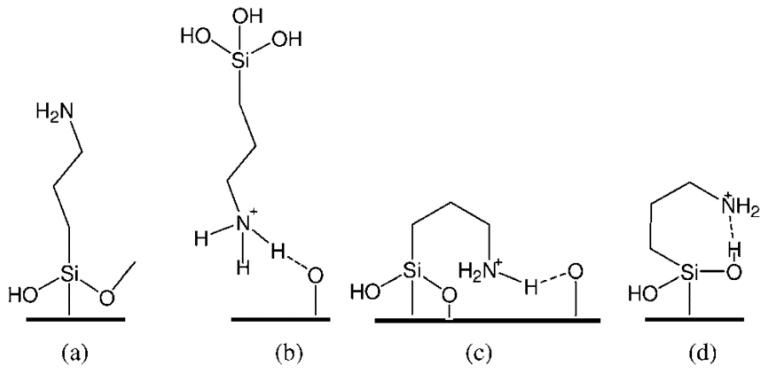


Figura 3

Principales mecanismos de funcionalización superficial con APTMS propuestos en la literatura. (a) Unión covalente mediante enlace siloxano; (b) adsorción física a través de enlace de hidrógeno con el grupo amino; (c) interacción intramolecular por formación de enlace de hidrógeno con la superficie adyacente; (d) enlace intramolecular con un grupo silanol. Adaptado (D'Sa et al., 2011).

4.5 Métodos de funcionalización de superficies

Existen diversos métodos para funcionalizar superficies, cada uno con características particulares que los hacen adecuados para diferentes tipos de aplicaciones y materiales. A continuación, se describen algunos de los más utilizados.

4.5.1 Modificación con silanos

La modificación con silanos es uno de los métodos más empleados para funcionalizar superficies inorgánicas, especialmente aquellas que contienen grupos hidroxilo superficiales, como el vidrio, la sílice o los óxidos metálicos. Este proceso se basa en la reacción entre los grupos silanol Si−OH presentes en la superficie activada y los grupos alquoxisilano (generalmente metoxilo u etoxilo) de los compuestos organosilanos (Rahman & Padavettan, 2012).

Uno de los compuestos más utilizados para la funcionalización de superficies es el (3-Aminopropil)trietoxisilano (APTES) Figura 4, el cual posee una cadena propilo con un grupo amino terminal (–NH_2) y tres grupos etoxisilano (–$Si(OC_2H_5)_3$) que participan en el proceso de anclaje. Durante la funcionalización, los grupos etoxilo del APTES se hidrolizan en presencia de agua o humedad, formando grupos silanol (–Si–OH) altamente reactivos. Estos grupos reaccionan posteriormente con los silanoles presentes en la superficie del soporte mediante reacciones de condensación, generando enlaces covalentes tipo Si–O–Si. Este proceso permite la fijación estable del agente silanizante sobre la superficie, dejando expuestos los grupos amino que pueden ser utilizados para posteriores enlaces covalentes con biomoléculas (Sypabekova et al., 2022).

Este método tiene varias ventajas: permite una modificación química controlada, es relativamente sencillo de implementar, y es aplicable a una amplia variedad de superficies. Sin embargo, también presenta desafíos, como la posibilidad de formación de capas poliméricas no deseadas (por auto-condensación del silano), y la sensibilidad del proceso a condiciones como pH, humedad y temperatura (Iler, 1979).

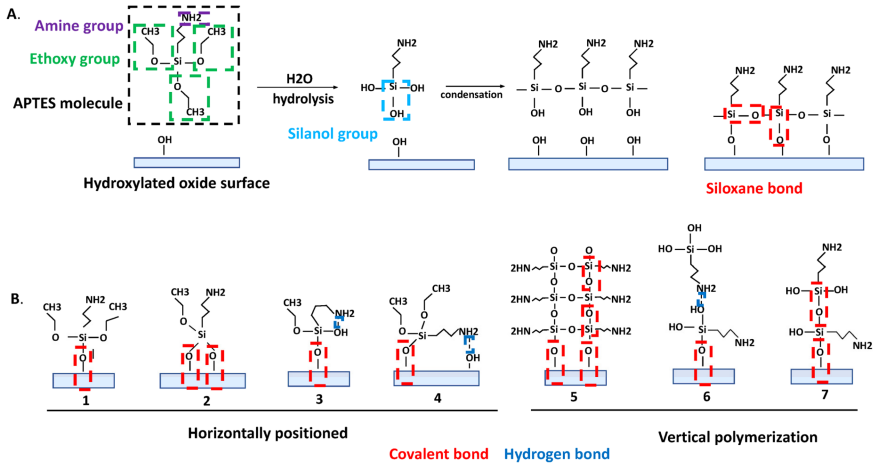


Figura 4

Reacción de funcionalización de una superficie con silanoles mediante APTES.

4.5.2 Deposición química en fase vapor (CVD, por sus siglas en inglés)

La Deposición Química en Fase Vapor (CVD, por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente utilizada para la modificación superficial de materiales. Consiste en la deposición de una delgada capa de material sobre un sustrato sólido mediante la reacción de precursores químicos en fase gaseosa. Estos precursores se introducen en una cámara de reacción donde, bajo condiciones controladas de temperatura, presión y atmósfera, reaccionan o se descomponen para formar una película sólida sobre la superficie del sustrato (George, 2010).

Este método permite un control preciso sobre el grosor, uniformidad y composición química de la capa depositada. Es especialmente útil para recubrir superficies complejas o tridimensionales, lo que lo hace ideal para aplicaciones en microelectrónica, catálisis y funcionalización de superficies para biotecnología (Yanguas-Gil, 2016).

La elección de los precursores químicos es fundamental para la eficiencia del proceso y para lograr la funcionalidad deseada. Por ejemplo, se pueden depositar capas con grupos funcionales específicos (como amino o carboxilo) que sirvan como puntos de anclaje para biomoléculas o polímeros (Alf et al., 2010). Sin embargo, el proceso requiere equipos especializados y condiciones estrictas de operación, lo cual puede aumentar sus costos y complejidad en comparación con otros métodos.

4.5.3 Tratamiento con plasma

El tratamiento con plasma es una técnica de funcionalización superficial que utiliza gases ionizados (plasma) para modificar las propiedades físico-químicas de una superficie. Cuando un material es expuesto a un plasma generado en condiciones de vacío o baja presión, su superficie puede ser limpiada, activada o recubierta con grupos funcionales según el tipo de gas utilizado (Friedrich, 2011).

Este método es particularmente útil para introducir grupos polares como –OH, –COOH o $–NH_2$ sobre materiales orgánicos o inorgánicos, mejorando así su mojabilidad, adhesión y compatibilidad química con otras fases. La activación por plasma no requiere el uso de disolventes, lo que lo convierte en una técnica respetuosa con el medio ambiente y adecuada para aplicaciones biomédicas o alimentarias (Mittal, 2004).

Entre los gases comúnmente utilizados se encuentran el oxígeno, nitrógeno, argón y amoníaco, los cuales determinan el tipo de funcionalización superficial obtenida. Una de las ventajas clave del tratamiento con plasma es su rapidez y la capacidad de tratar uniformemente grandes áreas o geometrías complejas. No obstante, la estabilidad a largo plazo de las modificaciones introducidas puede verse afectada por procesos de envejecimiento de la superficie.

Como resumen de los métodos de funcionalización descritos, en la Tabla 1 se presenta una comparación entre la modificación con silanos, la deposición química en fase vapor (CVD) y el tratamiento con plasma. Esta tabla destaca sus principales características, ventajas y limitaciones, permitiendo identificar el método más adecuado según las necesidades específicas del sistema a funcionalizar.

Tabla 1

Comparación de métodos de funcionalización de superficies

Parámetro	**Modificación con silanos**	**CVD**	**Tratamiento con plasma**
Naturaleza del proceso	Reacción química entre silanoles superficiales y silanos	Reacción de precursores gaseosos en fase vapor	Activación por gases ionizados (plasma)
Tipo de funcionalización	Introducción de grupos funcionales como $–NH_2$, –SH, –COOH	Recubrimientos delgados funcionales (orgánicos o inorgánicos)	Introducción de grupos polares (–OH, –COOH, $–NH_2$)
Compatibilidad con geometrías complejas	Moderada	Alta	Alta
Requiere vacío / atmósfera controlada	No necesariamente	Sí	Generalmente sí
Ventajas	Fácil de implementar, económica, control químico directo	Recubrimientos uniformes y precisos, alta pureza	Rápido, ecológico (sin disolventes), buen control superficial
Desventajas	Posible autocondensación de silanos, sensibilidad a condiciones ambientales	Costoso, requiere equipo especializado, condiciones estrictas	Modificación superficial poco estable a largo plazo

En el presente trabajo se seleccionó la técnica de modificación superficial con silanos debido a su capacidad para introducir grupos funcionales reactivos —como epóxidos o aminos— sobre superficies inorgánicas de vidrio, permitiendo la formación de enlaces covalentes estables con las enzimas. Esta estrategia no solo mejora la estabilidad estructural del biocatalizador y reduce la lixiviación, sino que también preserva la actividad catalítica al evitar cambios drásticos en la conformación proteica. Además, el uso de silanos como GPTMS o APTMS ofrece versatilidad química, bajo costo y compatibilidad con técnicas de deposición controlada como *"spin coating"*, lo que la convierte en una alternativa eficiente y escalable

para aplicaciones industriales y biomédicas (Fadeev & McCarthy, 1999; Matisons, 2012).

4.6 Técnica del *"spin coating"*

Como se ha mencionado anteriormente, es fundamental obtener un recubrimiento adecuado sobre la superficie para garantizar una funcionalización efectiva. Para ello, una de las técnicas más utilizadas actualmente es el *"spin coating"*, debido a su simplicidad, versatilidad y capacidad para generar películas delgadas homogéneas.

El *"spin coating"* consiste en depositar una pequeña cantidad de solución sobre el centro de un sustrato plano, el cual es posteriormente sometido a una rotación a alta velocidad. Esta rotación genera fuerzas centrífugas que distribuyen el fluido de manera uniforme sobre la superficie, formando una película delgada. La velocidad de rotación, la viscosidad del fluido, el tiempo de centrifugado y las condiciones ambientales son factores clave que determinan el grosor y la uniformidad del recubrimiento obtenido.

Gracias a su capacidad para producir recubrimientos controlados y reproducibles, esta técnica es ampliamente empleada en la fabricación de dispositivos electrónicos, recubrimientos ópticos y, en este caso, en la funcionalización de superficies para inmovilización de biomoléculas.

4.6.1 "spin coating" como técnica de recubrimiento

El *"spin coating"* es una técnica ampliamente utilizada para la formación de películas delgadas sobre sustratos planos. Su popularidad se debe a su capacidad para generar recubrimientos homogéneos de espesor controlado, mediante un procedimiento relativamente sencillo y reproducible. Estas características la convierten en una herramienta fundamental en la fabricación de dispositivos electrónicos, sensores, óptica de precisión y, más recientemente, en aplicaciones biotecnológicas (Mendhe, 2023).

En el contexto de la inmovilización de enzimas, el *spin coating* permite generar superficies funcionalizadas con capas delgadas que sirven como soporte físico y químico para las biomoléculas. La homogeneidad del recubrimiento es esencial para garantizar una distribución uniforme de las enzimas y una actividad catalítica controlada en la superficie (Tong et al., 2008). Además, el espesor de la capa puede ajustarse para optimizar el contacto entre

la enzima y el medio de reacción, facilitando la difusión de sustratos y productos (Datta et al., 2013).

En la Tabla 2 se presenta una comparación entre diferentes metodologías empleadas para la obtención de películas delgadas, tales como el *"dip coating"* y el *"spray coating"*, dos de las técnicas más comunes en aplicaciones industriales y científicas. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y limitaciones particulares según el tipo de aplicación, el material a recubrir y la naturaleza de la solución utilizada. En general, estas técnicas se utilizan para crear superficies activas sobre las cuales se puede anclar material biológico, como enzimas, mediante enlaces físicos o químicos, permitiendo su reutilización y mejorando su estabilidad operativa.

Tabla 2

Comparación de métodos de recubrimiento para la formación de películas delgadas

Parámetro	Spin Coating	Dip Coating	Spray Coating
Principio de operación	Distribución centrífuga de una solución sobre un sustrato giratorio	Inmersión y extracción controlada del sustrato desde una solución	Atomización y pulverización de la solución sobre el sustrato
Homogeneidad del recubrimiento	Alta	Media-alta	Variable, depende del control del spray
Control de espesor	Excelente (ajustable por velocidad, viscosidad y tiempo)	Bueno (dependiente de velocidad de extracción y concentración)	Moderado (influenciado por la distancia y presión del spray)
Geometría del sustrato	Limitado a superficies planas	Apto para geometrías variadas	Alta versatilidad
Complejidad del equipo	Media	Baja	Media-alta
Aplicaciones comunes	Electrónica, óptica, recubrimientos funcionales	Recubrimientos uniformes de gran área	Recubrimientos textiles, biomateriales, capas porosas

4.6.2 Ventajas del spin coating en la preparación de superficies

Como se mencionó anteriormente, una de las principales ventajas del *"spin coating"* y la razón por la cual fue seleccionado como técnica de recubrimiento en este proyecto es su capacidad para generar películas delgadas altamente homogéneas, con un control preciso del grosor. Además, se trata de un procedimiento de muy fácil implementación y rápida ejecución, lo cual reduce significativamente los tiempos de laboratorio. En pocos minutos es posible obtener recubrimientos uniformes sobre sustratos planos.

En la Figura 5 se presenta un esquema representativo del proceso de *spin coating*, donde se aprecia el mecanismo de esparcimiento de la solución mediante rotación a alta velocidad (Mustafa & Jameel, 2021).

Sin embargo, la técnica también presenta limitaciones importantes. Una de las más relevantes es la necesidad de una buena afinidad entre el sustrato y la solución. Esta interacción superficial es crítica, ya que el contacto entre ambos ocurre en un tiempo muy breve. Si la solución presenta baja afinidad con el sustrato, tiende a ser expulsada completamente durante el giro, impidiendo la formación de una película uniforme. Por el contrario, si existe una afinidad excesiva, la solución podría no distribuirse de forma homogénea, generando recubrimientos irregulares. Por tanto, la afinidad entre el sustrato y la solución debe ser cuidadosamente controlada y evaluada al momento de elegir esta técnica.

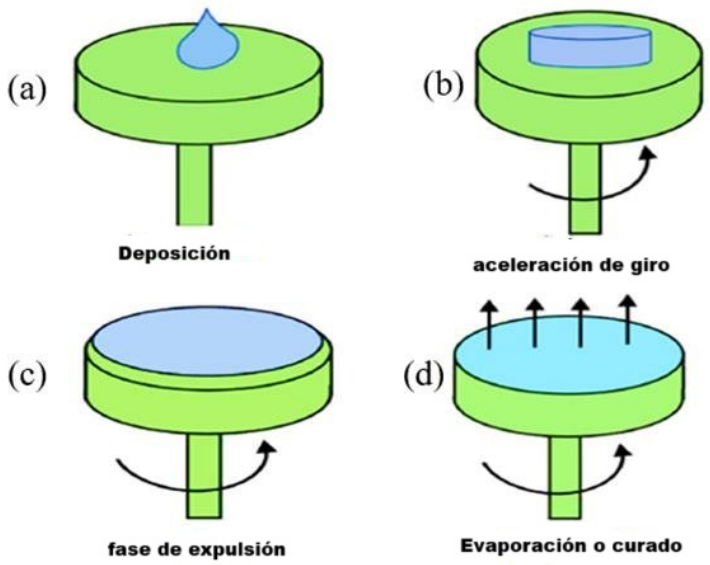


Figura 5

Esquema del proceso de "spin coating".Tomado de (Mustafa & Jameel, 2021).

4.6.3 Aplicaciones del "spin coating" en la fabricacion de bioreactores

A través de la revisión de bases de datos científicas y literatura especializada, se han identificado múltiples trabajos en los que la técnica de *spin coating* ha sido empleada exitosamente en la fabricación de películas delgadas con aplicaciones biomédicas, en biosensores y, más recientemente, en biotecnología industrial.

Por ejemplo, Bondade y sus coautores((Bodade et al., 2017)) desarrollaron un biosensor basado en quitosano y lipasas de *Aspergillus niger*, utilizando *spin coating* para la deposición de la capa enzimática sobre el soporte. Esta técnica fue preferida sobre otros métodos reportados en la literatura debido a su menor requerimiento de tiempo de procesamiento y su bajo costo, manteniendo al mismo tiempo un alto grado de uniformidad en el recubrimiento funcional.

En otro estudio Jessika Pazol((Pazol et al., 2019)), investigaron la interacción no covalente entre la lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CALB) y un polímero modelo sintetizado mediante *spin coating*. Este sistema fue diseñado para su aplicación en membranas reactivas destinadas a la separación de agua en procesos industriales. La técnica permitió la obtención de capas delgadas uniformes, adecuadas para estudiar la estabilidad y distribución de

la enzima en superficies funcionalizadas, lo cual es esencial en el diseño de plataformas de separación y sensores enzimáticos.

Más allá del uso en sensores y dispositivos analíticos, el *spin coating* también se ha explorado como una estrategia viable para la preparación de superficies activas en bioreactores, especialmente en sistemas de inmovilización enzimática utilizados en la industria química, alimentaria y ambiental. Su capacidad para generar películas delgadas y uniformes permite optimizar la exposición de la enzima al medio de reacción, favoreciendo una mayor eficiencia catalítica, mejor estabilidad operativa y posibilidad de reutilización del biocatalizador.

Este tipo de recubrimientos facilita el diseño de biocapas sobre materiales poliméricos o vítreos, los cuales se integran en sistemas de flujo continuo o reactores de lecho fijo. Aplicaciones industriales documentadas incluyen la hidrólisis de aceites vegetales para la producción de biodiesel, la degradación enzimática de contaminantes orgánicos en aguas residuales, y la síntesis de intermediarios farmacéuticos. En todos estos casos, el *spin coating* proporciona una forma sencilla, reproducible y escalable de generar superficies funcionalizadas adecuadas para la operación prolongada de biocatalizadores en entornos reales.

En el marco del presente trabajo de grado, esta técnica ha sido adoptada como método de recubrimiento de sustratos funcionalizados, con el objetivo de desarrollar superficies enzimáticamente activas para su eventual aplicación en biorreactores, contribuyendo al avance de soluciones sostenibles y eficientes para la biocatálisis industrial.

4.7 Lipasas

Las lipasas son enzimas pertenecientes a la clase de las hidrolasas, específicamente clasificadas bajo la nomenclatura EC 3.1.1.3. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces éster en los triglicéridos, liberando ácidos grasos y glicerol. Su función principal es facilitar la degradación de lípidos, lo que las convierte en elementos clave en procesos metabólicos relacionados con la digestión, el transporte y el almacenamiento de grasas.

Desde el punto de vista bioquímico, las lipasas actúan en la interfase entre el sustrato lipídico insoluble en agua y el medio acuoso, lo que les confiere propiedades únicas en comparación con otras hidrolasas(Brzozowski et al., 2000). Además, su especificidad por sustratos y su capacidad para actuar en condiciones extremas las hacen valiosas en diversas aplicaciones industriales, incluyendo la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y en la producción de biocombustibles.

Las lipasas presentan una notable diversidad en sus secuencias de aminoácidos, lo que se traduce en una amplia variedad de estructuras primarias. Sin embargo, a pesar de esta variabilidad, existe una alta conservación en sus estructuras secundarias y terciarias (Brzozowski et al., 2000). Esta conservación estructural sugiere que, aunque las lipasas pueden diferir significativamente en su composición primaria, mantienen conformaciones tridimensionales similares que son esenciales para su función catalítica. Esta característica estructural conservada permite que diferentes lipasas compartan mecanismos de acción comunes, a pesar de provenir de distintas fuentes biológicas o tener distintas especificidades de sustrato.

En este proyecto se emplea una lipasa derivada del hongo filamentoso *Aspergillus oryzae*, ampliamente utilizado en procesos industriales por la producción de enzimas altamente eficientes y estables. Esta enzima pertenece a la familia de las serina-hidrolasas y posee un sitio activo conformado por una tríada catalítica altamente conservada: serina, ácido aspártico e histidina. Estos residuos son esenciales para la hidrólisis de enlaces éster presentes en triglicéridos.

En la Figura 6 se muestra la estructura cristalina de la lipasa de A. oryzae (PDB ID: **5XK2**), determinada mediante difracción de rayos X con una resolución de 1,70 Å. Los residuos que conforman la tríada catalítica se representan con colores distintivos: serina en azul, ácido aspártico en rojo e histidina en verde. Esta codificación cromática permite visualizar con claridad su disposición espacial y su accesibilidad al sustrato. Adicionalmente, un círculo azul resalta la región en la que la proximidad entre estos residuos define el sitio activo de la enzima.

Este modelo estructural permite comprender plenamente la conformación del sitio activo y el mecanismo catalítico de la enzima, elementos clave para su uso eficaz en biocatálisis, aun no ha sido confirmado el sitio activo de la enzima, pero obervamos en la figrua ciertas zonas donde la distancia entre los aminoacidos permiten tener la triada catalitica, comparandola con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* .

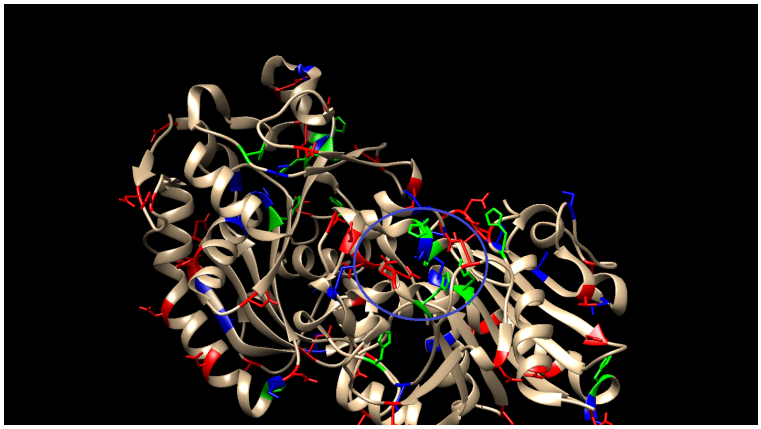


Figura 6

Estructura cristalina de la lipasa de Aspergillus oryzae (PDB ID: 5XK2). Los residuos de la tríada catalítica aparecen en colores específicos: serina (azul), ácido aspártico (rojo) e histidina (verde).

4.8 Características principales de las lipasas

Las lipasas son enzimas pertenecientes a la familia de las hidrolasas, cuya función principal es catalizar la hidrólisis de enlaces éster en triglicéridos, liberando ácidos grasos y glicerol. Esta reacción ocurre típicamente en la interfase entre el sustrato lipídico y el medio acuoso, lo que diferencia a las lipasas de otras esterasas que actúan en solución homogénea. Además de la hidrólisis, estas enzimas son capaces de catalizar reacciones de síntesis, como la esterificación y la transesterificación, especialmente en medios con bajo contenido de agua o en presencia de disolventes orgánicos.

Una característica destacada de las lipasas es su promiscuidad catalítica, es decir, su capacidad para transformar una amplia gama de sustratos mediante diferentes tipos de reacciones químicas. A diferencia de muchas enzimas altamente específicas, las lipasas pueden reconocer y actuar sobre diversos ésteres, ácidos grasos, alcoholes y otros compuestos orgánicos. Esta versatilidad las convierte en herramientas valiosas para procesos de síntesis enzimática y aplicaciones industriales.

Tal como se muestra en la Figura 7, las lipasas participan en una amplia variedad de transformaciones químicas, lo cual pone en evidencia su bajo grado de especificidad y su potencial en procesos de interés tecnológico.

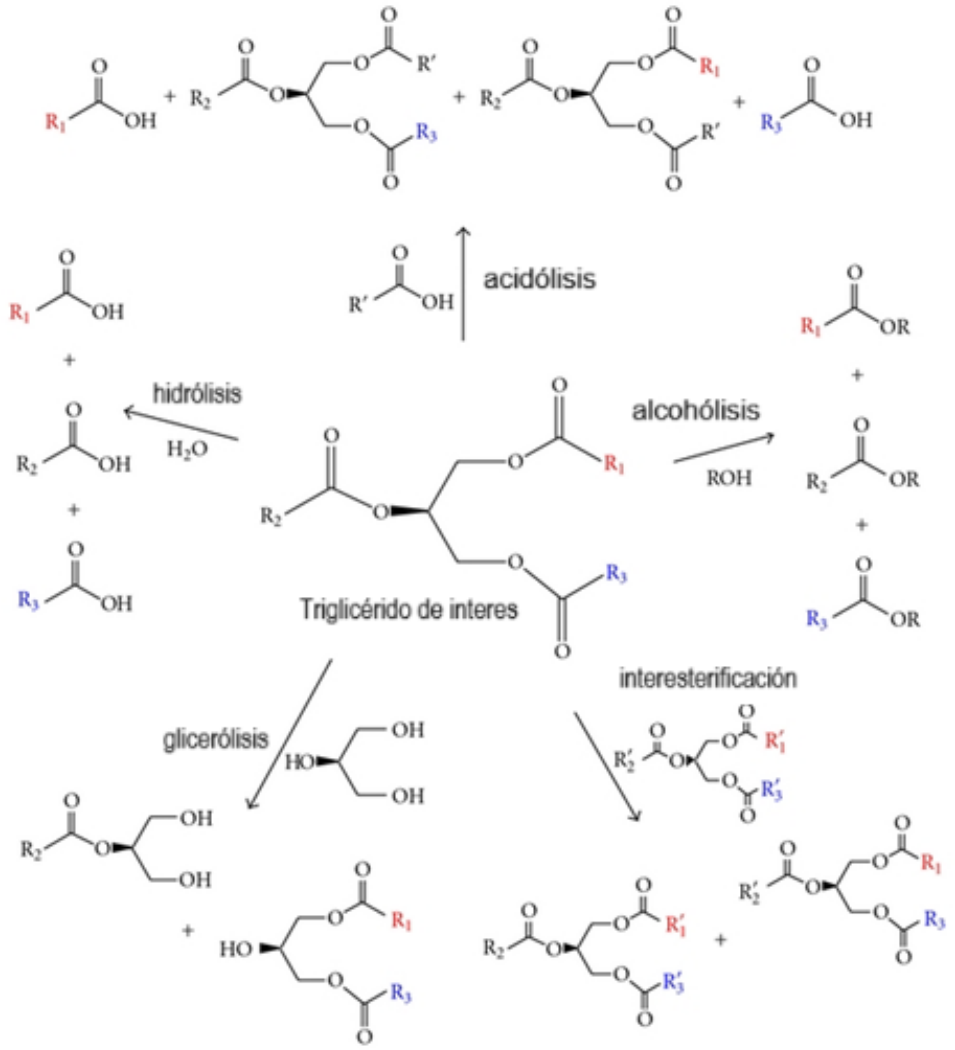


Figura 7

Reacciones catalizadas por lipasas, incluyendo hidrólisis, esterificación y transesterificación. Tomado de((B. D. Ribeiro et al., 2011)).

Una característica estructural distintiva de muchas lipasas es la presencia de una región móvil conocida como "tapa" o *"lid"*, que cubre el sitio activo de la enzima. En condiciones acuosas, esta tapa permanece cerrada, impidiendo el acceso del sustrato al centro catalítico. Sin embargo, en presencia de interfases hidrofóbicas—como las que se forman entre el agua y los lípidos—la enzima sufre un cambio conformacional que desplaza la tapa, exponiendo el sitio activo y permitiendo que ocurra la reacción catalítica. Este fenómeno se conoce como *activación interfacial* y es fundamental para la eficiencia de muchas lipasas en medios

heterogéneos.

Cabe destacar que no todas las lipasas presentan esta estructura de tapa, por lo que el mecanismo de activación puede variar entre diferentes tipos de enzimas. En la Figura 8 se muestra un esquema representativo de este proceso, que ilustra el cambio estructural responsable de la transición de la forma inactiva a la forma activa de la enzima.

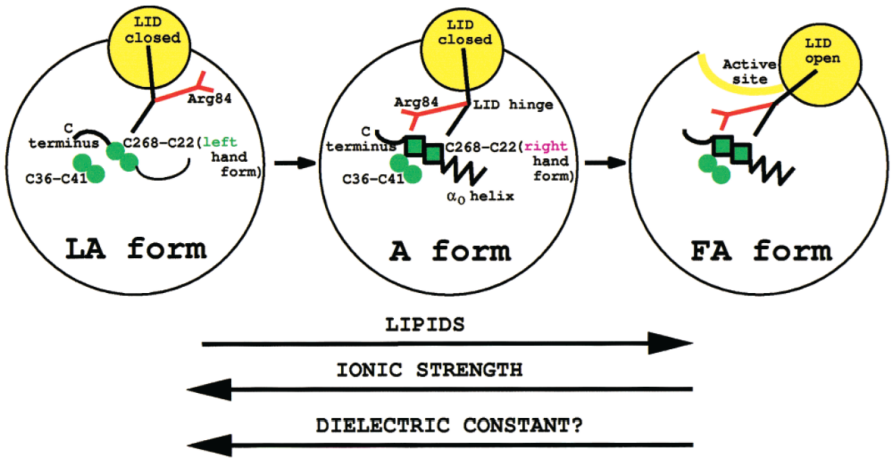


Figura 8

Representación esquemática de la activación interfacial en lipasas. A la izquierda, la enzima se encuentra en su forma cerrada, con la tapa (lid) cubriendo el sitio activo, impidiendo el acceso del sustrato. A la derecha, en presencia de una interfase hidrofóbica, la tapa se desplaza, exponiendo el sitio catalítico y permitiendo la interacción con el sustrato(Brzozowski et al., 2000).

4.9 Mecanismos de acción de la Lipasa de *Aspergillus oryzae* en la hidrólisis de lípidos

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo catalítico de las lipasas en la hidrólisis de lípidos se basa en la acción de una tríada de residuos activos: serina, histidina y ácido aspártico. El proceso inicia con un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina sobre el carbono carbonílico del enlace éster del sustrato lipídico. Esta interacción genera un intermedio tetraédrico, estabilizado por el entorno del sitio activo.

Durante el colapso de este intermedio, la histidina actúa como base, capturando un protón y facilitando la liberación del primer producto. Posteriormente, una molécula de agua ingresa al sitio activo y realiza un segundo ataque nucleofílico sobre el intermediario acilado,

formando un nuevo intermedio tetraédrico. Finalmente, el colapso de este segundo intermedio libera el segundo producto y regenera la enzima en su forma activa.

4.10 Estudios previos sobre la inmovilización de Lipasas

Las lipasas han sido ampliamente inmovilizadas en matrices poliméricas. Estudios previos han demostrado que estas enzimas son capaces de exponer su centro activo al acercarse a superficies hidrofóbicas (Pazol et al., 2019). En este contexto, se utilizó un biomodelo para simular la inmovilización en membranas celulares con el fin de hidrolizar acetato de 4-nitrofenilo (pNPA) y aceite de ricino (Ricinus communis), rico en triglicéridos, empleando la lipasa B de Candida antarctica (CALB, EC 3.1.1.3).

Se utilizó un copolímero ensamblado en bloques de poliestireno-bloque-poli(4-vinilpiridina) (PS-b-P4VP) , logrando retener el 91 % de su actividad catalítica. En la figura 9 se muestra el procedimiento utilizado por los autores para obtener la biopelícula, mediante una metodología de inmovilización no covalente.

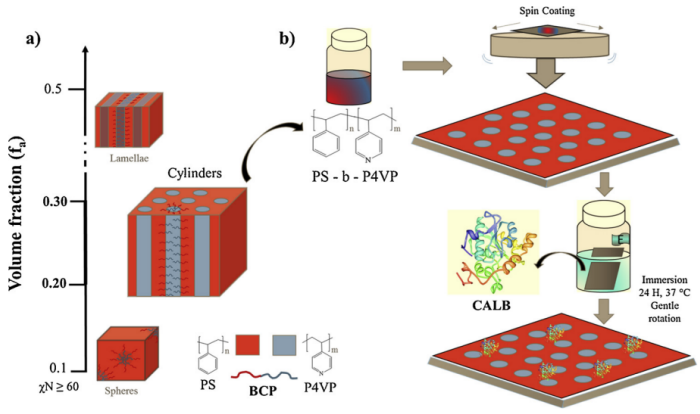


Figura 9

Representación esquemática del método de recubrimiento por giro (spin coating) e inmersión utilizado para fabricar la película de PS-b-P4VP, seguido por la adsorción de CALB (estructura en forma de cinta de CALB obtenida del PDB 1TCB ()(Pazol et al., 2019))

Las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas representan procesos de gran relevancia industrial, tanto en el ámbito químico como bioquímico. Estas enzimas no solo catalizan reacciones de hidrólisis, sino también de esterificación, siendo esta última de creciente

interés debido a la importancia de los ésteres orgánicos en biotecnología y en la industria química.

Diversos estudios han explorado la inmovilización de lipasas para mejorar su estabilidad y reutilización en procesos de esterificación. En particular, se ha observado que las lipasas mantienen su actividad catalítica en sistemas bifásicos, donde los reactivos se distribuyen dinámicamente entre las fases a medida que avanza la reacción. La cinética de estas reacciones está influenciada por múltiples factores, incluyendo la naturaleza del soporte, las condiciones del medio y el tipo de lipasa utilizada.

Este enfoque ha sido especialmente relevante en la producción de biocombustibles, donde se ha evaluado el uso de cepas bacterianas y fúngicas tanto en forma de células completas como mediante lipasas purificadas. Las investigaciones han destacado el potencial de estas enzimas inmovilizadas para catalizar eficientemente la esterificación(Pinto et al., 2014), abriendo nuevas posibilidades para aplicaciones sostenibles y de alto valor agregado.

5 Metodología

5.1 Determinación de las condiciones óptimas de funcionalización de la superficie de vidrio utilizando agentes silanizante

Con el objetivo de optimizar el proceso de funcionalización de superficies de vidrio, se llevó a cabo una serie de ensayos variando las condiciones de tratamiento con los agentes silanizantes (3-Aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) y (3-Glicidoxipropil)trimetoxisilano (GPTMS). Previo al tratamiento con los silanos, las superficies vítreas fueron sometidas a una activación química mediante una solución piraña (mezcla 3:1 de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno) durante 4 horas, seguida de un enjuague con agua Milli-Q y secado al aire. Las variables evaluadas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Variables evaluadas en la funcionalización con silano

Variable	**Descripción**	**Propósito de evaluación**	**Parámetros estudiados**
Tipo de silanizante	Tipo de agente silanizante utilizado para funcionalizar la superficie.	Comparar el comportamiento de silanos con diferentes grupos funcionales.	APTMS, GPTMS
Concentración del silanizante	Porcentaje volumétrico del silano en la solución de funcionalización.	Estudiar el efecto de la concentración sobre la densidad de grupos funcionales.	20, 40, 60, 80 % **(v/v)**
Tiempo de spin coating	Tiempo de rotación durante la aplicación del recubrimiento.	Evaluar su impacto en la uniformidad y espesor del recubrimiento.	15, 30, 45 **s**
Prehidrolización del silano	Activación previa del silano con agua antes de aplicarlo.	Analizar si mejora la reactividad y orden de la capa funcionalizada.	Con y sin prehidrolización

La concentración de la solucion de APTMS se varió entre el 20-80 % v/v utilizando etanol como solvente. Se comparó el comportamiento del APTMS utilizado directamente con el de APTMS previamente hidrolizado en presencia de ácido clorhídrico 0.1 M (pH $\approx$ 1),

durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C) y bajo agitación constante.

Para efectos de organización y análisis de los resultados, se adopta la siguiente nomenclatura para las muestras: **Silanizante–Concentración–Tiempo de rotación**. En esta convención, se emplean las siglas que se describen en el Tabla 4 para el estado del agente silanizante.

Tabla 4

Nomenclatura empleada para la identificación de las superficies funcionalizadas con 3-Aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) o 3-Glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS) con y sin prehidrólisis.

Sigla	Descripción
PA	APTMS prehidrolizado
A	APTMS sin prehidrolizar
PG	GPTMS prehidrolizado
G	GPTMS sin prehidrolizar

Por ejemplo, una muestra identificada como **PA-40-45** corresponde a una película obtenida con APTMS prehidrolizado, a una concentración del 40 % v/v, y aplicada mediante *"spin coating"* durante 45 s.

5.2 Caracterización del extracto enzimático comercial de lipasa de *Aspergillus oryzae*

Se caracterizó el extracto comercial de lipasa de *Aspergillus oryzae* para evaluar su actividad enzimática, cuantificar su contenido proteico y determinar las diluciones óptimas que evitaran la agregación molecular y el bloqueo del sitio activo, factores que podrían comprometer su funcionalidad. Con este fin, se prepararon diferentes diluciones del extracto madre (1:2000, 1:1000, 1:500, 1:250 y 1:100) en solución buffer de fosfato 25 mM y pH 7, en presencia de Triton X-100 (1×10^{-3} M) para mejorar la estabilidad proteica. Estas diluciones permitieron identificar la concentración que maximizara la eficiencia de inmovilización sin afectar la actividad biológica de la enzima.

La determinación de la actividad enzimática se realizó mediante la metodología de hidrólisis de *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB). Tras evaluar la actividad enzimática y la co-

bertura superficial, esta última determinada mediante análisis termogravimétrico (TGA) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), se seleccionó la dilución que ofreció el mejor equilibrio entre retención de actividad y capacidad de inmovilización, la cual fue empleada en los ensayos posteriores sobre superficies funcionalizadas.

Para el ensayo por *p*-NPB se empleó espectroscopía UV-Vis utilizando un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35. La reacción se monitorizó a una longitud de onda de 348 nm, correspondiente a la absorción del *p*-nitrofenol (producto de la hidrólisis), el cual presenta una coloración amarilla característica.

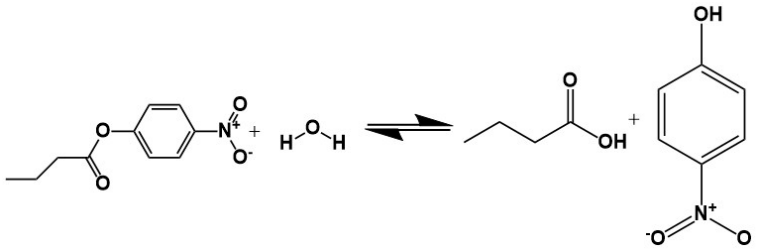


Figura 10

Reacción de hidrólisis de p-NPB. Representación esquemática del proceso catalítico mediante el cual la lipasa hidroliza el p-nitrofenil butirato (p-NPB), liberando p-nitrofenol como producto detectable espectrofotométricamente.

El ensayo se llevó a cabo adicionando 2.5 mL de buffer fosfato (pH 7, 25 mM) y 25 µL del sustrato *p*-NPB. La reacción fue iniciada con la adición de 50 µL de la solución enzimática. Se midió la absorbancia durante un período de 5 min. El blanco se preparó de la misma manera, omitiendo la adición de la enzima.

Utilizando la Ecuación 1, se encontró la actividad enzimática:

$$\text{Actividad (U)} = \left(\frac{\Delta A/\text{min} \cdot V_{\text{total}}}{\varepsilon \cdot L \cdot V_{\text{enzima}}} \right) \cdot \text{factor de dilución} \tag{1}$$

donde:

- $\Delta A/\text{min}$: cambio de absorbancia por minto.
- V_{total}: volumen total de la mezcla de reacción (en L).
- ε: coeficiente de extinción molar del *p*-NPB: 5.235 (en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

- L: longitud del camino óptico de la cubeta (en cm), usualmente 1 cm.
- V_{enzima}: volumen de la solución enzimática utilizada (en L).
- *factor de dilución*: inverso del factor por el cual se diluyó la enzima antes de la medición.

5.3 Protocolo de inmovilización enzimática

5.3.1 Inmovilización por adsorción

Una vez determinada la dilución óptima del extracto enzimático, se procedió con la inmovilización de las enzimas sobre las superficies funcionalizadas con APTMS, utilizando la técnica de spin coating. Esta técnica permite un recubrimiento homogéneo y controlado de las superficies mediante la deposición del extracto enzimático diluido, que es distribuido uniformemente por la fuerza centrífuga durante la rotación.

Para el proceso de inmovilización, se aplicarón 600 µL de extracto enzimático pH 7 a 25 °C sobre las superficies funcionaliazada y se procedió a girar las muestras a una velocidad de 450 rpm durante 45 s, permitiendo que las enzimas se adsorban a través de las interacciones entre los grupos los grupos cargados negativamente de las enzimas y los grupos silanol, finalmente se usan 24 h de secado a 30 °C, tras los cuales las superficies se lavaron cuidadosamente con el mismo buffer fosfato a pH 7 para eliminar las enzimas no unidas. Luego, se procedió a secar las muestras bajo corriente de aire a temperatura ambiente.

Posteriormente, se realizaron análisis de actividad enzimática sobre las superficies inmovilizadas para verificar que el proceso de inmovilización no hubiera afectado la actividad biológica de las enzimas. Este paso fue crucial para confirmar la viabilidad del proceso para su aplicación en la mejora de propiedades superficiales de materiales.

5.3.2 Inmovilización covalente

Con el fin de evaluar el efecto del método de inmovilización sobre la estabilidad y actividad de la enzima, se llevó a cabo la inmovilización covalente utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante. Previamente, las superficies funcionalizadas con APTMS fueron modificadas mediante su exposición a una solución de glutaraldehído al 2.5 % (v/v) en tampón

fosfato 25 mM, pH 7, durante 4 h a temperatura ambiente. Este tratamiento permite la formación de enlaces covalentes entre los grupos aldehído del glutaraldehído y los grupos amino presentes en superficie funcionalizada, favoreciendo una unión estable y orientada (Barbosa et al., 2014). Posteriormente, se realizó el enjuague con solucion tampon de carbonato pH 10 para eliminar el exceso de reactivo y se procedió con la adición de la solución enzimática para permitir su inmovilización. Para este proceso, se aplicarón 600 µL de extracto enzimático pH 7 a 25 ˚C sobre las superficies funcionaliazada y se procedió a girar las muestras a una velocidad de 450 rpm durante 45 s, Finalmente, se realizaron lavados sucesivos para remover la enzima no unida y se almacenaron las muestras a 4°C hasta su caracterización.

5.4 Medición de la actividad y reusabilidad de las superficies con enzima inmovilizada

Con el objetivo de evaluar la eficacia de la inmovilización enzimática sobre las superficies funcionalizadas, se realizaron mediciones de la actividad catalítica mediante dos metodologías: la hidrólisis del *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) y la hidrólisis de triglicéridos presentes en aceite de aguacate. Asimismo, se estudió la reusabilidad de los biocatalizadores constituidos por lipasa de *Aspergillus oryzae* inmovilizada sobre superficies de vidrio previamente funcionalizadas con agentes silanizantes y, en algunos casos, entrecruzadas con glutaraldehído a través de ciclos consecutivos de reacción.

5.4.1 Hidrólisis de p-NPB con los biotacalizadores

Para cuantificar la actividad catalítica de los biocatalizadores, se empleó la misma metodología utilizada en la caracterización del extracto enzimático (véase la sección 5.2), con la diferencia de que la reacción se dejó transcurrir durante 5 minutos antes de retirar el biocatalizador. Posteriormente, se midió la absorbancia relativa de la muestra a 348 nm, correspondiente a la absorción del *p*-NPB, producto de la hidrólisis, el cual presenta una coloración amarilla característica.

5.4.2 Hidrólisis de triglicéridos con los biotacalizadores

La segunda metodología empleada para la evaluación de la actividad enzimática se basó en un método colorimétrico de titulación indirecta, diseñado para estimar la cantidad

de ácidos grasos liberados durante la reacción de hidrólisis. En este sistema, se utilizó aceite de aguacate como fuente natural de triglicéridos, los cuales son sustratos susceptibles a la acción catalítica de la lipasa. La reacción esperada consiste en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos presentes en el aceite, generando glicerol y ácidos grasos libres como productos. La liberación de ácidos grasos durante la reacción provoca una disminución del pH del medio. Esta variación puede cuantificarse mediante un proceso de retrovaloración, que consiste en neutralizar los ácidos formados añadiendo un exceso de hidróxido de potasio (KOH) de concentración conocida. Posteriormente, el KOH no reaccionado se titula con un ácido fuerte, como el ácido clorhídrico (HCl), que actúa como agente titulante. El volumen de HCl empleado para neutralizar el exceso de base permite calcular, de manera indirecta, la cantidad de ácidos grasos liberados. Esta metodología ofrece una estimación efectiva de la actividad enzimática, ya que el consumo neto de base está directamente relacionado con la cantidad de producto generado por la reacción catalizada bajo las condiciones experimentales.

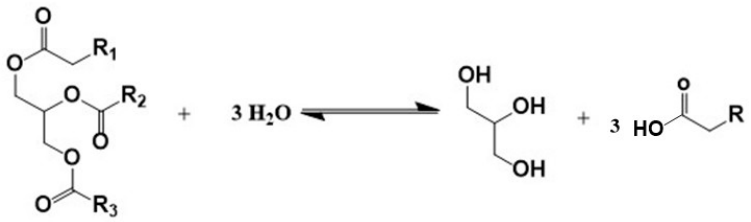


Figura 11

Reacción de hidrólisis de triglicéridos presentes en el aceite de aguacate usando lipasa de Aspergillus oryzae. Representación esquemática de la reacción catalizada por lipasas, en la cual los triglicéridos presentes en el aceite de aguacate son hidrolizados en presencia de agua, generando glicerol y ácidos grasos libres como productos principales.

Para ello, se preparó una emulsión compuesta por agua, aceite de aguacate y buffer fosfato (pH 7, 25 mM). La emulsión se obtuvo mediante agitación vigorosa de la mezcla en un agitador magnético a 1000 rpm a temperatura ambiente, asegurando una distribución homogénea de las fases acuosa y oleosa. Posteriormente, se adicionaron 4.5 mL de esta emulsión en un vaso de reacción y se calentó a 30 °C (temperatura óptima de la enzima) durante 10 min. A continuación, se introduce el biocatalizador y se dejó reaccionar durante 5 min.

Después de ese tiempo, se adicionaron 10 mL de KOH 0.05 M y unas gotas de fenolftaleína como indicador. La mezcla fue titulada con HCl 0.05 M hasta la desaparición del color rosado. El blanco se realizó bajo las mismas condiciones, omitiendo la introducción de la película enzimática. La actividad enzimática se calculó utilizando la Ecuación 2, la cual

relaciona el volumen de ácido clorhídrico consumido durante la titulación con la cantidad de ácido graso liberado en la reacción.

$$\mathrm{U} = \frac{(V_B - V_{\mathrm{HCl}}) \times 1000 \times C_{\mathrm{KOH}}}{t \times m} \tag{2}$$

donde:

- V_B: Volumen de HCl 0,05 M consumido en el blanco (mL).
- V_{HCl}: Volumen de HCl 0,05 M consumido en la muestra (mL).
- C_{KOH}: Concentración de KOH (mol/L).
- t: Tiempo de reacción (min).
- m: Masa del biocatalizador utilizado (g).

Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de ácido graso libre por min bajo las condiciones del ensayo.

5.4.3 Reusabilidad de los biocatalizadores

Para evaluar la reusabilidad de los biocatalizadores, estos fueron recuperados al finalizar cada ciclo de reacción, antes de la adición de KOH. Las superficies funcionalizadas fueron lavadas cuidadosamente con agua Milli-Q en tres ocasiones para eliminar residuos de sustrato y productos de reacción, y posteriormente reutilizadas en nuevos ciclos bajo condiciones idénticas. Este procedimiento se repitió para múltiples ciclos con el fin de evaluar la pérdida de actividad catalítica a lo largo del tiempo, permitiendo determinar la estabilidad operativa del sistema enzimático inmovilizado.

El porcentaje de reuso de la actividad enzimática se calculó utilizando la Ecuación 3, comparando la actividad medida en cada ciclo con la actividad inicial:

$$\%\mathrm{Reuso} = \left(\frac{U_n}{U_0}\right) \times 100 \tag{3}$$

donde:

- U_n: Actividad enzimática medida en el ciclo n.
- U_0: Actividad enzimática inicial (primer ciclo).

5.5 Ensayos de lixiviación de proteina

La cuantificación de proteína fue realizada empleando el método colorimétrico de Bradford, tanto para evaluar la lixiviación como para determinar el contenido total de proteína inmovilizada en el biocatalizador. Este método se basa en la interacción del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con residuos de aminoácidos, principalmente arginina, presentes en las proteínas. En condiciones ácidas, el colorante se une a las proteínas y su forma aniónica se estabiliza, generando un cambio en la absorbancia máxima del colorante de 465 nm a 595 nm. La intensidad del color azul formado es proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra, lo que permite su cuantificación mediante espectrofotometría UV-Vis.

Para la **cuantificación de lixiviación**, los biocatalizadores fueron sumergidas en 4 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 y NaCl 1 M durante un período de 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante, la cual fue mezclada con el reactivo de Bradford siguiendo el protocolo estándar. La absorbancia se midió a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, y la concentración de proteína en la solución fue determinada utilizando una curva de calibración construida previamente con albúmina sérica bovina (BSA) la cual es lineal entre concentraciones de 10-125 µg/mL. En la Figura 12, se observa la relación entre la concentración y el valor promedio medido. Se evidencia un comportamiento creciente y lineal de los datos experimentales, lo que permite establecer un modelo de regresión confiable.

La ecuación de la recta de regresión lineal ajustada a los datos es la siguiente:

$$y = 0{,}00576x + 0{,}14881 \tag{4}$$

$$R^2 = 0{,}9969 \tag{5}$$

Este valor cercano a 1 indica un excelente ajuste del modelo a los datos experimentales.

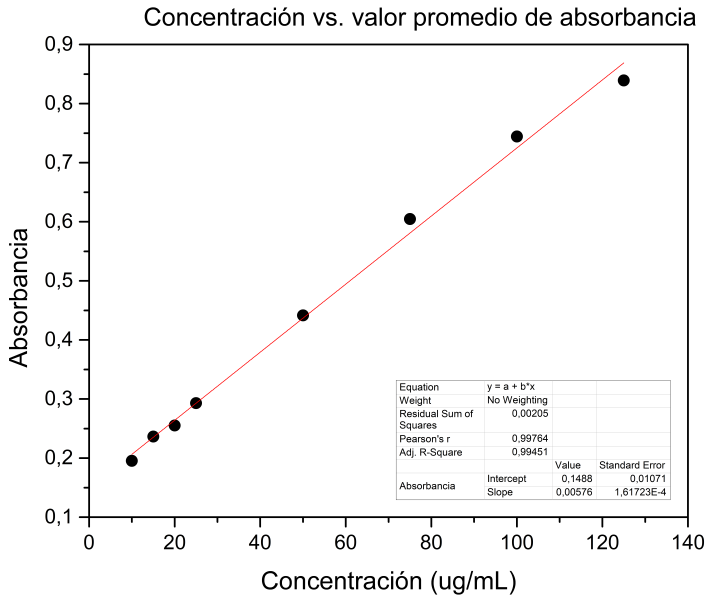


Figura 12

Relación entre la concentración de proteína y el valor promedio de absorbancia obtenido experimentalmente, mostrando la línea de regresión lineal ajustada y su tendencia.

Para la **cuantificación de proteína inmovilizada**, cada película fue sometida a un proceso de lavado exhaustivo con 4 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 7. Posteriormente, se realizó un raspado mecánico suave de la superficie para desprender la enzima residual. El material obtenido fue homogeneizado en buffer fosfato 0,1 M pH 7, y se tomó una alícuota de 1 mL que fue sometida al ensayo de Bradford de la misma forma, con agitación previa durante 10 min para asegurar una correcta disolución de la proteína antes de la medición.

Las absorbancias registradas permitieron calcular la cantidad de proteína presente tanto en los sobrenadantes como en las películas, permitiendo así evaluar la eficiencia del proceso de inmovilización y la estabilidad de la enzima frente a la lixiviación.

5.6 Caracterización fisico-quimica

5.6.1 Análisis termogravimétrico

La caracterización fisicoquímica mediante análisis termogravimétrico (TGA) se realizó utilizando un analizador termogravimétrico, bajo una atmósfera controlada de nitrógeno, con un flujo constante de $50\,\mathrm{mL{\cdot}min^{-1}}$. Las muestras, previamente secas y homogeneizadas, se colocaron en crisoles de platino y se sometieron a un barrido de temperatura desde 25 °C hasta 650 °C, con una velocidad de calentamiento de $10\ ^\circ\mathrm{C{\cdot}min^{-1}}$. Durante el análisis, se registró la pérdida de masa en función de la temperatura, lo que permitió identificar los eventos de descomposición térmica.

6 Resultados y discusión

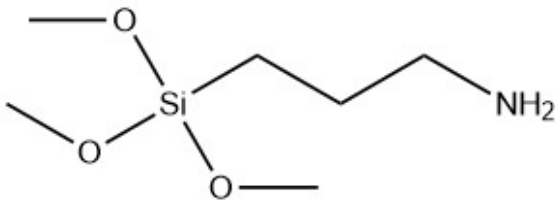
6.1 Determinación de las condiciones óptimas de funcionalización de la superficie de vidrio utilizando agentes silanizante

La activación de la superficie se llevó a cabo mediante una solución piraña, compuesta por ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno en proporción 3:1. Esta mezcla, altamente oxidante, elimina de manera eficiente los residuos orgánicos presentes y promueve la exposición de grupos hidroxilo ($-OH$) en la superficie del vidrio. Dado que dicho sustrato está constituido principalmente por enlaces siloxano ($Si-O-Si$), la acción de la solución piraña rompe parcialmente estos enlaces superficiales, favoreciendo la formación de grupos silanol ($Si-OH$).

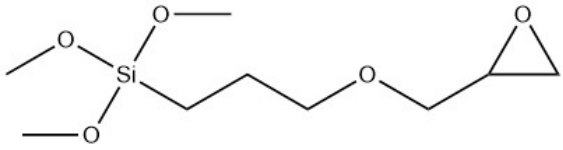
Estos grupos funcionales son esenciales para la posterior reacción de condensación con los agentes silanizantes, ya que actúan como sitios activos de anclaje, facilitando una mayor uniformidad y adherencia de las capas funcionalizadas. Holmes et al. han demostrado que, incluso bajo tratamientos prolongados, la solución piraña no modifica de manera significativa propiedades como la rugosidad superficial, el índice de refracción o el espesor de capas delgadas de sílice depositadas sobre sustratos de silicio (Holmes et al., 2010).

En la Figura 13 se muestran las estructuras químicas de los dos silanos utilizados en este estudio: (3-Aminopropil) trimetoxisilano (APTMS) y (3-Glicidoxipropil) trimetoxisilano (GPTMS). La principal diferencia entre ellos radica en el grupo funcional expuesto tras la funcionalización. El APTMS presenta un grupo amino que, bajo las condiciones experimentales empleadas, se encuentra protonado, ya que su $p\mathrm{K_a}$ —al tratarse de una amina primaria— se sitúa entre 9.5 y 10.5. Por otro lado, el GPTMS contiene un grupo epóxido que, debido a su inestabilidad, sufre apertura del anillo tras la funcionalización, generando un diol en la superficie , como se ilustra en la Figura 14.

Esta diferencia no es únicamente estructural, sino que también repercute directamente en la reactividad superficial. Como se discutirá más adelante, tanto la morfología como la homogeneidad de las capas formadas dependen significativamente del tipo de silano empleado y de las condiciones químicas de tratamiento.



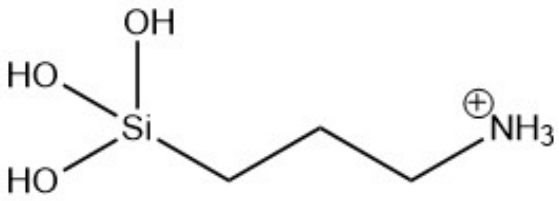
(a) *Grupo amino de APTMS.*



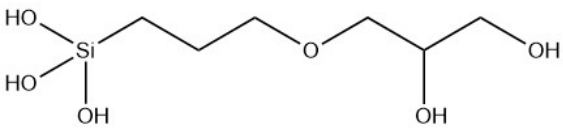
(b) *Grupo epóxido de GPTMS.*

Figura 13

Estructuras químicas representativas del y (a) (3-Aminopropil) trimetoxisilano (APTMS) y (b) (3-Glicidoxipropil) trimetoxisilano (GPTMS).



(a) *Grupo amino protonado posterior a la prehidrolización; igualmente, se obtienen los grupos silanoles*



(b) *Grupo diol obtenido posterior a la prehidrolización; igualmente, se obtienen los grupos silanoles del GPTMS*

Figura 14

Estructuras químicas representativas del y (a) (3-Aminopropil) trimetoxisilano (APTMS) y (b) (3-Glicidoxipropil) trimetoxisilano (GPTMS) prehidrolizado.

Al observar la Figura 16, se evidencia una diferencia notable en la homogeneidad de las superficies funcionalizadas, lo cual refleja directamente una variación significativa en la reactividad de las moléculas silanizantes. Esta diferencia está estrechamente relacionada con la estructura química y la estabilidad de cada silano bajo las condiciones experimentales empleadas.

En el caso del APTMS sin prehidrólisis, se observa una marcada tendencia a la autopolimerización, manifestada por la aparición de puntos blancos distribuidos sobre la superficie funcionalizada (17a). Esta formación sugiere una autoadhesión del silano, producto de la condensación entre moléculas libres de APTMS en solución, antes de que se establezca una interacción efectiva con los grupos silanonles presentes en la superficie vítrea.

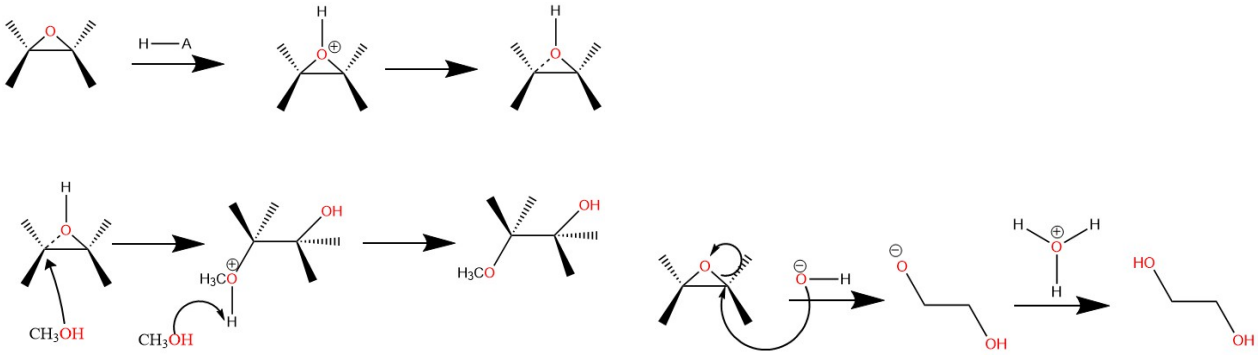
La interacción inicial se ve favorecida por la presencia del grupo amino terminal, el cual, en ausencia de prehidrolización, puede formar enlaces por puente de hidrógeno con los

grupos –OH superficiales. Esta interacción modifica la orientación de la molécula, exponiendo hacia el medio los grupos metoxisilano. Como consecuencia, estos grupos reaccionan entre sí o con otras especies presentes en el ambiente, promoviendo una polimerización en solución o sobre la superficie. Este proceso genera una red polimérica que dificulta la formación de enlaces covalentes con la superficie vitrea, reduciendo así la eficacia de la funcionalización esperada.

En cambio, la menor reactividad superficial observada con el GPTMS (17b) puede atribuirse a la limitada afinidad hacia los grupos silanol del vidrio. Esta situación se ve acentuada por la baja tasa de hidrólisis-condensación de los grupos metoxi del GPTMS bajo condiciones neutras, ya que, a diferencia del APTMS, carece de un grupo amino capaz de catalizar localmente dicho proceso mediante interacciones ácido–base. En consecuencia, la hidrólisis de los grupos –OCH_3 ocurre de manera más lenta y menos eficiente, dificultando así su anclaje efectivo a la superficie. Adicionalmente, los anillos epóxido permanecen cerrados en estas condiciones, lo que restringe su participación en reacciones posteriores de acoplamiento, dado que su apertura requiere medios ácidos o básicos específicos (pH entre 3–5 o 9–11).

La reacción de apertura del anillo epóxido es un proceso bien documentado que ocurre a través de mecanismos distintos dependiendo del medio:

- **En condiciones ácidas**, el oxígeno del epóxido se protona, lo cual debilita el enlace C−O y genera un intermedio más susceptible al ataque nucleofílico. La reacción suele seguir un mecanismo mixto S_{N1}/S_{N2}, donde el nucleófilo ataca preferentemente al carbono más sustituido (Hansen et al., 2020; Master Organic Chemistry, 2015b) Figura 15.
- **En condiciones básicas**, el nucleófilo ataca directamente al carbono menos sustituido del anillo epóxido mediante un mecanismo S_{N2}. En este caso no se requiere protonación, pero sí nucleófilos fuertes como OH^-, RO^- o reactivos de Grignard (Mamedova et al., 2022; Master Organic Chemistry, 2015a).



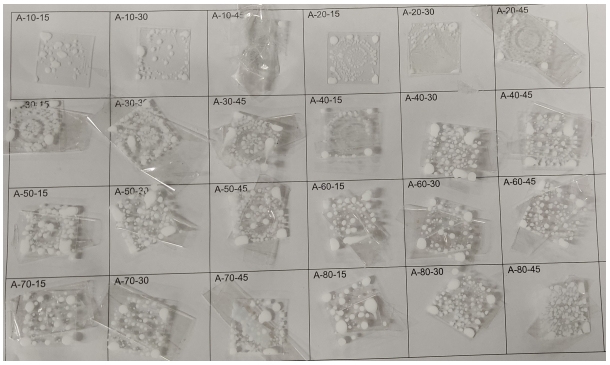
Mecanismo general de reacción en medio ácido *Mecanismo general de reacción en medio Base*

Figura 15

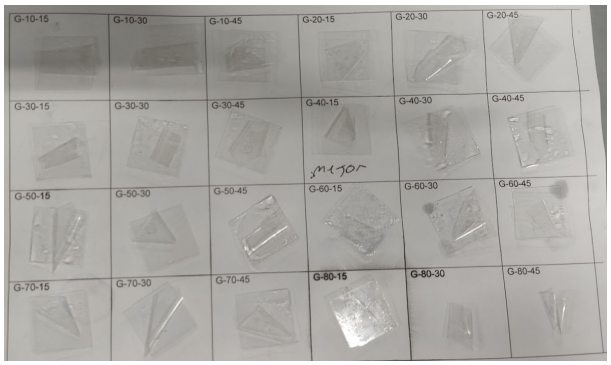
Mecanismos de reacción de la apertura del anillo epóxido.

Dado que el tratamiento superficial con GPTMS no se realizó bajo estos entornos extremos de pH, los anillos epóxido permanecen cerrados y, por tanto, no participan eficazmente en reacciones de anclaje con la superficie vítrea.En cambio, la menor reactividad superficial observada con el GPTMS puede atribuirse a la limitada afinidad del grupo epoxi hacia los grupos silanol del vidrio. Esta situación se ve acentuada por el hecho de que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, los anillos epoxi no se abren, dificultando así su anclaje efectivo a la superficie, dado que la apertura del epóxido requiere condiciones ácidas o básicas específicas (pH 3–5 o 9–11) (Chemistry Steps, s.f.). Esta inercia química del grupo epoxi bajo condiciones neutras limita la formación de enlaces covalentes entre el GPTMS y los grupos −OH presentes en la superficie.

Por otra parte, si bien los grupos hidroxilo generados mediante el tratamiento con solución piraña son esenciales para la funcionalización, su mera presencia no garantiza una reacción efectiva con el GPTMS. En ausencia de la activación del epóxido, estos grupos sólo pueden establecer interacciones débiles, como puentes de hidrógeno, que no resultan en una anclaje químico estable. Además, la orientación del GPTMS sobre la superficie vítrea puede verse desfavorecida, dado que el grupo epoxi no presenta una afinidad significativa con los grupos −OH. Por tanto, a pesar de contar con una superficie adecuadamente activada, la falta de condiciones que promuevan la apertura del anillo epoxi limita severamente la eficiencia del proceso de funcionalización con este silano.



(a) Superficie tratada con APTMS sin prehidrolizar.



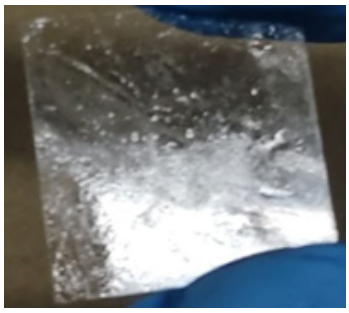
(b) Superficie tratada con GPTMS sin prehidrolizar.

Figura 16

Comparación de la morfología superficial entre el APTMS sin prehidrolizar y el GPTMS sin prehidrolizar, en todas las concentraciones y muestras.



(a) *Superficie tratada con APTMS sin prehidrolizar. Muestra A-40-45*



(b) *Superficie tratada con GPTMS sin prehidrolizar. Muestra G-40-45*

Figura 17

Comparación de la morfología superficial entre el APTMS y el GPTMS sin prehidrolizar en una muestra específica.

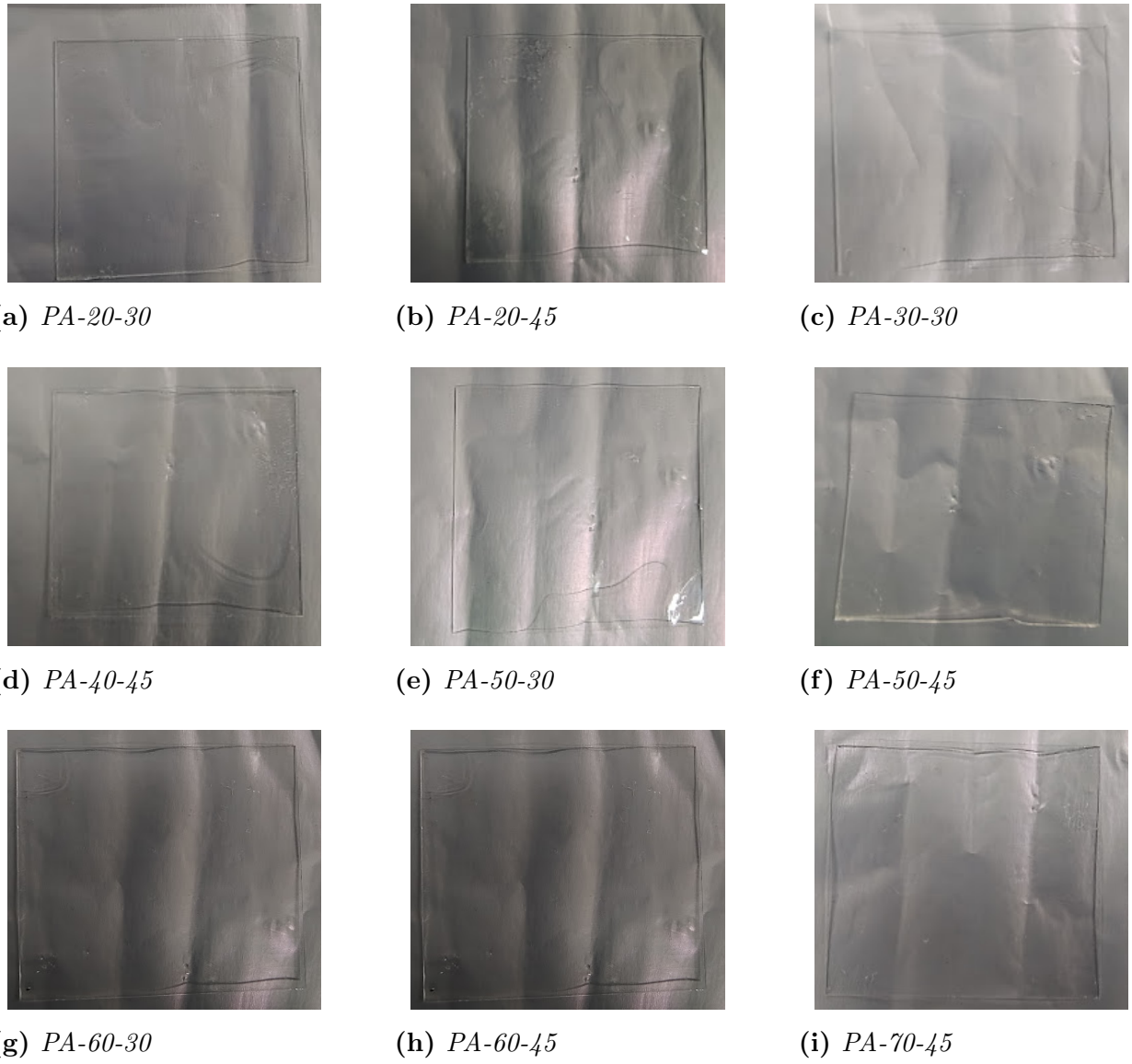
Se observó que tanto el APTMS (Figura 18) como el GPTMS (Figura 19), tras ser prehidrolizados para convertir sus grupos –OCH_3 en –OH, pueden formar redes de silicio (Si–O–Si) con la superficie de vidrio. No obstante, la cinética de condensación difiere notablemente entre ambos compuestos.

En el caso del APTMS, la presencia del grupo amina cargado positivamente acelera la condensación, favoreciendo la formación de redes densas y fuertemente entrecruzadas (Brochier Salon & Belgacem, 2011), incluso en un amplio rango de concentraciones (20–60 % v/v).

Este comportamiento garantiza una cobertura más homogénea y robusta, especialmente útil cuando se requiere una alta densidad de grupos funcionales disponibles para la inmovilización de biomoléculas.

Por su parte, el GPTMS presenta un anillo epóxido que estabiliza temporalmente la molécula, ralentizando la condensación completa y promoviendo la formación de películas delgadas y uniformes (Casagrande et al., 2020), como se observa en la Figura 19c. Aunque esta característica puede ser ventajosa para aplicaciones que requieran capas controladas de espesor nanométrico, en este estudio se identificaron dos limitaciones críticas: (i) una menor disponibilidad de grupos funcionales activos para la inmovilización y (ii) una baja reproducibilidad en los recubrimientos, especialmente al variar parámetros como la humedad y el tiempo de prehidrolisis. Estas variaciones dificultan la obtención de resultados consistentes entre lotes, lo que compromete su uso en procesos que demandan alta estandarización.La apertura del anillo epóxido de GPTMS resultó contraproducente. La formación de dioles y cadenas tipo (poli/oligo)etileno óxido promueve entrecruzamiento lateral y autocondensación en solución, lo que incrementa el espesor y la rugosidad, favorece la gelificación y genera tensiones que desembocan en recubrimientos no homogéneos.

Por estas razones, y considerando los resultados de las pruebas preliminares, se optó por utilizar el APTMS como agente de funcionalización principal, priorizando la robustez, la densidad funcional y la reproducibilidad de las superficies obtenidas.



(a) *PA-20-30* **(b)** *PA-20-45* **(c)** *PA-30-30*

(d) *PA-40-45* **(e)** *PA-50-30* **(f)** *PA-50-45*

(g) *PA-60-30* **(h)** *PA-60-45* **(i)** *PA-70-45*

Figura 18

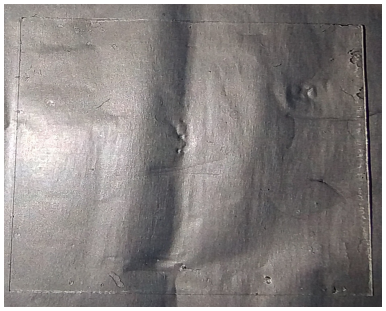
Recubrimientos obtenidos con APTMS prehidrolizados, a diferentes concentraciones y tiempos de spin coating.

Del mismo modo, en la Figura 19 se presenta una visualización ampliada de las películas formadas con GPTMS. Tal como se mencionó previamente, este silano fue descartado para el proceso de inmovilización enzimática debido a que no se logró confirmar la formación de una capa homogénea bajo ninguna de las condiciones evaluadas. A concentraciones elevadas, la baja afinidad del GPTMS con la superficie vítrea se hizo evidente, particularmente en la muestra PG-60-45(19e), donde el recubrimiento se concentró en una región específica

de la superficie, dejando el resto expuesto y sin funcionalizar. Esta distribución desigual no solo redujo la cobertura efectiva de la superficie, sino que también afectó el espesor de la película, generando una morfología no uniforme que podría dificultar tanto la difusión de las enzimas como la de los sustratos durante la catálisis. Este comportamiento puede atribuirse a la limitada capacidad del GPTMS para formar enlaces covalentes estables con los grupos silanol del vidrio, en comparación con otros agentes silanizantes como el APTMS. Asimismo, a altas concentraciones, el GPTMS tiende a auto-condensarse en solución antes de fijarse a la superficie, favoreciendo la formación de agregados localizados y reduciendo la uniformidad del recubrimiento (Palafox-González et al., 2023; Pustahija et al., 2024).



(a) *PG-20-45*



(b) *PG-30-45*



(c) *PG-40-45*



(d) *PG-50-45*



(e) *PG-60-45*

Figura 19

Imágenes representativas de las películas obtenidas mediante funcionalización con GPTMS prehidrolizado, a diferentes concentraciones y tiempos de spin coating.

Teniendo en cuenta los resultados de homogeneidad obtenidos en etapas previas, se seleccionaron cinco películas funcionalizadas con APTMS, en la Figura 20, en las cuales se varió sistemáticamente la concentración del silano con el objetivo de identificar las condiciones óptimas para la formación de recubrimientos uniformes. Durante estos experimentos se evaluó también el efecto del tiempo de *spin coating* sobre la uniformidad de las películas. Sin

embargo, se observó que dicha variable no ejercía una influencia significativa en la morfología o continuidad de los recubrimientos obtenidos. Este resultado es coherente con lo reportado en la literatura, donde se señala que una vez alcanzado un régimen estable de rotación, usualmente superior a los 1000 rpm, la homogeneidad de las películas depende en mayor medida de parámetros como la viscosidad de la solución y la concentración del precursor, más que del tiempo de recubrimiento en sí mismo (Ossila Ltd., s.f.; Trino et al., 2018). Por consiguiente, se decidió mantener el tiempo de *spin coating* constante en 45 segundos para todas las muestras, asegurando así la reproducibilidad del proceso y eliminando una variable potencial en el análisis posterior.



(a) PA-20-45



(b) PA-30-45



(c) PA-40-45



(d) PA-50-45



(e) PA-60-45

Figura 20

Películas seleccionadas para la inmovilización enzimática con diferentes concentraciones.

Los sistemas PA-20-45, PA-30-45, PA-40-45, PA-50-45 y PA-60-45 corresponden a películas funcionalizadas con diferentes concentraciones de APTMS, lo que modula la densidad de grupos amino disponibles para la inmovilización enzimatica. Esta variación estructural impacta directamente en parámetros críticos como la carga superficial y la accesibilidad del sitio activo, los cuales influyen en la eficiencia catalítica del biocatalizador. Por consiguiente, la evaluación comparativa del desempeño enzimático permite establecer correlaciones entre

la composición del soporte y su capacidad para preservar o mejorar la actividad y estabilidad de la enzima inmovilizada, facilitando la selección racional del sistema más adecuado.

6.2 Caracterización del extracto enzimático comercial de lipasa de *Aspergillus oryzae*

Al medir la actividad mediante el método con p-NPB, se buscaba observar la concentración límite que podía ser utilizada para la inmovilización, ya que concentraciones excesivamente altas pueden inducir fenómenos de desactivación enzimática, como la agregación proteica, la obstrucción estérica de los centros activos y la adsorción no específica en las superficies, lo cual reduce significativamente la eficiencia catalítica del sistema(Zhang et al., 2013a, 2013b).

Utilizando la Ecuación 1, se encontró la actividad enzimática: esta expresión permitió calcular la cantidad de unidades enzimáticas (U) presentes en cada muestra, considerando tanto el cambio de absorbancia por minuto como los parámetros físicos y experimentales del sistema. El resultado obtenido refleja la capacidad catalítica efectiva de la enzima bajo cada condición evaluada, lo cual fue fundamental para comparar diferentes concentraciones y seleccionar la más adecuada para el proceso de inmovilización. Estos resultados se muestran en la tabla 5.

Se observa que, a mayor concentración de enzima utilizada (es decir, a menor dilución), se presenta una disminución significativa en la actividad enzimática. Este comportamiento indica que en concentraciones elevadas pueden producirse efectos negativos como la agregación de proteínas, la obstrucción estérica de los centros activos o interacciones no específicas con la superficie, los cuales comprometen la eficiencia catalítica. Por el contrario, las diluciones 1:1000 y 1:2000 mostraron las mayores actividades específicas, lo que sugiere que son condiciones más favorables para mantener la enzima en su forma activa.

Estos resultados se complementan con el comportamiento de la enzima observado en la hidrólisis de triglicéridos, evidenciado en la Tabla 6, donde también la dilución 1:1000 resultó ser la más adecuada, manteniendo una actividad enzimática constante.

Tabla 5

Actividad enzimática calculada para diferentes diluciones de la enzima, utilizando el método con p-NPB.

Dilución	Actividad (UI/mL)
1:2000	$1676{,}00 \pm 103{,}39$
1:1000	$1663{,}79 \pm 87{,}88$
1:500	$1547{,}46 \pm 17{,}78$
1:250	$868{,}17 \pm 41{,}37$
1:100	$135{,}15 \pm 26{,}54$

Tabla 6

Resultados de la hidrólisis de triglicéridos para diferentes diluciones de enzima.

Dilución	Actividad enzimática (UI/mL)
1:2000	$5666{,}67 \pm 500{,}35$
1:1000	$5666{,}67 \pm 577{,}35$
1:500	$5666{,}67 \pm 288{,}68$
1:250	$3300{,}00 \pm 500{,}00$
1:100	$2000{,}00 \pm 100{,}00$

6.3 Protocolos de inmovilización enzimática

6.3.1 Inmovilización por adsorción

Para evaluar la eficiencia del método de inmovilización enzimática, se determinó la actividad catalítica de las superficies funcionalizadas tras el proceso de inmovilización. En una primera etapa, se compararon diferentes películas con el objetivo de identificar el sistema con mejor desempeño. La cuantificación inicial se realizó mediante el método colorimétrico basado en la hidrólisis del (p-NPB), que permite estimar la actividad relativa a través de la absorbancia de la solución final. No obstante, para obtener una medida más representativa de la actividad absoluta de la enzima inmovilizada bajo condiciones más cercanas a su aplicación práctica, se empleó un ensayo de hidrólisis de triglicéridos presentes en aceite de aguacate. Esta metodología complementaria permitió una evaluación más precisa del comportamiento catalítico de cada sistema.

Inicialmente, se propuso un enfoque de inmovilización enzimática basado en interacciones electrostáticas. Las proteínas, compuestas por cadenas de aminoácidos unidas mediante enlaces peptídicos, presentan estructuras tridimensionales específicas que determinan sus propiedades funcionales y su capacidad de interacción con otras moléculas. En este contexto, la distribución de cargas eléctricas en los residuos aminoacídicos adquiere especial relevancia, ya que condiciona la afinidad y orientación de la enzima sobre superficies funcionalizadas. El estado de protonación de los grupos funcionales de los aminoácidos depende del pH del medio en relación con su valor de pK: si el pH es mayor que el pK, el grupo tiende a desprotonarse (forma básica); si el pH es menor, permanece protonado (forma ácida). Por ejemplo, el ácido aspártico (pKa $\approx$ 3,86)(Applichem, s.f.) se encuentra casi completamente desprotonado a pH 7, lo que le confiere una carga negativa; en contraste, la lisina (pKa $\approx$ 10,53)(Applichem, s.f.) mantiene su grupo amino lateral protonado a ese mismo pH, presentando una carga positiva. Dado que el soporte utilizado presenta grupos amino expuestos —protonados a pH de funcionalización—, se favorecen las interacciones con residuos cargados negativamente. Por ello, se consideraron particularmente los aminoácidos ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E), cuyas cadenas laterales permiten establecer interacciones electrostáticas con la superficie cargada positivamente del soporte.

Como se mencionó anteriormente, el interés principal se centra en los residuos de ácido glutámico y ácido aspártico, debido a que, al encontrarse cargados negativamente a pH fisiológico, pueden establecer interacciones electrostáticas con la superficie funcionalizada del soporte, la cual presenta grupos amino protonados. Este tipo de interacción representa un método simple y eficaz de inmovilización por adsorción. Sin embargo, para determinar si la proteína adopta una conformación tridimensional preferente durante el proceso de inmovilización, es necesario realizar un análisis detallado de la distribución de carga sobre su estructura tridimensional. Este análisis es fundamental para teorizar la orientación final de la proteína, ya que permite identificar las regiones más involucradas en la interacción con la superficie. Dichas interacciones pueden influir directamente en la orientación, estabilidad estructural y conservación de la actividad catalítica de la enzima una vez inmovilizada.

En un estudio realizado con la lipasa CALB ((Chen et al., 2008)), sobre una superficie hidrofóbica, se generaron 3 posibles distribuciones de la proteína, tal como se evidencia en la Figura 21, se ven las tres posibles orientaciones que el monómero de CALB podría asumir en películas con hidrofobicidad variable. Los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos están representados en azul y verde, respectivamente. Las cisteínas están en rosa. Otros aminoácidos que pueden reaccionar con grupos epóxidos están en magenta. Los lazos azules representan las entradas a los sitios activos

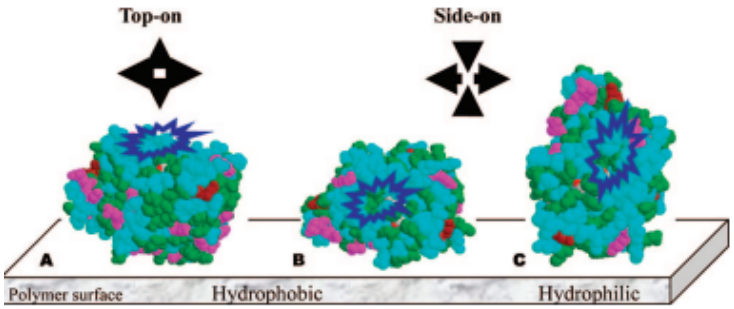


Figura 21

A, la superficie hidrofóbica de CALB unida a películas hidrofóbicas en orientación top-on; B, la superficie hidrofóbica de CALB unida a películas en orientación side-on; y C, la superficie hidrofílica de CALB unida a películas en orientación side-on.(Chen et al., 2008).

En estudios previos de inmovilización en lipasas, se ha reportado que la orientación de la enzima sobre la superficie juega un papel determinante en su actividad catalítica. Por ejemplo, en el caso de la lipasa CALB, se ha demostrado que la orientación tipo A (top-on) sobre superficies hidrofóbicas favorece la actividad catalítica, al permitir una mejor exposición y apertura del sitio activo. Por el contrario, la orientación tipo C, más común sobre superficies hidrofílicas, tiende a inducir agregación y distorsiones estructurales, reduciendo así la actividad enzimática. Esta evidencia resalta la importancia no solo del tipo de inmovilización, sino también de la naturaleza química de la superficie funcionalizada, factores que en este trabajo han sido cuidadosamente controlados para favorecer orientaciones estructurales que preserven la actividad catalítica de la enzima durante los ciclos de reutilización.

En nuestro caso específico, la proteína presenta un total de 32 aminoácidos cargados negativamente (Asp y Glu), los cuales se encuentran distribuidos sobre la superficie de la enzima. Estos residuos fueron identificados utilizando la herramienta de análisis estructural de Chimera, mediante:

- Generación de la superficie molecular de la proteína. Aplicación del modelo de Coulombic Surface Coloring para visualizar la distribución de cargas.
- Identificación de regiones altamente negativas (coloración roja intensa).

A continuación se incluye la figura 22 resultante del análisis, donde pueden observarse claramente las regiones de potencial negativo predominantes:

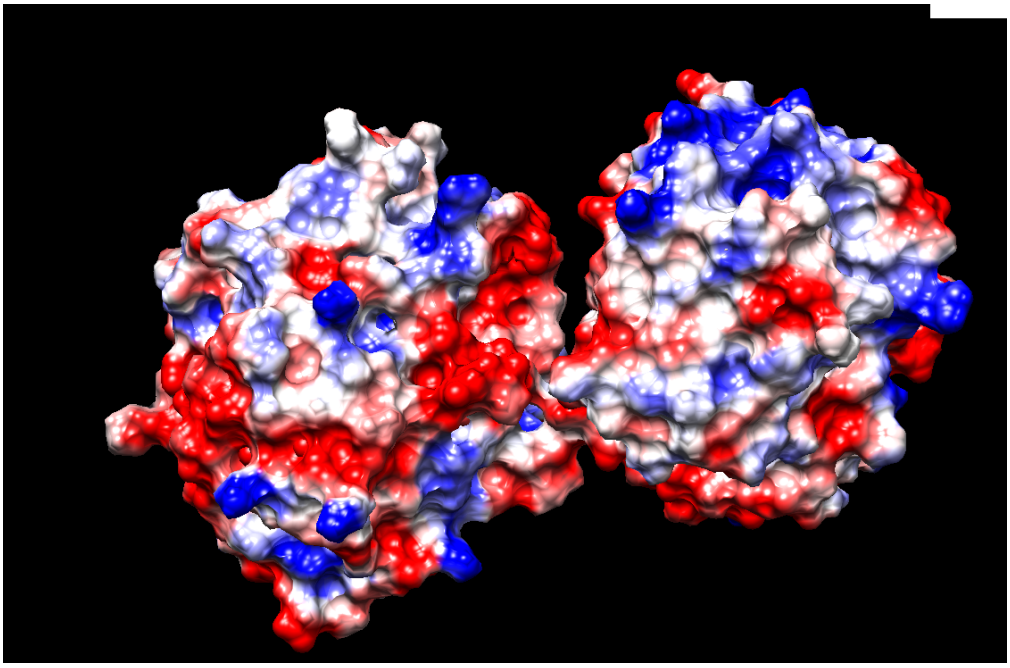


Figura 22

Distribución de carga de la proteína obtenida mediante Coulombic Surface Coloring en Chimera. Las zonas rojas corresponden a regiones con carga negativa (usualmente debidas a residuos de Asp, Glu y grupos fosfato). Las zonas azules indican regiones con carga positiva (usualmente debidas a residuos de Lys, Arg y His). Las zonas blancas o grisáceas representan potenciales cercanos a neutro.

Con este resultado, podemos plantear la hipótesis de que la carga electrostática de la enzima se encuentra distribuida de forma homogénea sobre toda la superficie de la proteína. La imagen de distribución de carga obtenida muestra una dispersión uniforme, sin acumulación significativa de carga en regiones específicas, lo que sugiere que no existen dominios altamente cargados que puedan favorecer interacciones electrostáticas selectivas o generar anisotropías en el comportamiento de la molécula. generando una inmovilización aleatoria sobre la superficie.

Para determinar el sistema de inmovilización más eficiente, se evaluó la actividad enzimática en un único ciclo de reacción, variando la concentración del funcionalizante empleado en el proceso de inmovilización. Cada experimento fue realizado por triplicado, con el fin de asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los valores promedio de actividad enzimática obtenidos, así como sus correspondientes desviaciones estándar, se presentan en la Tabla 7.No se evidencia una tendencia lineal directa entre el aumento de la concentración

del funcionalizante y la actividad enzimática obtenida. Los sistemas PA-20-45, PA-30-45, PA-40-45 y PA-50-45 presentan actividades relativamente similares, con valores comprendidos entre 4954,47 y 5500,78 UI/g. Sin embargo, al emplear la concentración PA-60-45, se observa un incremento notable en la actividad enzimática, alcanzando un valor de 13824,31 UI/g, significativamente superior al resto de las condiciones evaluadas.

Este comportamiento sugiere que existe un umbral de concentración de funcionalizante a partir del cual se favorece significativamente la orientación, accesibilidad y estabilidad de la enzima sobre la superficie de inmovilización, optimizando la retención de su actividad catalítica. A concentraciones inferiores, es probable que el número de grupos funcionales disponibles resulte insuficiente para promover interacciones eficientes entre la enzima y el soporte, lo que limita su desempeño catalítico.

No obstante, también es importante considerar que excesivas concentraciones de funcionalizante podrían, en otros sistemas, generar efectos adversos como obstrucción estérica o sobrecarga de grupos funcionales, afectando negativamente la actividad; por tanto, la concentración óptima debe ser cuidadosamente balanceada según el sistema en estudio (Mateo et al., 2007).

Al analizar las Figuras23 y 24, se observa que la película PA-60-45 presenta una disminución rápida de su actividad catalítica, alcanzando un límite operativo máximo de tres ciclos de reacción. Este comportamiento puede atribuirse principalmente a fenómenos de lixiviación enzimática, los cuales son consecuencia de la ruptura progresiva de las interacciones electrostáticas que inicialmente estabilizan la enzima sobre el soporte.para mitigar este efecto, y mejorar la estabilidad operacional del biocatalizador, se evaluó un sistema de inmovilización covalente mediante la utilización de glutaraldehído como agente entrecruzante, favoreciendo la formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte, lo que proporciona una mayor resistencia frente a los ciclos repetidos de uso.

Tabla 7

Actividad enzimática obtenida a diferentes concentraciones del funcionalizante durante la inmovilización. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

Concentración de funcionalizante	Actividad (UI/g)
PA-20-45	5440,27 ± 1,70
PA-30-45	4964,47 ± 1,59
PA-40-45	5500,78 ± 1,64
PA-50-45	4954,47 ± 1,97
PA-60-45	13824,31 ± 1,70

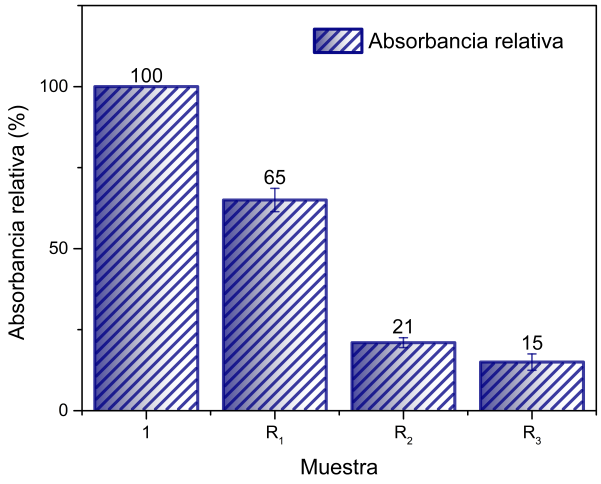


Figura 23

Gráfico de absorbancia relativa vs. reuso de los biocatalizadores obtenidos al inmovilizar la lipasa de Aspergillus oryzae mediante el método de adsorción

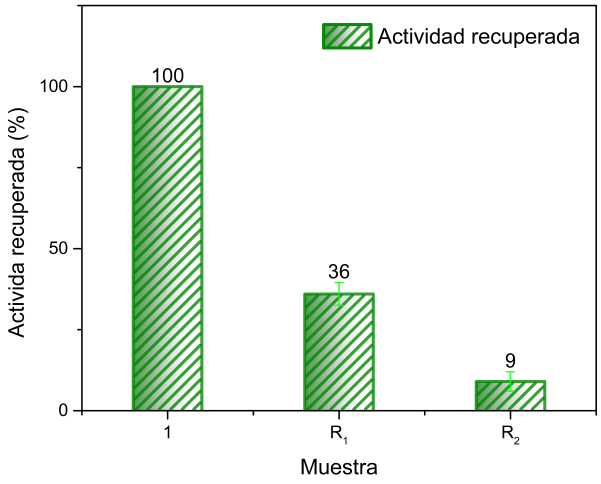


Figura 24

Porcentaje de actividad enzimática en función del número de uso de los biocatalizadores obtenidos al inmovilizar la lipasa de Aspergillus oryzae mediante el método de adsorción.

6.3.2 Estrategia de inmovilización covalente utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante

Para el proceso de entrecruzamiento con glutaraldehído, se ajustó el pH de la solución de 10 a 7 con el objetivo de optimizar la reactividad de los grupos funcionales involucrados. Este ajuste se fundamenta en la naturaleza química de la amina terminal presente en el APTMS, la cual, a pH 10, se encuentra mayoritariamente en su forma desprotonada ($-NH_2$), lo que incrementa su nucleofilicidad y su capacidad para reaccionar con los grupos carbonilo del glutaraldehído. Sin embargo, al disminuir el pH a 7, la amina se protona parcialmente ($-NH_3^+$), favoreciendo la formación de un intermediario imínico más estable que conduce a enlaces covalentes robustos. Este cambio en el pH mejora significativamente la eficiencia del entrecruzamiento, promoviendo una inmovilización enzimática más efectiva, con mayor estabilidad estructural y mejor conservación de la actividad catalítica.

Aunque aún no existe consenso sobre cuál es la especie reactiva principal del glutaraldehído durante el proceso de reticulación, se acepta que los grupos aldehído pueden reaccionar con las funciones ε-amino de los residuos de lisina en las proteínas para formar bases de Schiff tras un ataque nucleofílico. No obstante, estas bases de Schiff son inestables en condiciones ácidas y tienden a hidrolizarse, regenerando el aldehído y la amina. En contraste,

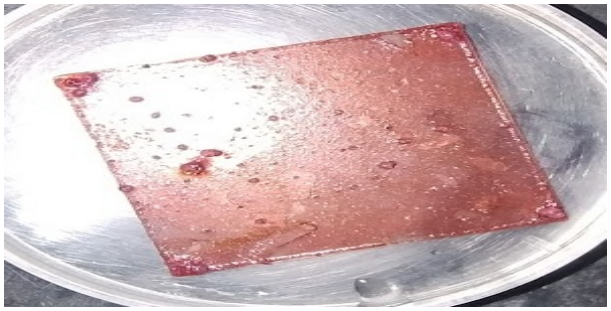
los enlaces formados entre el glutaraldehído y los grupos amino han mostrado una estabilidad notable incluso a pHs y temperaturas extremas, lo que sugiere que la reticulación no se basa únicamente en una simple base de Schiff de glutaraldehído monomérico. Por ello, se han propuesto varios mecanismos alternativos que involucran formas poliméricas del glutaraldehído y reacciones secundarias que incrementan la estabilidad de los enlaces.

- Entre 1968 y 1975, Richards y Knowles postularon rutas que involucraban la reacción del grupo amino de la proteína con aldehídos α,β-insaturados formados por condensación aldólica del glutaraldehído. (Richards & Knowles, 1968)
- Monsan propuso un mecanismo ligeramente diferente, en el que se producía una reacción de adición sobre la parte aldehídica de los polímeros α,β-insaturados (y del poliglutaraldehído) para dar lugar a una base de Schiff (imina) estabilizada por conjugación. (Margel & Rembaum, 1980a)

Aunque en un primer momento tanto el tratamiento con glutaraldehído a pH 7 como a pH 10 generaron un recubrimiento uniforme sobre la superficie funcionalizada, tras el lavado con agua ultrapura se observó que la película tratada a pH 10 se desprendió por completo (Figura 25c). Este resultado sugiere que, a pH alcalino, las aminas terminales del APTMS se encuentran predominantemente en su forma desprotonada (-NH_2), lo que aumenta su nucleofilicidad y, en consecuencia, favoreceria la formación de enlaces covalentes con los grupos carbonilo del glutaraldehído. Sin embarbo, a ese pH el glutaraldehido se enceuntra en su forma polimerica (poli-glutaraldehido), ya que se presenta reacciones de condensación aldólica investigada en 1980 por Margel y Rembaum (Margel & Rembaum, 1980b).Posteriormente, en 1970, Boucher (Boucher, 1972, 1974) propuso que la especie reactiva en la reticulación era el glutaraldehído monomérico, y que la capacidad para revertir del polímero al monómero dependía del pH. Asimismo, consideró que, a pH alcalinos, los polímeros no pueden revertir al monómero, ya que el tiempo y la temperatura tienden a favorecer la formación de estructuras poliméricas más irreversibles. En contraste, a pH neutro (7), las aminas pueden encontrarse parcialmente protonadas (-NH_3^+), lo que favorece la formación de un intermediario imínico más estable que conduce a una inmovilización más eficiente. Estos resultados concuerdan con reportes previos que indican que el pH es un factor crítico en la eficiencia del entrecruzamiento mediado por glutaraldehído (Multiple contributors, 2023).



(a) *Superficie tratada con glutaraldehído pH 10*



(b) *Superficie tratada con glutaraldehído pH 7*



(c) *Superficie tratada previamente a pH 10 y posteriormente lavada para eliminar el glutaraldehído residual*

Figura 25

Comparación de la reactividad del glutaraldehído a pH 7 y pH 10 durante el proceso de entrecruzamiento.

El glutaraldehído también presenta un comportamiento peculiar, ya que su conformación y reactividad dependen fuertemente del pH de la solución. Como se muestra en la Figura 26, puede existir en al menos 13 formas diferentes según las condiciones del medio, tales como el pH, la concentración, la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Migneault et al., 2004).

Este agente bifuncional puede reaccionar con proteínas a través de diversos mecanismos, como la condensación aldólica o la adición tipo Michael, dependiendo de las condiciones de reacción específicas. A pesar de la extensa literatura existente sobre su reactividad, aún persisten discrepancias respecto a los mecanismos predominantes y a cómo estos varían entre diferentes enzimas. Como consecuencia, el uso de glutaraldehído en procesos de inmovilización enzimática continúa siendo en gran medida empírico, requiriendo una optimización caso por caso para cada sistema biocatalítico.

El resultado observado en la Figura 25 puede explicarse por la formación de polímeros de glutaraldehído bajo condiciones alcalinas. A pH elevados, el glutaraldehído tiende a sufrir reacciones de condensación aldólica entre sus propias moléculas, lo que da lugar a la formación de estructuras poliméricas como las representadas en las estructuras VI y/o VII de la Figura 26 (Migneault et al., 2004). Estos polímeros, denominados poliglutaraldehídos, presentan menor reactividad hacia los grupos funcionales disponibles en la superficie, lo cual limita la eficiencia del entrecruzamiento covalente. Como consecuencia, parte del agente de entrecruzamiento permanece sin anclarse y puede ser fácilmente eliminado durante los procesos de lavado posteriores, dando lugar a la lixiviación observada experimentalmente.

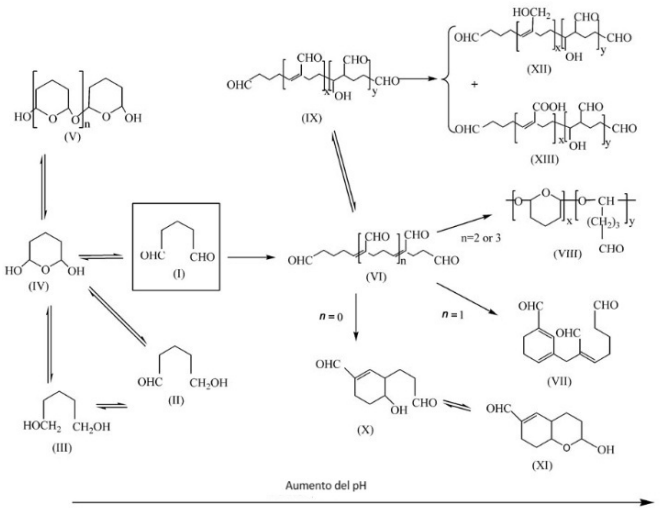


Figura 26

Conformaciones del glutaraldehído en función del pH. Imagen tomada y adaptada de (Migneault et al., 2004).

La alta reactividad del glutaraldehído a pH neutro se atribuye tanto a la presencia de residuos nucleofílicos en las proteínas como a las diversas formas moleculares que este compuesto puede adoptar en solución acuosa. Específicamente, el glutaraldehído puede existir como dialdehído monomérico, así como en formas dímeras, trímeras o poliméricas, lo que permite múltiples mecanismos de reacción y una mayor versatilidad en la formación de enlaces covalentes. Considerando estas propiedades, se seleccionó trabajar a pH 7, condición que favorece la reactividad del grupo amino terminal del APTMS al encontrarse parcialmente protonado, facilitando así la formación de enlaces covalentes con los grupos carbonilo del glutaraldehído. Para llevar a cabo el entrecruzamiento, las superficies funcionalizadas fueron sumergidas en la solución de glutaraldehído durante 4 horas, bajo agitación constante y a

temperatura ambiente. Este protocolo permitió optimizar la eficiencia del proceso de inmovilización covalente, contribuyendo a una mayor estabilidad estructural y funcional del sistema enzimático.

La metodología de inmovilización covalente se basa en el uso de glutaraldehído como agente entrecruzante bifuncional. Inicialmente, la superficie del soporte es funcionalizada con APTMS, introduciendo grupos amino primarios sobre la superficie. Posteriormente, el glutaraldehído reacciona con estos grupos amino a través de la formación de enlaces imina reaccion de base de Schiff , dejando grupos aldehído libres disponibles (27) estos grupos reaaccionan posteriormente con los residuos de lisina u otros aminoácidos con grupos amino libres en la superficie de la proteína, formando un enlace covalente estable, que permite una firme fijación de la biomolécula al soporte (Harley, 2023; Romero et al., 2023).

Este método presenta ventajas como su simplicidad, bajo costo y elevada eficiencia de inmovilización. Sin embargo, requiere una cuidadosa optimización de las condiciones experimentales para evitar una reticulación excesiva, la cual podría afectar negativamente la actividad biológica de la enzima inmovilizada (Romero et al., 2023; Yang et al., 2018a).

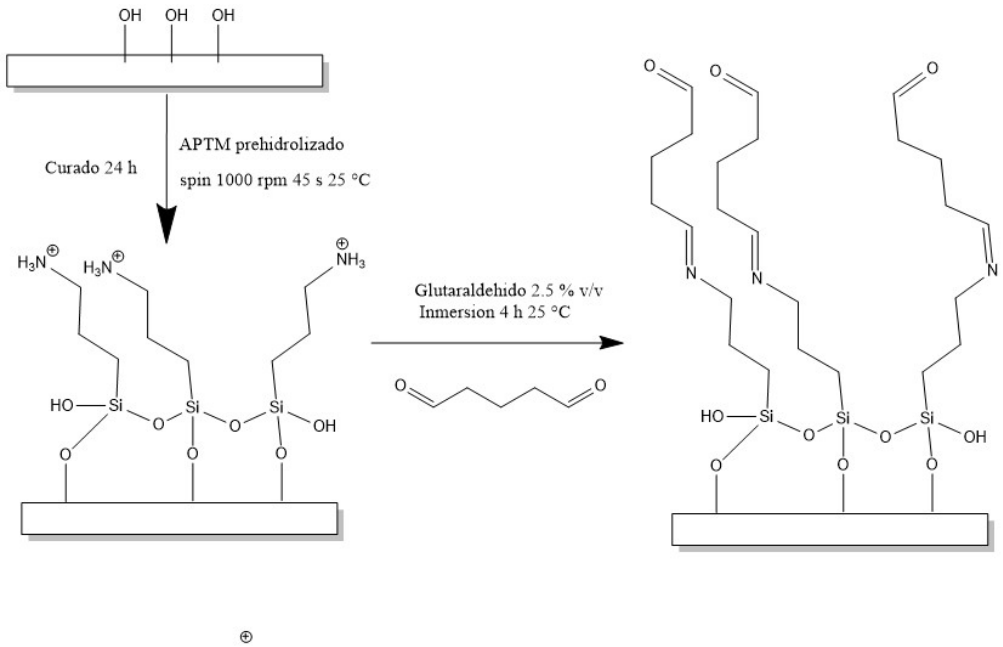


Figura 27

Mecanismo de utilización de APTMS y glutaraldehído para funcionalizar una superficie de celulosa. El APTMS puede reaccionar con los hidroxilos de la superficie mediante una reacción SN2 que da lugar a la pérdida de etanol. El glutaraldehído reacciona con la amina primaria para formar una base de Schiff dejando un extremo aldehído disponible para una reacción posterior con una amina primaria en una biomolécula.

La lipasa de *Aspergillus oryzae* posee 15 residuos de lisina, los cuales son reactivos y funcionales para la inmovilización mediante enlace covalente utilizando glutaraldehído. En la Figura 28 se muestra la disponibilidad y ubicación general de estos residuos, lo que permite comprender la facilidad con la que podría generarse la reacción de inmovilización.

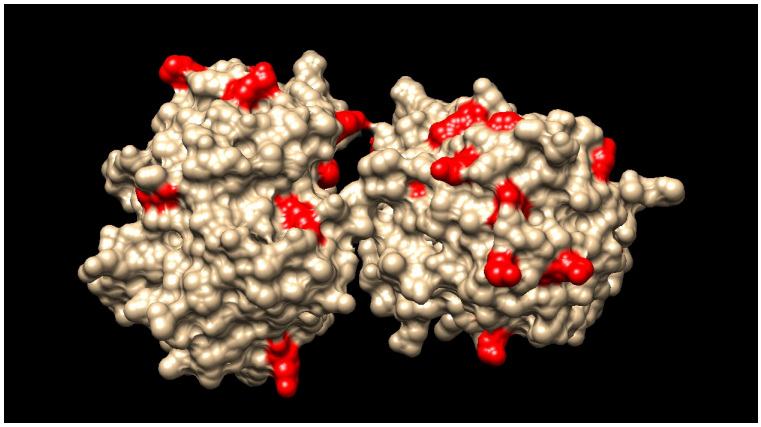


Figura 28

Distribución de los residuos de lisina en la estructura de la lipasa de Aspergillus oryzae.

Se observó que los residuos de lisina se encuentran expuestos en la superficie de la enzima, lo que favorece la formación de enlaces covalentes y facilita su inmovilización mediante dicha estrategia. Al evaluar la actividad enzimática bajo las condiciones experimentales establecidas, se obtuvieron resultados de actividad y absorbancia relativa que evidencian un incremento en la estabilidad del biocatalizador. Adicionalmente, al someter el sistema a múltiples ciclos de reacción, se logró mantener aproximadamente un 50 % de la actividad inicial (13824,31 UI/g) después de ocho ciclos consecutivos (29), lo que sugiere una adecuada estabilidad operacional del sistema inmovilizado.

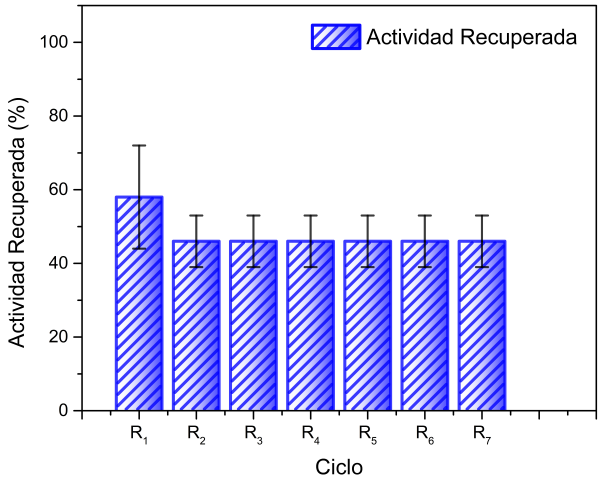


Figura 29

Porcentaje de actividad recuperada durante los ocho ciclos de reutilización de los biocatalizadores.

6.4 Ensayos de lixiviación de proteina

Finalmente, se empleó la metodología de Bradford para cuantificar la concentración de proteína presente en las soluciones enzimáticas antes del proceso de inmovilización. Este método colorimétrico, basado en la interacción del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con residuos básicos y aromáticos de las proteínas, permitió determinar la concentración proteica mediante espectrofotometría a 595 nm. La cuantificación fue esencial para establecer con precisión la cantidad de proteína ofrecida en el procedimiento de inmovilización. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8.

En la Tabla 9 se presenta la cantidad de proteína inmovilizada en función del medio de inmovilización utilizado. Al analizar los datos, se observa que no existe una correlación directa entre la masa de proteína inmovilizada y la concentración del agente silanizante (APTMS). Este resultado sugiere que, si bien la densidad de grupos funcionales puede influir en la capacidad de inmovilización, otros factores como la orientación de la enzima, la accesibilidad de los sitios activos y la eficiencia del entrecruzamiento también desempeñan un papel determinante en el rendimiento final del sistema. Por tanto, la cantidad de proteína inmovilizada no depende exclusivamente de la concentración del silano, lo que resalta la importancia de considerar múltiples variables en el diseño de superficies funcionalizadas para aplicaciones

biotecnológicas.

Tabla 8

Concentración de proteína determinada a distintas diluciones.

Dilución	Proteína (mg/mL)
1:20000	$< 0{,}001 \pm 0{,}00129$
1:1000	$19{,}01 \pm 4{,}58$
1:500	$74{,}81 \pm 4{,}92$
1:250	$124{,}59 \pm 4{,}20$
1:100	$137{,}37 \pm 1{,}67$

Tabla 9

Masa de enzima inmovilizada en diferentes condiciones del medio.

Medio de inmovilización	Masa inmovilizada (g)
PA-20-45	1,2867
PA-30-45	2,1193
PA-40-45	1,7506
PA-50-45	1,6539
PA-60-45	0,7957

Estos resultados de actividad se ven respaldados con la cuantificación de lixiviación de proteína que se realizó, donde se sometieron los sistemas a varios medios con diferente fuerza iónica, promoviendo el efecto de lixiviación por efecto salino (30). Este efecto consiste en la desorción de proteínas previamente adsorbidas debido al apantallamiento de las interacciones electrostáticas por los iones presentes en solución. A medida que aumenta la fuerza iónica, los iones compiten con las cargas superficiales, disminuyendo las fuerzas de interacción proteína-soporte y facilitando su liberación al medio líquido (Essa et al., 2007; Salis et al., 2016; Yang et al., 2018b).

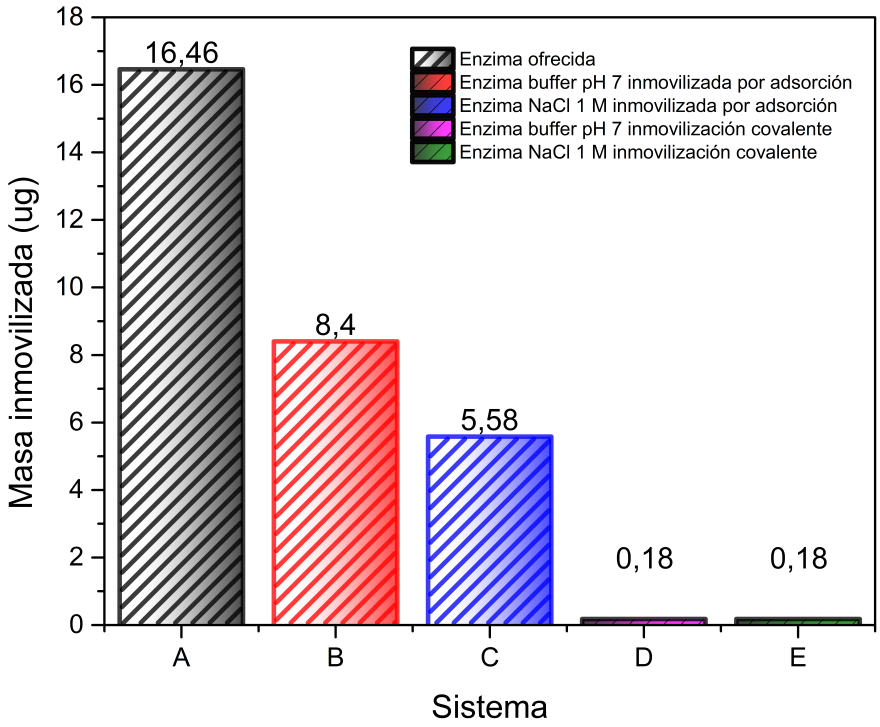


Figura 30

Cuantificación de proteína lixiviada bajo diferentes condiciones de fuerza iónica.

Estos resultados permiten no solo establecer con precisión la cantidad de enzima ofrecida en el proceso de inmovilización, sino también correlacionar esta información con la eficiencia del anclaje obtenido en diferentes condiciones del medio. A pesar de que el incremento en la concentración del agente funcionalizante (APTMS) no mostró una relación lineal con la masa inmovilizada, la cuantificación realizada por el método de Bradford permitió evidenciar diferencias significativas entre tratamientos, lo que resalta la influencia de múltiples factores en el proceso de inmovilización.

Al integrar los datos obtenidos de la actividad catalítica, los ensayos de reutilización y la cuantificación de proteína, se determinó que el sistema funcionalizado bajo la condición PA-60-45 ofreció el mejor balance entre estabilidad y eficiencia de inmovilización. A pesar de presentar una menor cantidad de proteína anclada en comparación con otros sistemas, este tratamiento mostró una mayor retención de actividad en los ciclos de reutilización, junto con una menor lixiviación proteica, lo que evidencia una inmovilización más estable y efectiva.

De forma complementaria, se evaluó la estabilidad de la proteína inmovilizada frente a condiciones de lixiviación iónica, como se muestra en la Figura 30. Esta evaluación permitió confirmar la fortaleza del anclaje bajo distintas estrategias de inmovilización, siendo un indicador clave de la robustez del sistema y su potencial aplicación en medios operativos más exigentes.

7 Caracterización fisico-quimica

7.1 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se utilizó para evaluar el perfil de descomposición de las superficies funcionalizadas y de los biocatalizadores obtenidos. Esta técnica consiste en medir de manera continua la variación de la masa de una muestra en función de la temperatura o del tiempo, bajo una atmósfera controlada.

El termograma obtenidos permitieron identificar eventos de pérdida de masa asociados a:

- Eliminación de humedad y solventes residuales, normalmente observada por debajo de 100 °C.
- Descomposición de grupos orgánicos funcionalizantes (como el APTMS), evidenciada en un intervalo de 350-400 °C. Con un pico maximo a los 391.4 °C

En la Figura 31 se presenta el termograma correspondiente a la superficie funcionalizada con APTMS al 60 % v/v. Se observa una pérdida de masa total del 1.798 %, de la cual el 0.4 % corresponde a agua. Por lo tanto, el porcentaje real de APTMS funcionalizado es del 1.398 %.

A partir de una masa inicial de muestra de:

$$m_{\text{muestra}} = 16{,}211 \text{ mg}$$

la masa de APTMS anclado se calcula como:

$$m_{\text{APTMS}} = \frac{1{,}398}{100} \times 16{,}211 \text{ mg} = 0{,}2266 \text{ mg}$$

Considerando que se adicionaron 600 μL de solución de APTMS al 60 % v/v, con una densidad de 0,946 $\frac{\text{g}}{\text{mL}}$, la masa total de APTMS ofrecida es:

$$m_{\text{ofrecido}} = 0{,}6 \times 600\ \mu L \times 0{,}946\ \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 0{,}34056\ \text{g} = 340{,}56\ \text{mg}$$

El rendimiento de inmovilización se obtiene como:

$$R = \frac{m_{\text{APTMS}}}{m_{\text{ofrecido}}} \times 100 = \frac{0{,}2266}{340{,}56} \times 100 = 0{,}0611\,\%$$

Rendimiento de inmovilización: 0,0611 %.

Estos resultados indican que, aunque la cantidad de APTMS efectivamente anclada sobre la superficie es pequeña en relación con la cantidad ofrecida, el recubrimiento logrado es suficiente para generar un cambio detectable en el perfil de descomposición térmica. Este tipo de valores es consistente con recubrimientos moleculares delgados, característicos de capas autoensambladas sobre superficies inorgánicas. La baja fracción de aprovechamiento podría estar asociada a factores como la saturación de sitios activos, barreras difusionales o la formación de estructuras poliméricas en solución que no interactúan con la superficie. No obstante, la presencia de APTMS sobre la superficie abre la posibilidad de posteriores caracterizaciones fisicoquímicas más detalladas (p. ej., mediante FTIR, XPS o AFM) y de la aplicación de estas superficies funcionalizadas en reacciones catalizadas por lipasas, como esterificación y transesterificación.

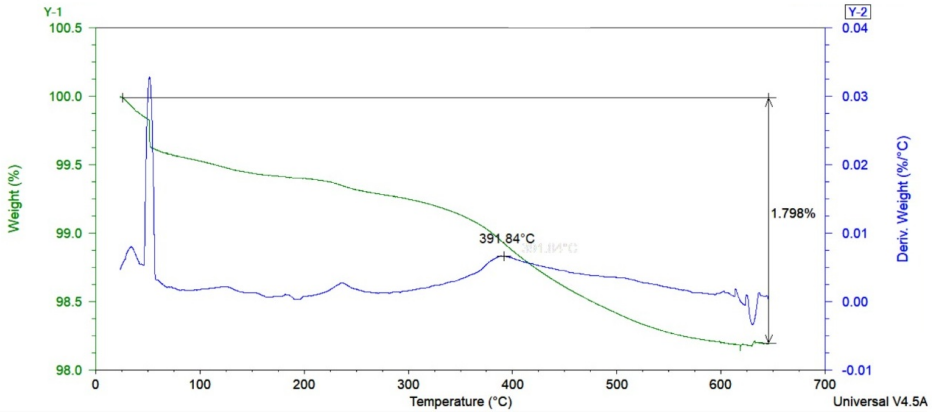


Figura 31

Termograma correspondiente a la superficie funcionalizada con APTMS al 60 % de concentración.

8 Conclusiones

En este trabajo se desarrolló un sistema de inmovilización enzimática sobre superficies silíceas funcionalizadas con APTMS, utilizando lipasa de *Aspergillus oryzae* como modelo. A través de métodos de inmovilización por adsorción y unión covalente, se analizaron distintos niveles de funcionalización para evaluar su efecto sobre la masa de enzima anclada, la actividad catalítica y la estabilidad operativa. La cuantificación proteica mediante el ensayo de Bradford permitió determinar que no existe una correlación directa entre la cantidad de enzima inmovilizada y la concentración del agente silanizante, lo que evidencia la influencia de factores estructurales y de orientación en el proceso de anclaje. Adicionalmente, los ensayos de actividad enzimática y reusabilidad demostraron que el sistema PA-60-45 presentó el mejor rendimiento global, al conservar una alta actividad relativa a lo largo de los ciclos y exhibir una baja lixiviación proteica, incluso en condiciones de elevada fuerza iónica. Estos resultados destacan la eficacia de la inmovilización covalente en condiciones controladas de funcionalización, y posicionan al sistema PA-60-45 como una plataforma robusta y eficiente para aplicaciones biotecnológicas que demandan estabilidad y reutilización del biocatalizador.

9 Recomendaciones

Como perspectivas futuras, se plantea realizar una caracterización más profunda de la homogeneidad y distribución de la funcionalización mediante técnicas avanzadas como microscopía de fuerza atómica (AFM), y mapeo por microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS), con el fin de correlacionar las propiedades superficiales con el desempeño catalítico. Asimismo, se proyecta evaluar el uso de estos biocatalizadores en reacciones de esterificación y transesterificación de interés industrial, explorando su comportamiento frente a diferentes sustratos y condiciones operativas, para ampliar su aplicabilidad en procesos de síntesis de compuestos de alto valor agregado.

Referencias

Alf, M. E., Asatekin, A., Barr, M. C., Baxamusa, S. H., Chelawat, H., Ozaydin-Ince, G., & Gleason, K. K. (2010). Chemical vapor deposition of conformal, functional, and responsive polymer films. *Advanced Materials*, *22*(18), 1993-2027.

Andreescu, S., Njagi, J., & Ispas, C. (2008). Nanostructured materials for enzyme immobilization and biosensors. En *The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology* (pp. 355-394). Elsevier.

Applichem. (s.f.). Buffer reference center – pKa values of amino acids [Consultado en línea]. https://www.iscabiochemicals.com/page/32/amino-acid-pka-and-pki-values

Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*, *4*(4), 1583-1600.

Benavente, R., Pessela, B. C., Curiel, J. A., De las Rivas, B., Muñoz, R., Guisán, J. M., & Corzo, N. (2015). Improving properties of a novel β-galactosidase from Lactobacillus plantarum by covalent immobilization. *Molecules*, *20*(5), 7874-7889.

Bodade, A. B., Taiwade, M. A., & Chaudhari, G. N. (2017). Bioelectrode based chitosan-nano copper oxide for application to lipase biosensor. *Journal of Applied Pharmaceutical Research*, *5*(1), 30-39.

Boucher, R. M. G. (1972). Advances in sterilization techniques: state of the art and recent breakthroughs. *American Journal of Hospital Pharmacy*, *29*(8), 661-672.

Boucher, R. M. G. (1974). Potentiated acid 1,5 pentanedial solution: a new chemical sterilizing and disinfecting agent. *American Journal of Health System Pharmacy*, *31*(6), 546-557.

Brochier Salon, M. C., & Belgacem, M. N. (2011). Hydrolysis-condensation kinetics of different silane coupling agents. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, *186*(2), 240-254.

Brzozowski, A. M., Savage, H., Verma, C. S., Turkenburg, J. P., Lawson, D. M., Svendsen, A., & Patkar, S. (2000). Structural origins of the interfacial activation in Thermomyces (Humicola) lanuginosa lipase. *Biochemistry*, *39*(49), 15071-15082.

Casagrande, C. A., Jochem, L. F., & Repette, W. L. (2020). Analysis of the 3-Glycidoxypropyltrimethoxysila (GPTMS) hydrolysis by infrared spectroscopy. *Matéria (Rio de Janeiro)*, *25*(03), e12811.

Chemistry Steps. (s.f.). Reactions of epoxides under acidic and basic conditions [Recuperado en julio de 2025]. https://www.chemistrysteps.com/reactions-of-epoxides-under-acidic-and-basic-conditions/

Chen, B., Pernodet, N., Rafailovich, M. H., Bakhtina, A., & Gross, R. A. (2008). Protein immobilization on epoxy-activated thin polymer films: effect of surface wettability and enzyme loading. *Langmuir*, *24*(23), 13457-13464.

Contreras, C. B. (2015). *Funcionalización, micro/nanoestructuración de superficies esféricas y planas. Preparación de materiales híbridos* [Doctoral dissertation]. Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, *3*(1), 1-9.

Dorau, R., Jensen, P. R., & Solem, C. (2021). Purified lactases versus whole-cell lactases—the winner takes it all. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(12), 4943-4955.

D'Sa, R. A., Dickinson, P. J., Raj, J., Pierscionek, B. K., & Meenan, B. J. (2011). Inhibition of lens epithelial cell growth via immobilisation of hyaluronic acid on atmospheric pressure plasma modified polystyrene. *Soft Matter*, *7*(2), 608-617.

Engelmann, C., Ekambaram, N., Johannsen, J., Fellechner, O., Waluga, T., Fieg, G., & Bubenheim, P. (2020). Enzyme immobilization on synthesized nanoporous silica particles and their application in a bi-enzymatic reaction. *ChemCatChem*, *12*(8), 2245-2252.

Espinoza-Espinoza, L. A., Muñoz-More, H. D., Nole-Jaramillo, J. M., Ruiz-Flores, L. A., Arana-Torres, N. M., Moreno-Quispe, L. A., & Valdiviezo-Marcelo, J. (2024). Microencapsulation of vitamins: A review and meta-analysis of coating materials, release and food fortification. *Food Research International*, *187*, 114420.

Essa, H., Magner, E., Cooney, J., & Hodnett, B. K. (2007). Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *49*(1-4), 61-68.

Fadeev, A. Y., & McCarthy, T. J. (1999). Trialkylsilane monolayers covalently attached to silicon surfaces: wettability studies indicating that molecular topography contributes to contact angle hysteresis. *Langmuir*, *15*(11), 3759-3766.

Friedrich, J. (2011). Mechanisms of plasma polymerization—reviewed from a chemical point of view. *Plasma Processes and Polymers*, *8*(9), 783-802.

George, S. M. (2010). Atomic layer deposition: an overview. *Chemical Reviews*, *110*(1), 111-131.

Hansen, T., Vermeeren, P., Haim, A., van Dorp, M. J., Codée, J. D., Bickelhaupt, F. M., & Hamlin, T. A. (2020). Regioselectivity of epoxide ring-openings via SN2 reactions under basic and acidic conditions. *European Journal of Organic Chemistry*, (25), 3822-3828.

Harley, W. (2023). A (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) and Glutaraldehyde Functionalized Cellulose Surface for Immunoassays.

Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(2), 235-251.

Holmes, M., Keeley, J., Hurd, K., Schmidt, H., & Hawkins, A. (2010). Optimized piranha etching process for SU8-based MEMS and MOEMS construction. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, *20*(11), 115008.

Iler, R. K. (1979). *The Chemistry of Silica*. Wiley-Interscience.

Juarez, B. B. (2013). *Tecnología enzimática para la sacarificación de biomasas vegetales en solventes neotéricos = Enzyme technology for plant biomass saccharification in neoteric solvents* [Doctoral dissertation]. Universidad de Murcia.

Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS Omega*, *8*(6), 5184-5196.

Malar, C. G., Seenuvasan, M., & Kumar, K. S. (2019). Improvisation of diffusion coefficient in surface modified magnetite nanoparticles: A novel perspective. *Materials Science and Engineering: C*, *103*, 109832.

Mamedova, V. L., Khikmatova, G. Z., Korshin, D. E., Gavrilova, E. L., & Mamedov, V. A. O. (2022). Epoxides: methods of synthesis, reactivity, practical significance. *Russian Chemical Reviews*, *91*(11).

Margel, S., & Rembaum, A. (1980a). Synthesis and characterization of poly (glutaraldehyde). A potential reagent for protein immobilization and cell separation. *Macromolecules*, *13*(1), 19-24.

Margel, S., & Rembaum, A. (1980b). Synthesis and characterization of poly (glutaraldehyde). A potential reagent for protein immobilization and cell separation. *Macromolecules*, *13*(1), 19-24.

Master Organic Chemistry. (2015a). Epoxide ring opening with base [Recuperado en julio de 2025]. https://www.masterorganicchemistry.com/2015/02/10/opening-of-epoxide-with-base/

Master Organic Chemistry. (2015b). Opening of epoxides with acid [Recuperado en julio de 2025]. https://www.masterorganicchemistry.com/2015/02/02/opening-of-epoxides-with-acid/

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(6), 1451-1463.

Matisons, J. G. (2012). Silanes and siloxanes as coupling agents to glass: a perspective. En *Silicone Surface Science* (pp. 281-298). Springer.

Mendhe, A. C. (2023). Spin coating: Easy technique for thin films. En *Simple Chemical Methods for Thin Film Deposition: Synthesis and Applications* (pp. 387-424). Springer Nature Singapore.

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, *37*(5), 790-802.

Mittal, K. L. (Ed.). (2004). *Polymer Surface Modification: Relevance to Adhesion, Volume 3*. CRC Press.

Multiple contributors. (2023). Glutaraldehyde [Disponible en ResearchGate]. https://www.researchgate.net/topic/Glutaraldehyde

Mustafa, H. A. M., & Jameel, D. A. (2021). Modeling and the main stages of spin coating process: A review. *Journal of Applied Science and Technology Trends*, *2*(02), 119-123.

Ossila Ltd. (s.f.). Spin coating: Complete guide to theory and techniques [Recuperado el 5 de junio de 2025]. https://www.ossila.com/pages/spin-coating

Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, *272*, 494-506.

Palafox-González, A. P., Rosas-Orta, L. R., Contreras-Lopez, D., Rocha-Jimenez, J., Gonzalez-Zarate, D., Pawar, T., & Vallejo-Montesinos, J. (2023). Study of the photodegradation of polypropylene: effect of the silane coupling agents as organosilicon coatings in TiO2 fillers, evaluation of the thermomechanical properties. *Polymer Degradation and Stability*, *216*, 110481.

Patel, N., Rai, D., Shivam, Shahane, S., & Mishra, U. (2019). Lipases: sources, production, purification, and applications. *Recent Patents on Biotechnology*, *13*(1), 45-56.

Pazol, J., Vázquez, A., & Nicolau, E. (2019). Characterization of non-covalent immobilized Candida antarctica lipase B over PS-b-P4VP as a model bio-reactive porous interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *183*, 110418.

Pinto, M. C., Freire, D. M., & Pinto, J. C. (2014). Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from Candida antarctica. *Molecules*, *19*(8), 12509-12530.

Pustahija, L., Bandl, C., Alem, S. A. A., & Kern, W. (2024). Surface Functionalization of Activated Carbon: Coupling of 3-(Aminopropyl) trimethoxysilane and (3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilane. *C*, *10*(4), 104.

Rahman, I. A., & Padavettan, V. (2012). Synthesis of silica nanoparticles by sol-gel: size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites—a review. *Journal of Nanomaterials*, *2012*(1), 132424.

Ribeiro, B. D., Castro, A. M. D., Coelho, M. A. Z., & Freire, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, *2011*(1), 615803.

Ribeiro, J. S., & Veloso, C. M. (2021). Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. *Food Hydrocolloids*, *112*, 106374.

Richards, F. M., & Knowles, J. R. (1968). Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. *Journal of Molecular Biology*, *37*(1), 231-233.

Romero, G., Contreras, L. M., Aguirre Céspedes, C., Wilkesman, J., Clemente-Jiménez, J. M., Rodríguez-Vico, F., & Las Heras-Vázquez, F. J. (2023). Efficiency assessment between entrapment and covalent bond immobilization of mutant β-Xylosidase onto Chitosan support. *Polymers*, *15*(15), 3170.

Salis, A., Medda, L., Cugia, F., & Monduzzi, M. (2016). Effect of electrolytes on proteins physisorption on ordered mesoporous silica materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *137*, 77-90.

Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, *409*(6817), 258-268.

Seenuvasan, M., Kumar, K. S., Kumar, A., & Parthiban, R. (2020). Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: An enzyme immobilization aspect. *Biochemical Engineering Journal*, *158*, 107574.

Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *349*(8-9), 1289-1307.

Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, *42*(15), 6223-6235.

Staniszewski, M., Kujawski, W., & Lewandowska, M. (2007). Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product–Kinetic model predictions. *Journal of Food Engineering*, *82*(4), 618-625.

Sypabekova, M., Hagemann, A., Rho, D., & Kim, S. (2022). 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) deposition methods on oxide surfaces in solution and vapor phases for biosensing applications. *Biosensors*, *13*(1), 36.

Taylor, R. H., Fournier, S. M., Simons, B. L., Kaplan, H., & Hefford, M. A. (2005). Covalent protein immobilization on glass surfaces: Application to alkaline phosphatase. *Journal of Biotechnology*, *118*(3), 265-269.

Tischer, W., & Wedekind, F. (1999). Immobilized enzymes: methods and applications. En W.-D. Fessner (Ed.), *Biocatalysis – from Discovery to Application* (pp. 95-126, Vol. 200). Springer.

Tong, X., Trivedi, A., Jia, H., Zhang, M., & Wang, P. (2008). Enzymic thin film coatings for bioactive materials. *Biotechnology Progress*, *24*(3), 714-719.

Trino, L. D., Bronze-Uhle, E. S., George, A., Mathew, M. T., & Lisboa-Filho, P. N. (2018). Surface physicochemical and structural analysis of functionalized titanium dioxide films. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *546*, 168-178.

Yang, J., Sun, L., Guo, R., Yang, H., Feng, X., & Zhang, X. (2018a). A facile route for oriented covalent immobilization of recombinant Protein A on epoxy agarose gels: In situ generation of heterofunctional amino-epoxy supports. *ChemistrySelect*, *3*(37), 10320-10324.

Yang, J., Sun, L., Guo, R., Yang, H., Feng, X., & Zhang, X. (2018b). A facile route for oriented covalent immobilization of recombinant Protein A on epoxy agarose gels: in situ generation of heterofunctional amino-epoxy supports. *ChemistrySelect*, *3*(37), 10320-10324.

Yanguas-Gil, A. (2016). *Growth and Transport in Nanostructured Materials: Reactive Transport in PVD, CVD, and ALD*. Springer.

Zhang, D. H., Yuwen, L. X., & Peng, L. J. (2013a). Parameters affecting the performance of immobilized enzyme. *Journal of Chemistry*, *2013*(1), 946248.

Zhang, D. H., Yuwen, L. X., & Peng, L. J. (2013b). Parameters affecting the performance of immobilized enzyme. *Journal of Chemistry*, *2013*(1), 946248.