



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Estudio de Métodos Alternativos Sustentables de Remediación

Bioq. MARÍA VICTORIA TUTTOLOMONDO

Director: PROFESOR DOCTOR MARTÍN FEDERICO DESIMONE

Lugar de trabajo: CÁTEDRA DE QUÍMICA ANALÍTICA INSTRUMENTAL

Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad De Buenos Aires

Año 2014

A mamá y papá.

A mis hermanas.

A todos los que de una forma u otra estuvieron ahí cuando los necesité.

Gracias.

Agradecimientos

(en ningún orden en particular)

Al Prof. Dr. Luis E. Díaz por haber creído en mi y haberme estimulado y guiado durante todo este tiempo.

Al Prof. Dr. Martín F. Desimone por haberse hecho cargo del presente trabajo, por su constante apoyo y dedicación (y por las sesiones de psicoanálisis también).

Al Dr. Guillermo J. Copello por haberme permitido aprender y haberme explicado y presentado a la química sol-gel, inmovilización de biomoléculas y la importancia de la remediación ambiental.

A la Dra. Gisela S. Alvarez por haber compartido conmigo sus conocimientos de inmovilización de bacterias.

A mis compañeros de laboratorio Guille, Gise, Andre, Emi, Joaqui, Ine, Silvia y Sergio porque gracias a ellos y a su constante reto intelectual pude crecer como profesional, y por la ayuda prestada siempre que lo requerí (y la *paciencia* que me tuvieron chicos).

A Juan M. Galdopórpora (bah, Juancito) por la ayuda invaluable durante los experimentos.

A Jessica A. Bertinatto, porque sin ella no hubiese aplicado ni entendido microemulsiones.

A Victor G. Ciancio, porque sin su ayuda para conseguir los imanes el primer capítulo nunca hubiese visto la luz.

A mis amigos por soportarme, cosa que se tornó bastante dificultosa hacia el final.

A mis amigos/guildies de Fallen Order, porque sin tener mucha idea de lo que hago, siempre estuvieron ahí para tirar una palabra o poner el hombro en los momentos más difíciles (Tor ilisar'thera'nal!).

A mi mamá por no dejarme bajar los brazos nunca, por obligarme a ir a rendir el final de Biología metiéndome en un taxi y por aguantar mis ataques de locura y desesperación.

A mi papá por enseñarme que siempre se puede.

A mis abuelos por enseñarme que hay que perseverar para triunfar.

A mis hermanas por ser y estar siempre ahí.

A mis tíos, tías primos y primas por el apoyo incondicional.

A Federico L. Franco por ser mi cable a tierra y no dejar que me ahogue en una cucharita de té.

A Jonatan y a Olga, por el material, café de todas las mañanas y los consejos.

A Juana por sus importantes tareas en la Cátedra.

A la ANPCyT, al CONICET y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA por los subsidios y el lugar de trabajo durante los períodos en los cuales he desarrollado mi tesis.

Los resultados de la presente tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones

Sol-gel Encapsulation of Biomolecules and Cells for Medicinal Applications. Wang, Xiaolin; Ahmed, Nada Ben; Alvarez, Gisela Solange; Tuttolomondo, Maria Victoria; Hélyary, Christophe; Desimone, Martin Federico; Coradin, Thibaud. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014. *En prensa*.

Removal of azo dyes from water by sol-gel immobilized *Pseudomonas sp.* Tuttolomondo, María Victoria; Álvarez, Gisela Solange; Desimone, Martín Federico; Díaz, Luis Eduardo. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2014, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2014, **2**, 131.

Preparation of submicrometer monodisperse magnetic silica particles using a novel water in oil microemulsion: properties and application for enzyme immobilization. Tuttolomondo, María Victoria; Villanueva, María Emilia; Alvarez, Gisela Solange; Desimone, Martín Federico; Díaz, Luis Eduardo. *Biotechnology Letters*. 2013, **35**, 1571

Solicitud de patente

Captación de azocolorantes utilizando hidrogeles de colágeno. MV Tuttolomondo y MF Desimone. *En evaluación*, Septiembre 2014.

Índice

Introducción	1
Estructura y propiedades de los colorantes	4
El proceso sol-gel	6
Polimerización entre pH 2,00 y 7,00	10
Polimerización a pH mayor a 7,00	11
Geles y films	12
Síntesis de nanopartículas	14
Inmovilización de moléculas por el método sol-gel	15
Inmovilización de células por el método sol-gel	19
Nanocompuestos con relleno de sílica	22
Formas de reforzar polímeros orgánicos	25

Propósito e Hipótesis	27
------------------------------	-----------

Capítulo 1: Preparación de partículas submicrométricas de sílica monodispersas utilizando un método novedoso mediante microemulsión agua en aceite: propiedades y aplicación en inmovilización de enzimas.

Introducción	28
Materiales y métodos	29
Resultados	36
Discusión	46
Conclusiones	48

Capítulo 2: Remoción de azo colorantes del agua utilizando *Pseudomonas* sp. inmovilizadas en perlas de silicio por la técnica sol-gel

Introducción	50
Materiales y métodos	52
Resultados y discusión	60
Conclusiones	72
Capítulo 3: Aplicación ambiental de hidrogeles de colágeno: adsorción de azo colorantes	
Introducción	74
Materiales y métodos	79
Resultados y discusión	85
Conclusiones	110
Conclusión general	113
Apéndice técnico	117
Referencias	130
Resumen	152

Introducción

Introducción

Son muchos los contaminantes que se encuentran en las aguas de desecho, tales como bases, ácidos, tóxicos orgánicos e inorgánicos, sólidos disueltos y color. Este último es considerado el menos deseado y generalmente está causado por colorantes. La contaminación por colorantes es uno de los problemas ambientales más serios debido al importante daño producido a los ecosistemas cuando los colorantes son descargados directa o indirectamente en cuerpos de agua. Concentraciones tan bajas como 1 ppm de colorante tiñen intensamente al agua; si consideramos además al ecosistema acuático en particular, la presencia de colorantes reduce la penetración de luz y, en consecuencia, altera la capacidad fotosintética de las plantas, alterando al ecosistema, pudiendo llegar en casos graves a la eutrofización. Es por este motivo que los convierte en antiestéticos y ambientalmente inaceptables. Los colorantes descartados forman una fina capa en la superficie de las aguas que lleva a la reducción de la cantidad de oxígeno disuelto, afectando de esta manera la fauna acuática. Las aguas de descarte altamente coloreadas se producen mayoritariamente en industrias como papeleras, destilerías, curtiembres y farmacéutica. La industria textil es la que produce la mayor cantidad de estos efluentes que poseen color persistente y muy intenso debido a las grandes cantidades de agua utilizadas en el procesamiento de las telas. Aproximadamente del 2 al 10% de los colorantes básicos, dispersos y directos se pierden en los descartes de los procesos de tinción, pero este valor puede alcanzar el 50% cuando hablamos de colorantes reactivos ^{1, 2}. Esto se supone que ocurre debido a la forma hidrolizada de los colorantes reactivos que no posee afinidad por las fibras. Teniendo en cuenta que hoy en día los azo colorantes reactivos son los más comúnmente utilizados en la

industria textil, hay un interés especial en encontrar un método de remoción para este tipo de colorantes. Una vez que éstos se encuentran en los efluentes y son liberados a los cursos de agua, su alta estabilidad puede mantenerlos inalterados por cerca de 50 años. Debido a su importancia comercial, el impacto ambiental y la toxicidad de estos colorantes ha sido ampliamente estudiada³⁻⁷. El tratamiento de los efluentes se basa no sólo en la remoción del color (decoloración), sino también en la degradación y mineralización del colorante. La decoloración ocurre cuando las moléculas del colorante se remueven de la solución o cuando el cromóforo de la molécula se rompe, pero en ambos casos la molécula o el fragmento permanecen intactos. La región de absorción de luz cambia de la región visible al infrarrojo. En la **figura 1** pueden observarse los cromóforos más comunes.

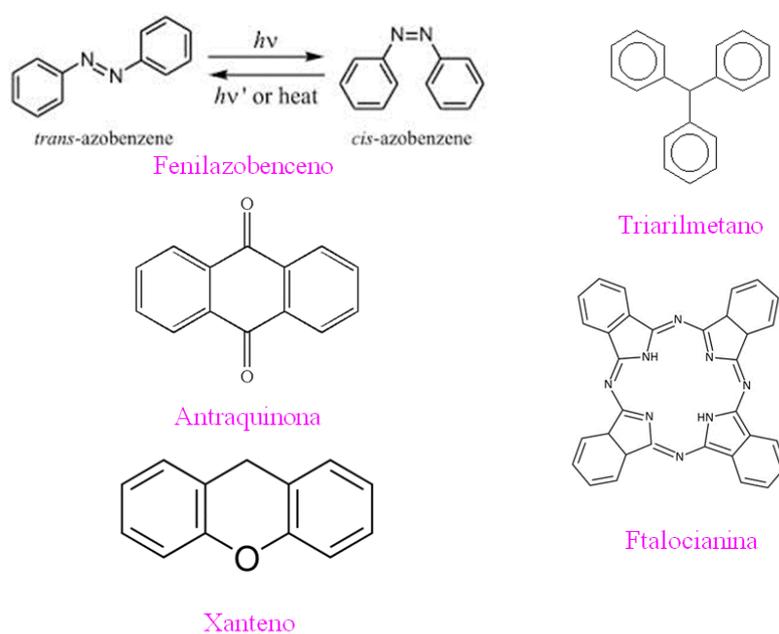


Figura 1: Esquema algunas estructuras típicas de los cromóforos de colorantes reactivos utilizados en la industria

Los tratamientos tradicionales de efluentes son marcadamente ineficientes para el manejo de aguas contaminadas con colorantes sintéticos debido a la estabilidad química de éstos ⁸. Las desventajas principales de los métodos fisicoquímicos son el alto costo, baja eficiencia, versatilidad limitada, necesidad de equipamiento especializado, interferencia con otros analitos presentes en el efluente y el manejo del desecho resultante ^{9,10}. Los métodos físicos remueven el color con alta eficiencia, pero las moléculas del colorante no son degradadas, se concentran y eso requiere de un descarte adecuado. A pesar de que las técnicas químicas remueven eficientemente el colorante, la acumulación de los barros y desechos concentrados pueden crear un problema de descarte. Existe también la posibilidad de la creación de una fuente de contaminación secundaria debido a la cantidad de químicos necesarios para lograr la decoloración del efluente. Otras técnicas desarrolladas recientemente como los procesos avanzados de oxidación, basados en la generación de oxidantes fuertes, pudieron ser aplicadas en tratamientos efectivos ^{11, 12}. El problema de estos es el muy alto costo, lo que los lleva a ser poco atractivos comercialmente debido a la alta demanda energética y al alto consumo de reactivos químicos. El desarrollo de tecnologías eficientes, económicas y ecológicas para disminuir o eliminar el contenido de colorantes sintéticos de las aguas de desecho a un costo relativamente aceptable es de importancia primordial ¹³. Los métodos biológicos se consideran generalmente ecológicos porque pueden llevar a la mineralización completa de los contaminantes orgánicos a bajo costo ¹⁴. La principal limitación se relaciona generalmente con la toxicidad de algunos de los colorantes y/o sus productos de degradación hacia los microorganismos utilizados. La remoción de colorantes depende no sólo de sus propiedades físicas y químicas, sino también del método de tratamiento elegido sin que haya hoy en día un método o tecnología que tenga aplicación universal. Algunos de los procesos no satisfacen el tema de costos y

otros no son adecuados para remover la contaminación del agua ¹⁵. Todas las tecnologías utilizadas y aquellas en desarrollo se discutieron en infinidad de trabajos, entre ellos los publicados por Forgacs *et al.*, ⁸ Mondal *et al.*, ¹⁵ Vandevivere *et al.*, ¹⁶ Robinson *et al.*, ¹⁷ Anjaneyulu *et al.*, ¹⁸ Hai *et al.*, ¹⁹ y Hao *et al.* ²⁰.

La sorción eficiente de colorantes sintéticos sobre soportes de bajo costo se considera un método simple y económico, haciendo de éstos una alternativa atractiva para ser utilizada para la remediación de agua, especialmente cuando el sorbente es de bajo costo y no requiere pretratamiento del efluente para su utilización. Comparado con otras tecnologías y metodologías es superior en cuanto a la posibilidad de reutilización del agua, flexibilidad y simpleza del diseño, facilidad de operación y baja interferencia con otros contaminantes, entre otros. Algunas de las ventajas de recurrir a la sorción incluyen: baja área de superficie utilizada (de medio a un cuarto del área total requerida para la bioremediación), menos interferencias por otras especies químicas presentes, mayor flexibilidad de diseño y operación, remoción superior de contaminantes orgánicos, sumado a que la adsorción no lleva a la formación de productos secundarios contaminantes no coloreados ^{8, 21-24}.

Estructura y propiedades de los colorantes

La mayoría absoluta de colorantes utilizados en la actualidad pertenece a los llamados azo colorantes ²⁵⁻²⁷. Estos colorantes pueden tener uno a más grupos azo presentes en su estructura. Los colorantes también pueden ser clasificados según su índice de color (CI, del inglés *colour index*). Pueden ser agrupados en diferentes clases: ácidos, básicos, directos, dispersos, metálicos, mordientes, pigmentos, reactivos, solventes, sulfuros y colorantes vat, que reflejan su comportamiento macroscópico y sus funcionalidades principales. Cada colorante se utiliza de acuerdo con la compatibilidad que tenga con el material a colorear y

el uso que tendrá el mismo ²⁵. Los colorantes ácidos, directos y reactivos son solubles en agua y aniónicos. Los colorantes básicos son catiónicos y los colorantes dispersos, los pigmentos y los solventes son no iónicos ^{2, 25}. Los colorantes dispersos son muy poco solubles en agua. Generalmente son estructuralmente antraquinolinas y sulfuros, con muchos -C=O, -NH- y grupos aromáticos ²⁸. Muchos de los colorantes mordientes son aniónicos, pero también existen catiónicos. En solución acuosa los colorantes aniónicos llevan una carga neta debido a la presencia de grupos sulfonato ($\phi\text{-SO}^3^-$), mientras que los colorantes catiónicos llevan una carga neta positiva debido a las aminas protonadas ^{2, 25}.

Se utilizan aproximadamente 40.000 colorantes sintéticos diferentes en la industria y aproximadamente 450.000 toneladas de sustancias para tinción se producen anualmente en el mundo ²⁹. El mayor consumidor de estos colorantes es la industria textil, con aproximadamente 2/3 del total. El resto está dividido entre las industrias de teñido de cuero, producción de papel, alimentos, fotografía a color, medicina y farmacia, cosmética, tinturas de cabello, teñido de maderas, agricultura, investigación química y biológica, arreglos de acumulación de luz y celdas fotoeléctricas ^{13, 30}.

Los colorantes reactivos difieren de las otras clases de colorantes debido a que sus moléculas contienen uno o más grupos reactivos capaces de formar un enlace covalente con las fibras compatibles ².

Por lo general los azo colorantes reactivos poseen baja toxicidad en mamíferos y animales acuáticos *per se*, pero los productos que se forman por biodegradación (principalmente aminas aromáticas por la reducción anaeróbica del enlace azo) pueden ser altamente tóxicos ^{3, 31, 32}. Algunas de las aminas aromáticas están relacionadas con el cáncer de vejiga, sarcomas esplénicos, hepatocarcinomas y han producido anomalías nucleares en animales de experimentación y aberraciones cromosómicas en cultivos de células animales. Se ha

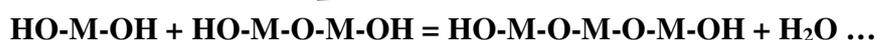
reportado también alta incidencia de cáncer de vejiga en trabajadores expuestos a grandes cantidades de azo colorantes ⁵.

En definitiva, el impacto de los residuos generados por la actividad del ser humano sobre el ecosistema ha sido motivo en los últimos años de innumerables esfuerzos en busca de soluciones. En este sentido, una de las áreas que más crecimiento experimentó es el desarrollo de nuevos biosorbentes para ser utilizados como sorbentes en remediación ambiental para la remoción de metales y/o contaminantes orgánicos, tanto en aguas naturales como en efluentes industriales. Consecuentemente se han desarrollado y evaluado numerosos materiales de origen orgánico y/o inorgánico, con diferentes formas, tamaños y propiedades. En particular el proceso sol-gel permite desarrollar materiales inorgánicos o híbridos orgánicos e inorgánicos especialmente diseñados para la aplicación deseada. Por otro lado, el uso de materiales orgánicos debe fundamentarse en aquellos de bajo costo y fácilmente accesibles. Es por ello que en el presente trabajo de tesis desarrollamos ambas estrategias para el desarrollo de nuevos materiales sustentables y su aplicación a procesos de remediación.

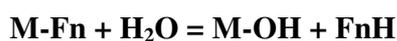
El proceso sol-gel

El proceso sol-gel es un procedimiento versátil que ocurre en solución, a presión y temperatura ambiente y que permite la obtención de materiales cerámicos y vítreos. Este proceso implica la formación de coloides en el líquido (sol) y la posterior gelificación del sol para dar un esqueleto sólido continuo que contiene una fase líquida también continua que conforma el denominado gel. Los materiales de partida utilizados en la preparación del sol incluyen un elemento metálico o metaloide (M) que sea capaz de formar estructuras poliméricas en solución a través de la formación de uniones covalentes ^{33,34}. A pesar de que

se conocen procesos no hidrolíticos en medios no acuosos, la mayoría de las reacciones sol-gel ocurren en presencia de agua y llevan a la formación de enlaces M-O-M. Básicamente, el precursor de la reacción debería tener dos o más grupos hidroxilo (OH) o cualquier función (Fn) que pueda ser sustituida por grupos hidroxilo en contacto con el agua. En el primer caso, la formación de los enlaces metal-oxígeno-metal ocurren espontáneamente a través de una reacción de condensación que puede, en principio, extenderse siempre y cuando haya grupos M-OH disponibles



En el segundo caso, cuando el precursor de la reacción posee una función capaz de ser hidrolizada, es necesario un paso preliminar de hidrólisis:



En la mayoría de los casos, Fn es un grupo alcóxido (OR), siendo R un resto orgánico. La reacción produce el alcohol ROH. El progreso del proceso de condensación es muy dependiente de la reactividad del enlace M-O y, por lo tanto, del pH. La condición ácida favorece la hidrólisis y el crecimiento de las cadenas cortas lineales, mientras que cuando el pH es básico lleva a la condensación rápida de polímeros tridimensionales extendidos (sol de partículas). La gelación ocurre cuando los polímeros que van creciendo se conectan para formar una red percolada continua (ver **figura 2**). El pH acá también juega un rol

importante ³⁵. En condiciones básicas la percolación se origina principalmente por el llenado espacial de partículas grandes y la red resultante posee una estructura abierta. Por el contrario, en condiciones ácidas la percolación ocurre a través del agregado de cadenas cortas, teniendo como consecuencia una red densa. Es importante resaltar que las condiciones ácidas o básicas se refieren al pKa del enlace M-OH, por lo que siendo el pKa (SiOH/SiO⁻)~6, al pH neutro se lo considera un medio básico.

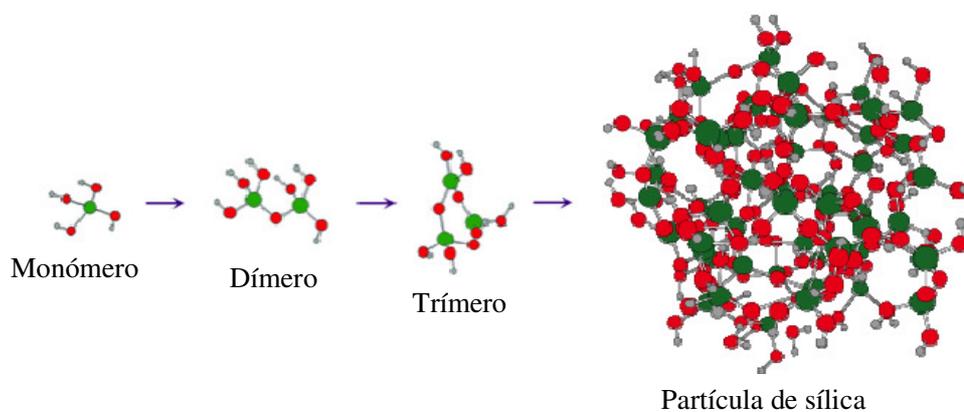


Figura 2: Esquema de crecimiento de una partícula de sílica.

El precursor más común utilizado en sistemas acuosos es el silicato de sodio (ver **figura 3**), que en medio ácido forma ácido silícico. En estos sistemas y a pH menor a 7,00, la forma predominante del silicio es el monómero hidrolizado Si(OH)₄. Cuando el pH se encuentra entre 7,00 y 12,00 predomina la especie aniónica SiO(OH)₃¹⁻ que es un ácido débil. A partir de pH 12,00 comienza a observarse la forma [SiO₂(OH)₂]²⁻. Estas especies condensan para formar el máximo número de enlaces Si-O-Si y minimizar el número de OH⁻ terminales.

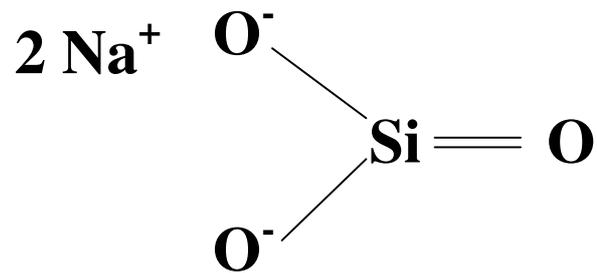


Figura 3. Estructura química del precursor acuoso: silicato de sodio

Los monómeros forman progresivamente dímeros, oligómeros cíclicos y finalmente coloides. La morfología de las partículas finales depende del pH y de los electrolitos presentes. En medio básico las partículas crecen en tamaño y disminuyen en número, mientras que en medio ácido o en medio básico pero en presencia de sales flocculantes las partículas se unen en un agregado tridimensional para formar un gel. La gelificación a pH menor a 2,00 (punto isoelectrico) es sumamente lenta. Estos geles se forman por agregación de partículas muy pequeñas (< 2nm). A pH mayor a 10,00 el SiO₂ es soluble y sólo existen especies monoméricas. Los soles son inestables y su gelificación ocurre entre pH 2,00 y 10,00 (ver **figura 4**).

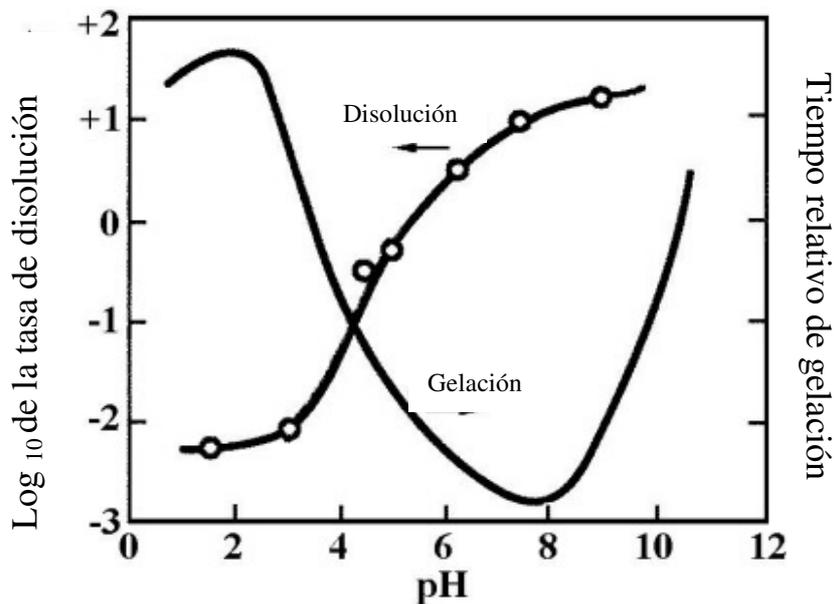


Figura 4: Tiempo de gelificación de soles de silicio a diferentes pH

Polimerización entre pH 2,00 y 7,00

En el rango 2,00 a 7,00 la velocidad de condensación es proporcional a la concentración de OH^- . Los grupos silanol (Si-OH) más ácidos son más fáciles de desprotonar y están contenidos en las especies condensadas. Esto implica que la condensación ocurre preferencialmente entre las especies más condensadas y las especies neutras (menos condensadas). La velocidad de formación de los dímeros es lenta, pero una vez que éstos se han formado, reaccionan con monómeros formando trímeros, que siguen reaccionando con monómeros formando tetrameros y otros oligómeros. Finalmente adoptan una conformación cíclica. Una vez llegado a este punto, el sistema puede evolucionar por agregación o por crecimiento (ver **figura 5**). Cerca del punto isoeléctrico ambos procesos ocurren simultáneamente.

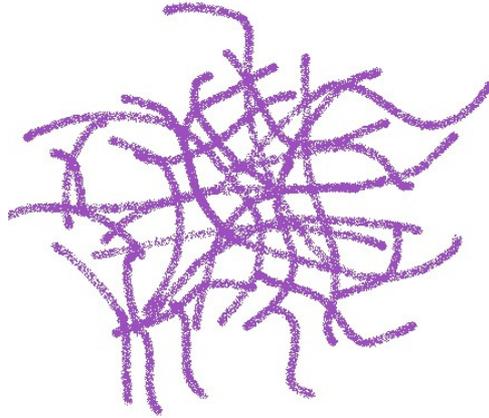


Figura 5: Estructura de una partícula de silicio obtenida por polimerización a pH ácido

Polimerización a pH mayor a 7,00

En este caso, la polimerización ocurre por los mismos mecanismos indicados anteriormente, pero al predominar las especies condensadas que tienden a estar ionizadas, la adición de monómeros a las especies más condensadas es más probable que la agregación de partículas, por la tendencia a la repulsión electrostática de estas últimas. Debido a la solubilidad de la sílica a pHs mayores a 7,00, las partículas crecen en tamaño pero disminuyen en número (ver **figura 6**).

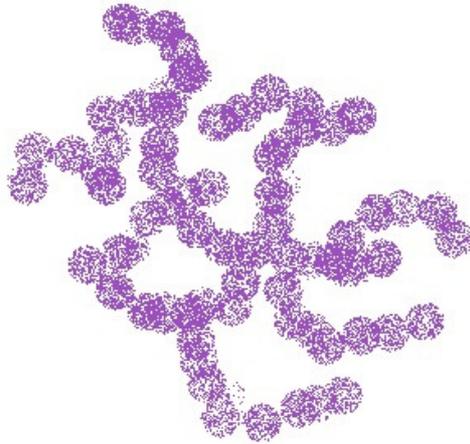


Figura 6: Estructura de una partícula de silicio obtenida por polimerización a pH básico

Geles y films

Como se mencionó anteriormente, el progreso de la reacción de sol-gel finalmente lleva a la formación de una red inorgánica porosa tridimensional que posee agua atrapada en su interior. Ese tipo de hidrogeles es particularmente compatible con entidades biológicas (moléculas, células) ya que asegura una buena hidratación y difusión para gases, nutrientes y metabolitos. Desde un punto de vista práctico, el proceso sol-gel nos permite obtener materiales a gran escala como también films (de 10 a 1000 nm) y partículas de tamaño micrométrico y/o nanométrico. Algunas de las diversas estructuras que pueden obtenerse por el proceso sol-gel pueden observarse en la **figura 7**.

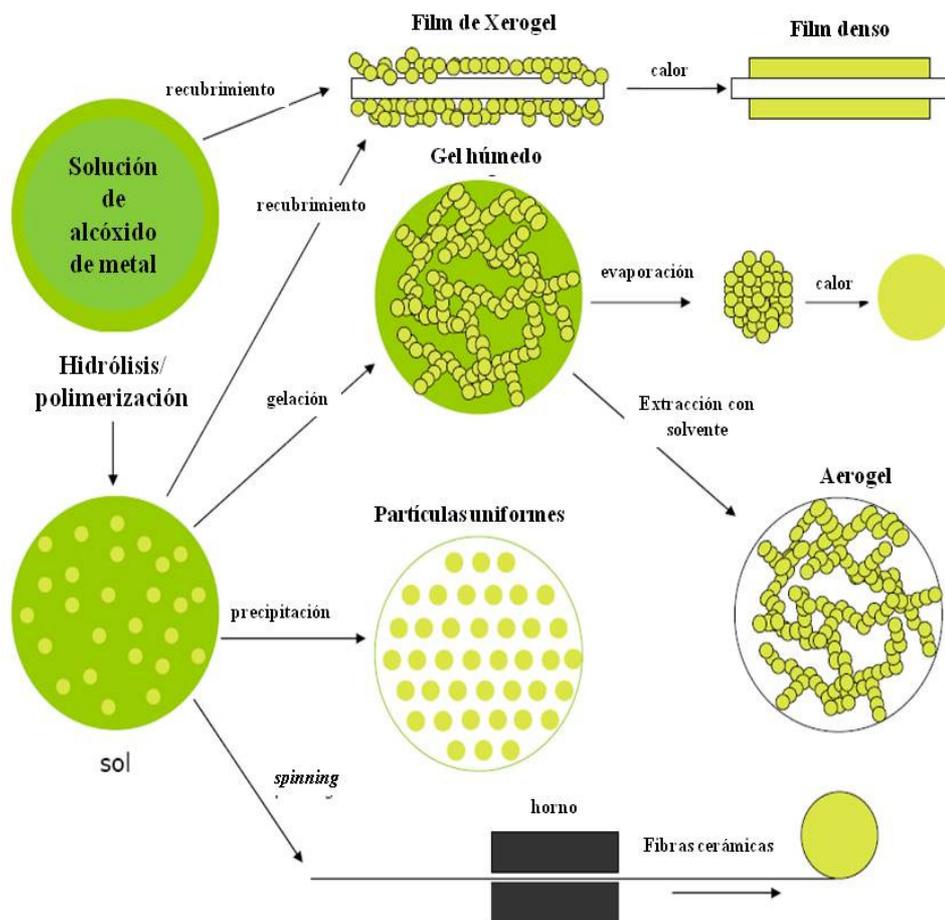


Figura 7: Diferentes estructuras obtenidas por sol-gel.

En principio, todas las técnicas que nos permiten obtener films basados en hidrogeles de polímeros como ser *drop casting*, moldeado, *spin/dip coating* pueden ser adaptados a las condiciones sol-gel. Cuando consideramos la preparación de films de sílica muy finos para inmovilizar enzimas y anticuerpos, deben seleccionarse cuidadosamente las estrategias para evitar el secado rápido y la ruptura del mismo, problemas importantísimos en films inorgánicos³⁶. La formación de estos films puede obtenerse por las rutas acuosa o mediante la utilización de alcóxidos^{37,38}.

Síntesis de nanopartículas

El caso de las partículas de óxido de silicio es diferente ya que su formación es muy dependiente de las condiciones del medio de reacción, que influyen de manera significativa las reacciones sol-gel. Las rutas de síntesis desarrolladas mediante el uso de emulsiones pueden ser utilizadas para preparar perlas, cápsulas y coloides de diferente tamaño y son compatibles con la encapsulación de biomoléculas ³⁹.

A la hora de considerar la síntesis de nanopartículas, existen diferentes formas de controlar la reacción sol-gel. En el caso de la sílica, el método más popular es aquel desarrollado por Stöber, que aprovecha la dependencia del pH en las reacciones de hidrólisis y condensación⁴⁰. La formación de nanopartículas de sílica se realiza partiendo de un alcóxido de silicio en un medio de alcohol/agua y amoníaco. El tamaño final de la partícula puede controlarse ajustando la cantidad relativa de cada componente en la solución. Este método puede aplicarse a la encapsulación de moléculas siempre y cuando éstas no sean sensibles a las condiciones de pH alto y a la presencia de alcohol. De todas maneras, la cantidad resultante de analito en las partículas suele ser baja.

El primer trabajo sobre la síntesis de partículas de sílica esféricas y monodispersas fue el de Stöber *et al.* ⁴¹. En éste se describe la síntesis de partículas de sílica cuyo diámetro iba desde 5 a 2000 nm a partir de soluciones alcohólicas de alcóxidos de silicio en presencia de amoníaco como catalizador (condición básica). La principal ventaja de este método es la capacidad de obtener nanopartículas esféricas monodispersas, contrariamente a los métodos que utilizan catálisis ácida que generalmente resultan en geles.

Además del método de Stöber mencionado anteriormente, el uso de microemulsiones inversas es otra técnica muy utilizada. En ellas, las moléculas de surfactante se encuentran disueltas en solventes orgánicos formando micelas esféricas. En presencia de agua, las

cabezas polares de las moléculas de surfactante se organizan para formar microcavidades que contienen agua en su interior. Cuando se sintetizan nanopartículas de sílica, estas nanopartículas pueden crecer dentro de las microcavidades si se controla cuidadosamente la adición del alcóxido de silicio y del catalizador al medio que contiene las micelas inversas. La mayor desventaja de este método es el alto costo y la dificultad en la remoción del surfactante en el producto final. De todas maneras, el método fue aplicado con éxito para el recubrimiento de las nanopartículas con diferentes grupos funcionales para varias aplicaciones^{33, 42, 43}

Otra forma de producir nanopartículas de sílica es a través de la descomposición con llama a altas temperaturas de los precursores organometálicos. Este proceso también es conocido como condensación química de vapores (CVC, de chemical vapor condensation)⁴⁴. En un proceso típico de CVC, las nanopartículas de sílica se producen haciendo reaccionar una mezcla de tetracloruro de silicio (SiCl_4) con hidrógeno y oxígeno⁴⁵. La dificultad del método radica en controlar el tamaño de la partícula, la morfología y la composición de fase⁴⁶.

Inmovilización de moléculas por el método sol-gel

La inmovilización de moléculas orgánicas en una matriz no es exclusiva de la técnica sol-gel. La inmovilización es utilizada con muchos de fines en campos de aplicación muy diversos. La variedad de moléculas a inmovilizar es tan amplia como las matrices de inmovilización utilizadas, que en definitiva dependen de la aplicación final de las mismas. Se han encapsulado desde pequeñas moléculas orgánicas, polímeros, enzimas hasta células y tejidos.

Si consideramos a las matrices de sílica, por lo general las moléculas orgánicas a inmovilizar se confinan a la matriz mediante adsorción o utilizando los grupos silanoles superficiales como anclaje para uniones covalentes. Los métodos para funcionalizar matrices de sílica en la actualidad pueden resumirse de la siguiente manera (ver esquema en la **figura 8**):

- ▣ Inmovilización química
- ▣ Adsorción
- ▣ Inmovilización por inclusión
- ▣ Copolimerización

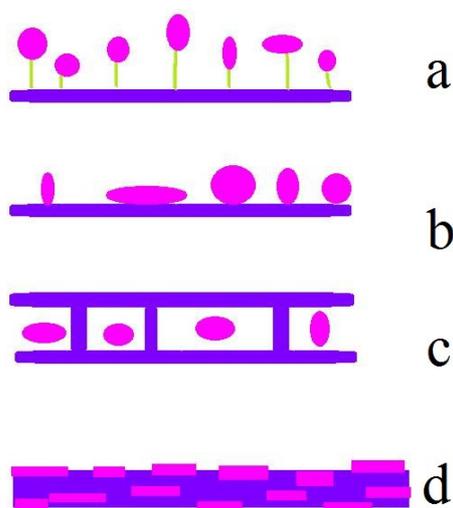


Figura 8: Esquema de los diferentes tipos de inmovilización. a) Inmovilización química, b) Adsorción, c) Inmovilización por inclusión, d) Copolimerización.

Por lo general, la modificación química de la superficie utilizando agentes modificantes y acoplantes de sílica puede realizarse vía acuosa o no acuosa, lo que también se conoce como postmodificación. La vía no acuosa se utiliza generalmente para modificar superficies

de silicio con 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTES). La razón principal para no utilizar la vía acuosa para realizar esto es para prevenir la hidrólisis, especialmente los silanos como el APTES que contienen un grupo amino, o sea, que se comportan como bases, pueden sufrir una hidrólisis incontrolable y pueden llegar a policondensar en un sistema acuoso. El uso de un solvente orgánico, por lo tanto, provee al sistema de un mejor control de los parámetros de reacción, por lo tanto es el sistema preferido para utilizar APTES. Para sistemas no acuosos, las moléculas de alcoxi o alquilalcoxi silanos se pegan a la superficie por medio de una reacción de condensación directa.

Por otra parte, la reacción en medio acuoso es favorable para la producción a gran escala. En este sistema, los silanoles se hidrolizan y condensan antes de su depósito en la superficie de sílica. Las moléculas de alcoxisilano se hidrolizan en contacto con el agua, y esto es seguido de reacciones de autocondensación entre los silanos hidrolizados. Las moléculas formadas se depositan sobre la superficie de sílica a través de la formación de enlaces siloxano entre los grupos silanoles y los silanos hidrolizados dando lugar a la liberación de moléculas de agua ⁴⁷. La inmovilización química través de uniones covalentes a matrices preformadas supone la unión química del reactivo orgánico a soportes de sílica. Esta técnica ha tomado gran importancia a partir de los años 80. Podemos citar a los organoclorosilanos como ejemplo de uso para unir grupos orgánicos apropiados a través de reacciones de condensación con los grupos silanoles de la superficie, como también al APTES, cuya reacción con los silanoles de la superficie de la matriz de sílica deja libre un grupo amino para la posterior unión del reactivo de interés. Este tipo de inmovilización es altamente específico y tanto las condiciones de reacción como los precursores deben ser optimizados en cada caso particular.

La adsorción se lleva a cabo exponiendo al material poroso a una solución concentrada de los reactivos, seguido de la evaporación del solvente. Esta técnica posee gran versatilidad y los solventes, equipamiento para la manufactura y protocolos de adsorción pueden ser utilizados para la inmovilización de varios reactivos en un amplio número de matrices orgánicas o inorgánicas. Posee la desventaja que la unión del reactivo al soporte resulta débil, por lo que las aplicaciones son limitadas. Estos métodos se encuentran limitados a su uso en desarrollo de materiales descartables o renovables y/o de vida operacional corta.

La inmovilización por inclusión supone la inclusión de los reactivos a los precursores sol-gel y su atrapamiento dentro de la matriz polimérica generada. Se lo llama comúnmente “sol-gel *doping*” y ganó popularidad debido a la gran diversidad de moléculas que pueden ser incorporadas y a su aplicación en catálisis química y biocatálisis. Este método es intermedio entre la impregnación y la unión química. Una de sus desventajas radica en la posible pérdida de las moléculas incluidas debido a procesos difusionales, y a la necesidad de que las moléculas o biomoléculas a incorporar sean compatibles con las condiciones de la mezcla de reacción.

La copolimerización (**figura 9a**) es una alternativa que consiste en la utilización de más de un tipo de monómeros, donde uno de ellos posee un grupo funcional reactivo unido de forma covalente, que le confiere propiedades fisicoquímicas y reactividades químicas particulares. La síntesis en un paso es la alternativa para reducir tiempo, energía o cualquier desventaja que acarree la postmodificación (**figura 9b**) como método de funcionalización de superficie. La copolimerización tiene como ventaja también la homogeneidad en la incorporación del grupo funcional de interés tanto en la superficie como en el interior del gel o partícula de sílica a modificar. A pesar de que se han reportado muchos métodos de

modificación por copolimerización para sílica porosa o mesoporosa funcionalizada, casi no se encuentra literatura que incluya nanopartículas funcionalizadas.⁴⁸⁻⁵¹

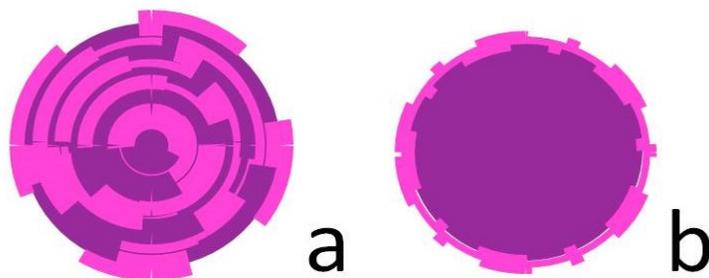


Fig. 9: Diferencia entre a) copolimerización y b) postmodificación.

Inmovilización de células por el método sol-gel

Cuando hablamos de inmovilización de células, además del uso de polímeros orgánicos como el alginato, podemos utilizar la tecnología sol-gel. La combinación de polímeros inorgánicos con componentes biológicos ofrece la ventaja de la alta estabilidad mecánica, química, térmica y fotoquímica de este tipo de matrices. Sumado a esto, una característica fundamental de esta tecnología, que la hace apta para ser utilizada en la inmovilización celular, es que puede realizarse a temperatura, pH y humedad compatibles con la biomolécula y/o célula a inmovilizar. En un principio los procesos sol-gel se realizaban a pHs extremos, altas temperaturas y altas concentraciones de alcohol. Sin embargo, para la inmovilización de células estas condiciones no eran adecuadas y fue necesario que las condiciones de reacción se adapten de manera tal de lograr la biocompatibilidad de las mismas. Esto se logró gracias a la obtención de nanosoles acuosos y pH neutro seguido de gelificaciones suaves y secados controlados.

Los soportes para la inmovilización celular deberían, idealmente, cumplir con los siguientes criterios:

- ▣ No reducir la actividad biocatalítica de la célula
- ▣ Retener la integridad física y ser insolubles en las condiciones de trabajo
- ▣ Ser inertes, permeables y tener altos coeficientes de difusión con los sustratos, nutrientes o metabolitos
- ▣ Tener gran superficie específica
- ▣ Proveer el balance hidrofóbico/hidrofílico óptimo para los sustratos, nutrientes o metabolitos
- ▣ Ser resistentes a la degradación microbiana
- ▣ Retener la estabilidad química y térmica durante los bioprocesos y las condiciones de guardado
- ▣ Ser lo suficientemente elásticos para acomodar células en crecimiento
- ▣ Tener grupos funcionales disponibles para realizar entrecruzamientos
- ▣ Ser reconocidos como generalmente seguros para las aplicaciones donde se los utilice
- ▣ Estar disponibles con calidad constante en cantidades adecuadas a bajo costo
- ▣ Ser fácilmente manipulables durante el proceso de inmovilización
- ▣ Ser ecológicamente seguros cuando se descartan y/o ser capaces de ser reciclados.

Las matrices sol-gel cumplen con la gran mayoría, si no todas, de estas características, lo que hace a estas matrices interesantes para ser utilizadas como soportes en procesos de inmovilización ^{52, 53}. Por otro lado, dichos procesos de inmovilización deben cumplir con otros requisitos:

- ▣ Tener efectos mínimos o nulos sobre las propiedades biocatalíticas de interés

- ▣ Ser seguros y simples de utilizar
- ▣ Requerir pocos pasos y pocos ingredientes
- ▣ No generar productos secundarios ni requerir de procesos especiales para su descarte
- ▣ Ser de fácil escalado, adaptable a la automatización y económico

El proceso de inmovilización utilizando la química sol-gel es rápido y sencillo, de fácil automatización, no genera productos secundarios y es muy económico, dado que los precursores utilizados son de muy bajo costo. De hecho, la sílica es un material inerte, que se encuentra en gran cantidad en la superficie terrestre. Las condiciones suaves asociadas con la química sol-gel permiten la inmovilización de células de mamífero ^{54, 55}, microorganismos vivos como bacterias ⁵⁶⁻⁵⁸, levaduras ⁵⁹ o parásitos ⁶⁰ y la matriz inorgánica protege a las especies incluidas (enzimas, bacterias, levaduras, etc) ⁶¹ (**figura 10**).

La posibilidad de controlar a los materiales sol-gel los ha hecho atractivos para otros ámbitos, por ejemplo, desarrollo de superficies antimicrobianas ⁶²⁻⁶⁵, materiales bioactivos para la reparación ósea ⁶⁶ y en la liberación controlada de drogas ^{67, 68}.

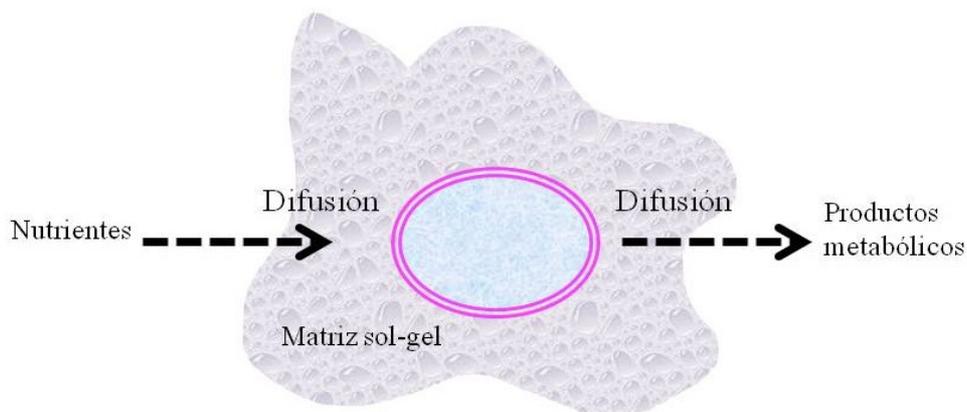


Figura 10: Esquema de una célula inmovilizada en una matriz porosa obtenida por el método sol-gel.

Nanocompuestos con relleno de sílica

Otra de las tantas aplicaciones promisorias de los materiales a base de sílica es la generación de materiales híbridos mediante la combinación con polímeros orgánicos. En particular las nanopartículas de sílica pueden ser utilizadas como relleno o refuerzo en materiales compuestos avanzados, donde se sabe que son capaces de lograr una dispersión homogénea, lo que determina las propiedades generales del nanocompuesto formado (**figura 11**). Las modificaciones químicas en la superficie del relleno (sílica) y el método efectivo de mezclado de los componentes del nanocompuesto son dos de las principales rutas que llevan a la distribución homogénea de estas nanopartículas. Cabe aclarar que el desempeño del nanocompuesto también depende del tipo del polímero a rellenar y del tipo de relleno a utilizar.

Las técnicas comúnmente utilizadas para producir nanocompuestos de sílica-polímero pueden ser clasificados en tres clases

- ▣ Mezclado en solución
- ▣ Polimerización *in situ*
- ▣ Procesos de mezclado y fusión ⁶⁹

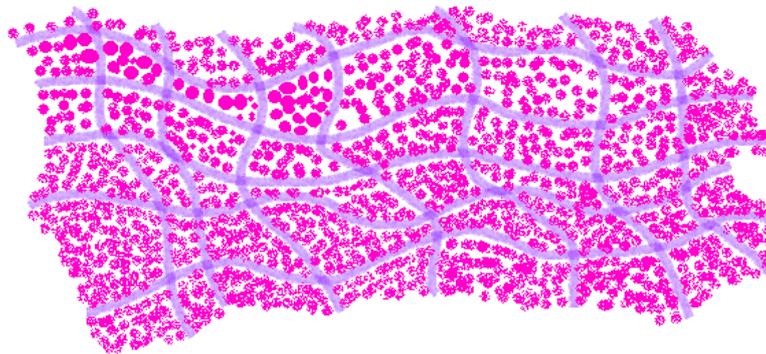


Figura 11: Esquema de un nanocompuesto donde la parte violeta indica al polímero y la rosa a las nanopartículas actuando como relleno

Debido a la gran superficie creada por las nanopartículas de sílica al ser usadas como *fillers*, es posible producir nanocompuestos de sílica-polímero con propiedades nuevas y mejoradas. Las ventajas del uso de nanopartículas incluyen refuerzo eficiente con excelente fuerza mecánica, estabilidad al calor, encogimiento reducido, expansión térmica y estrés residual reducido, mejorada resistencia a la abrasión, y propiedades ópticas y eléctricas mejoradas. Si el tamaño de la partícula es menor a los 100 nm, mejora la transparencia óptica, especialmente si se trata de nanopartículas de sílica. Es más, las nanopartículas ofrecen mejoras a menor carga debido a mejores relaciones superficie/volumen comparadas con partículas convencionales. En algunos casos, el refuerzo con nanopartículas de sílica en algunas matrices poliméricas lleva a mejoras significativas en sus propiedades mientras que otras propiedades se ven afectadas. Esto es una cuestión a tenerse en cuenta al evaluar la conveniencia del uso de los *fillers* para crear nanocompuestos ⁷⁰.

Dentro de los biopolímeros, el colágeno es uno de los más abundantes en mamíferos y está presente en todo el tejido conectivo; siendo una de las biomoléculas más estudiadas de la matriz extracelular. Esta proteína fibrosa es el componente mayoritario de la piel y el hueso, representando casi el 25% del peso seco de todos los mamíferos ⁷¹. Hasta la fecha se han distinguido 29 tipos diferentes de colágeno, y todos exhiben una estructura típica de triple hélice. Los colágenos tipo I, II, III, V y XI son conocidos por formar fibras de colágeno. Las moléculas de colágeno están formadas por tres cadenas α que se acoplan debido a su estructura molecular particular. Cada cadena α está compuesta por más de mil aminoácidos basados en la secuencia -Gly-X-Y-. La presencia de glicina es esencial cada tercer aminoácido para permitir un empaquetamiento ajustado de las tres cadenas α en la molécula de tropocolágeno. Las posiciones X e Y son generalmente ocupadas por prolina y 4-hidroxiprolina (ver **figura 12**) ^{72, 73}. La extracción de colágeno puede realizarse desde

varias fuentes considerando que es una de las proteínas más abundantes en la tierra. Puede ser extraído de casi cualquier animal. Sin embargo, las fuentes más comunes de obtención son la piel y tendones de los bovinos, piel porcina y cola de rata. De las formas de vida marina podemos extraer colágeno de esponjas, pescados y medusas ^{74, 75}

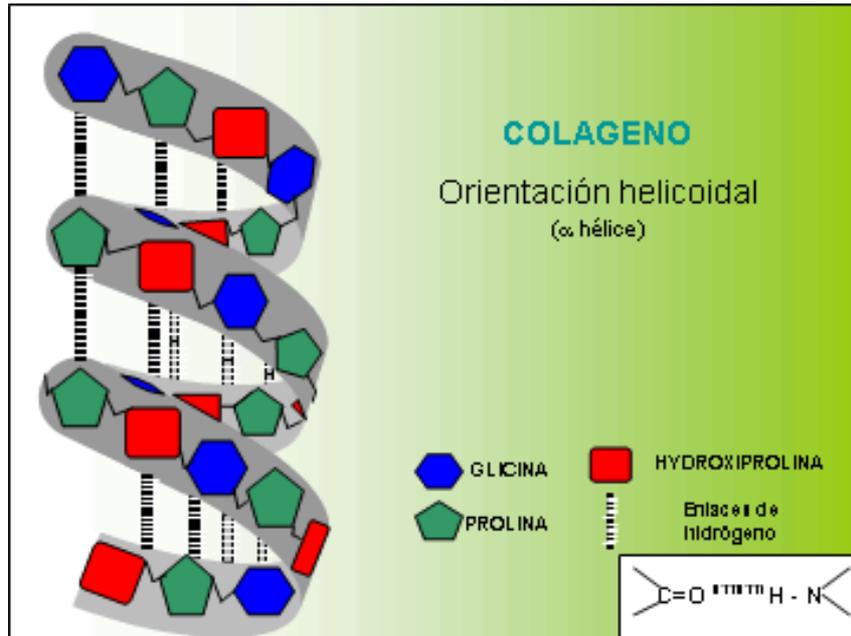


Figura 12: Esquema de la α hélice de la molécula de colágeno.

Los métodos de obtención de colágeno para producir geles son sencillos, basados principalmente en la solubilización del colágeno en medio ácido ⁷⁶, en sales neutras ^{77, 78}, o en soluciones proteolíticas ⁷⁹⁻⁸¹. La extracción proteolítica altera la estructura original del colágeno por el clivaje de los telopéptidos y resulta en una disminución proporcional en la formación de fibrillas de tropocolágeno ⁸². Para evitar este efecto se utilizan soluciones ácidas para inhibir a las proteasas endógenas durante la solubilización ⁸³. Un punto importante a tener en cuenta es que es posible preparar soluciones de colágeno y gatillar su

autoensamblaje (ver **figura 13**) para obtener fibras o fibrillas que interaccionan para formar matrices en tres dimensiones. El método para producir estos hidrogeles de colágeno involucra la neutralización de una solución ácida diluida de colágeno para formar el hidrogel deseado ⁸⁴.

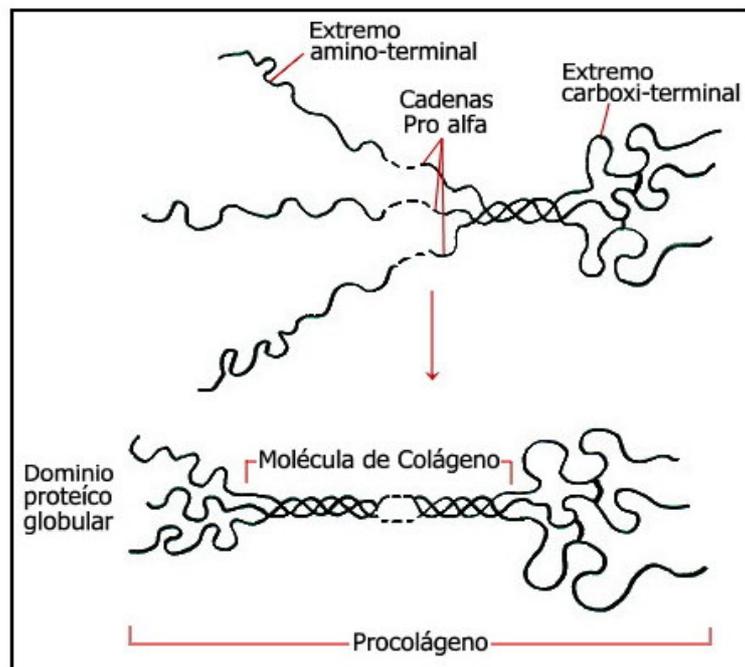


Figura 13: Autoensamblaje del colágeno.

Formas de reforzar polímeros orgánicos

El gel de colágeno es muy frágil. Para mejorar la resistencia mecánica de los geles en general puede recurrirse a varias técnicas. La más conocida es la técnica de entrecruzamiento. El principio de una reacción de entrecruzamiento radica en la modificación de grupos amino y/o carboxilo terminales para permitir la formación de una unión covalente. Existen métodos físicos, químicos y enzimáticos para lograr el

entrecruzamiento: los métodos físicos se basan en el uso de luz UV o fuentes de calor, los métodos enzimáticos utilizan enzimas como la transglutaminasa ⁸⁵⁻⁸⁷ y los métodos químicos utilizan moléculas como glutaraldehído o formaldehído para entrecruzar las moléculas del gel y lograr una estructura más resistente físicamente ^{88, 89}. El principal problema de utilizar la estrategia del entrecruzamiento para mejorar las propiedades mecánicas del gel es la pérdida de potenciales sitios de unión al adsorbente a estudiar.

Otra estrategia utilizada para mejorar el aspecto mecánico de los hidrogeles de colágeno es el uso de nanopartículas de sílica como relleno del gel, que es conocida por mejorar las características mecánicas de estos geles, dando lugar a un nanocompósito de sílica y colágeno. La matriz (colágeno) provee elasticidad y actúa como pegamento para el material inorgánico, lo que aumenta la fuerza del nanocompósito. Como resultado el área de interfase y la cohesión entre las fases aumenta, resultando esto en propiedades mecánicas mejoradas ⁸⁴.

Propósito e Hipótesis

Propósito e hipótesis

El objetivo de este trabajo de tesis es la generación de métodos alternativos sustentables de remediación. En particular se evaluará la síntesis de nanopartículas y materiales nanoestructurados mediante el uso de materiales biodegradables de bajo costo. En este sentido, los avances recientes en el área de la nanotecnología permiten vislumbrar que las propiedades de superficie que pueden obtenerse en materiales de escala nanométrica pueden ser aprovechados desde el punto de vista ambiental. Por lo tanto el propósito del presente trabajo de tesis incluye la evaluación de tres tipos diferentes de materiales: nanopartículas, geles inorgánicos con poros nanométricos y geles orgánicos formados por una red de fibras de diámetro nanométrico. En primer lugar se presentará el desarrollo de nanopartículas magnéticas de óxido de silicio para inmovilizar biomoléculas, en particular enzimas que puedan ser utilizadas como biocatalizadores en procesos de remediación. En segundo lugar el uso de matrices de sílica mesoporosa para la inmovilización de microorganismos con capacidad de metabolizar colorantes y por último el uso de hidrogeles de colágeno para remoción de azo-colorantes por mecanismos de adsorción.

Capítulo 1

*Preparación de partículas submicrométricas de sílica
monodispersas utilizando un método novedoso mediante
microemulsión agua en aceite: propiedades y aplicación en
inmovilización de enzimas.*

Introducción

La preparación de nanopartículas de sílica con morfología controlada como soporte de catalizadores, sorbentes y compartimientos para el almacenamiento y liberación de moléculas está recibiendo cada vez más atención ^{90, 91}. Las microemulsiones inversas se utilizaron extensivamente como moldes para la síntesis de nanopartículas ⁹²⁻⁹⁵. Estas emulsiones termodinámicamente estables actúan como reactores donde ocurren reacciones de polimerización y también como barreras estéricas que impiden la polimerización entre especies reactivas que se encuentran en diferentes gotas durante el tiempo de reacción ^{96, 97}. La preparación de sílica mesoporosa utilizando surfactantes no iónicos (conocida como “ruta neutral”) tiene ventajas importantes sobre las conocidas como “rutas electrostáticas” (donde el surfactante presenta carga neta), debido a la facilidad en la remoción del surfactante por extracción con solvente y la tendencia a producir nanopartículas con paredes más gruesas y tamaños de partícula más pequeños ⁹⁴.

Las nanopartículas supraparamagnéticas de óxido de hierro funcionalizadas (SPIONs del inglés SupraParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) también recibieron interés mundial. Las nanopartículas magnéticas recubiertas con sílica permiten tener muchos grupos reactivos en la superficie del recubrimiento (principalmente silanoles) para ser utilizados directamente en la modificación de la superficie de la nanopartícula ⁹⁸. Las nanopartículas con centro magnético de óxido de hierro y cubierta de silicio son materiales magnéticos que pueden ser aplicados exitosamente en protocolos de inmovilización enzimática, debido a la facilidad en su preparación y su amplia aplicabilidad ⁹⁹⁻¹⁰¹. Sumado a lo anterior, la inmovilización de enzimas sobre soportes magnéticos inertes tiene la potencial ventaja de ahorro en los costos gracias a que se facilita el reciclado de la enzima al poder ser utilizada

en múltiples ciclos de reacción, a la mejor estabilidad de la enzima una vez inmovilizada, a la resistencia a la pérdida de la misma y/o resistencia a la acción de compuestos que podrían llevar a la inactivación enzimática ¹⁰²⁻¹⁰⁵.

En este capítulo se reporta la síntesis de nanopartículas de sílica magnéticas monodispersas (MSNs) utilizando un sistema de microemulsión inversa agua en aceite que no requiere del uso de cosurfactantes. Proponemos el uso de una solución acuosa de silicato de sodio, Tween 20 como surfactante neutro y 1-butanol como fase orgánica. Hasta donde sabemos este sistema para obtener MSNs modificadas con enzimas es novedoso. Se muestra también la caracterización de las partículas magnéticas obtenidas y los resultados de la inmovilización de ureasa sobre las mismas, así como su reutilización y estabilidad intra e inter día. Este sistema demostró ventajas sobre otros previamente descritos, especialmente por los altos niveles de magnetización alcanzados, uniformidad de partículas y la biocompatibilidad en la inmovilización de enzimas.

Materiales y métodos

El 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) y la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) de frijol (54300 U g^{-1}) fueron adquiridos en Sigma. El kit de detección colorimétrico para urea fue adquirido en Weiner Lab. (Argentina). Todos los reactivos se utilizaron tal como fueron recibidos. Para todas las soluciones se utilizó agua deionizada.

Síntesis del ferrofluido

La síntesis del ferrofluido fue realizada utilizando un método clásico de coprecipitación ¹⁰⁶. Se mezclaron $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en proporciones equimolares en agua deionizada y

se goteó la solución obtenida sobre una solución NaOH 2M a temperatura ambiente (**figura 1**). Una vez obtenido el precipitado negro-amarronado del ferrofluido se lavó con agua deionizada hasta pH neutro. El fluido magnético se conservó hasta su uso en agua deionizada. El contenido de sólidos fue de $0,01 \text{ g mL}^{-1}$ ferrofluido.

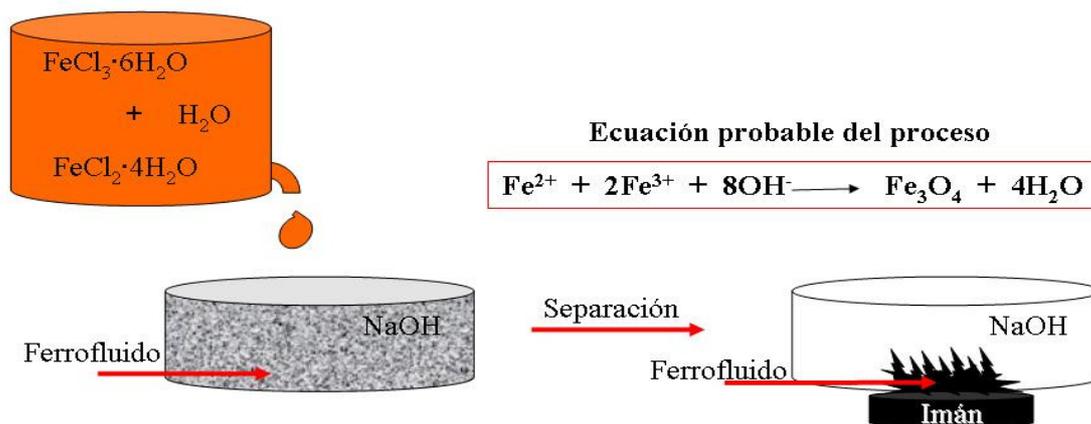


Figura 1: Representación esquemática de la formación del ferrofluido.

Síntesis de MSN

Se utilizó una microemulsión inversa compuesta por 1-butanol (71,6g) y Tween 20 (14,3g) como fase orgánica y 15 mL de solución de silicato de sodio ($2,2 \times 10^{-2} \text{ g mL}^{-1}$) mezclada con $0,01 \text{ g mL}^{-1}$ de ferrofluido como fase acuosa como se muestra en la **figura 2**. La fase acuosa fue agregada gota a gota a la fase orgánica con agitación vigorosa constante hasta la aparición de un precipitado grisáceo. Las MSNs se incubaron en la microemulsión toda la noche y luego fueron lavadas varias veces con acetona para remover los restos de 1-butanol y Tween 20. Finalmente las MSNs fueron secadas y guardadas secas a temperatura ambiente hasta ser utilizadas.

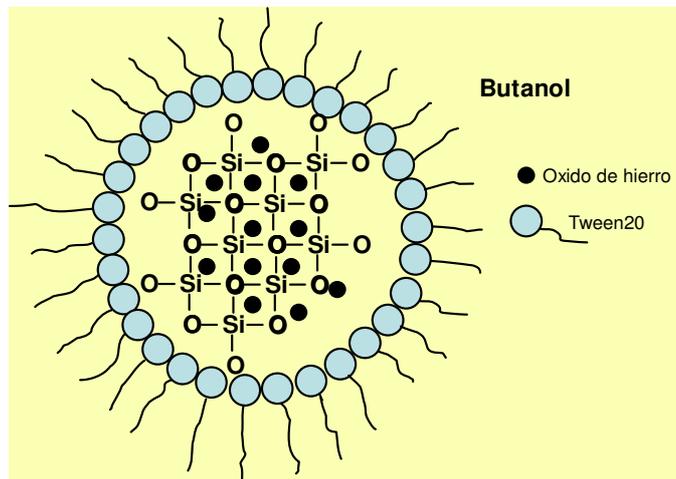
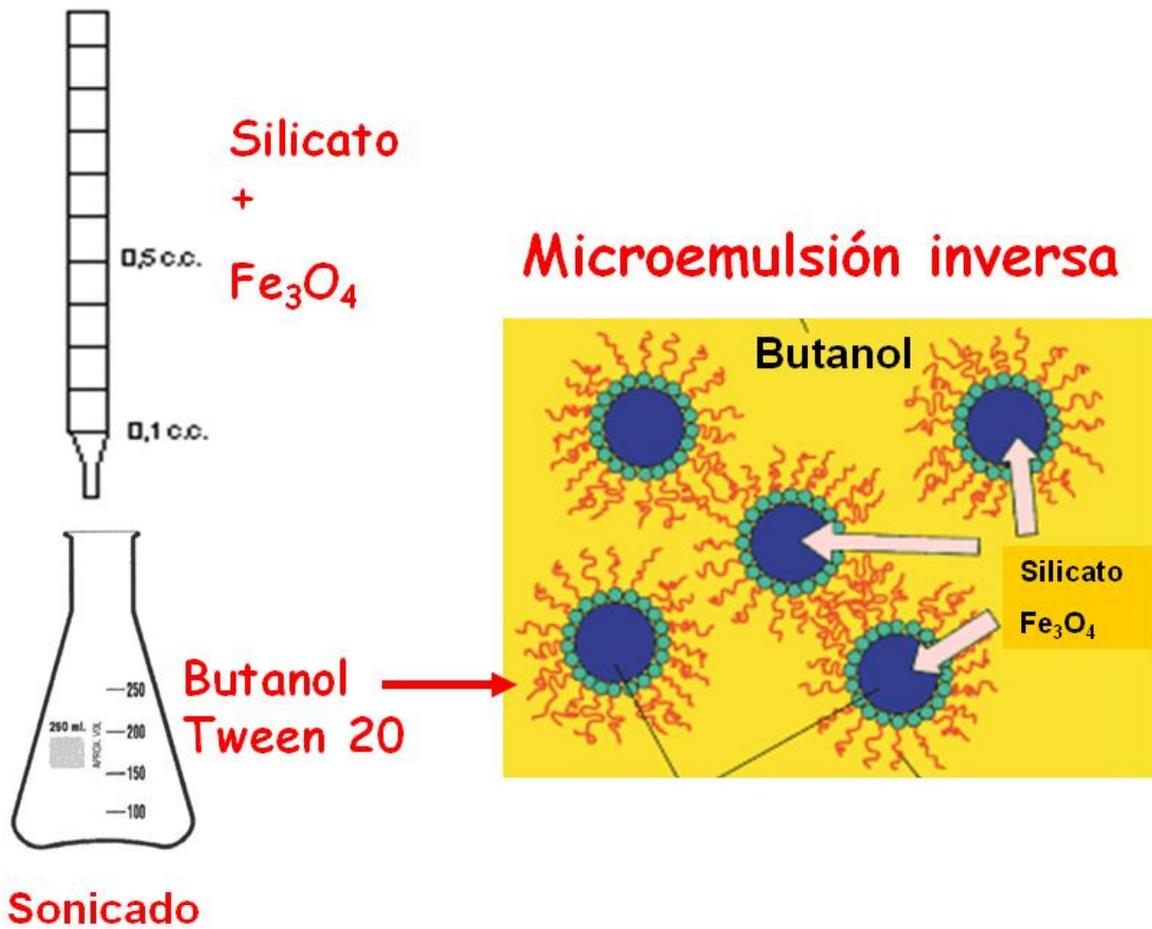


Figura 2: A) Esquema de la distribución de los componentes durante la síntesis de las MSNs. (superior)
B) Formación de nanopartículas de sílica magnéticas (inferior)

Derivatización de las MSNs

Como puede observarse en el esquema de la **figura 3**, la superficie de las MSNs fue activada por sonicado en una mezcla 0,1M de NaOH por 15 minutos. Luego de eso se lavaron dos veces con agua deionizada, una vez con una mezcla de acetona: agua 1:1 (v/v) y finalmente con acetona para evitar que el cambio brusco en la polaridad de los solventes provoque la aglomeración de las partículas. Una vez activadas las partículas, se incubaron con 5% P/V de APTES en acetona por 90 minutos a 37°C con agitación constante ^{107, 108}. Cumplido el tiempo de reacción, las MSNs se lavaron 2 veces con acetona, una vez con una mezcla acetona:agua 1:1 (v/v) y una vez con buffer fosfato 500 mM pH=7,40. Al término de los lavados, las partículas fueron tratadas con glutaraldehído en buffer fosfato 500 mM pH=7,40 por 60 minutos a 37°C con agitación constante. Para determinar si la concentración de glutaraldehído era determinante en la actividad de la enzima inmovilizada se evaluaron diferentes concentraciones del mismo (desde 0,025 hasta 0,25% P/V). Una vez terminado el tiempo de reacción, las MSNs se lavaron tres veces con buffer fosfato 500 mM pH=7,40 y se dejaron reaccionar con la enzima ureasa (0,5 mg mL⁻¹) toda la noche a 37°C con agitación constante.

Finalmente se lava 3 veces con buffer fosfato 500 mM pH=7,40 para eliminar el exceso de enzima no unida, los grupos aldehído que hubiesen quedado sin reaccionar se bloquearon con metanolamina 0,1% P/V en buffer fosfato 500 mM pH=7,40 a 37°C por 30 minutos. Por último las partículas fueron lavadas tres veces con buffer fosfato 500 mM pH=7,40, resuspendidas en el mismo buffer y guardadas a 4°C hasta su uso.

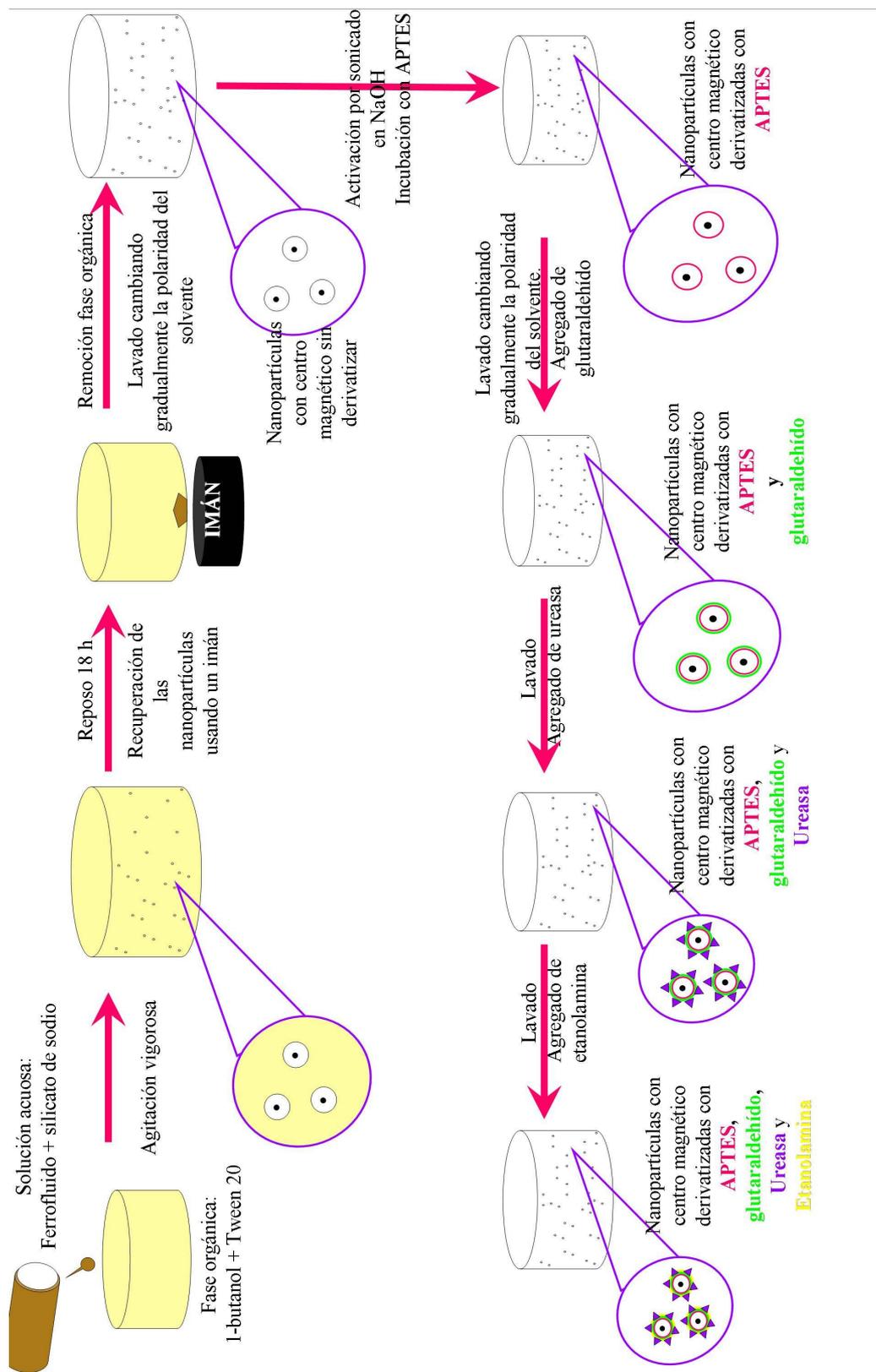


Figura 3: Esquema de la síntesis de nanopartículas magnéticas monodispersas derivatizadas

Caracterización de las nanopartículas

Las partículas magnéticas fueron caracterizadas mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). El espectro FTIR fue adquirido en el rango 4000-500 cm^{-1} utilizando un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (One IR, Perkin Elmer). El espectro infrarrojo se obtuvo utilizando una pastilla de KBr. El análisis magnético se llevó a cabo en un equipo VSM 7407 de Lake-Shore.

El tamaño promedio de las partículas se midió por dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés dynamic light scattering) (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) que posee un laser He-Ne (633nm) y un correlador ZEN3600, a 25 y 37°C. Las medidas se realizaron a un ángulo de dispersión de $\theta=173^\circ$ al haz incidente. El análisis elemental se realizó utilizando un analizador de Espectroscopía de Energía Dispersiva por Rayos X (EDX) INCA-X sight, Oxford Instrument, England. Las imágenes SEM fueron obtenidas en un microscopio DSM 982 Gemini, Carl Zeiss.

Actividad ureasa y parámetros cinéticos

La actividad ureasa fue evaluada utilizando el método del indofenol ¹⁰⁹ y midiendo la formación de azul de indofenol a 540 nm. La reacción entre urea y ureasa y la forma de detección se esquematizan en la **figura 4**:

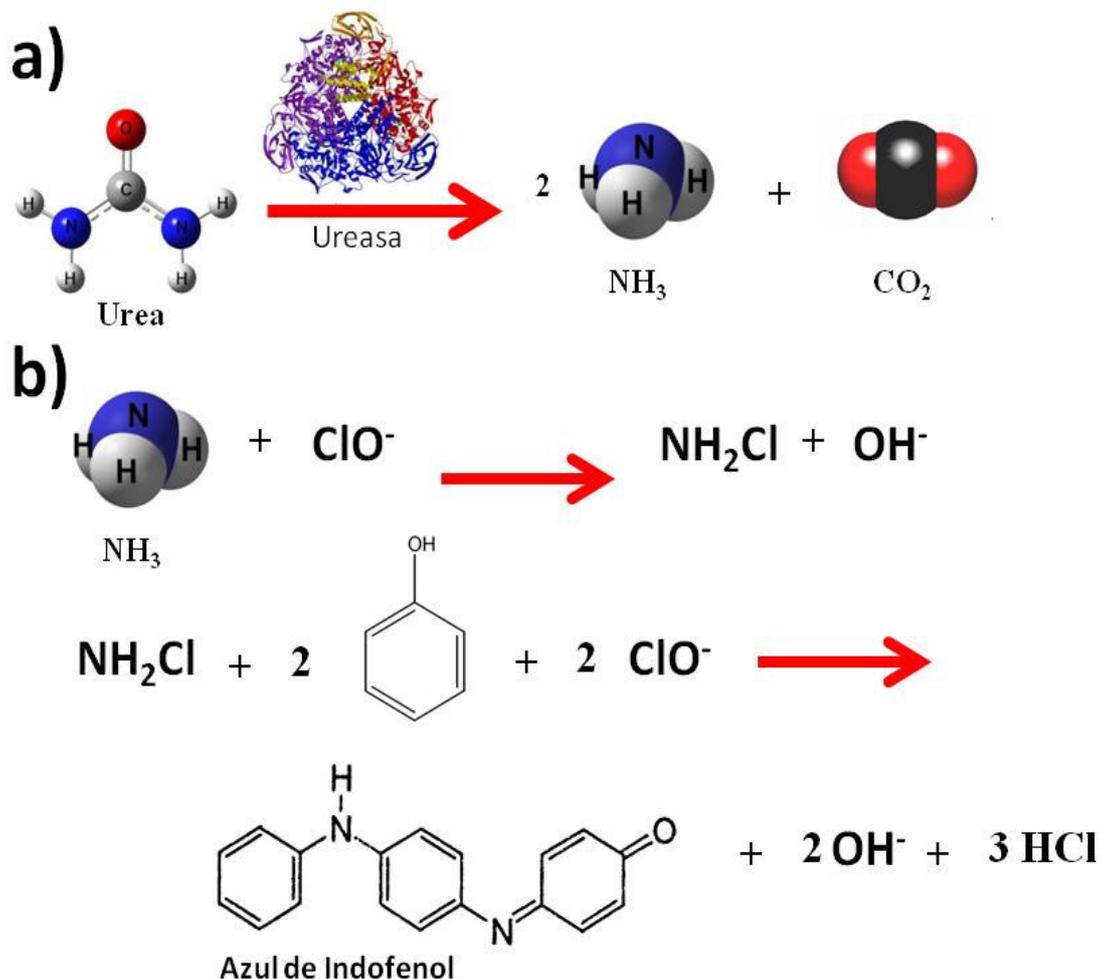


Figura 4: a) reacción de la enzima ureasa sobre la urea y b) su detección por el método del indofenol

Se incubaron ureasa libre y ureasa unida a MSNs (MSN-E) con una solución de urea en buffer fosfato 500 mM pH=7,40. Las actividades se midieron a 25°C. Otras alícuotas de la suspensión de MSN-E se incubaron con cantidades crecientes de urea por 15 minutos a 25°C. Para evaluar la K_m y V_{max} del sistema se utilizó la linealización de Lineweaver-Burk del gráfico de la ecuación de Michaelis-Menten¹¹⁰. Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado y se calcularon los promedios. Los datos expresados son

promedios \pm desvío estándar. Las diferencias se analizaron usando el test t para muestras no pareadas donde $p < 0,05$ se considera significativo.

Ensayos de estabilidad y recuperación

Las MSN-E se suspendieron e incubaron con soluciones de urea por 15 minutos a 25°C. Una vez completado el tiempo de incubación se utilizó un imán para separar a las MSN-E del sobrenadante que fue recolectado y utilizado para determinar el amonio generado por la reacción de la enzima ureasa sobre la urea mediante el método del indofenol. Las MSN-E se lavaron tres veces con buffer fosfato 500 mM pH=7,40 y se volvieron a utilizar. Este procedimiento se repitió tres veces al día durante cinco días consecutivos para evaluar la estabilidad del sistema. Las MSN-E se volvieron a testear en las mismas condiciones del ensayo previo luego de haber sido guardadas a 4°C por cuatro meses.

Resultados

Caracterización de las MSNs

Los resultados del análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas magnéticas pueden verse en la **figura 5**. En dicha figura se muestra que las partículas de sílica obtenidas son huecas, y el ferrofluido se encuentra en el interior de las mismas (core magnético).

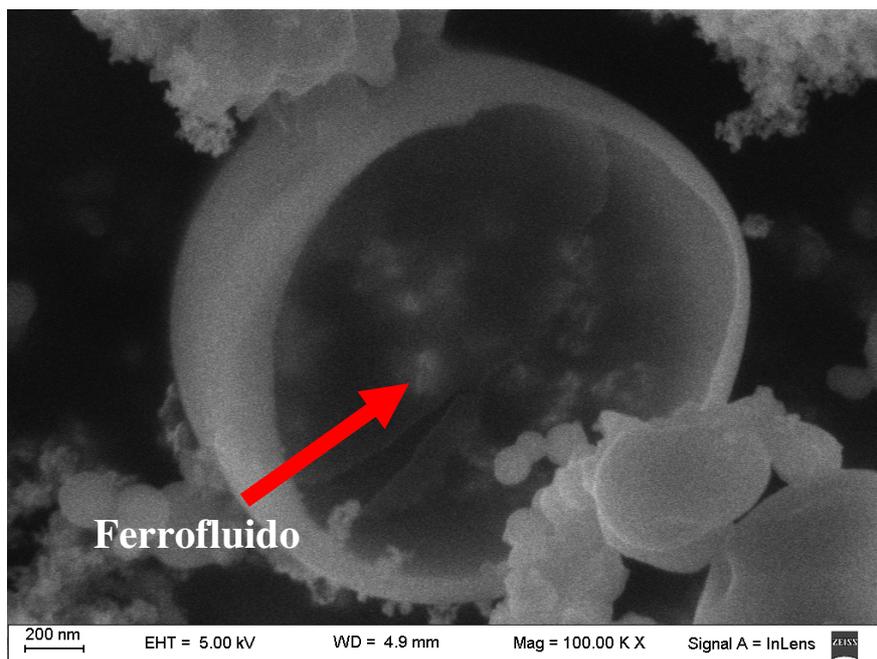


Figura 5: Imagen SEM de las partículas submicrométricas con core magnético.

Las propiedades magnéticas del ferrofluido obtenido y de las MSN-E se muestran en la **figura 6**. La ausencia de histéresis en ambos sistemas indica que tanto el ferrofluido como las nanopartículas poseen características supraparamagnéticas. Tanto la remanencia como la coercitividad son cero. El ferrofluido presentó el mayor valor de magnetización con un valor de saturación de 46 emu/g mientras que las MSN-E presentaron un valor de saturación de magnetización de 10 emu/g. Esta diferencia puede atribuirse a la presencia de la cubierta de sílica, glutaraldehído y enzima.

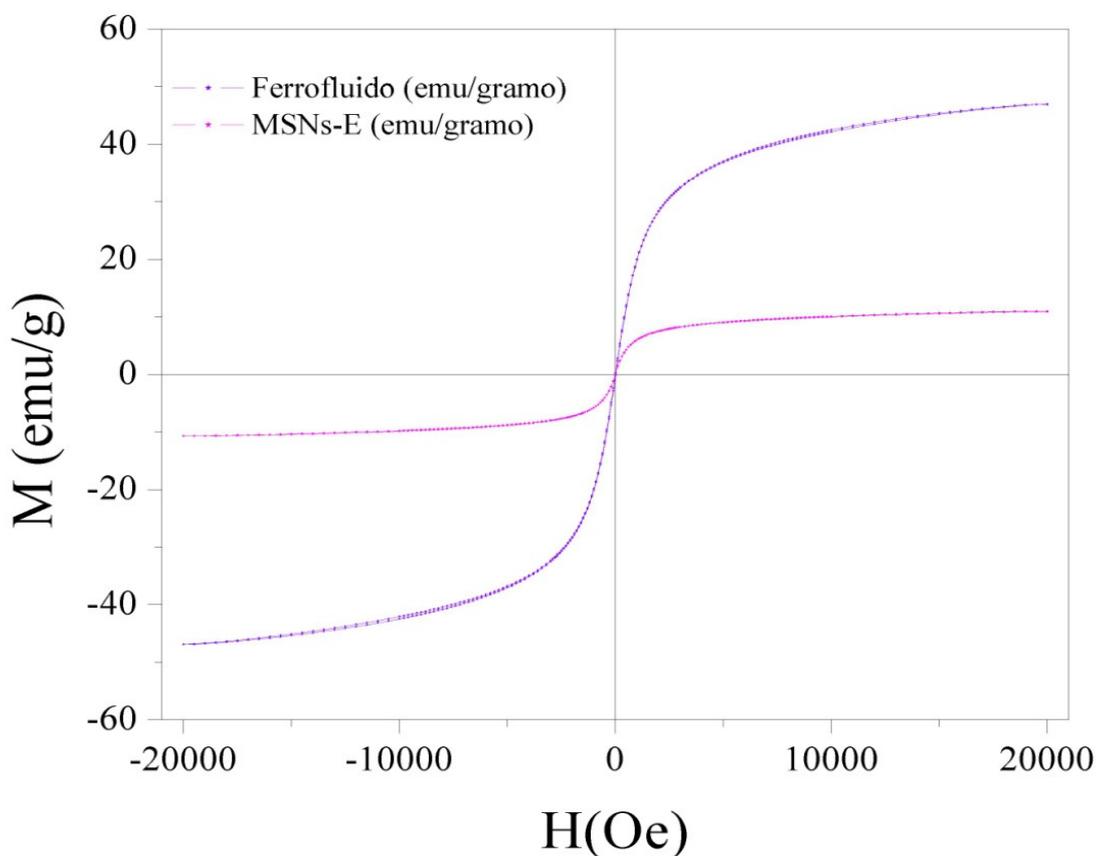


Figura 6: Propiedades magnéticas del ferrofluido (violeta) y las MSNs-E (fuxia).

La espectroscopía IR es una técnica muy útil para identificar las vibraciones de estiramiento de los enlaces Si-O, Si-O-Fe y Fe-O-Fe entre otros, por lo que se la utilizó para caracterizar al ferrofluido y a las MSNs. En el espectro del ferrofluido (**figura 7a**), la banda importante a 796cm^{-1} es debida a las vibraciones de flexión de Fe-O-H¹¹¹. La banda que aparece alrededor de 570cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento de enlaces Fe-O, que son típicos de la red cristalina de la magnetita¹¹².

El espectro de las MSNs (**figura 7b**) muestra las bandas anchas características del óxido de silicio en 750cm^{-1} , 880cm^{-1} y 1030cm^{-1} que corresponden al estiramiento simétrico del enlace Si-O-Si, al estiramiento del enlace Si-OH y al estiramiento asimétrico del enlace

Si-O-Si respectivamente, y se debe a la red polimérica del óxido de silicio. Las bandas que se observan alrededor de 3440 y 1600cm^{-1} , se asignan respectivamente a νOH y δOH . La señal que se observa a 1420 cm^{-1} se atribuye a la vibración del grupo $\text{C}=\text{O}$ del glutaraldehído y la señal observada a 1640 cm^{-1} se asigna al modo vibracional característico del enlace $\text{N}=\text{C}$ de una base de Schiff. Por último, la banda que se observa a 600 cm^{-1} sería evidencia de enlaces Fe-O-Fe .

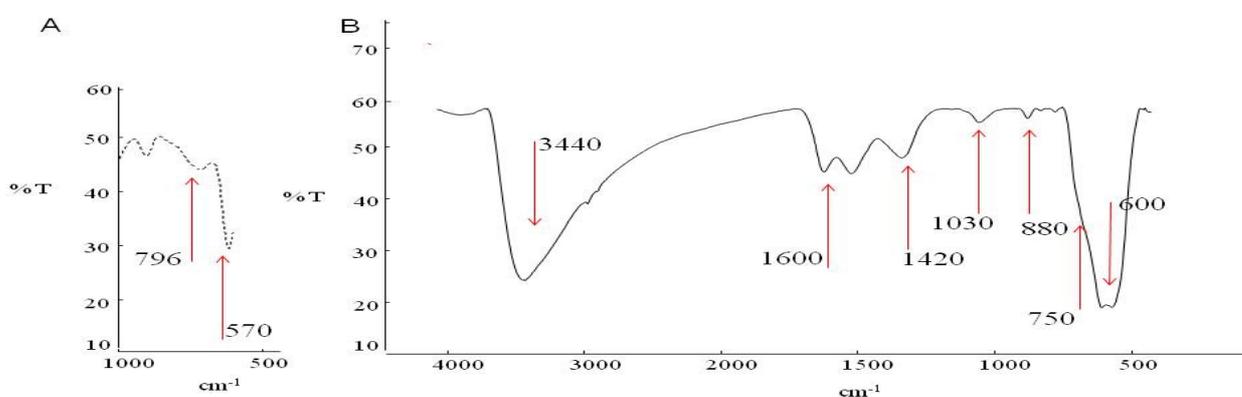


Figura 7: espectro FTIR de: a) ferrofluido y b) de las MSNs.

Efecto de la concentración de glutaraldehído en el desempeño de las MSNs

Una vez que las MSNs fueron derivatizadas con APTES fue posible lograr la unión de la enzima utilizando el residuo amino de ese precursor. Si bien existen muchos trabajos en donde la ureasa se inmoviliza a alquilaminas a través de sus grupos carboxilo (por ejemplo, los extremos C-terminales de los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico) mediante una reacción carbodiimida ^{113, 114}, se decidió utilizar glutaraldehído para mejorar la unión de la enzima a la superficie de las partículas magnéticas y evaluar así su efecto en la

actividad enzimática. Como puede observarse en la **figura 8**, cuando se utiliza la cantidad óptima de glutaraldehído la actividad enzimática aumenta al doble.

La cantidad óptima de glutaraldehído fue examinada por SEM y midiendo la actividad enzimática. La **figura 8** muestra la influencia de la concentración de glutaraldehído en dicha actividad enzimática de las MSNs-E. A medida que aumenta la concentración de glutaraldehído aumenta también la actividad enzimática debido a que más enzima puede unirse covalentemente a la superficie de las nanopartículas. Al aumentar la cantidad de glutaraldehído más allá del 0,1%, la actividad decrece drásticamente, probablemente porque ocurren entrecruzamientos entre las moléculas de glutaraldehído de la superficie, dejando menos grupos aldehído libres para que la enzima se una, disminuyendo en consecuencia la reactividad de la superficie de las MSNs y la cantidad de enzima unida.

Las imágenes de SEM de las nanopartículas derivatizadas con diferentes cantidades de glutaraldehído confirman estos resultados (**figura 9**), que se condicen con lo reportado previamente por Chen y Chiu y Liang *et al.*^{115, 116}. Estos resultados nos permiten concluir que la cantidad óptima de glutaraldehído para derivatizar a las MSNs en este trabajo es 0,1%. Cambios en la cantidad de APTES, monoetanolamina y cantidad inicial de enzima en $\pm 20\%$ no mostraron variación significativa en los resultados.

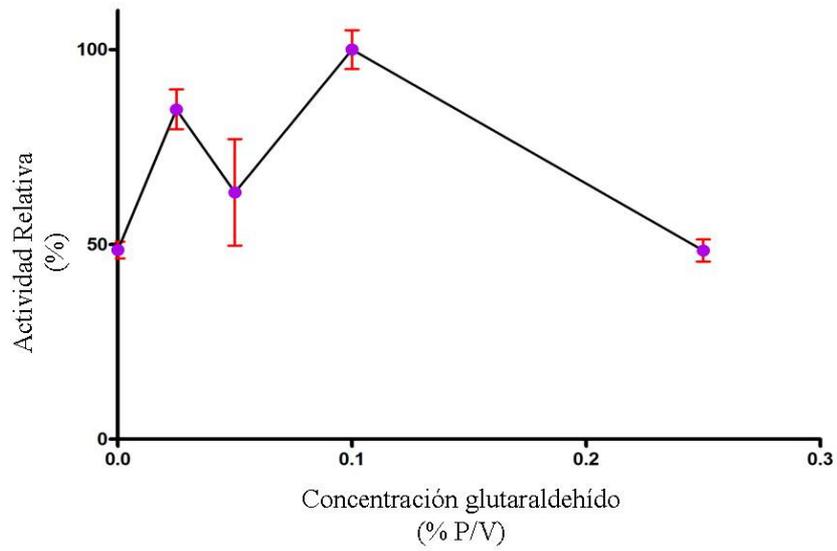


Figura 8: Influencia de la concentración de glutaraldehído en la actividad de la enzima ureasa. La mayor actividad de enzima inmovilizada corresponde al experimento realizado con 0,1% P/V glutaraldehído y fue asignado como 100% de actividad enzimática. Se representa el valor medio \pm SD de triplicados.

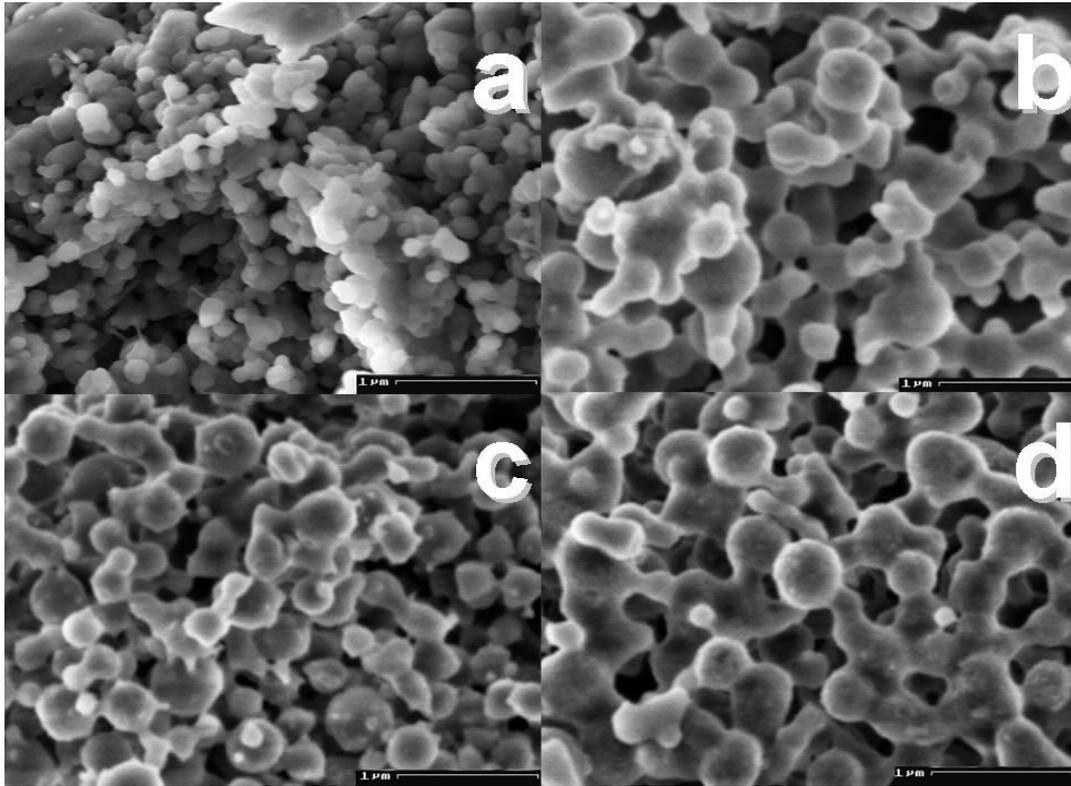


Figura 9: Imágenes de SEM de las MSNs derivatizadas con: a) 0%, b) 0,05%, c) 0,10% y d) 0,25% de glutaraldehído.

En cuanto a los resultados de EDX, el ferrofluido consiste principalmente de hierro (22%) y oxígeno (40%) (**figura 10a**). Las MSNs están compuestas principalmente de oxígeno (66%) y silicio (18%) y el hierro se detecta en muy bajo nivel, lo que se corresponde con la estructura centro magnético/cubierta de silicio (**figura 10b**). Finalmente, la cantidad de hierro y silicio detectados disminuye debido a la formación de una nueva capa compuesta principalmente de carbono (15%), oxígeno (60%) y silicio (10%), dado esto por la adición de APTES, glutaraldehído y la enzima (**figura 10c**).

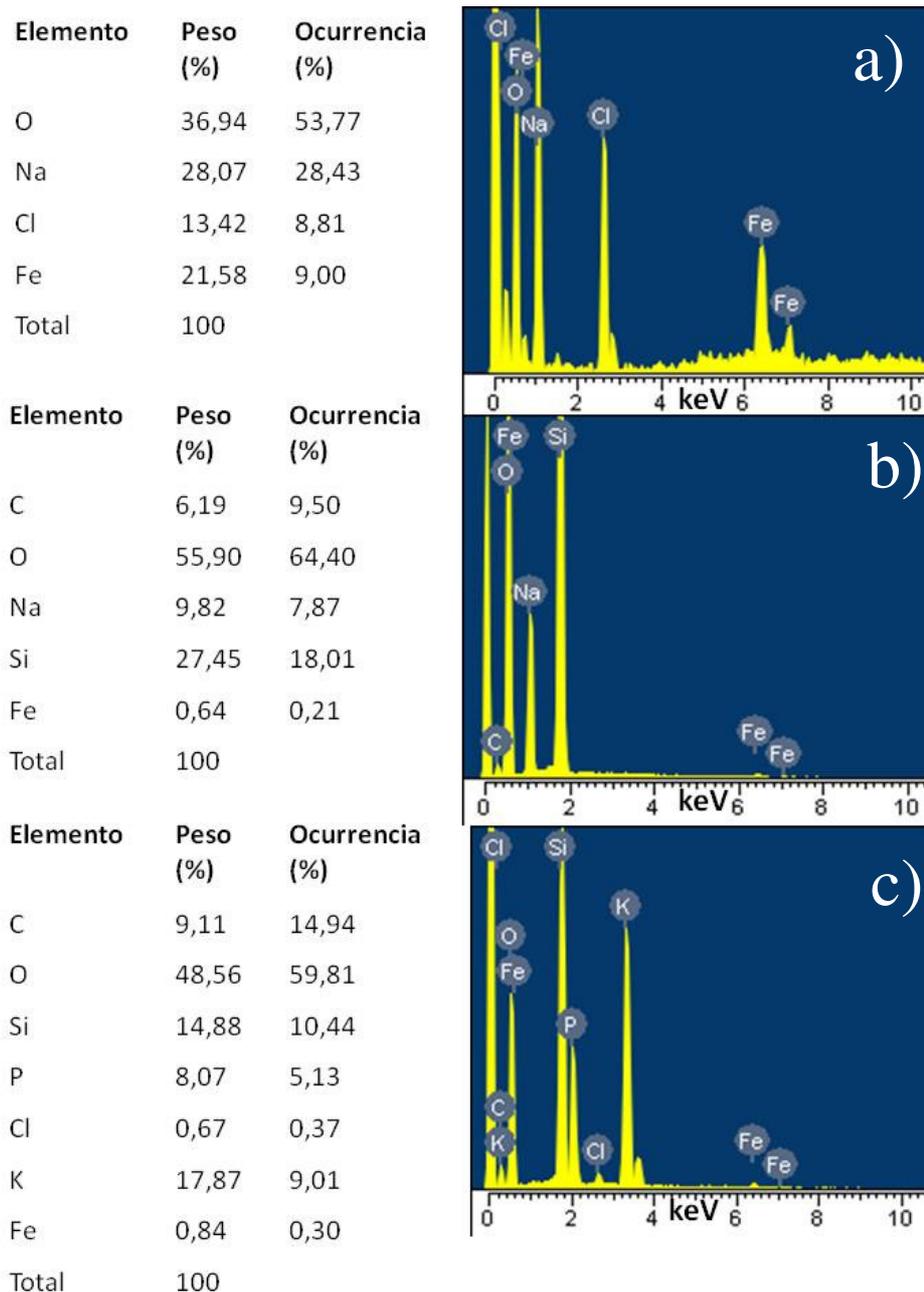


Figura 10: Análisis EDX de: a) ferrofluido; b) MSNs sin derivatizar y c) MSNs-E.

Los resultados de DLS mostraron que el diámetro medio de las nanopartículas derivatizadas es de 467 nm que, comparado con el tamaño de las nanopartículas desnudas (206 nm), sugiere que la capa que surge de la derivatización (APTES, glutaraldehído, ureasa y

monoetanolamina) tiene en promedio 130 nm de ancho. Vale la pena mencionar que la ureasa es un hexámero con un peso molecular de 545 kDa, lo que explicaría en parte la diferencia observada en el diámetro de las nanopartículas.

Repetitividad, estabilidad y actividad

La repetitividad de los ensayos intra (tres ciclos) e inter día (cinco ensayos con tres ciclos de repetición por día) se calculó sometiendo al mismo lote de MSNs-E a dichos ensayos. La **figura 11a** muestra que la pérdida de actividad en los ensayos intradía es menor al 5%. Por otro lado, los resultados entredías indican que se mantiene casi el 80% de la actividad enzimática (**figura 11b**). Finalmente, el ensayo de estabilidad a largo plazo indica que las MSN-E son estables por lo menos por 4 meses cuando son guardadas a 4°C (**figura 11c**), demostrado esto por la actividad remanente de más del 75% de la actividad inicial, lo que sugiere que las MSN-E son robustas y estables.

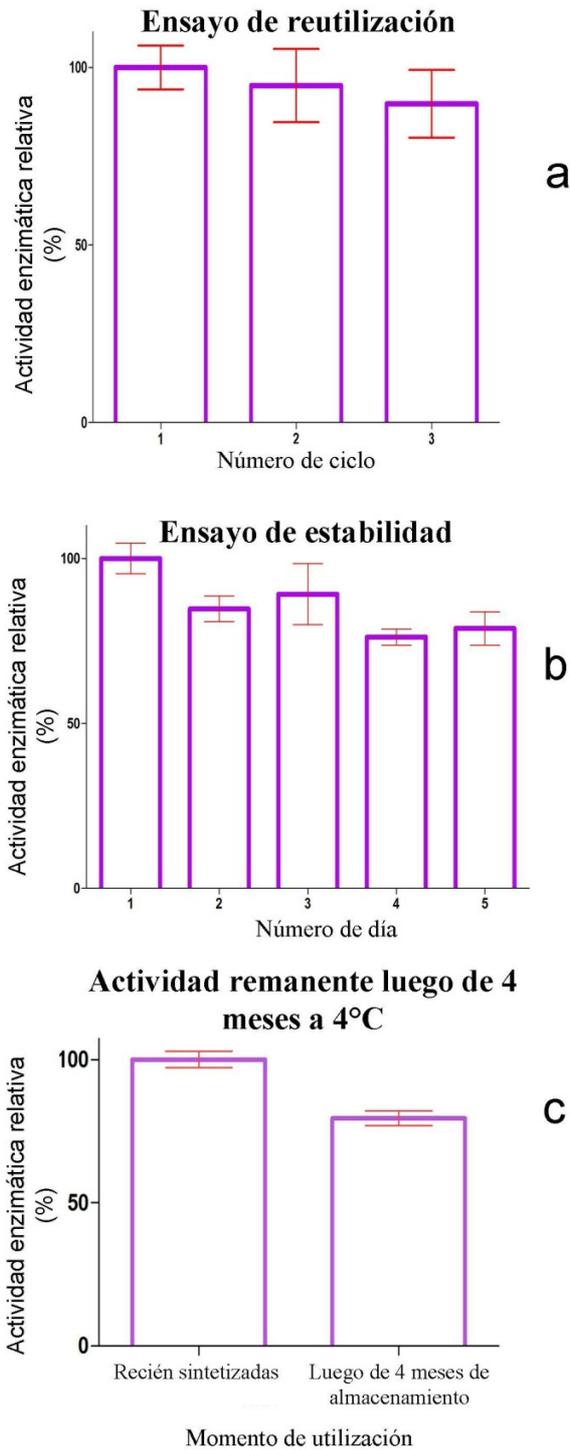


Figura 11: Medidas de actividad enzimática: a) repetitividad en el día (tres ciclos por día), b) repetitividad entre días (5 días con tres ciclos por día), c) estabilidad a largo plazo. Se representa el valor medio \pm SD de triplicados.

El análisis de los parámetros cinéticos indica que tanto la afinidad aparente (K_m) como la velocidad máxima (V_{max}) son mayores en la MSN-E que en la enzima libre (tabla 1).

Tabla 1: Parámetros cinéticos de la ureasa libre e inmovilizada

	Ureasa libre	Ureasa inmovilizada
V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	*0,093 \pm 0,009	0,314 \pm 0,011
K_m (μmol)	*0,255 \pm 0,020	1,765 \pm 0,045

* Diferencia estadísticamente significativa de la ureasa inmovilizada, $p < 0.001$

Discusión

Las propiedades magnéticas de las MSN descritas en este trabajo son mejores a las descritas anteriormente por Yang *et al.*; si bien las MSN preparadas con Tritón X-100 como surfactante, tetrametoxisilano como fuente de sílica, ciclohexano como la fase orgánica y n-hexanol como cosurfactante pueden ser obtenidas en un paso, su curva de magnetización reflejó que la saturación era sólo de 3 emu g^{-1} ¹¹⁷. Por otro lado, Zhang *et al.*,¹¹⁸ obtuvieron nanopartículas magnéticas cubiertas con sílica utilizando Igepal CO-520 como surfactante, tetraetoxisilano como fuente de sílica, hexano como fase oleosa y partículas magnéticas estabilizadas con ácido oleico como núcleo de sedimentación. Su conclusión fue que su trabajo no satisfizo requerimientos de bioaplicación porque el compuesto magnético de

sílica poseía sílica amorfa en exceso que afectaba las propiedades magnéticas del producto. El hecho de que las MSN-E sean supraparamagnéticas presenta la ventaja de que una vez que el magneto se retira, las partículas no quedan aglomeradas y son fácilmente dispersadas¹¹⁹.

La microemulsión agua/aceite empleada en este trabajo es termodinámicamente estable y pudo ser utilizada como reactor para mantener confinada a la reacción de polimerización dentro de cada una de las gotas de agua. Esos efectos nos permitieron obtener nanopartículas esféricas uniformes, similares a aquellas que se lograron con microemulsiones más complejas^{93, 96, 97}. Existen reportes de preparación de MSNs utilizando el método sol-gel en emulsiones inversas preparadas con Span 80 como surfactante y tetraetoxisilano como fuente de sílica⁹³.

El incremento de actividad obtenido para las enzimas inmovilizadas se corresponde con resultados previos^{120, 121} y puede ser explicado también por la presencia de sitios de unión inespecífico para el sustrato. En este contexto, la ureasa libre alcanza su velocidad máxima en presencia de cantidad de sustrato suficiente para la saturación a pesar de que esto causa un efecto inhibitorio en la actividad de la enzima. En el caso de las MSN-E, la velocidad es mayor debido a que el sustrato puede unirse a la enzima y también al soporte, que favorece la presencia de mayores cantidades de sustrato cerca de la enzima, promoviendo de esta manera su actividad catalítica. En este sentido la capacidad de adsorción de los materiales sol-gel es ampliamente conocida^{57, 122} especialmente para compuestos que forman uniones puentes de hidrógeno con la sílica, por ejemplo hidrazina, urea, formamida y acetamida. Este efecto disminuye la concentración de urea en la solución y, en consecuencia, disminuye también la posibilidad de inhibición ejercida por el sustrato. Finalmente, la enzima es estable en usos repetidos y períodos largos de almacenamiento.

Conclusiones

Las partículas submicrométricas de sílica monodispersas se prepararon utilizando una microemulsión de agua en aceite. Hasta donde sabemos, la composición de la microemulsión no ha sido utilizada previamente para obtener MSNs con enzimas covalentemente unidas. Hay varias ventajas del método propuesto incluyendo el mayor nivel de magnetización de las partículas obtenidas, la uniformidad de tamaño y que son fácilmente funcionalizables con ureasa unida covalentemente. Los resultados de estabilidad intra e inter día y de almacenamiento a largo plazo confirman que el proceso fue exitoso y que las MSN-E son estables en usos repetidos y en el almacenamiento. La velocidad máxima obtenida con el sistema MSN-E es mayor a aquella de la enzima libre. Estas propiedades son el efecto combinado de factores asociados a cambios estructurales de la enzima como resultado de la unión covalente y otros como resultado de la heterogeneidad del sistema. Son tanto la enzima como el soporte y la interacción entre ambos los que le dan al sistema las propiedades cinéticas y fisicoquímicas específicas responsables del rendimiento operacional. La separación sólido-líquido de las MSN-E puede ser fácilmente logrado con un imán, permitiendo la reutilización de la enzima inmovilizada.

Teniendo en cuenta lo visto anteriormente, el uso de nanopartículas de sílica permite la derivatización de las mismas para poder lograr la unión de moléculas biológicas para su uso como catalizadores biológicos. En este trabajo de tesis se logró unir a la enzima ureasa a nanopartículas de sílica huecas con centro magnético sintetizadas por esta técnica de microemulsión inversa. La idea del mismo fue lograr el conocimiento del material para luego probar su uso en decoloración de aguas contaminadas con azo colorantes. El problema surgió al considerar los costos de las enzimas involucradas en el proceso de

decoloración y las cadenas de reacción involucradas en dicho proceso de decoloración, lo que hacía que los costos fuesen prohibitivos. Para solucionar este problema, en el siguiente capítulo se recurrió al uso de microorganismos encapsulados en geles de sílica, que, como se sabe, poseen la porosidad necesaria para permitir el libre pasaje de iones, nutrientes y metabolitos desde el interior del gel hacia el exterior de la solución, a la vez que protegen a las bacterias de agentes externos agresivos y deletéreos para la sobrevivencia de dichos microorganismos.

Capítulo 2

*Remoción de azo colorantes del agua utilizando
Pseudomonas sp. inmovilizadas en perlas de silicio por la
técnica sol-gel.*

Introducción

El control de la contaminación del agua es una de las áreas de investigación científica de mayor relevancia en la actualidad. Los compuestos coloreados orgánicos en particular representan una pequeña fracción de los componentes orgánicos de las aguas de desecho, pero su color los hace estéticamente inaceptables. El color de los efluentes de desecho se debe en muchos casos a la presencia de compuestos fenólicos, que pueden ser taninos o ligninas (2-3%), tinturas orgánicas (3-4%) y especialmente colorantes e intermediarios de los mismos¹⁸. La remoción de colorantes es difícil debido a sus estructuras complejas, origen sintético y naturaleza recalcitrante, lo que hace que sea prácticamente obligatorio removerlos de los efluentes industriales antes de ser vertidos al sistema hídrico¹²³. Los colorantes incluyen diversas formas estructurales como ser ácidos, reactivos, básicos, dispersos, azo, diazo, basados en antraquinonas y colorantes complejados con metales¹²⁴. Esta es la razón por la cual la legislación de los distintos gobiernos impone medidas de regulación estrictas que obligan a las industrias a tratar a sus efluentes y llevarlos a niveles de calidad cada vez más altos.

A lo largo de las dos últimas décadas se reportaron varias técnicas de decoloración, pocas de las cuales fueron aceptadas por la industria. Esto lleva a la necesidad de encontrar tratamientos alternativos eficientes, efectivos y de bajo costo para remover colorantes de efluentes industriales¹⁷. Entre los diferentes métodos de tratamiento de efluentes, los biológicos presentan ventajas frente a ciertos métodos fisicoquímicos, entre otras razones porque más del 70% del material orgánico presente en los desechos podría ser convertido en biosólido³⁰. Teniendo en cuenta este último punto, se han reportado numerosas bacterias capaces de decolorar colorantes^{10, 13, 14, 125-130}.

El uso de microorganismos inmovilizados en bioreactores para tratamiento de efluentes es cada vez más común. Esto se debe a que ofrecen ventajas como alta densidad celular, alta estabilidad y tiempos de reacción extensos ¹³¹. Entre las diferentes técnicas de inmovilización, la química sol-gel es un campo interesante porque permite la obtención de materiales con las propiedades químicas y mecánicas especialmente diseñadas para la aplicación ¹³². Adicionalmente, fue identificado desde sus comienzos como un proceso *eco friendly* si lo comparamos con las rutas de síntesis tradicionales de vidrios y cerámicas, mejorando la sustentabilidad en el desarrollo de productos ¹³³. En los últimos 15 años se escribieron varios trabajos sobre el encapsulamiento de células vivas en matrices de sílica obtenidas por la técnica sol-gel ¹³⁴⁻¹³⁸. Desde el momento en el que Carturan *et al.* ¹³⁹ lograron por primera vez el encapsulamiento de microorganismos vivos en matrices sol-gel, se publicaron muchos otros trabajos extendiendo el proceso a otros tipos celulares ^{140, 141}. Se encapsularon exitosamente en matrices de sílica bacterias, levaduras, algas y células de mamífero ^{56, 122, 142-145}. Se demostró también que en la mayoría de los casos el empleo de moléculas biocompatibles como glicerol, polietilenglicol o glicina betaína mejora aún más la biocompatibilidad del proceso de inmovilización ¹⁴⁶⁻¹⁵⁰.

Hoy en día esta tecnología está reconocida como una alternativa válida para el desarrollo de matrices de inmovilización y su aplicación en diferentes procesos está creciendo rápidamente. En particular, la inmovilización de bacterias en matrices sol-gel para aplicaciones en procesos biotecnológico-ambientales constituye un área de investigación en creciente desarrollo ^{57, 151-157}, especialmente porque permite que los microorganismos sean utilizados en ambientes que normalmente son hostiles a los sistemas biológicos ^{53, 158}. En particular, en este capítulo se reporta la inmovilización de *Pseudomonas* sp. en matrices de sílica obtenidas por la técnica sol-gel y su aplicación para el tratamiento de agua. De hecho

las bacterias inmovilizadas fueron utilizadas con éxito para decolorar a los azo colorantes negro de Remazol (RB), naranja de metilo (MO) y naranja de bencilo (BO), que son utilizados habitualmente en procesos industriales. En este capítulo se reportará que *Pseudomonas* sp. inmovilizadas en matrices sol-gel poseen excelente capacidad de decoloración de azo colorantes.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y determinación de viabilidad

La cepa de *Pseudomonas* sp. fue gentilmente cedida por la cátedra de Higiene y Sanidad de la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (CCM 29) de la Universidad de Buenos Aires. Las bacterias de esta cepa expresan actividad azorreductasa y fueron capaces de decolorar varios azo colorantes.

Para el cultivo de bacterias, estas se dejaron crecer 24 h a 35 °C y se mantuvieron en medio Luria Bertani (LB) (extracto de levadura 5g l⁻¹, NaCl 10g l⁻¹, triptona 10g l⁻¹) hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,800. Posteriormente las bacterias se centrifugaron y se resuspendieron en medio LB fresco. Previo al encapsulamiento se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por la técnica de conteo en placa.

Inmovilización de bacterias en matrices sol-gel

Para los experimentos de inmovilización, una alícuota de 25 mL del cultivo celular en fase estacionaria fue centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos y el pellet se lavó con buffer fosfato 200 mM, pH=7,00. Luego de 2 lavados el pellet se resuspendió en el mismo buffer. La suspensión bacteriana resultante se utilizó para inmovilizar *Pseudomonas* sp. en

matrices de sílica obtenidas por la técnica sol-gel utilizando ácido cítrico en el proceso ¹⁵⁹. Para lograr el material deseado se colocó 1g de silicato de sodio en 6 mL de agua deionizada mediante calentamiento a 80°C para obtener el sol. El pH se ajustó a 6,50 utilizando 750 mM de ácido cítrico y añadiendo simultáneamente la suspensión celular. Se colocaron 0,2 mL/pocillo de la mezcla obtenida en una placa de 96 pocillos y se dejó gelificar a temperatura ambiente (aproximadamente 2 minutos). Una vez ocurrida la gelificación, los geles se colocaron toda la noche (ON) a 37°C para obtener perlas mecánicamente resistentes. Para determinar la viabilidad de las bacterias en las perlas, las perlas se trituraron, se realizaron diluciones seriadas al décimo en solución fisiológica estéril y se plaquearon por duplicado para conocer el número de UFC post encapsulación.

Caracterización de las matrices de sílica

La superficie específica, el volumen total de poro y el tamaño de poro de las matrices de sílica fueron analizados por isothermas de adsorción de nitrógeno a 77K usando un analizador automático de adsorción de gas (Gemini 2360 V2.00). Los geles fueron pulverizados y degaseados por 24 h a 150 °C previo a la medida. El área de superficie específica fue calculada según la teoría de Brunauer-Emmet-Teller (BET), mientras que la distribución de tamaño de poro y el volumen total de poro se calcularon por el método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH).

Las muestras de matrices de sílica para microscopía de barrido electrónico (SEM) se fijaron utilizando 3,63% de glutaraldehído en buffer cacodilato de sodio 50 mM a pH 7,40 con 300 mM de sacarosa por 1 hora a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de fijación, las muestras se lavaron tres veces con el mismo buffer y luego se deshidrataron mediante pasajes por etanol de diferente graduación (70%, 95% y 2 cambios 100%). Por último se sometió a las

muestras a secado supercrítico y fueron metalizadas con oro para el análisis utilizando un microscopio de barrido electrónico Zeiss Supra 40.

Análisis de la actividad enzimática

Se utilizaron bacterias encapsuladas y libres. Las bacterias libres se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm por 5 min y el sobrenadante se utilizó para medir el azo colorante residual mediante espectroscopia UV-Vis, utilizando la longitud de onda óptima de adsorción para cada colorante ensayado. En el caso de las bacterias inmovilizadas, los sobrenadantes libres de células se obtuvieron luego de remover las perlas de sílica.

Actividad azorreductasa

La reacción catalizada por esta enzima puede observarse en la **figura 1**.

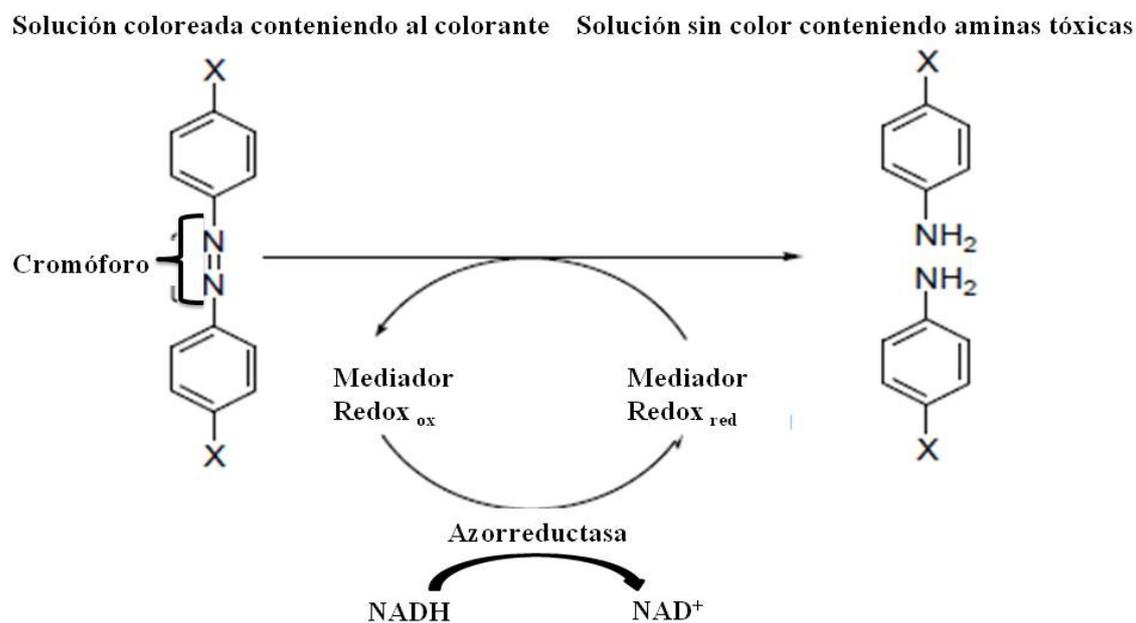


Figura 1: Mecanismo de acción de la azorreductasa. Adaptado de ¹⁶⁰

La actividad azorreductasa del sobrenadante libre de células se determinó según el procedimiento descrito por Zimmermann *et al.* ¹⁶¹. Brevemente, 1 mL de sobrenadante (aproximadamente 100 mg de proteína mL⁻¹) fue añadido a 12 mL de mezcla de reacción que contienen buffer fosfato 100 mM, pH=7,00, 24mM de negro de Remazol y 0,35mM NADH. El colorante remanente en la mezcla de reacción se detectó en función del tiempo y la actividad enzimática se determinó utilizando la tasa inicial de desaparición del colorante.

Actividad lignina peroxidasa

Es una enzima que cataliza la reacción:



En el caso de los azo colorantes, el mecanismo de acción propuesto puede observarse en la **figura 2**

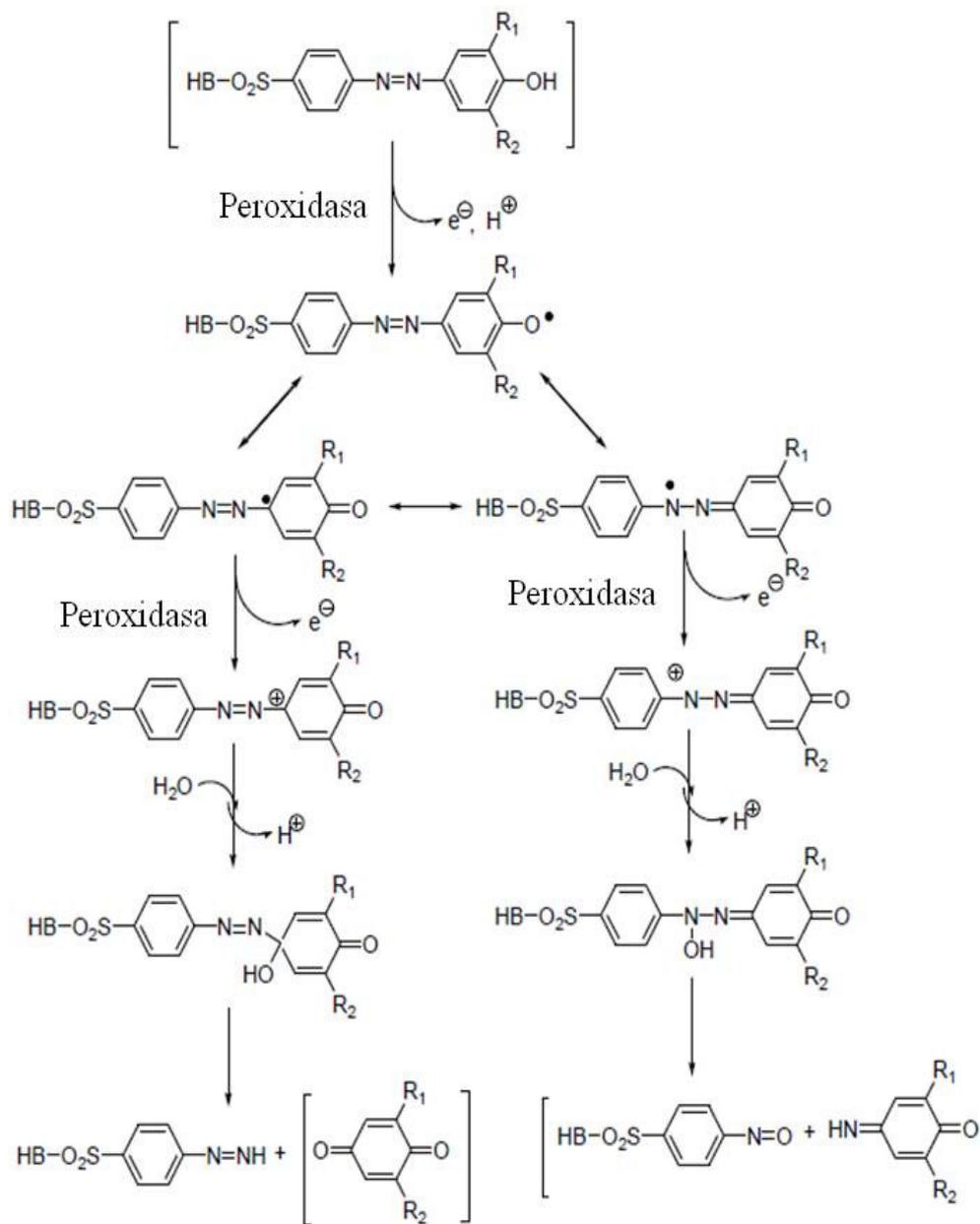


Figura 2: Mecanismo de acción de la enzima lignina peroxidasa. Adaptado de ¹⁶⁰

La actividad de lignina peroxidasa se determinó mediante el monitoreo de la formación de propionaldehído a 300nm en una mezcla de reacción a pH 3,50 que contiene 2,5mL de n-propanol 100mM, 250mM de ácido tartárico y 10mM de peróxido de hidrógeno, según fue descrito por Shanmugam *et al.* ¹⁶².

Actividad lacasa

La lacasa es una enzima capaz de clivar el anillo de compuestos aromáticos ¹⁶³. El mecanismo propuesto de acción para el ácido 3-(2-hidroxi-1-naftilazo)bensulfónico puede observarse en la **figura 3**.

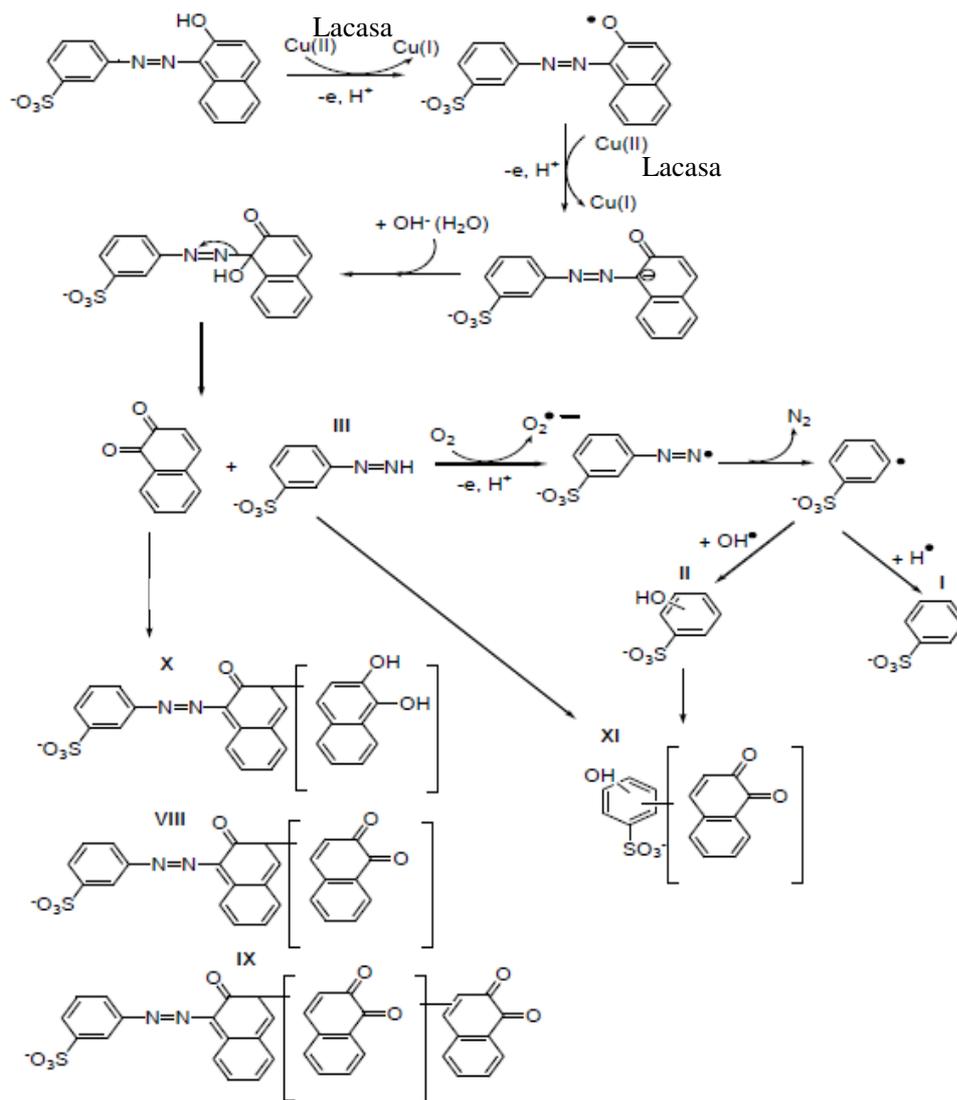


Figura 3: Mecanismo de acción de la enzima lacasa. Adaptado de ¹⁶⁰

La actividad lacasa fue determinada en una mezcla de reacción de 2mL conteniendo 10% de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) en buffer acetato 100 mM pH4,90. Se mide el aumento de densidad óptica a 420nm con el método de Hatvani y Mecs¹⁶⁴.

Actividad tirosinasa

La actividad tirosinasa involucra por un lado la hidroxilación de un monofenol y por otro lado la conversión de un o-difenol en la correspondiente o-quinona. La tirosinasa lleva a cabo la oxidación de los fenoles utilizando oxígeno. Los hidrógenos que se remueven del fenol se combinan con el oxígeno para formar agua. Puede observarse la reacción en la **figura 4:**

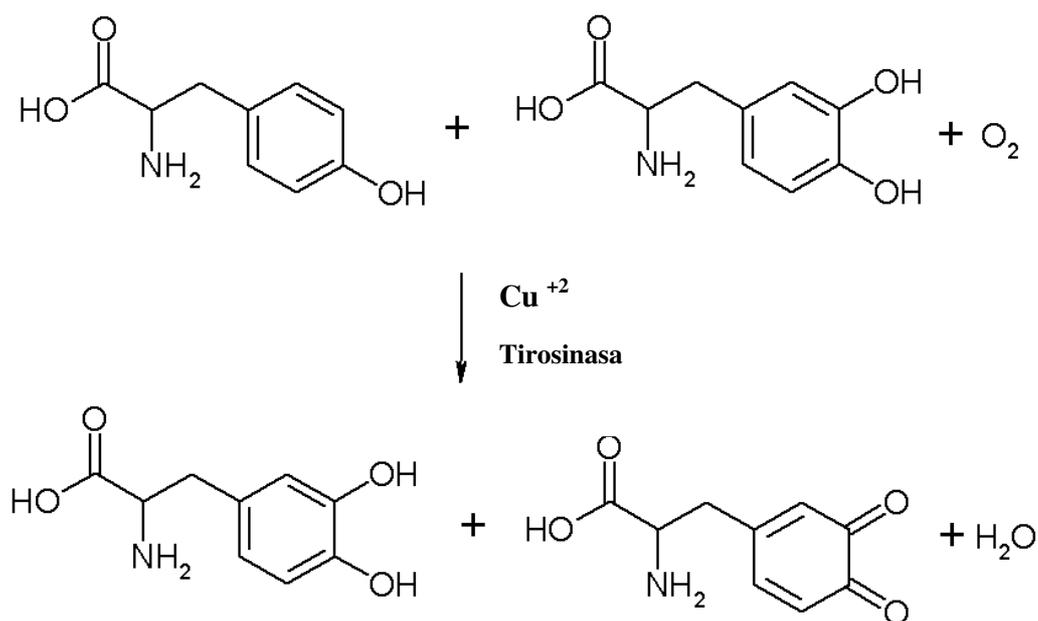


Figura 4: Esquema de reacción de la enzima tirosinasa.

La actividad tirosinasa se determinó en 2mL de una mezcla de reacción conteniendo 0,01% de catecol en buffer fosfato 100 mM pH 7,40 a 495nm según lo descrito por Zhang *et al.*¹¹⁸.

Todos los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo a 25°C y los blancos de reacción contenían todos los componentes excepto el sobrenadante libre de células. Todos los ensayos enzimáticos fueron realizados por triplicado y se calcularon los promedios de los mismos. Una unidad de actividad enzimática se define como un cambio en la unidad de absorbancia $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. La concentración de proteína se calculó por el método de biuret, que se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{+2} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico.

Decoloración por bacterias inmovilizadas

Los azo colorantes utilizados en este estudio fueron negro de Remazol (RB), naranja de metilo (MO) y naranja de bencilo (BO). Todos los colorantes fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). La concentración de los azo colorantes en las muestras fue determinada midiendo la absorbancia del sobrenadante a 595nm (RB), 495nm (MO) y 435nm (BO).

Se colocaron 3 perlas conteniendo *Pseudomonas* sp. inmovilizadas en 10 mL de medio conteniendo 0,1% de glucosa, 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% MgSO_4 , 0,25% K_2HPO_4 , 0,7% K_2HPO_4 , 0,05% de citrato de sodio y la concentración designada de RB, MO o BO. La solución resultante se incubó en forma estática a 35°C hasta la decoloración completa del sobrenadante. Una vez ocurrido esto, las perlas se recolectaron, se enjuagaron dos veces con solución fisiológica estéril y se colocaron en medio fresco para un nuevo experimento

de bioremediación. El mismo procedimiento fue repetido cuatro veces por semana durante cuatro semanas (16 experimentos de decoloración en total). Cada experimento fue repetido por triplicado. Se utilizaron los valores promedio obtenidos para los cálculos. Los datos se expresan como media±desvío estandar. Las diferencias se analizaron utilizando test *t* para muestras no apareadas, considerando significativos valores $p<0,05$.

Ensayo de toxicidad

Se realizó un ensayo de toxicidad aguda basado en la germinación de semillas de *Lactuca sativa L* (lechuga común) ¹⁶⁵. Consiste básicamente en enfrentar a las semillas de lechuga con la solución de colorantes, la solución de colorante metabolizado y un blanco con buffer fosfato 200 mM pH=7,00 y recoger las mediciones de crecimiento de la raíz de la planta de lechuga al cabo de 1 semana de incubación.

Resultados y discusión

Actividad de enzimas extracelulares

Las enzimas extracelulares microbianas pueden, potencialmente, degradar un amplio rango de colorantes aromáticos complejos. Por lo tanto, el análisis de la actividad y liberación de estas enzimas por bacterias inmovilizadas es muy importante cuando se tienen en cuenta aplicaciones industriales. Habida cuenta de eso, se determinó la actividad de lacasa, tirosinasa, azorreductasa y lignina peroxidasa en los sobrenadantes libres de células de bacterias libres e inmovilizadas. En la **tabla 1** puede observarse que la actividad de las enzimas lignina peroxidasa y tirosinasa aumentaron en presencia de RB. Particularmente, la actividad de lignina peroxidasa, lacasa y tirosinasa fueron significativamente más altas para

las bacterias inmovilizadas frente a la misma cantidad de bacterias libres, mientras que no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la actividad de azorreductasa entre ambas condiciones (libre *vs.* encapsulada). Otro resultado interesante es que la masa de proteína en los sobrenadantes libres de células de las bacterias inmovilizadas es significativamente mayor que aquella en el sobrenadante libre de células de bacterias libres. Este resultado aporta más evidencia al hecho de que las bacterias inmovilizadas pueden producir proteínas extracelulares, particularmente las enzimas involucradas en la degradación de RB como modelo de azo colorante (**tabla 1**).

Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno de los materiales de sílica son similares a las isothermas características de los materiales microporosos (**figura 5**). Poseen baja porosidad con un volumen total de poro de $0,033 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ con un área específica de superficie de $72 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Esta estructura porosa permite la difusión de los azo colorantes desde el sobrenadante hasta el interior de la perla de sílica, o la liberación de las enzimas extracelulares involucradas en la degradación de los azo colorantes estudiados desde la perla de sílica hasta el medio en que está el colorante. Estos resultados nos permiten observar al menos dos ventajas reales de inmovilizar bacterias en perlas de sílica obtenidas por la técnica sol-gel: por un lado, el empleo de bacterias inmovilizadas por este método facilita la reutilización de las mismas y evitaría la diseminación de los microorganismos en el efluente. Por otro lado, el mayor nivel de proteínas y en particular la mayor actividad enzimática expresada permiten biodegradar los azo colorantes con mayor velocidad.

Tabla 1: Cantidad total de proteína y actividad de enzimas extracelulares medidas en extracto libre de células.

	Bacterias inmovilizadas	Bacterias libres
Proteínas (mg/mL)	130,0 ± 0,2 *	50,3 ± 0,9
Actividad azorreductasa (μmol/min)	7,91 ± 0,9	6,79 ± 1,0
Actividad lacasa (μmol/min)	0,20 ± 0,01 *	0,036 ± 0,01
Actividad lignina peroxidasa (mmol/min)	6,9 ± 0,4 *	0,9 ± 0,1
Actividad tirosinasa (μmol/min)	29,6 ± 1,9 *	2,8 ± 1,0

* Diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,001$ Se representa el valor medio \pm SD de cuatro replicados.

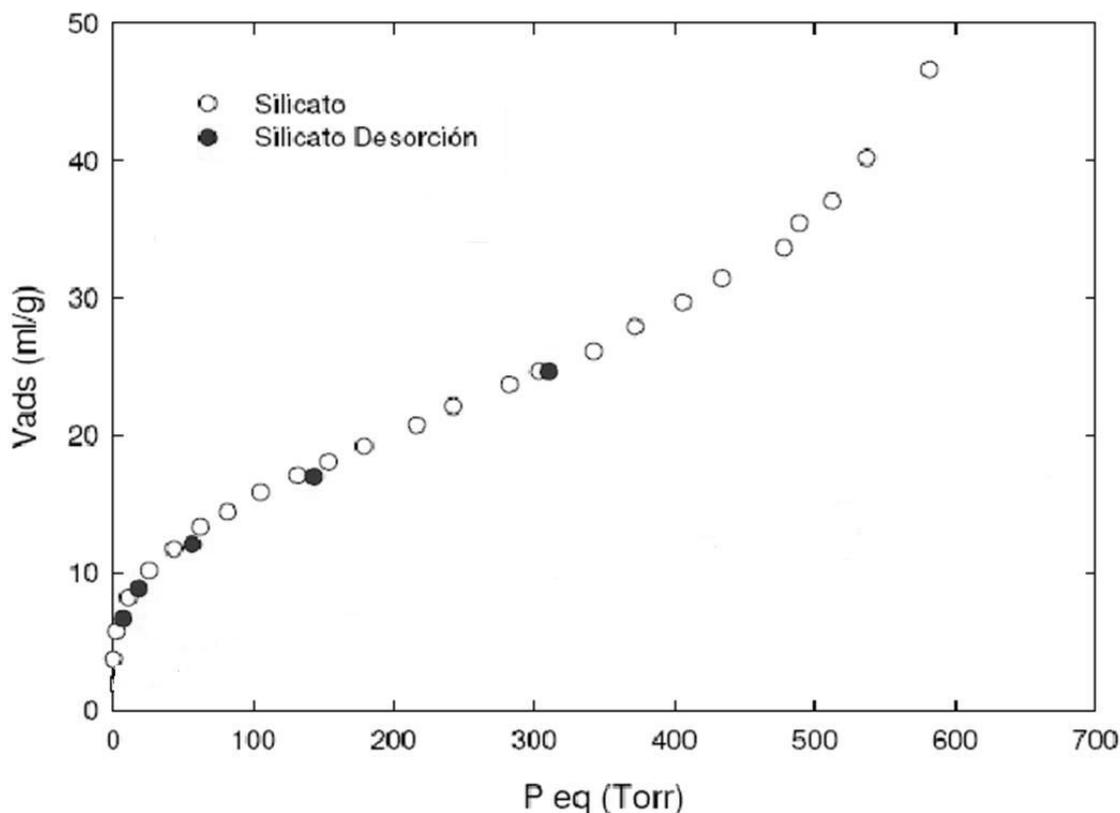


Figura 5: Isoterma de adsorción de nitrógeno obtenida para geles de silicato de sodio.

Decoloración de negro de Remazol con bacterias inmovilizadas

La inmovilización es una de las grandes herramientas disponibles para desarrollar biocatalizadores económicos y ecológicos y puede ser utilizada con enzimas libres o con bacterias enteras ¹⁶⁶. Los resultados presentados antes indican que las matrices sol-gel son apropiadas para el mantenimiento de un alto nivel de bacterias viables, permitiendo la salida de proteínas de la matriz sol-gel. A pesar de los resultados obtenidos, el desempeño de las bacterias inmovilizadas en la remoción de colorantes debe ser evaluado. En este sentido se observó que las bacterias inmovilizadas fueron capaces de decolorar al RB y que esta actividad era influenciada por la concentración inicial de colorante evaluada. Como puede observarse en la **figura 6**, las bacterias inmovilizadas pueden decolorar 80% del

colorante a las 24 horas de incubación cuando la concentración inicial era de 25 o 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La decoloración fue casi completa a las 48 hs, pero cuando se probaron concentraciones de 75 o 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a las 24 hs la decoloración fue del 75% y cerca del 90% a las 48 horas. Estos resultados muestran que la concentración de colorante tuvo un efecto importante en la reducción de actividad, que se refleja en la **figura 7**. En efecto, la cantidad de colorante metabolizado por día decreció de 85 $\mu\text{g día}^{-1}$ a 75 $\mu\text{g día}^{-1}$ cuando la concentración de colorante cambia entre 25 a 100 $\mu\text{g día}^{-1}$. Por lo tanto, es probable que a concentraciones mayores de RB el colorante ejerza un efecto inhibitorio sobre las bacterias. Vale la pena mencionar que las bacterias aparecen dispersas al azar en la matriz de sílica y que alcanzan un número medio alrededor de 10^7 UFC por gel en todas las condiciones (**figura 8**). Esta densidad bacteriana concuerda con reportes previos que sugieren que los geles pueden tener una capacidad máxima para alojar bacterias ⁵⁸. Parecería ser que la producción de proteínas de *quorum sensing* estaría involucrada en este estado de “ocupación máxima” de la perla por las bacterias ¹⁶⁷.

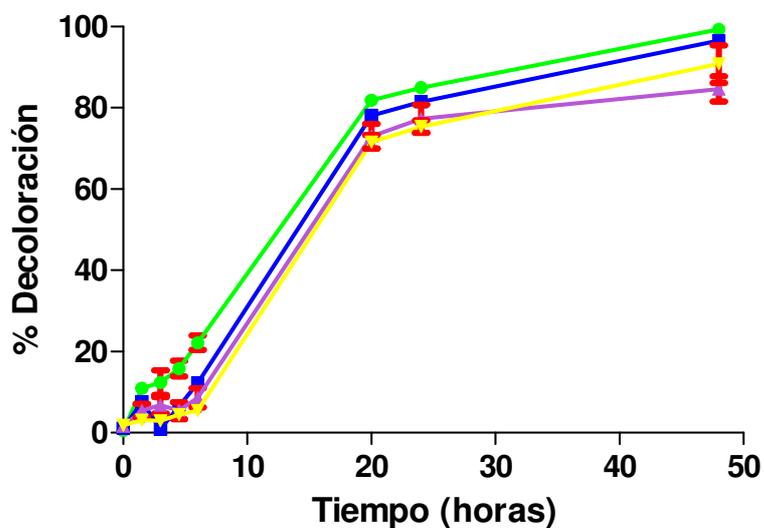


Figura 6: Remoción de color del Remazol black con bacterias inmovilizadas. La concentración inicial de RB fue: ● 25 µg mL⁻¹, ■ 50 µg mL⁻¹, ▲ 75 µg mL⁻¹ and ▼ 100 µg mL⁻¹. Se representa el valor medio ±SD de cuatro replicados.

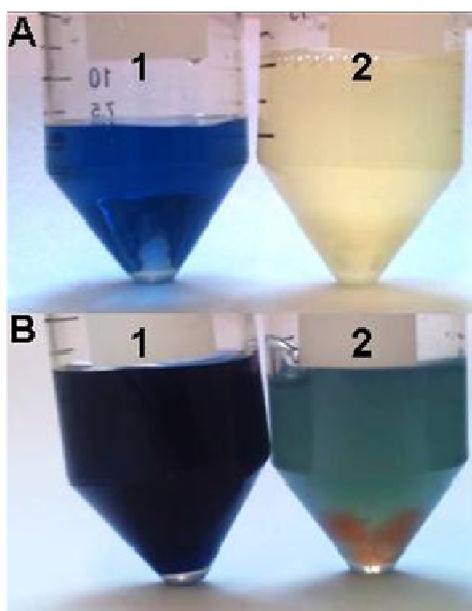


Figura 7: Decoloración del Remazol black. A: 25 µg mL⁻¹ y B: 100 µg mL⁻¹. Tubos 1: Perlas de sílica sin bacterias, tubos 2 Perlas de sílica con bacterias inmovilizadas.

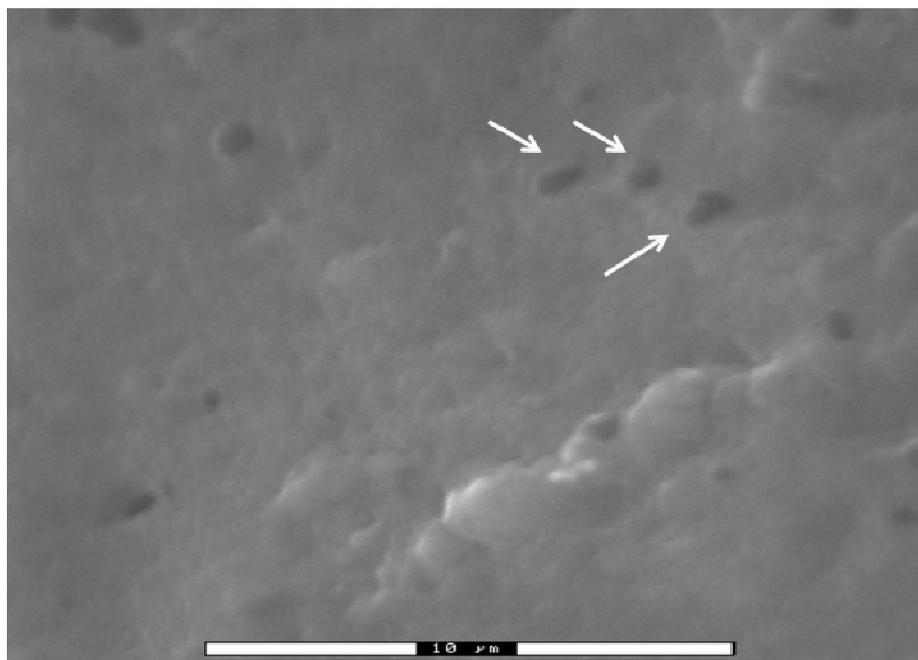


Figura 8: Imagen de espectroscopía electrónica de barrido de matrices de sílica con bacterias inmovilizadas

Reutilización de las bacterias inmovilizadas

Las bacterias inmovilizadas fueron expuestas a varias concentraciones de RB, se incubaron 24 horas, se retiraron las perlas, se lavaron y se reutilizaron para tres ciclos más de biodegradación. Este procedimiento se repitió durante 4 semanas. Puede observarse que no hubo pérdida de eficiencia entre ciclos de reutilización. Una de las ventajas del uso de bacterias inmovilizadas para el tratamiento de soluciones acuosas contaminadas, en comparación con la utilización de bacterias libres, es la posibilidad de reciclar las perlas y reutilizarlas sin pérdida significativa de eficiencia a lo largo de los ciclos de utilización, como se muestra en la **figura 9**.

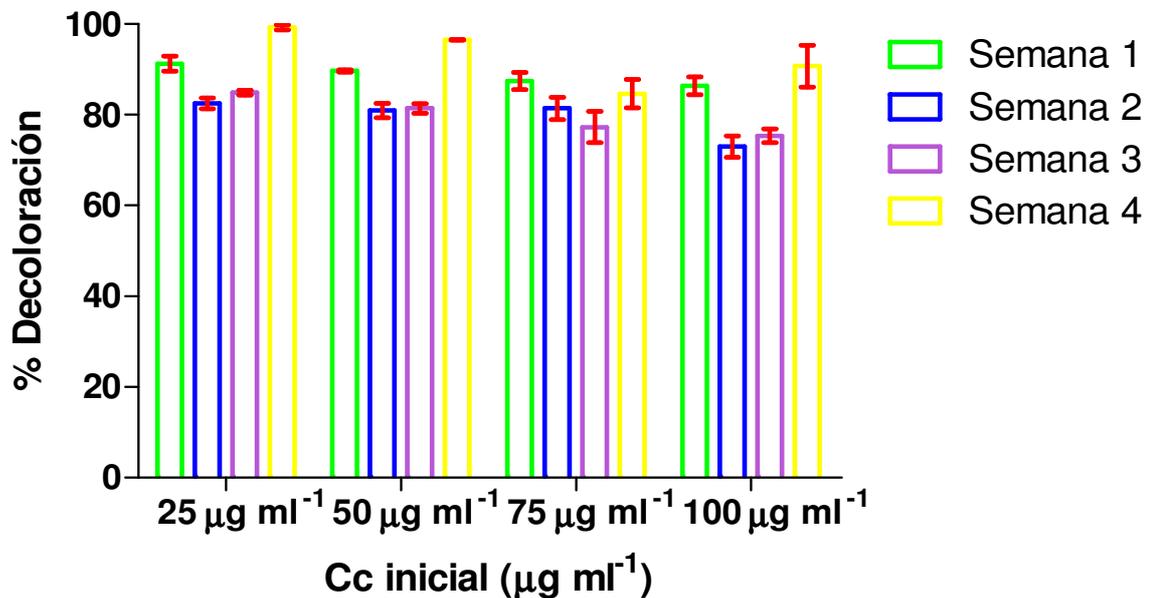


Figura 9: Decoloración de Remazol black por bacterias inmobilizadas en perlas de sílica en medio acuoso luego de cuatro ciclos de reutilización cuando son expuestas a diferentes concentraciones de RB. Se representa el valor medio \pm SD de cuatro replicados.

Efecto sobre otros colorantes industriales

Las perlas de sílica con bacterias inmobilizadas en su interior se emplearon con éxito para decolorar otros azo colorantes. En la **figura 10** se muestra la actividad de decoloración de las bacterias inmobilizadas frente a varias concentraciones de naranja de metilo y naranja de bencilo. De la misma forma que ocurre con el negro de Remazol, la actividad de las bacterias inmobilizadas es influenciada por la concentración de MO y BO. Después de 24 horas con baja concentración de colorante la biodegradación fue más alta para el RB (85%) que para el MO (77%) y el BO (66%), mientras que para una concentración de $100\mu\text{g mL}^{-1}$, la biodegradación fue mayor para el BO (83%), seguido por el MO (79%) y el RB (75%). Estos resultados aportan aún más evidencia de que la concentración inicial de colorante

influye en el proceso de biodegradación. Como puede observarse en la **tabla 2**, la máxima degradación del RB se obtiene con la menor concentración, mientras que en el caso del MO y el BO esto ocurre con una concentración de $50\mu\text{g mL}^{-1}$.

Cuando comparamos la biodegradación de los tres colorantes en estudio, puede observarse que durante las primeras 6h de incubación la biodegradación del MO y el BO fue mayor que la del RB en el mismo período de tiempo. Estos resultados pueden estar relacionados con la estructura de cada colorante y su difusión a través de la matriz sol-gel. De hecho, el MO es la molécula de menor tamaño y se supone debe tener la menor limitación por difusión, por lo tanto, la mayor velocidad de biodegradación. Es decir, la biodegradación a corto plazo (6 horas) se correlaciona perfectamente con el tamaño de los colorantes. Como puede observarse en la **figura 11**, otro factor a tener en cuenta es la carga de los colorantes al pH utilizado para este trabajo. Mientras el MO y el BO tienen una carga negativa proporcionada por el grupo $\phi\text{-SO}_3^-$, el RB tiene 4 cargas negativas aportadas por el mismo grupo, lo que podría implicar una mayor repulsión electrostática debida a la carga de la superficie de la perla. Luego de 48 horas, la limitación por difusión no es tan significativa y la decoloración de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ de los 3 colorantes fue superior al 90% en todos los casos (**figura 12**). Asimismo, las bacterias inmovilizadas fueron utilizadas con éxito en la remoción de color de los tres colorantes sin disminución significativa de su actividad incluso luego de 4 ciclos de reutilización en presencia de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ de los tres colorantes ensayados (**figura 13**).

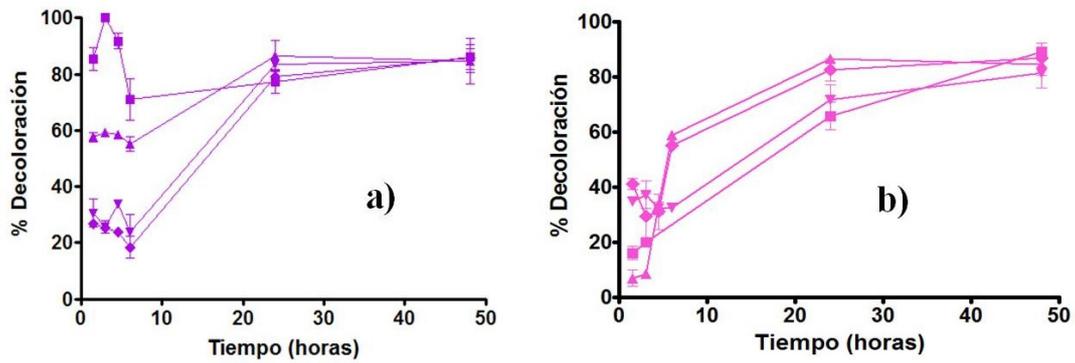
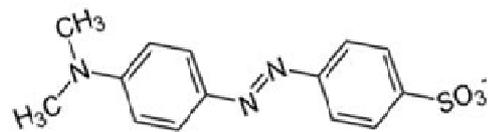
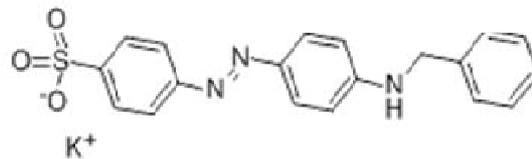


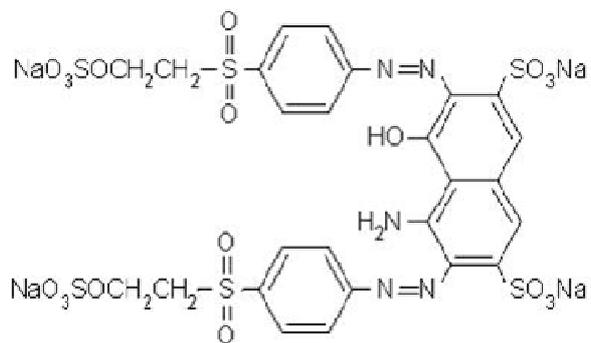
Figura 10: Decoloración del MO a) y el BO b) por las bacterias inmovilizadas. La concentración inicial de colorante fue: ● 25 µg mL⁻¹, ▲ 50 µg mL⁻¹, ▼ 75 µg mL⁻¹ and ◆ 100 µg mL⁻¹ en ambos casos. Se representa el valor medio ±SD de cuatro replicados.



Naranja de metilo



Naranja de bencilo



Negro de Remazol

Figura 11: Estructura química de naranja de metilo (MO), naranja de bencilo (BO) y Negro de Remazol (RB).

Tabla 2: Porcentaje de colorante biodegradado luego de 24 h.

Concentración colorante ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Biodegradación		
	RB	BO	MO
25	85 \pm 2	66 \pm 5	77 \pm 4
50	81 \pm 2	86 \pm 3	86 \pm 3
75	77 \pm 4	72 \pm 4	84 \pm 2
100	75 \pm 4	83 \pm 3	79 \pm 1

Se representa el valor medio \pm SD de cuatro replicados.

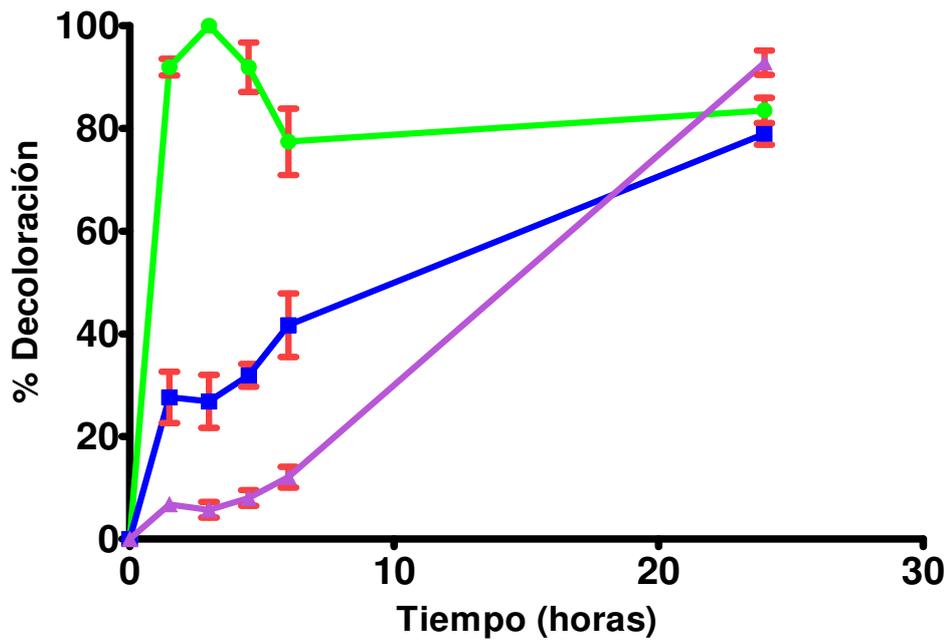


Figura 12: Decoloración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de \blacktriangle RB, \blacksquare BO y \bullet MO. Se representa el valor medio \pm SD de cuatro replicados.

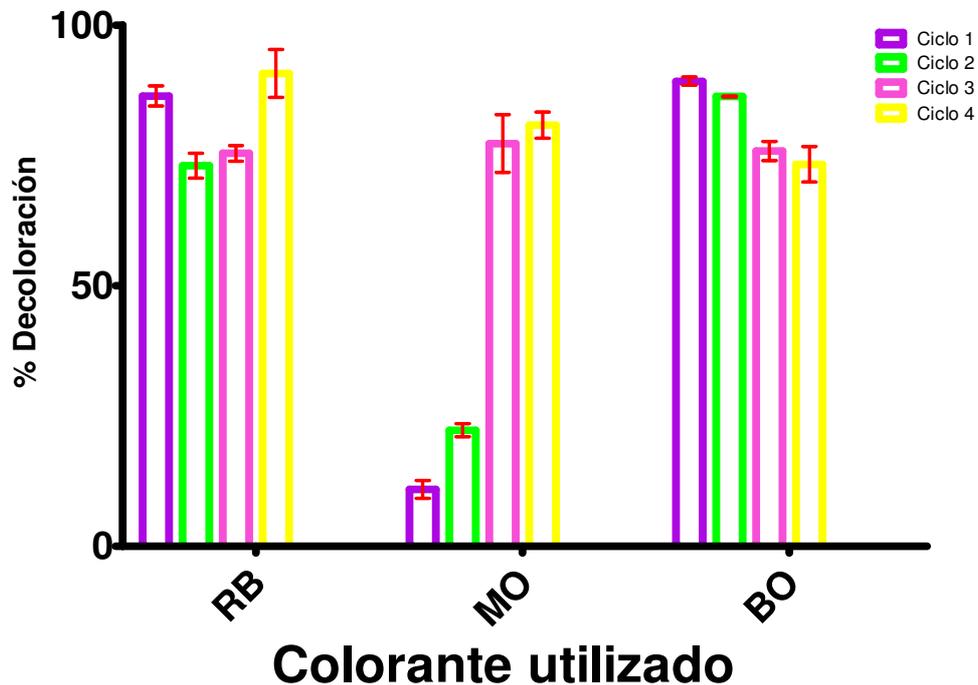


Figura 13: Remoción de color por bacterias inmovilizadas en medio acuoso luego de cuatro ciclos de reutilización. La concentración de colorante fue de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ en todos los casos. Se representa el valor medio \pm SD de cuatro replicados.

Ensayo de toxicidad

En la **figura 14** se muestra el efecto de los colorantes sobre el crecimiento de las raíces de semillas de lechuga. En este ensayo de toxicidad puede observarse que la presencia de los colorantes durante la germinación provoca una disminución significativa en el crecimiento de las raíces. Por el contrario, este efecto no se observa una vez realizada la decoloración de los mismos utilizando bacterias encapsuladas. Como puede observarse en la **figura 14**, la decoloración de los colorantes por *Pseudomonas* sp. encapsuladas no genera productos que resulten ser más tóxicos para las semillas que los colorantes en su estructura nativa, por lo

que podemos afirmar que las bacterias encapsuladas lograron no sólo decolorar a los colorantes en cuestión, sino que también lograron detoxificar las soluciones ensayadas.

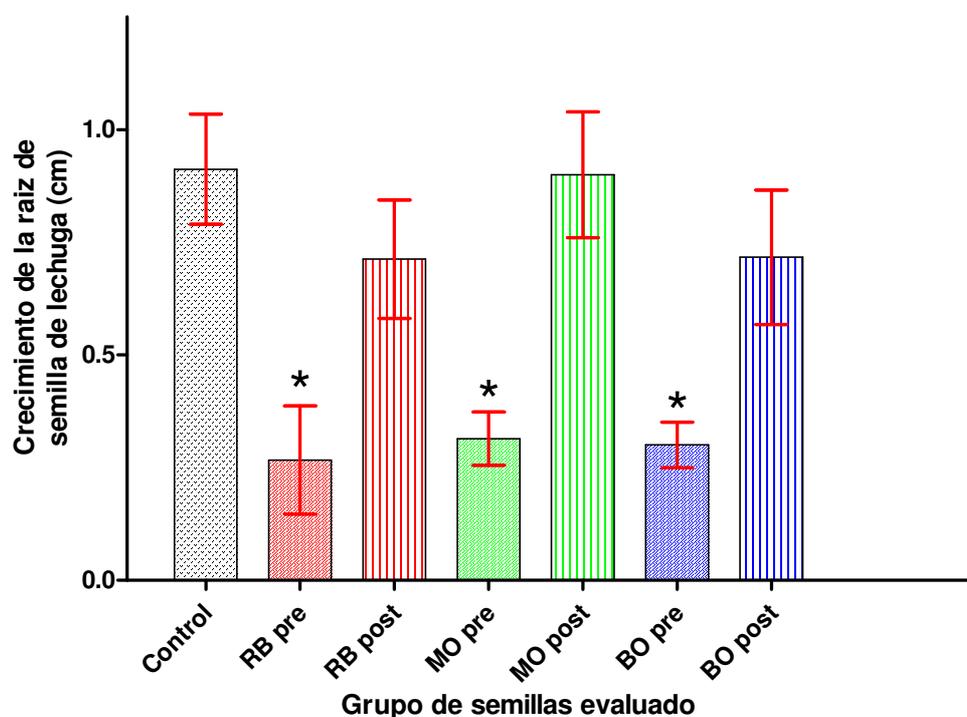


Figura 14: Ensayo de toxicidad sobre semillas de *Lactuca sativa L.* La concentración de colorante inicial en todos los casos fue de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. La solución remanente luego del proceso de decoloración se utilizó sin tratamientos previos sobre las semillas. Se representa el valor medio \pm SD de veinte replicados. * Diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,01$

Conclusiones

En este capítulo demostramos que las bacterias inmovilizadas en perlas de silicato no pierden su viabilidad o su habilidad para decolorar los tres colorantes ensayados. Podría decirse incluso que las bacterias inmovilizadas adquirieron algunas ventajas, siendo una de ellas la producción de mayores niveles de enzimas extracelulares involucradas en la

biodegradación de azo colorantes. De hecho, los tres azo colorantes fueron biotransformados exitosamente por *Pseudomonas* sp. inmovilizada por la técnica sol-gel. La remoción de los colorantes no está relacionada con la adsorción de los mismos a la matriz de sílica. Las ventajas de la encapsulación de bacterias incluyen protección de las bacterias del medio externo hostil, mayor producción de proteínas por bacteria y la posibilidad de reutilizar las perlas. Nuestros resultados indican que las *Pseudomonas* sp. inmovilizadas por la técnica sol-gel podrían ser utilizadas como un sistema efectivo y seguro para la biotransformación de los azo colorantes ensayados.

Capítulo 3

*Aplicación ambiental de hidrogeles de colágeno: adsorción
de azo colorantes*

Introducción

El uso de colorantes es una práctica utilizada para cambiar la característica de sustancias tan diversas como telas, papel, cuero, alimentos y medicamentos entre muchas otras. En un principio se utilizaban colorantes extraídos de fuentes naturales, como plantas y animales, pero a principio del siglo XX estas prácticas se abandonaron para recurrir al uso de colorantes sintéticos. Como se mencionó anteriormente, el mayor consumidor de estos colorantes es la industria textil, con aproximadamente 2/3 del total. El resto está dividido entre las industrias de teñido de cuero, producción de papel, alimentos, fotografía a color, medicina y farmacia, cosmética, tinturas de cabello, teñido de maderas, agricultura, investigación química y biológica, arreglos de acumulación de luz y celdas fotoeléctricas^{13, 30}. Los colorantes pueden clasificarse según su índice de color (CI, del inglés *colour index*), o pueden ser agrupados en diferentes clases: ácidos, básicos, directos, dispersos, metálicos, mordientes, pigmentos, reactivos, solventes, sulfuros y colorantes vat, que reflejan su comportamiento macroscópico y sus funcionalidades principales. Los colorantes reactivos poseen una estructura química relativamente sencilla, y están químicamente constituidos por los compuestos azo (**figura 1**), antraquinonas y ftalocianinas. Poseen la capacidad de formar uniones covalentes con la fibra a teñir. Vale la pena mencionar que la mayoría absoluta de los colorantes utilizados en la actualidad corresponden a la categoría de azo colorantes²⁷.

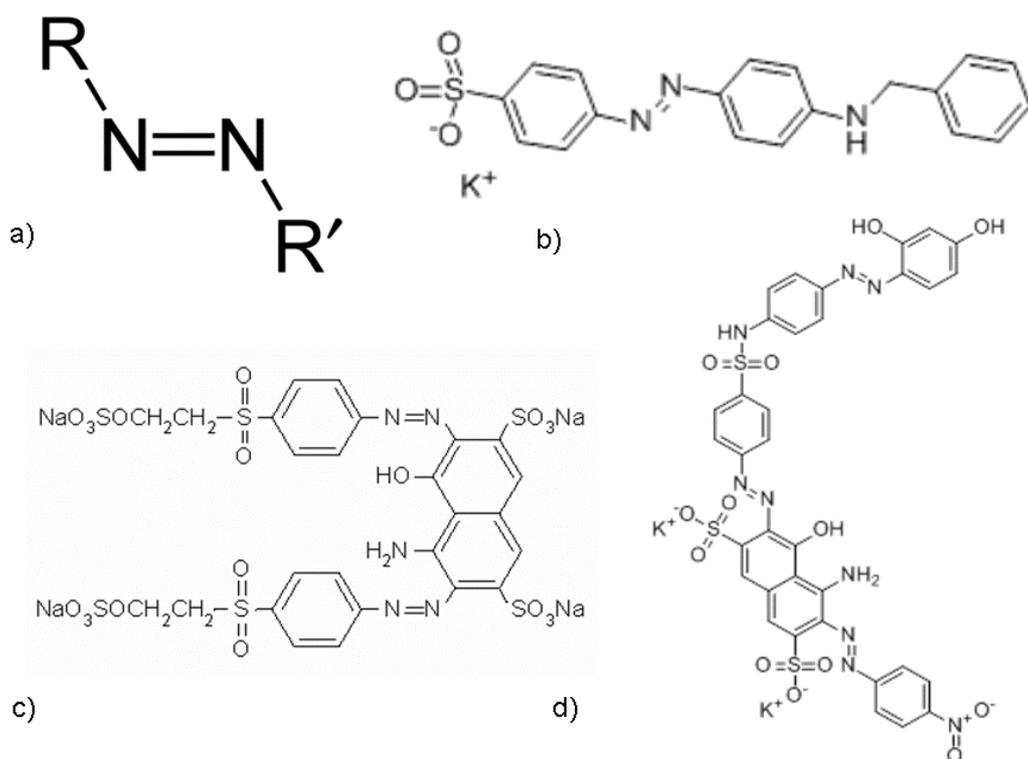


Figura 1: a) Estructura básica de los compuestos azo. R y R' son restos aromáticos que pueden ser iguales o diferentes y estar o no sustituidos b) Naranja de bencilo, monoazo colorante. c) negro de Remazol, diazo colorante. d) EINECS 284-407-0, triazo colorante.

El interés especial en los colorantes se relaciona con que una muy baja concentración de los mismos (1 ppm) colorea intensamente al agua. El color en el agua no sólo la hace estéticamente inaceptable, sino que también impide la llegada de la luz, alterando la flora y consecuentemente la fauna de los cursos de agua. En algunos casos este cambio es tan grande que puede llegar a la eutrofización. Los azo colorantes en particular (cualquiera sea su tipo) pueden sufrir rupturas en sus enlaces azo si las condiciones del medio son reductoras, produciendo la liberación de aminas aromáticas a los torrentes de agua. Estas aminas son consideradas muy tóxicas por su capacidad carcinogénica^{3, 168, 169}.

Los tratamientos tradicionales de efluentes son marcadamente ineficientes para el manejo de aguas contaminadas con colorantes sintéticos, especialmente azo colorantes, debido a la estabilidad química de éstos ⁸. Entre las muchas formas conocidas de tratar efluentes o aguas contaminadas se encuentran tratamientos químicos, físicos y biológicos. Los procesos menos costosos son aquellos basados en la adsorción. En el caso de los azo colorantes estos últimos pueden considerarse los más seguros debido a que no se produce ruptura de la molécula del colorante, disminuyéndose drásticamente la posibilidad de producción de aminas aromáticas potencialmente tóxicas. Por otro lado, el problema de la adsorción está generalmente ligado al desecho de los productos de adsorción, que implican un costo en el traslado de desechos y su posterior descarte. En el caso del uso de hidrogeles de colágeno, esto está compensado por el hecho de que el colágeno en si es un producto de desecho, y que el volumen ocupado por el gel una vez deshidratado es mínimo, por lo que los costos de manipulación y transporte estarían amortizados.

El colágeno es una biomolécula muy abundante, de obtención simple y que puede encontrarse en los desechos de varias industrias ¹⁷⁰. La estructura básica de la molécula de colágeno es $-\text{gly-X-Y-gly}-$ donde X e Y son prolina y 4-hidroxiprolina ¹⁷¹⁻¹⁷⁵. Físicoquímicamente es un polielectrolito semi-flexible helicoidal de 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro. Los extremos de las moléculas de colágeno adyacentes están desplazadas una de otra en una distancia de aproximadamente 67 nm, que es lo que produce la apariencia estriada de la molécula que se observa en microscopía electrónica.

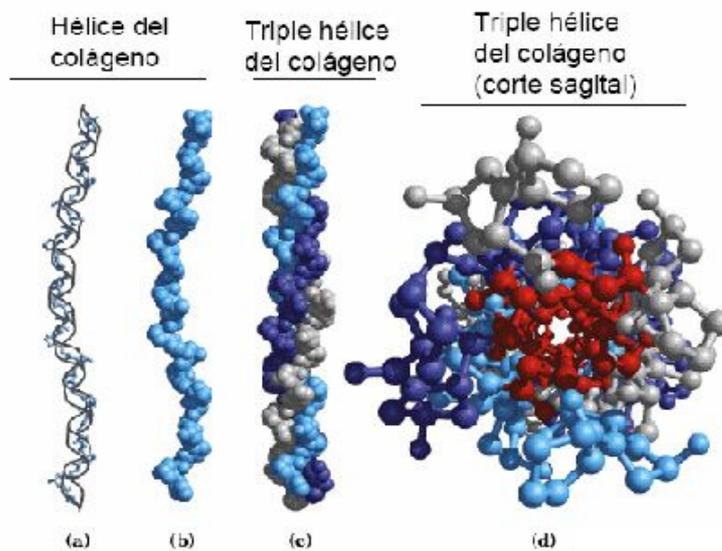


Figura 2: a) y b) Estructura del colágeno. c) Estructura del tropocolágeno. Nótese la posición central de las glicinas (en rojo, d.).

El colágeno es un polianfólitico que posee entre un 15 a 20 % de cargas ionizables por lo que según el pH presenta diferente carga neta, siendo esta diferencia máxima a partir de pH 2,50, donde las repulsiones electrostáticas son máximas (+254 mV). Su punto isoeléctrico se encuentra a pH 9,20 y a pH entre 6,50 y 9,00 presenta repulsión electrostática mínima con un valor de +38 mV¹⁷¹.

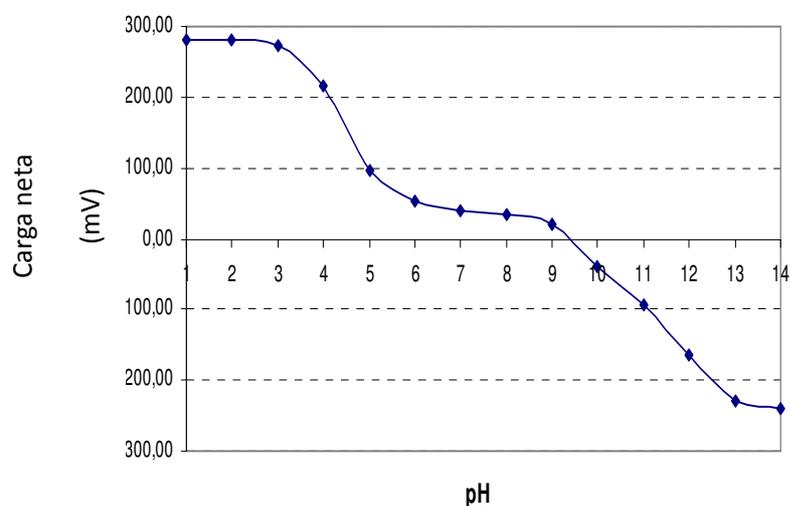
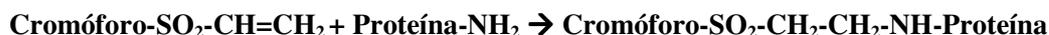
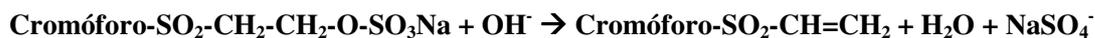


Figura 3: Curva de titulación del colágeno mostrando la carga neta a diferentes pH. Adaptado de ¹⁷¹

Como se mencionó en la introducción de esta tesis los hidrogeles de colágeno (1 mg ml^{-1}) son muy frágiles y presentan propiedades mecánicas muy pobres. El uso de técnicas de entrecruzamiento para mejorar el aspecto mecánico del gel llevaría a la pérdida de sitios activos para la unión del colorante ^{88, 89}. Se propone por lo tanto: el uso de nanopartículas de sílica como relleno del hidrogel, lo que da lugar a la formación de un nanocompósito (ver introducción) para mejorar las características mecánicas de los hidrogeles y/o el uso de hidrogeles de colágeno más concentrados (4 mg ml^{-1}).

Es sabido que los colorantes reactivos se unen a las fibras de seda por medio de una reacción de adición de Michaelis que involucra a la vinilsulfona que forma la parte reactiva de la molécula de colorante, sobre los $-\text{NH}_2$ libres de las proteínas. Esta reacción ocurre en medio básico para proteínas como keratina y seda ¹⁷⁶⁻¹⁸¹:



En este capítulo se evaluará la capacidad de hidrogeles de colágeno de: adsorber azo colorantes, el efecto en dicha capacidad al introducir nanopartículas de sílica para mejorar sus propiedades mecánicas, evaluar las diferencias de adsorción entre azo colorantes reactivos y no reactivos y la relación entre el pH de adsorción y la estructura de dichos colorantes, así como también la disminución del volumen y peso de dicho gel una vez utilizado, proveyendo esto una ventaja muy buena en cuanto a costos sobre otros tipos de sorbentes.

Materiales y métodos

El colágeno tipo I fue purificado de colas de rata. Resumiendo, se toman las colas de rata y se enjuagan con acetona y alcohol. Luego se quiebra el extremo terminal de la cola, se corta el tejido blando y se tira, extrayendo de esta manera los tendones. Esto se repite hasta que no se pueden extraer más tendones de la cola. A medida que se extraen, los tendones se colocan en solución fisiológica estéril. Se lavan 3 veces con solución fisiológica para limpiar restos de sangre. Una vez que el sobrenadante queda límpido se procede a lavar otra vez con NaCl estéril 4M para lisar los glóbulos rojos. Luego se procede a disolver los tendones en ácido acético 500 mM estéril y frío, dejándolo en agitación a 4°C toda la noche. Una vez que el colágeno está disuelto, se procede a realizar una precipitación diferencial del colágeno tipo I con NaCl 700 mM. Una vez que precipitó todo el colágeno, se descarta el sobrenadante y se vuelve a colocar ácido acético 500 mM estéril sobre el precipitado y se deja disolver toda la noche ^{170, 172, 182-184}. Al día siguiente se toman

alícuotas de la solución de colágeno para proceder a su cuantificación. La concentración fue estimada por el método de la hidroxiprolina¹⁸⁵. Básicamente, se somete al colágeno a hidrólisis exhaustiva por 24 horas con HCl en caliente. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se evapora a sequedad el líquido remanente. Se resuspende el pellet y se lo enfrenta a cloramina T y dimetilamino-4-benzaldehído, dando como resultado de la reacción con la hidroxiprolina un color rojo medible por espectroscopía UV-Vis a $\lambda=557\text{nm}$. El contenido de hidroxiprolina en el colágeno se estima en un 14%, por lo que a partir de este método puede estimarse la cantidad total de colágeno en la solución original. Los colorantes negro de Remazol (RB), rojo Congo (RC) y marrón de Bismarck (BB) se utilizaron tal cual fueron comprados. Se utilizó agua deionizada para preparar todos los reactivos y soluciones. La concentración remanente en solución de los colorantes RB, RC y BB se efectuó mediante espectroscopía UV-Vis a las siguientes longitudes de onda: RB: 595 nm; RC 482 nm y BB: 448 nm.

Preparación de las nanopartículas de sílica

Las nanopartículas de sílica (200 nm) utilizadas fueron sintetizadas por el método de Stöber⁴⁰. Resumiendo, se coloca etanol absoluto (500 mL), tetraetil ortosilicato (TEOS) (38 mL), agua destilada (60 mL) e hidróxido de amonio (80 mL) en un recipiente cerrado, en agitación toda la noche. Una vez obtenidas las nanopartículas, se lavaron con agua destilada 2 veces. Estas partículas tienen potencial zeta negativo, debido a la carga superficial aportada por los grupos silanoles (SiNP-OH). Se obtienen aproximadamente 2 g de nanopartículas secas.

Para obtener partículas con diferentes grupos funcionales en la superficie de las mismas (SiNP-NH₂), las partículas obtenidas anteriormente fueron derivatizadas con 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) (1 mmol por cada gramo seco de nanopartículas).

La modificación para obtener otras nanopartículas (SiNP-SH) se realizó colocando SiNP-OH en etanol. Luego se le agrega amoníaco, 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMOS) y se lo deja reaccionar a temperatura ambiente por 40 minutos aproximadamente. Luego se coloca a 80 °C para reducir el volumen de reacción aproximadamente 1/3; se deja enfriar la mezcla y se lavan las partículas obtenidas tres veces con etanol.

El esquema de las modificaciones puede observarse en la **figura 4**

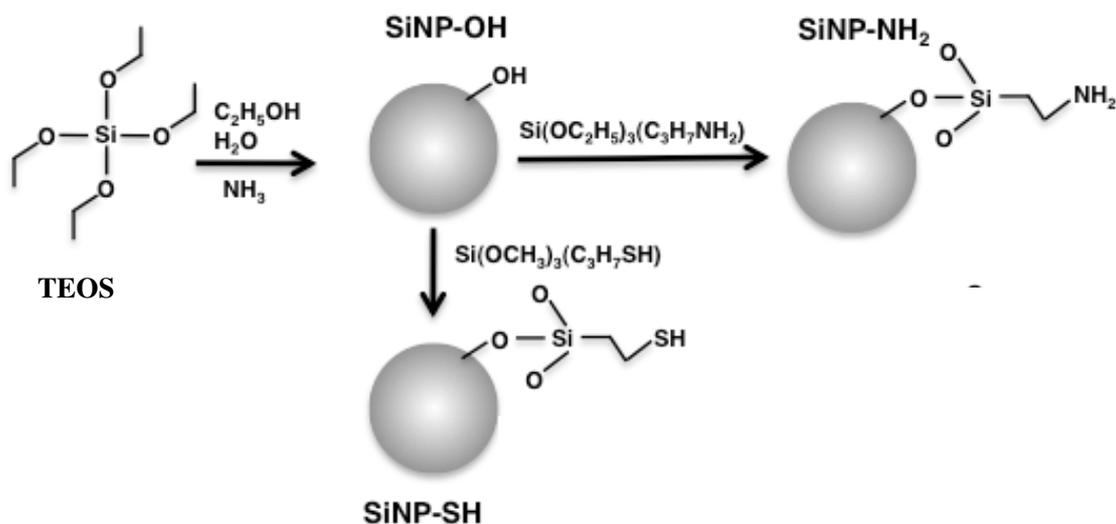


Figura 4: Esquema de obtención nanopartículas de sílica y su post-modificación. SiNP-OH, SiNP-NH₂, y SiNP-SH. Adaptado de ¹⁸⁶

Preparación de los hidrogeles de colágeno

Se colocan 250 µl de una solución de colágeno de una concentración de 3,5 mg mL⁻¹ en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Luego se colocó la placa en atmósfera saturada de

NH₃ a 20°C hasta que se obtuvo el hidrogel. Una vez obtenidos los geles se colocó la placa bajo campana para evaporar el amoníaco hasta que los geles arrojaron pH neutro.

Preparación de los nanocompósitos

La obtención de los nanocompósitos se realizó siguiendo un protocolo similar al realizado para la obtención de los hidrogeles de colágeno, con la salvedad de que previamente a la exposición al NH₃, se colocó una masa de 0,3 mg de nanopartículas de silicio por mL de solución de colágeno.

Caracterización del material

Nanopartículas de sílica

El potencial zeta se midió con un Zetasizer (Nano-Zs, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Así mismo, las nanopartículas fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido para lo cual fueron secadas y metalizadas para luego ser observadas en un microscopio Zeiss SUPRA 40.

Análisis SEM

Los hidrogeles de colágeno se fijaron utilizando una concentración de glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato 200 mM pH 7,00 por 1 hora a 4°C. Una vez fijados, los geles se lavaron 3 veces con dicho buffer, se congelaron a -20°C y luego se liofilizaron. Una vez liofilizados los geles se llevaron a metalizar para luego ser observados con un microscopio Zeiss SUPRA 40.

Análisis TEM

Las muestras se fijaron como se describió anteriormente y luego fueron observadas con un microscopio TEM

Análisis por FTIR

Los geles liofilizados sin fijar se pulverizaron y se armaron pastillas de KBr. Luego se analizaron por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en el rango 4000 a 450 cm^{-1} en un equipo Nicolet 360.

Inactivación e hidrólisis del grupo vinilsulfona del negro de Remazol

Una solución de 2 mg mL^{-1} de RB fue sometida a dos pretratamientos. En primer lugar se realizó un tratamiento con bisulfito de sodio $800\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 30 minutos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para inactivar a la vinilsulfona. En segundo lugar se procedió a realizar la hidrólisis del grupo vinilsulfona mediante la utilización de una solución de NaOH 10 mg mL^{-1} a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por el espacio de 1 hora¹⁷⁷.

Estudios de adsorción de azo colorantes

Dependiendo del experimento a realizar, se colocaron diferentes soluciones de fosfato de potasio 200 mM a pH 5,00, 7,00 y 9,00 en los pocillos y se dejaron 1 hora para estabilizar el pH de los hidrogeles.

Dependiendo del estudio a realizar se siguieron diferentes protocolos.

Estudios de adsorción según pH

Hidrogeles de colágeno: Una vez estabilizado el hidrogel, se procedió a retirar el sobrenadante y agregar 1 mL de una solución de RB $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ en la solución de fosfato de potasio 200 mM al pH deseado. Una vez transcurridas 24 horas se procedió a retirar el sobrenadante y a medir por espectroscopía UV-Vis el colorante remanente en la solución.

Nanopartículas de sílica: Se colocaron 0,3 mg de SiNP-OH, SiNP-NH₂ o SiNP-SH junto a 1 mL de una solución de RB $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ en la solución de fosfato de potasio 200 mM a pH 9,00. Una vez transcurridas 24 horas se procedió a retirar el sobrenadante y a medir por espectroscopía UV-Vis el colorante remanente en la solución.

Nanocompósitos: se procedió igual que con los hidrogeles de colágeno, pero utilizando nanocompósitos en lugar de hidrogeles.

Estudio de adsorción post hidrolización

El procedimiento fue igual al protocolo anterior, con la salvedad de que se utilizó RB previamente hidrolizado para ser incubado con el hidrogel.

Estudios de cinética de adsorción

Una vez conocido el pH óptimo de adsorción, se realizaron diferentes soluciones de RB en concentraciones entre 20 y $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ en fosfato de potasio pH 9,00 200 mM. Se colocó un mililitro de la dilución a utilizar en cada pocillo de una placa multipocillo y el sobrenadante fue retirado a distintos intervalos de tiempo y el colorante remanente en solución se determinó utilizando espectroscopía UV-Vis.

Estudios de isotermas de adsorción:

Una vez conocido el tiempo en el que se alcanza el equilibrio, soluciones de diferente concentración de RB (entre 5 y 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) disueltas en soluciones de fosfato de potasio 200 mM a pH 5,00, 7,00 y 9,00 se incubaron 24 horas. Una vez pasado este tiempo se tomaron los sobrenadantes para estimar la masa de colorante adsorbido utilizando espectroscopía UV-Vis.

Estudio de adsorción según estructura:

Se utilizó un protocolo similar al utilizado para determinación del pH óptimo de adsorción para el RB pero utilizando también RC y BB.

La capacidad de adsorción máxima del hidrogel de colágeno (Q) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$Q(\mu\text{g mg}^{-1}) = (C_i - C_e) / m * V \quad (1)$$

donde C_i y C_e son las concentraciones iniciales y en equilibrio del colorante en $\mu\text{g mL}^{-1}$, V es el volumen de la solución testeada (mL) y m (mg) es la masa de colágeno en el hidrogel.

Resultados y discusión

Microscopía SEM -TEM

En la **figura 5a** puede observarse la microscopía SEM del gel de colágeno. El mismo está formado por una red de fibras de colágeno de un diámetro aproximado de 60 nm y presenta

un alto grado de porosidad, con tamaños de poro superior a un micrón, característico de la estructura de un hidrogel. Esta estructura muestra que el ensamblado de las moléculas de colágeno para formar las fibras se realizó exitosamente y que el material obtenido no es un precipitado proteico amorfo. En la **figura 5b** pueden observarse lo que asemejarían ser las estriaciones transversales características de las fibras de colágeno. Esta observación es confirmada en la **figura 5c** correspondiente a la microscopía TEM del gel de colágeno. En dicha figura se observan las fibras de colágeno dispersas y en cada una de ellas puede confirmarse la presencia de las estriaciones transversales características de estas fibras.

En la **figura 6** pueden observarse las nanopartículas de silicio obtenidas por el método de Stöber sin modificar (**figura 6a**), con modificación $-NH_2$ (**figura 6b**) y con modificación $-SH$ (**figura 6c**). Puede evidenciarse que la derivatización realizada no cambia el tamaño ni la forma de las nanopartículas obtenidas. En todos los casos el tamaño promedio de las SiNP fue de 250 ± 30 nm. Paralelamente las mediciones de potencial zeta arrojaron valores de: SiNP-OH= $-74,02 \pm 4,04$ mV, SiNP-NH₂= $20,82 \pm 3,72$ mV y SiNP-SH= $-50,38 \pm 4,93$ mV

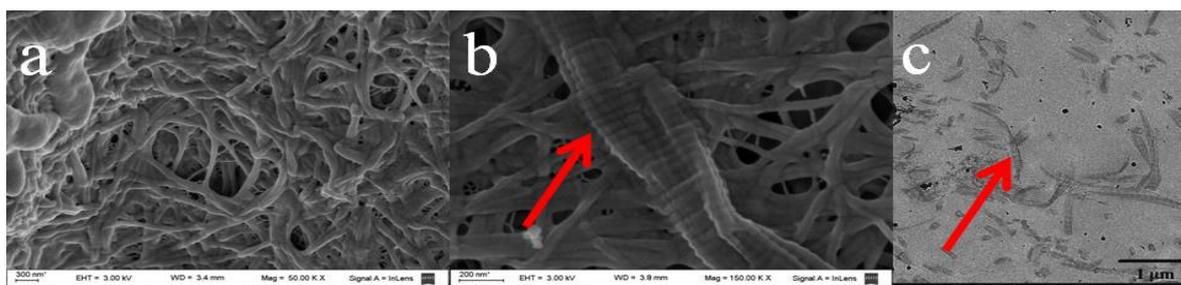


Figura 5: a) Imagen SEM del hidrogel de colágeno. b) detalle de las estriaciones del colágeno vistas por microscopía SEM. c) Imagen TEM del hidrogel de colágeno donde se aprecian las estriaciones características de la molécula.

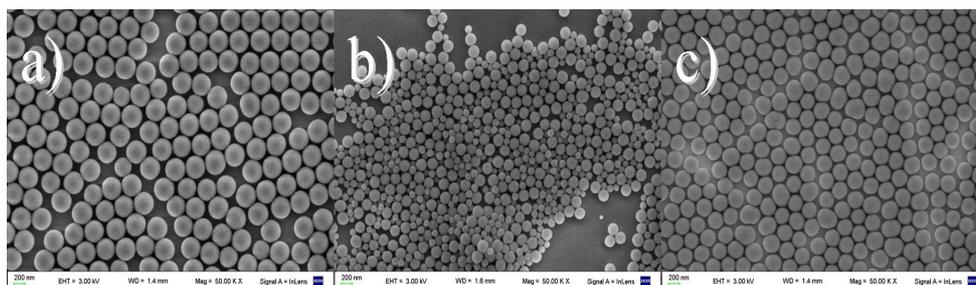


Figura 6: Imagen SEM de las a) SiNP-OH b) SiNP-NH₂ y c) SiNP-SH.

En la **figura 7** se observa una imagen SEM de uno de los nanocompuestos obtenidos. Puede observarse claramente a diferentes aumentos que las nanopartículas se encuentran atrapadas dentro de la red de colágeno. Esta fotografía en particular es del nanocompuesto obtenido a partir de SiNP-OH y colágeno.

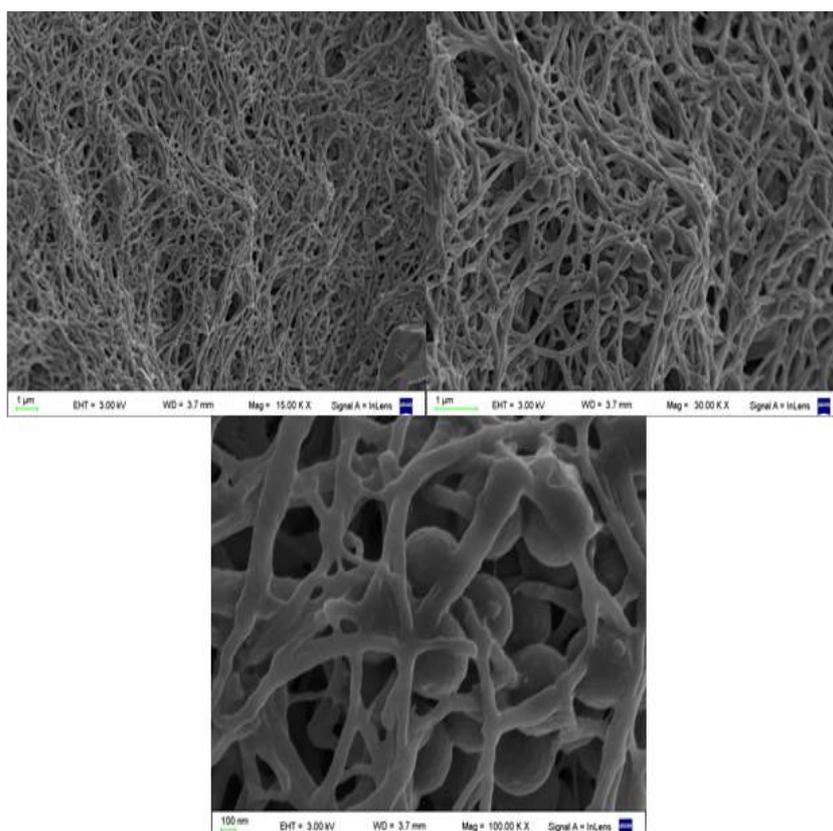


Figura 7: Imagen SEM del nanocompuesto SiNP-OH-colágeno a diferentes aumentos.

Espectroscopía IR

En la **figura 8** podemos observar el espectro FTIR del colágeno sin modificar. Las bandas principales de absorción son las de amida A ($3400\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$), amida I 1658 cm^{-1} , 1552 cm^{-1} y 1240 cm^{-1} . Que en este caso haya un corrimiento hacia números menores de onda puede ser atribuido a la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos N-H y otros grupos que estabilizan la estructura de la hélice.

Las bandas en la región entre 1200 y 1350 cm^{-1} reflejan la estructura conformacional del colágeno (región de huellas dactilares), porque cambios en estas bandas se atribuyen al tripéptido (Gly-Pro-Hyp) $_n$ del colágeno. La asignación de bandas de esta región fue: deformación $\text{-CH}_2\text{-}$ a cm^{-1} , torsión $\text{C}(\text{CH}_2)_2$ a 1315 cm^{-1} , estiramiento de CN y deformación NH a 1240 cm^{-1} ¹⁸⁷.

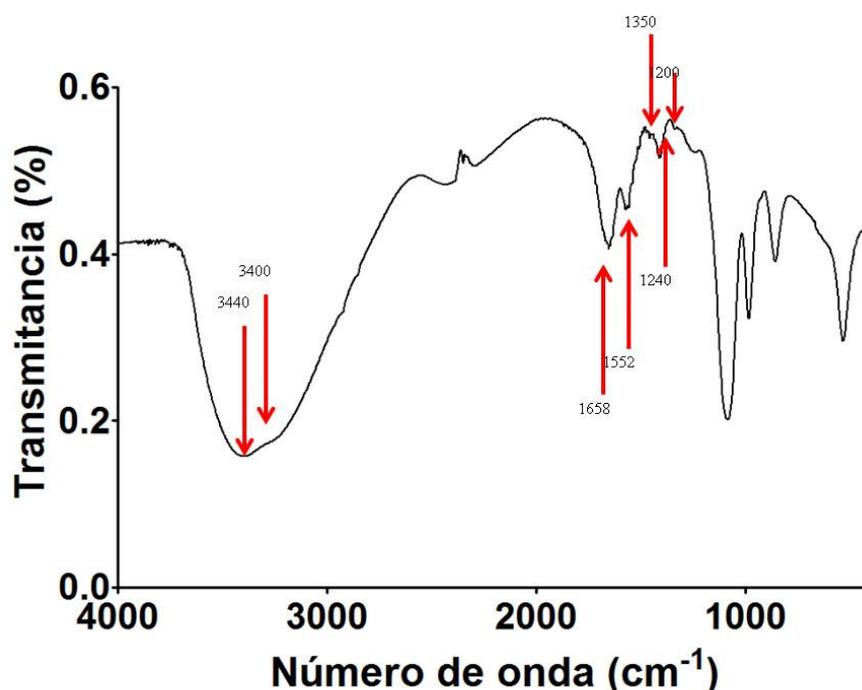


Figura 8: FTIR del hidrogel de colágeno tipo I extraído de cola de rata.

Efecto de pH en la adsorción del colorante negro de Remazol

El efecto del pH en la adsorción del colorante en los hidrogeles de colágeno, las nanopartículas con las diferentes derivatizaciones y los nanocompuestos con las diferentes nanopartículas incluidas en el hidrogel se estudiaron utilizando soluciones de concentración 10 o 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Remazol black en diferentes soluciones de fosfato de potasio 200 mM ajustadas a pH 5,00, 7,00 y 9,00 que fueron enfrentadas a los materiales a evaluar.

Como puede observarse en la **figura 9**, la mayor adsorción a los hidrogeles de colágeno ocurre a pH 9,00, mientras que a pH 5,00 y 7,00 ocurre en menor medida.

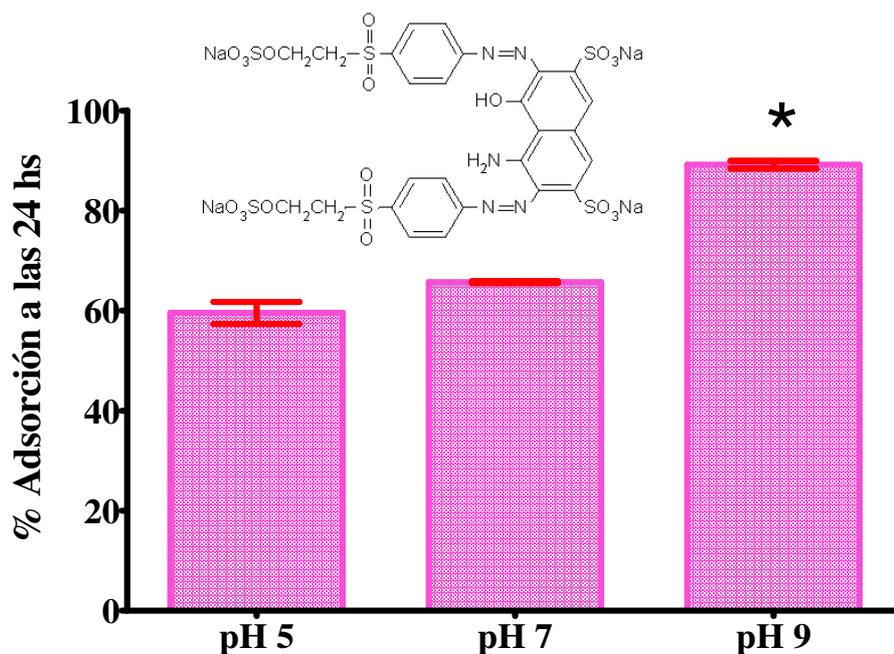


Figura 9: Porcentaje de adsorción al hidrogel de colágeno a las 24 hs. La concentración de RB utilizada en todos los casos fue de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se presentan como la media de triplicados \pm SD.

*muestra diferencia estadísticamente significativa $p < 0,005$

En la **figura 10** puede observarse que sólo hay adsorción significativa del colorante a pH 9,00 cuando se enfrentan el colorante RB y las SiNP-SH. A pH 5,00 la adsorción es nula para todos los tipos de nanopartículas ensayados.

En la **figura 11** se observa la adsorción del colorante RB a los diferentes nanocompuestos. Puede observarse que la mayor adsorción ocurre a pH 9,00 en todos los casos, y que no se presentan diferencias significativas entre los diferentes nanocompuestos a este pH.

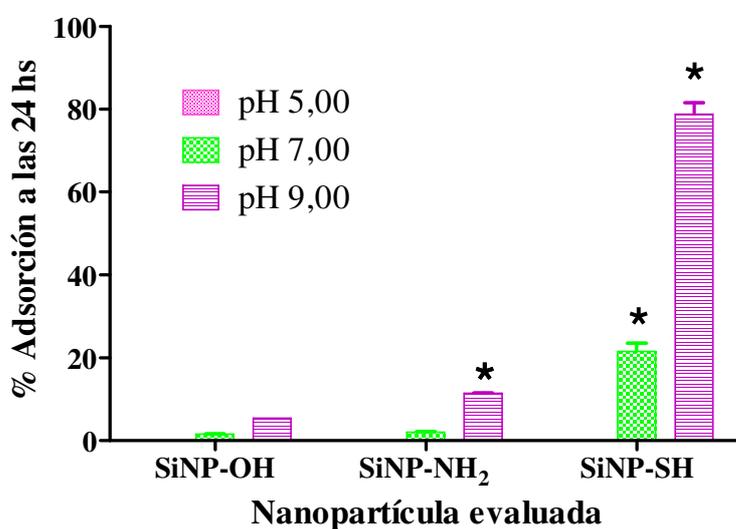


Figura 10: Porcentaje de adsorción a los diferentes tipos de nanopartículas a las 24 hs. La concentración de RB utilizada en todos los casos fue de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se presentan como la media de triplicados \pm SD. *muestra diferencia estadísticamente significativa $p < 0,005$

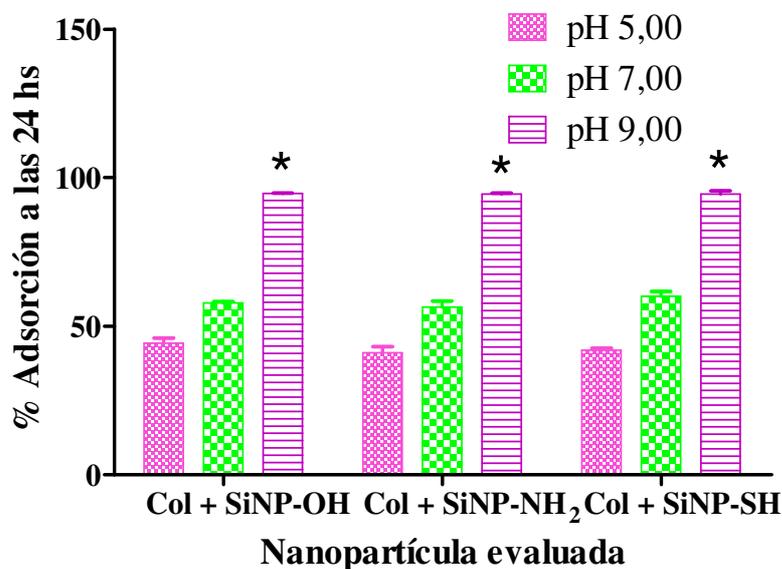


Figura 11: Porcentaje de adsorción a los diferentes tipos de nanocompuestos a las 24 hs. La concentración de RB utilizada en todos los casos fue de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se presentan como la media de triplicados \pm SD. *muestra diferencia estadísticamente significativa $p < 0,005$

Capacidad máxima de adsorción

Para realizar la comparación entre las diferentes capacidades máximas de los distintos materiales analizados se tomó el parámetro q_m del ajuste de Langmuir (**tabla 1**). Puede observarse claramente que el uso de nanocompuestos no mejora la adsorción de los colorantes al hidrogel de colágeno, por lo que se siguió trabajando y profundizando el análisis con el hidrogel de colágeno sin modificar. Se cree que las nanopartículas ocuparon sitios fundamentales de interacción entre el colorante y el colágeno, al igual que el efecto del relleno podría haber impedido la llegada del colorante a las fibras de colágeno del hidrogel.

Tabla 1: Capacidad máxima de adsorción de Remazol black a pH=9,00 de los diferentes materiales ensayados

	Hidrogel colágeno	SiNP-OH	SiNP-NH2	SiNP-SH	Colágeno +SiNP-OH	Colágeno + SiNP-NH2	Colágeno + SiNP-SH
q_m ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	1043	67,46	124,1	285,7	301,0	286,6	279,5
\pm SD	$\pm 42,7$ *	$\pm 2,6$	$\pm 16,7$	$\pm 9,6$	$\pm 16,7$	$\pm 16,6$	$\pm 19,4$

*muestra diferencia estadísticamente significativa $p < 0,005$

Considerando que el RB posee carga negativa en todo el rango de pH evaluado y teniendo en cuenta también que la molécula de colágeno a pH entre 6,50 y 9,00 presenta una densidad de carga positiva aproximada de +38mV¹⁷¹ y que a pH 5,00 su densidad de carga positiva es cercana a +100mV, parecería contradictorio encontrar mayor adsorción de colorante a pH 9,00 que a pH 5,00. Esta aparente contradicción puede explicarse por la capacidad que poseen los colorantes reactivos como el RB de formar uniones covalentes con los grupos amino de las proteínas. Esta unión ocurre mediante una adición de Michaelis entre el grupo vinilsulfona del colorante y los grupos amino o hidroxilo libres de los aminoácidos presentes en la proteína¹⁸⁸. En la **figura 12** se muestran los resultados obtenidos al comparar el % de adsorción a diferentes pH de una solución de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RB. Puede observarse que una vez hidrolizados o bloqueados los grupos reactivos del colorante, la adsorción del mismo al colágeno disminuye notablemente, dando apoyo a la idea de la existencia de cierto grado de participación de uniones covalentes entre el sustrato (negro de Remazol) y el sorbente (colágeno).

Teniendo en cuenta la estructura química del colágeno, encontramos que éste posee relativamente pocos grupos amino y oxhidrilo libres. Sólo el 14% de los aminoácidos son hidroxiprolina cuyo grupo –OH permitiría que ocurra la reacción covalente entre el colorante y el colágeno, lo que explicaría el aumento de adsorción de RB al colágeno a este pH. La estructura aminoacídica de la molécula de colágeno no deja muchos grupos amino libres capaces de reaccionar con el colorante (**figura 13**). En caso de ser así, esta diferencia sería mayor al porcentaje observado. Podemos observar también que la unión covalente no es la única manera en la que el RB interactúa con el colágeno, que es evidente en la adsorción presentada a pH 5,00, 7,00 y con el RB hidrolizado a todos los pH testeados. En un estudio realizado por Qiang *et al.*, que utiliza colágeno poliaminado, puede observarse el incremento que ellos observaron en la adsorción de colorantes ácidos no reactivos a medida que aumentaba el porcentaje de restos amino libres en el colágeno¹⁸⁹. En caso de realizar la misma modificación en el colágeno, sería lógico suponer el aumento de la diferencia de adsorción a pH 9,00 con respecto a los otros pH estudiados en la presente tesis.

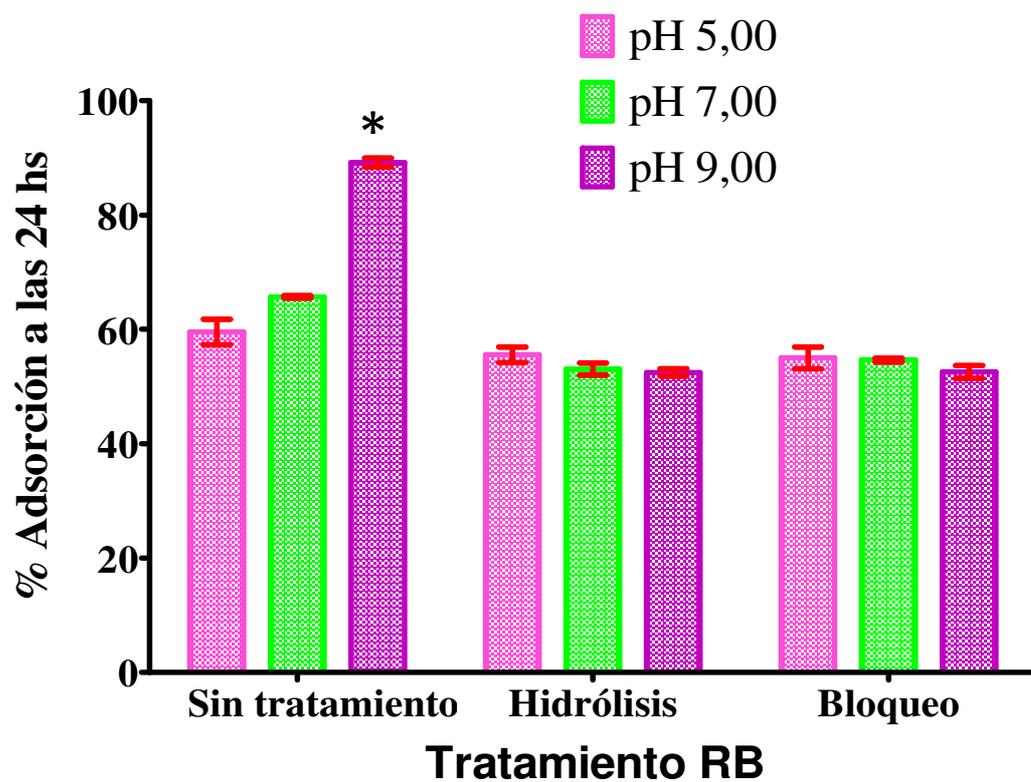


Figura 12: Diferencias en la adsorción de RB, RB hidrolizado y RB bloqueado a diferentes pH. La concentración de colorante en todos los casos fue de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se presentan como la media de triplicados \pm SD. *muestra diferencia estadísticamente significativa $p < 0,005$

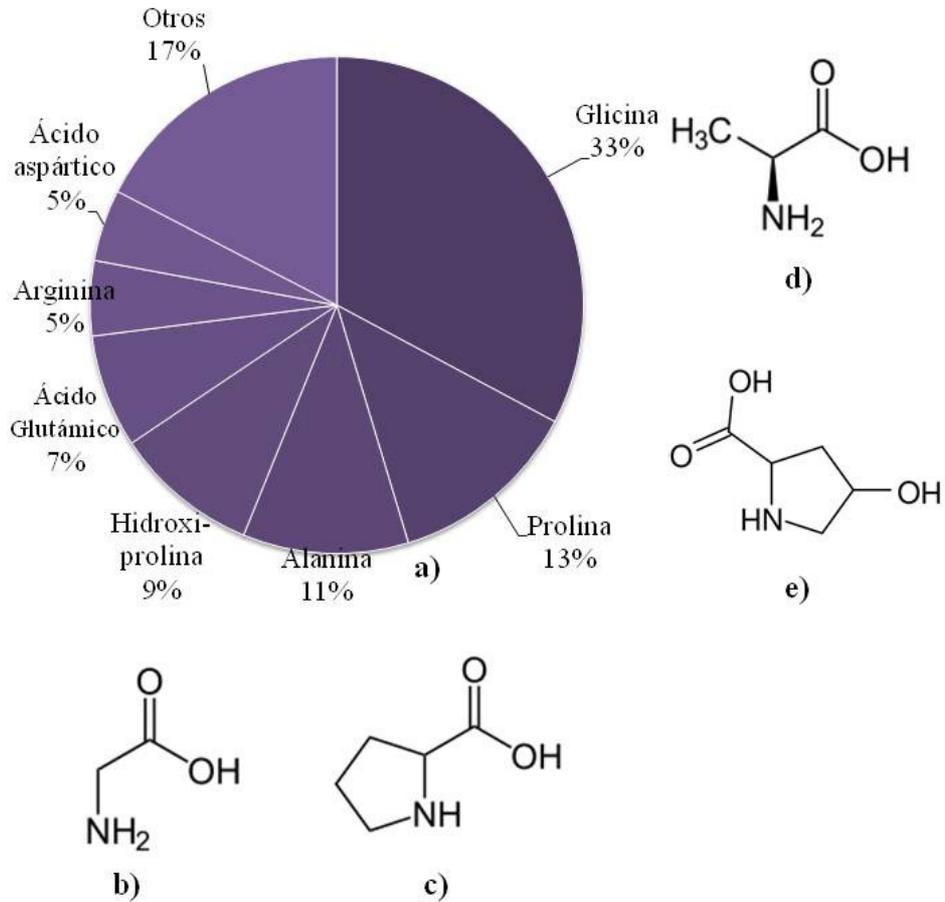


Figura 13: a) composición porcentual aminoacídica de la molécula de colágeno. Estructura de los aminoácidos principales b) glicina, c) prolina, d) alanina, e) hidroxiprolina

Cinética de adsorción

La ecuación de pseudo primer orden es la más simple y la más utilizada para describir la adsorción de un soluto en solución líquida a un adsorbente. La ley que define la ecuación de primer orden es:

$$dq_t / dt = k_1 (q_e - q_t) \quad (2)$$

donde k_1 es la constante de adsorción de pseudo primer orden (min^{-1}), q_e y q_t ($\mu\text{g mg}^{-1}$) denotan la cantidad de colorante adsorbido en el equilibrio y en el tiempo (t , min) respectivamente. Al integrar la ecuación 2 se obtiene

$$q_t = q_e (1 - e^{-k_1 t}) \quad (3)$$

Los valores de k_1 y q_e se evaluaron por regresión no lineal del gráfico q_t versus t para el colorante.

Asimismo, como se ha observado en otros trabajos, la adsorción de colorantes y/o metales en materiales porosos puede seguir una ley de pseudo segundo orden. La ecuación de pseudo segundo orden basada en el equilibrio de adsorción, puede ser expresada de la siguiente manera en el equilibrio:

$$dq_t / dt = k_2 (q_e - q_t)^2 \quad (4)$$

donde k_2 ($\text{mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) es la constante de adsorción de pseudo segundo orden. La integración de dicha ecuación es:

$$q_t = (k_2 q_e^2 t) / (1 + k_2 q_e t) \quad (5)$$

Los valores de k_2 y q_e también fueron evaluados por regresión no lineal de q_t versus t ^{190, 191}.

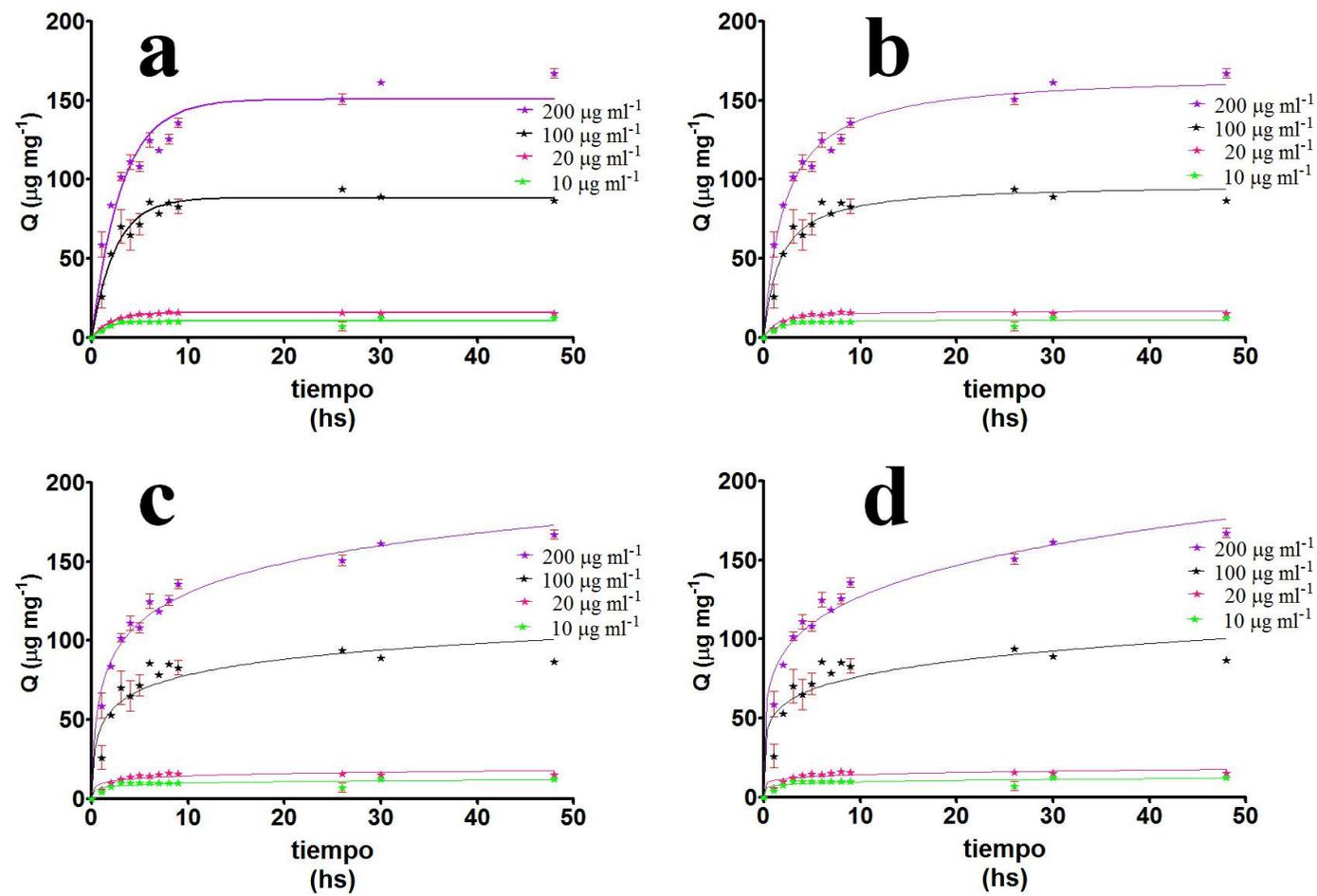


Figura 14: Cinética de adsorción de RB sin hidrolizar en función del tiempo a pH 9,00. Se presenta el gráfico obtenido utilizando un ajuste de: a) pseudo primer orden, b) pseudo segundo orden, c) Elovich, d) Freundlich modificada. Los resultados se presentan como el valor promedio \pm SD de triplicados.

En la actualidad pueden encontrarse varios trabajos que demuestran que la biosorción puede ajustarse mejor utilizando el modelo de pseudo segundo orden. Este mejor ajuste a la cinética de pseudo segundo orden se atribuye generalmente a que el modelo de pseudo primer orden no contempla el retraso que sufren los procesos de sorción en los biomateriales. El retraso mencionado puede ser causado por la presencia de una capa límite externa o resistencia externa que controla el principio del proceso de sorción¹⁹⁰. Como los valores de ajuste en este caso fueron parecidos, es posible que este factor no exista en los hidrogeles de colágeno debido a la alta hidratación y porosidad de los mismos.

Si consideramos que $q_t = qt$ a $t = t$ y que $q_t = 0$ a $t = 0$, la ecuación de Elovich se transforma en

$$Q_t = 1/\beta * \ln[1 + (\alpha\beta t)] \quad (6)$$

donde la constante α ($\text{mg g}^{-1}\text{h}^{-1}$) es la tasa inicial de adsorción y β (g mg^{-1}) se relaciona con la cantidad de superficie cubierta y la energía de activación involucrada en el proceso de quemisorción. Esta ecuación asume que los sitios de adsorción del sorbente son heterogéneos y por lo tanto exhiben diferentes energías de activación para la quemisorción¹⁹⁰.

El modelo de Freundlich modificado, desarrollado originalmente por Kuo y Lotse está descrito por

$$q_t = k_F * C_0 * t^{1/m} \quad (7)$$

donde k_F ($\text{L g}^{-1} \text{h}^{-1}$) es la constante aparente de adsorción, C_0 (mg L^{-1}) es la concentración inicial de sorbato y m (adimensional) es la constante de Kou-Lotse. Este modelo puede

describir procesos de difusión controlados por la superficie, en particular, puede describir cinéticas controladas por difusión intra partícula cuando m se aproxima a 2¹⁹⁰.

La cinética de decoloración es rápida, y el ajuste es dependiente de la masa inicial de colorante agregado (**figura 14**). A mayor masa inicial, parecería haber menor efecto de la capa límite, evidenciándose esto en el cambio en el valor de m a medida que la masa inicial de colorante agregada es menor. Cuando el parámetro m en la ecuación de Freundlich modificada tiende a 2, la ecuación se transforma en la ecuación que describe el modelo de difusión intrapartícula, que habla de esta capa límite que existe en los materiales nano y microporosos. Cuando la masa inicial es muy alta, este efecto parece ser despreciable (**tabla 2**).

Tabla 2: Parámetros de ajuste y constantes obtenidas de los ajustes de pseudo primer y segundo orden para la cinética del RB a pH 9,00 y los hidrogeles de colágeno.

	Pseudo 1° orden			Pseudo 2° orden			Elovich		Freundlich modificada			
Cc RB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	q_e ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	k_1 ($\text{mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	R^2	q_e ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	k_2 ($\text{mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	R^2	β ($\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$)	α ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	R^2	k_F ($\text{L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	M	R^2
	$\pm \text{SD}$	$\pm \text{SD}$		$\pm \text{SD}$	$\pm \text{SD}$		$\pm \text{SD}$	$\pm \text{SD}$		$\pm \text{SD}$	$\pm \text{SD}$	
200	150,6	0,3206	0,9287	167,1	0,02789	0,9998	0,03658	317,0	0,9771	314,4	4,797	0,9579
	$\pm 4,3$	$\pm 0,03$		$\pm 3,17$	$\pm 3 \times 10^{-3}$		$\pm 2 \times 10^{-3}$	$\pm 59,91$		$\pm 11,83$	$\pm 0,32$	
100	88,34	0,4082	0,9401	97,16	0,006177	0,9295	0,06991	341,4	0,8582	206,7	5,834	0,8234
	$\pm 2,4$	$\pm 0,04$		$\pm 3,4$	$\pm 1 \times 10^{-3}$		$\pm 0,01$	$\pm 22,29$		$\pm 16,80$	$\pm 1,05$	
20	15,92	0,4998	0,9867	17,34	0,04622	0,9295	0,4690	205,3	0,8586	42,50	7,512	0,8302
	$\pm 0,17$	$\pm 0,02$		$\pm 0,42$	$\pm 7 \times 10^{-3}$		$\pm 0,08$	$\pm 18,93$		$\pm 2,84$	$\pm 1,50$	
10	10,51	0,6623	0,7714	11,52	0,08676	0,7609	0,7380	224,9	0,7195	29,43	7,689	0,7071
	$\pm 0,46$	$\pm 0,15$		$\pm 0,68$	0.03		$\pm 0,20$	$\pm 36,8$		$\pm 2,76$	$\pm 2,2$	

A partir de estos estudios se pudo establecer que el equilibrio de adsorción se alcanza con seguridad a las 24 horas.

Isotermas de adsorción

Para ampliar el análisis del material elegido como óptimo para la adsorción de azo colorantes se realizaron isotermas de adsorción del colorante a diferentes pH y se las analizó aplicando los modelos de ajuste de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich y Temkin.

En la **figura 15** puede observarse que la capacidad máxima de adsorción del colorante es superior a pH 9,00 en comparación con lo que ocurre a pH 5,00 y 7,00.

Los modelos de Langmuir y Freundlich se han utilizado ampliamente para ajustar los datos de equilibrio en la biosorción. El primero de ellos toma como premisa que la interacción entre el sorbato y el sorbente es homogénea, con sitios de unión homogéneos hasta que se completa una monocapa en la superficie del sorbente. El segundo, en cambio, ajusta mejor cuando los sitios de adsorción son heterogéneos y poseen diferentes interacciones. Las ecuaciones que describen a ambas isotermas son

Langmuir:

$$q_{eq} = \frac{q_m K_a C_{eq}}{1 + K_a C_{eq}} \quad (8)$$

Freundlich

$$q_{eq} = k C_{eq}^n \quad (9)$$

donde C_{eq} es la concentración del colorante en el equilibrio, K_a es la constante de equilibrio, q_m es la capacidad máxima de adsorción ($\mu\text{mol g}^{-1}$) y k y n son parámetros arbitrarios.

Otra ecuación que apareció aplicada en sus orígenes a gases pero que puede ser aplicada a biosorbentes es la de Dubinin-Radushkevich (DR). Este modelo asume que los poros se llenan de moléculas adsorbidas de acuerdo a campos de fuerza de adsorción en los microporos y las interacciones con las moléculas adsorbidas. Al aplicar la ecuación a la adsorción en fase sólida, la cantidad adsorbida correspondiente a cualquier concentración de sorbato se asume que sigue una función gaussiana del potencial de Polanyi (ϵ):

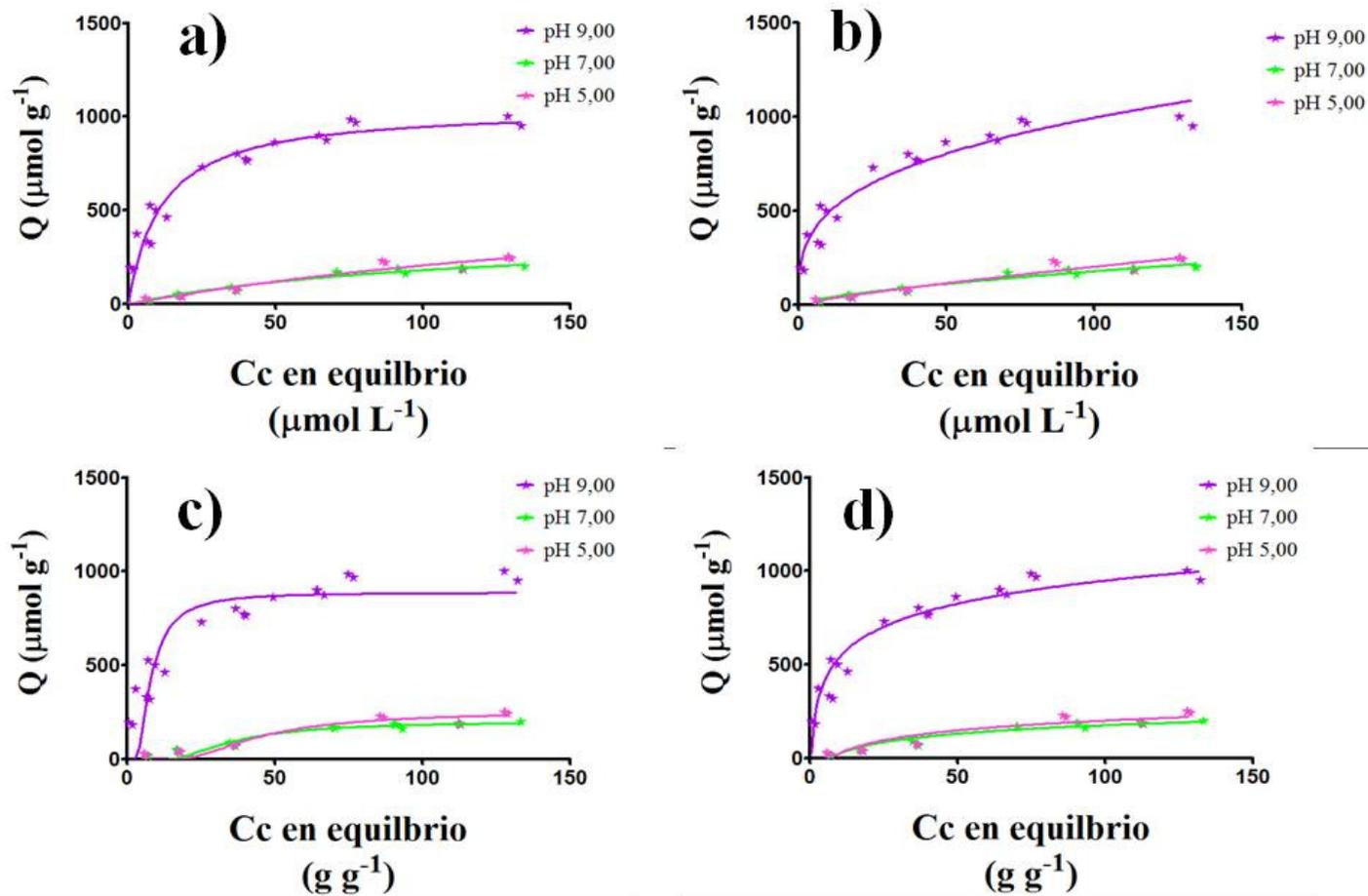


Figura 15: Isothermas de adsorción de RB a colágeno a diferentes pH. Se presenta el gráfico obtenido utilizando un ajuste de: a) Langmuir, b) Freundlich, c) Dubinin Radushkevich, d) Temkin.

$$q_{eq} = q_{DR} e^{-k_{DR} \varepsilon^2} \quad (10)$$

donde

$$\varepsilon = RT \ln \left(1 + \frac{1}{C_{eq}} \right) \quad (11)$$

Donde q_{DR} es la capacidad de adsorción máxima, k_{DR} ($\text{mol}^2 \text{kJ}^{-2}$) es una constante relacionada a la energía de adsorción y C_{eq} es la concentración en el equilibrio (g g^{-1})

La isoterma de Temkin contiene un factor que explícitamente tiene en cuenta las interacciones sorbato-sorbente. Si se ignoran los valores de concentración extremadamente altos y bajos, el modelo asume que el calor de adsorción (que es función de la temperatura) de todas las moléculas de una capa va a decrecer linealmente en lugar de logarítmicamente a medida que se completa cada capa ¹⁹².

$$q_e = RT/b * \ln(A_T * C_e) \quad (12)$$

$$B = RT/b \quad (13)$$

$$q_e = B \ln A_T + B \ln C_e \quad (14)$$

Donde A_T es la constante de unión en equilibrio de Temkin (L g^{-1}), b_T es la constante de Temkin, R es la constante universal de los gases ($8.314 \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), T es esta temperatura (K) y B es una constante relacionada con el calor de sorción (J mol^{-1}).

Tabla 3: Parámetros de ajuste y constantes obtenidas de los ajustes de las isotermas aplicadas a RB a diferentes pH a los hidrogeles de colágeno.

Modelo	Parámetro	Hidrogel colágeno pH 9,00		Hidrogel colágeno pH 7,00		Hidrogel colágeno pH 5,00	
		Valor	R ²	Valor	R ²	Valor	R ²
Langmuir	q_m (μmol/g)	1052,0	0,9300	383,8	0,9650	709,2	0,9359
	± SD	± 43,1		± 50,0		± 292,2	
	K_a (L/mmol)	11,24		111,40		243,60	
	± SD	± 1,86		± 26,04		± 142,90	
	ΔG^0 (kJ/mol)	-5,990		-11,700		-13,600	
Freundlich	K	2015,0	0,9317	843,8	0,9454	1314,0	0,9297
	± SD	± 158,0		± 121,9		± 292,6	
	N	0.3088		0,6742		0,8119	
	± SD	± 0,0251		± 0,0586		± 0,0954	
Dubinin-Radushkevich	q_{DR} (μmol/g)	888,2	0,7680	202,9	0,9150	257,5	0,9197
	± SD	± 41,8		± 9,7		± 14,3	
	K_{DR} (mol ² /kJ ²)	8,70		162,70		255,90	
	± SD	± 1,96		± 30,40		± 48,93	
Temkin	E_{DR} (kJ/mol)	42,15		20,14		22,69	
	K (mL/mg)	177,20	0,9194	65,21	0,9287	75,68	0,8433
	± SD	± 12,36		± 4,38		± 8,43	
	B (J/mol)	2,1160		0,1517		0,1447	
	± SD	± 0,5994		± 0,0213		± 0,0330	

La existencia de interacciones mixtas a pH 9,00 parecería ser la causa por la cual la ecuación de DR a ese pH no posee un ajuste óptimo y que éste sin embargo mejore a medida que el pH favorece interacciones no covalentes, lo que implicaría que el tipo de interacción sería más homogénea (**tabla 3**).

Al existir relativamente pocos sitios de interacción covalente (reflejado esto en la poca diferencia observada en la adsorción del RB sin hidrolizar al colágeno a diferentes pH), es

lógico pensar que las diferencias de ajuste encontradas entre el modelo de Langmuir y el de Freundlich sean pequeñas comparando las diferencias observadas con otros modelos.

Por lo tanto, puede decirse que en general el mejor ajuste es el modelo de Freundlich, lo que sugiere la existencia de sitios heterogéneos de interacción.

Si la superficie del sorbente es heterogénea pero consideramos a las diferentes sub regiones homogéneas, puede calcularse el promedio del valor de la energía libre utilizando la ecuación de Dubinin Radushkevich:

$$E_{DR}=(2K_{DR})^{-1/2} \quad (15)$$

donde E_{DR} es la energía libre media de adsorción (kJ/mol). La energía libre estándar (ΔG^0) del proceso de adsorción puede ser calculada relacionando la constante de equilibrio (K_a) de la ecuación de Langmuir mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G^0=-RT \ln K_a \quad (16)$$

En la **tabla 3** se muestra el valor de ΔG^0 para cada condición estudiada, donde se observa claramente que el proceso de adsorción es espontáneo, arrojando un resultado que indica que la espontaneidad de la reacción está inversamente relacionada con la posibilidad de formación de un enlace covalente entre el colorante y el colágeno.

En los procesos de adsorción donde prevalece la quimisorción la magnitud del parámetro E_{DR} se encuentra en el rango de 8-16 kJ mol⁻¹. Los valores más bajos se relacionan a procesos de fisisorción y cuando estos valores son aún mayores a 16 kJ mol⁻¹ se relacionan con procesos de coordinación o reacciones químicas (formación de enlaces covalentes)¹⁹⁰.

¹⁹². Sumado a esto, cuando analizamos el parámetro n de la isoterma de Freundlich aplicada a sistemas heterogéneos y, especialmente para compuestos orgánicos, el valor de n es una medida de la intensidad de adsorción o de la heterogenicidad de la superficie estudiada, siendo más heterogénea a medida de que ese valor se aproxima a 0 ¹⁹³. Si consideramos que la fuerza de unión del colorante a los diferentes aminos y oxhidrilos de los diferentes aminoácidos del colágeno es de diferente magnitud, podemos observar cómo aumenta el valor de n a medida que nos alejamos de las condiciones óptimas de la ocurrencia de la reacción de adición de Michaels.

Correlación estructura-adsorción

Se evaluó la adsorción de otros colorantes (rojo Congo y marrón de Bismarck) al hidrogel de colágeno. Estos colorantes no son reactivos y cada uno presenta diferencias de estructura química. La concentración utilizada de cada uno de ellos fue $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se muestran en la **figura 16**.

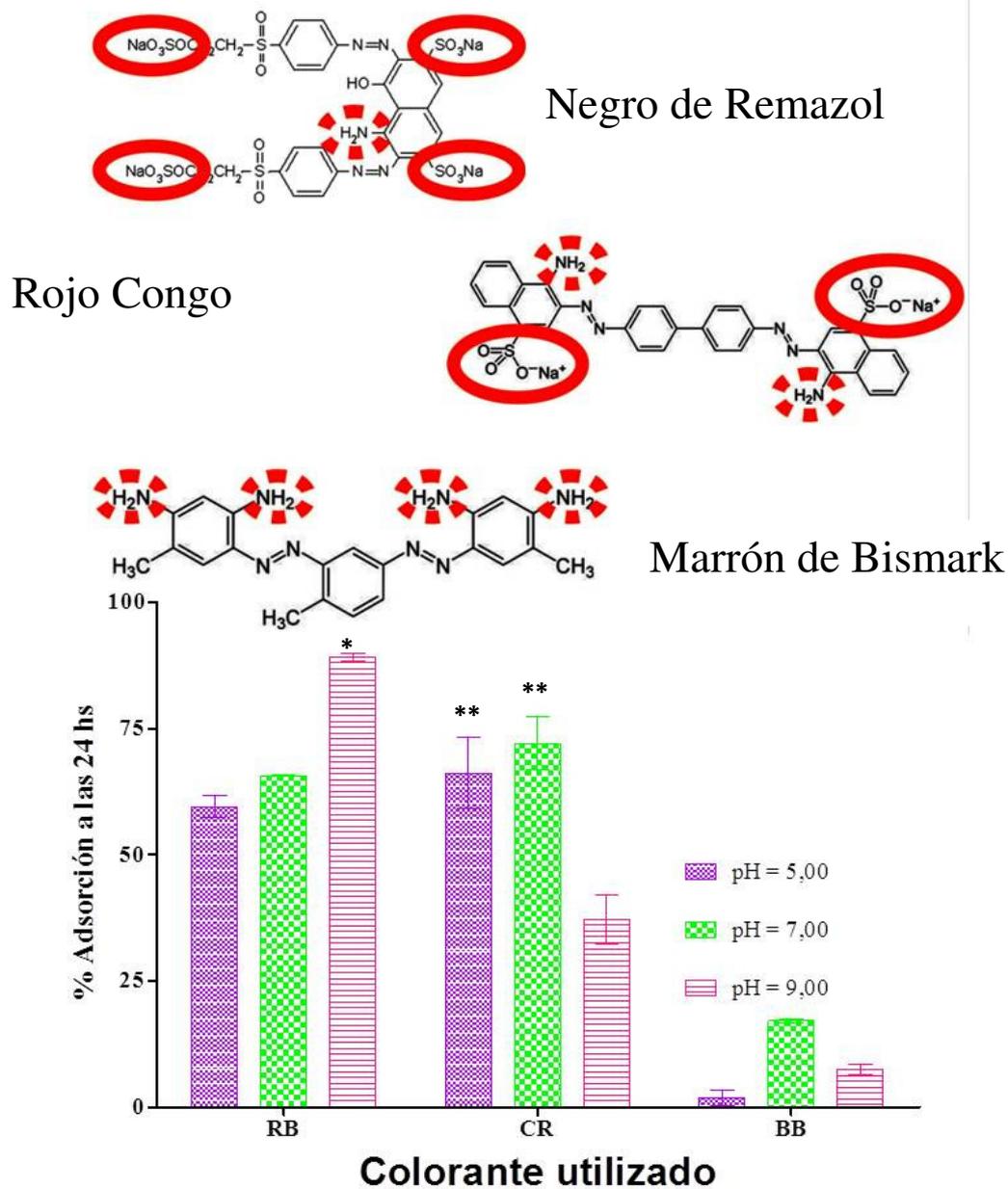


Figura 16: a) Estructura de los colorantes RB, RC y BB. b) % adsorción de los azo colorantes estudiados luego de 24 horas. Concentración de los colorantes: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados se presentan como el valor promedio \pm SD de triplicados. *muestra diferencia estadísticamente significativa $p < 0,005$. ** muestra diferencia estadísticamente significativa $p < 0,005$

Como puede observarse, la capacidad máxima de adsorción para el RB ocurre a pH 9,00. Considerando lo visto en la introducción, a este pH la adición de Michaelis del colorante reactivo está favorecida. A pH ácido y neutro esta reacción está desfavorecida, por lo que la interacción se produciría por interacciones no covalentes. La interacción electrostática parecería ser la responsable del fenómeno observado, porque a los pH estudiados el colágeno siempre tiene carga positiva y el RB posee cargas negativas debidas a sus grupos sulfónicos.

Por otro lado, al ser el RC y el BB colorantes no reactivos, la casi nula absorción de BB y la mayor adsorción del RC a pH=5,00 se corresponde con efectos electrostáticos del colágeno a ese pH. La adsorción de RC a pH=9,00 puede explicarse por la carga aportada por los grupos sulfónicos.

Disminución del peso y el volumen del gel una vez finalizado el tratamiento de adsorción

Una vez finalizado el proceso de adsorción, se secaron los geles conteniendo colorante a 100 °C y se registró la pérdida de peso y la disminución de volumen del mismo en función del tiempo. Las medidas de volumen inicial y final de los geles se muestran en la **figura 17a**, al igual que la disminución del peso en función del tiempo (**figura 17 b**). Las imágenes de la progresión de los geles. La **figura 7c_i** muestra al hidrogel recién obtenido; la **figura 7c_{ii}** muestra al hidrogel una vez enfrentado al colorante y la **figura 7c_{iii}** muestra al hidrogel luego del proceso secado. Estas imágenes son contundentes al mostrar la disminución de volumen del gel una vez terminado el tratamiento.

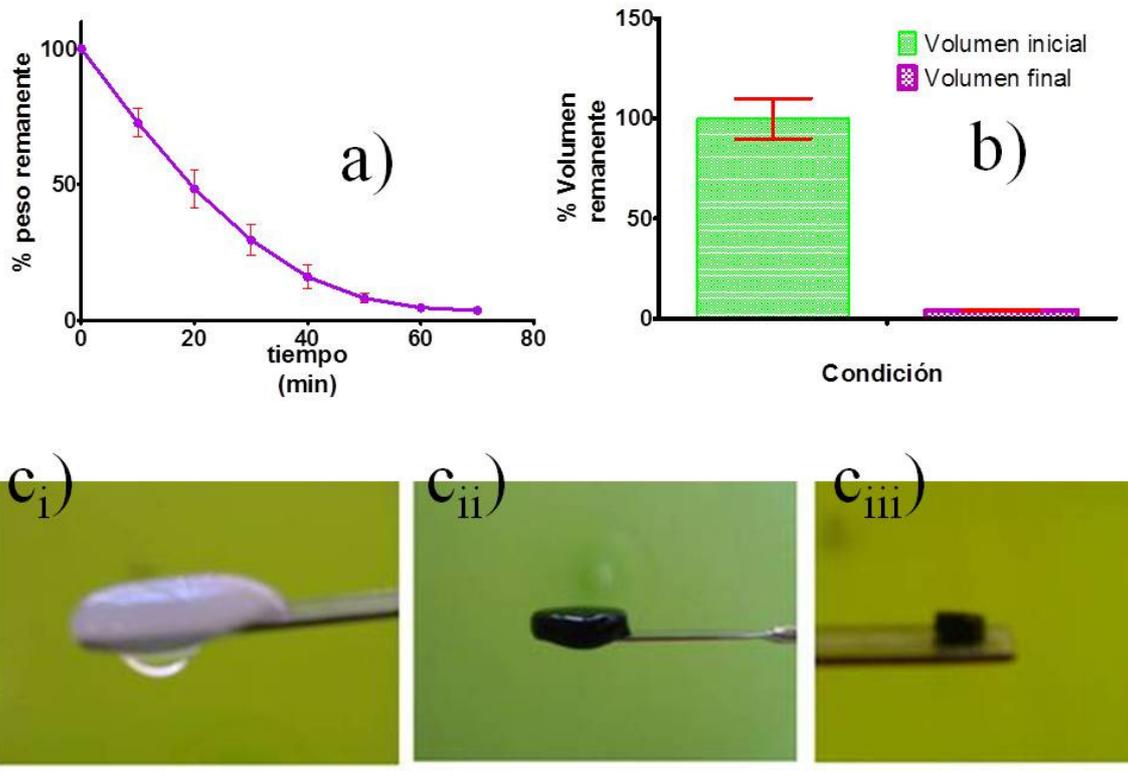


Figura 17: a) Porcentaje de pérdida de peso de los geles cargados con colorante en función del tiempo. Se consideraron 10 geles, cada uno con un peso inicial aproximado de 0,65 g. b) porcentaje de volumen remanente en el tiempo. Se consideraron 10 geles, cuyo volumen inicial fue aproximadamente 90 cm³ c_i) Imagen del gel sin tratar, c_{ii}) gel luego de enfrentarlo al colorante y c_{iii}) gel luego del proceso de secado. En los gráficos a) y b) se muestra el promedio de 10 medidas \pm SD

Conclusiones

El uso de geles de colágeno para su utilización en remediación de azo colorantes mostró buen rendimiento en su uso para la adsorción de los mismos. La adsorción demostró ser dependiente del pH. Se estimaron los parámetros cinéticos y termodinámicos. Los datos

mostraron que se trata de un proceso espontáneo que cinéticamente sigue un proceso de adsorción de pseudo segundo orden.

Las isothermas de equilibrio ajustaron bien al modelo de Freundlich y la máxima capacidad de adsorción de la monocapa según el ajuste de Langmuir arrojó un valor de $1052 \mu\text{mol g}^{-1}$ de RB sin hidrolizar a pH 9,00. Asimismo, la energía de adsorción media obtenida a partir de la isoterma de Dubinin-Radushkevich reveló que el proceso de adsorción podría ser debido a quemisorción a pH 9,00.

En el caso del presente material logramos REDUCIR la generación de residuos porque el material una vez utilizado en la adsorción de colorantes puede ser secado y alcanzar una reducción superior al 95% en peso y volumen. De esta forma tomamos acciones para reducir la producción de objetos susceptibles de convertirse en residuos, como el colágeno ya utilizado como adsorbente. Esto lleva a su vez a la disminución del espacio del almacenamiento del residuo de adsorción generado, llevando a la reducción de costos. Por otro lado se reduce también la emisión de residuos de otras industrias que produzcan colágeno como producto de desecho.

En segundo lugar se logró REUTILIZAR un determinado producto (colágeno, generalmente descartado como desecho) para darle una segunda vida. Particularmente se le dio un uso diferente, que es su aplicación para solucionar problemas ambientales, en este caso contaminación de agua. Al ser un material de descarte, su costo es bajo, por lo que el costo de este sistema de adsorción de azo colorantes también lo es.

RECICLAR al colágeno es fundamental si consideramos el bajo costo del sorbente, así como también la disminución en la generación de residuos de aquellas industrias donde el colágeno es un producto de desecho.

En conclusión, se propone el uso de colágeno de tipo I extraído de productos de desecho para ser utilizado en el atrapamiento y remoción de azo colorantes de cursos de agua. El proceso es rápido, el adsorbente (colágeno) es biodegradable, y los colorantes azoicos no sufren ruptura que puedan originar productos más tóxicos que el colorante sin degradar. La unión del colorante al colágeno es lo suficientemente fuerte/estable como para que no ocurra pérdida de colorante. La capacidad de unión del colorante al colágeno es alta, al igual que la velocidad de unión.

Una vez producida la reacción, la reducción de volumen y peso del hidrogel de colágeno es superior a un 95% lo que permite una gran disminución en los costos de transporte y almacenamiento de los residuos previo a su disposición final

Conclusión general

Conclusión general

El impacto de los residuos generados por la actividad del ser humano sobre el ecosistema ha sido motivo en los últimos años de innumerables esfuerzos en busca de soluciones. En este sentido, una de las áreas que más crecimiento experimentó es el desarrollo de nuevos materiales para ser utilizados en remediación ambiental para la remoción de metales y/o contaminantes orgánicos, tanto en aguas naturales como en efluentes industriales.

Existen más de 100.000 tipos de colorantes que se utilizan comercialmente en industrias, implicando esto el uso de más de 700.000 toneladas al año de los mismos. Pequeñas cantidades (1ppm) en agua de algunos colorantes ya modifican el color de la misma y la hacen no consumible. Muchos de ellos resultan poseer estructuras químicas estables térmicamente y resistentes a la biodigestión aeróbica. En particular, los azo colorantes son los colorantes más utilizados por la industria en la actualidad. Su estructura química particular los convierte en ideales para mantener el color de telas, alimentos, medicamentos, etc., inalterados por mucho tiempo. Se los conoce como colorantes recalcitrantes, es decir que permanecen en el ecosistema mucho más tiempo que colorantes con otra estructura. Es muy difícil que sean degradados por la luz o por los procesos estándares de las plantas de tratamientos de efluentes. Las aguas coloreadas llevan a un cambio total de la flora y la fauna, llegando en casos a la eutroficación. La remoción de azo colorantes de los cursos de agua es de primordial atención.

El presente trabajo de tesis pretende promover el avance y la aplicación de la investigación científica relacionada con el manejo de contaminantes del medio ambiente, como también

la formación de recursos humanos en el área de química ambiental y consolidar la inserción de esta temática de alta incumbencia social para el bienestar humano y ecológico.

Los resultados obtenidos en el **primer capítulo** están referidos a la inmovilización de biomoléculas en nanopartículas magnéticas de silicio obtenidas mediante microemulsión inversa por la técnica sol-gel. Ellos nos muestran que el material obtenido es monodisperso, con nanopartículas *core/shell* donde el interior posee el ferrofluido magnético y el exterior puede ser modificado sin perder las propiedades magnéticas. La enzima (ureasa como modelo) inmovilizada en la superficie de las nanoesferas mantiene su actividad en un largo período de tiempo. Por otro lado, el costo de las enzimas necesarias para decolorar azo colorantes y la necesidad de formar una cadena de reacción para que la decoloración vaya acompañada de una detoxificación mostraron ser económicamente inviables.

Por lo antes mencionado, el **segundo capítulo** trata de la inmovilización de microorganismos (*Pseudomonas* sp.) capaces de decolorar azo colorantes (negro de Remazol, naranja de metilo y naranja de bencilo) en una matriz de sílica obtenida por la técnica sol-gel. Los resultados obtenidos muestran que las células son capaces de mantener la viabilidad dentro del material polimérico, que el gel no impide la entrada de nutrientes ni la salida de enzimas y productos de desecho y que las bacterias mantienen la viabilidad por largos períodos de tiempo. Puede observarse también que la capacidad de decolorar los colorantes azoicos ensayados se acompaña también de la detoxificación de los mismos, dado que el ensayo realizado con semillas de lechuga mostró mejoras en la germinación de dichas semillas luego del tratamiento con el residuo decolorado.

Por último, el **tercer capítulo** trata de la utilización de un biopolímero abundante, biodegradable y de muy bajo costo para la adsorción de azo colorantes reactivos (negro de Remazol) en solución acuosa. En el capítulo se muestra la excelente capacidad de adsorción

del hidrogel de colágeno tipo I para este tipo de colorantes, el estudio de las interacciones entre sorbente y sorbato y la comparación entre diferentes azo colorantes con otras estructuras químicas (Rojo Congo y marrón de Bismarck).

Si realizamos una tabla (ver **tabla 1**) considerando los costos de los tres materiales estudiados, podemos observar la clara ventaja del uso de bacteria encapsuladas o el uso de biopolímeros naturales sobre el uso de enzimas inmovilizadas.

Tabla 1: Comparación entre los diferentes modelos propuestos en la presente tesis

MÉTODO	COVALENTE:	ATRAPAMIENTO:	ADSORCIÓN:
	Inmovilización de Ureasa a partículas magnéticas	Inmovilización de bacterias por atrapamiento en gel	Hidrogel de colágeno
Preparación	Compleja	Media	Sencilla
Reutilización	SI	SI	NO
Costo de preparación	Alto	Bajo	Bajo
Estabilidad	Alta	Alta	Alta
Aplicabilidad	Muy acotada	Acotada	Acotada
Precio aproximado	100 mg de nanopartículas SIN enzima: u\$ 510	Cada 100 perlas con bacterias inmovilizadas: u\$ 10	Por cada 100 ml de colágeno: u\$ 4

En definitiva, el presente trabajo de tesis permitió, por un lado, abordar aspectos básicos relacionados con la técnica sol-gel y describir una nueva forma de obtener nanopartículas

magnéticas huecas, así como realizar la inmovilización de biomoléculas en su superficie. Este nuevo material podría ser utilizado en procesos biotecnológicos o en el desarrollo de biosensores donde el costo de la síntesis se vea amortizado por el valor agregado del producto obtenido o por la reutilización de las partículas, pero desde el punto de vista ambiental todavía se pretende que el método utilizado sea de menor costo. En este sentido la inmovilización de microorganismos por atrapamiento en matrices sol-gel reveló ser un sistema de bajo costo y muy eficiente logrando alcanzar rendimientos superiores al 80% en la capacidad de remoción de colorantes, sin generar productos tóxicos por lo que constituye un sistema viable de ser aplicado en remediación.

Los excelentes resultados obtenidos finalmente al utilizar hidrogeles de colágeno superan ampliamente los materiales mencionados anteriormente. El uso de un biopolímero de muy bajo costo y muy abundante para abordar el tema de remediación de los azo colorantes en los cursos de agua resultó una estrategia innovadora tanto a nivel local como internacional.

Apéndice técnico

Apéndice técnico

MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO Y ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA POR RAYOS X

La Microscopía de Barrido Electrónico (SEM, del inglés Scanning Electron Microscopy) es una técnica utilizada para el análisis de la topografía y morfología de superficies en la escala de micrones. En la actualidad los instrumentos SEM poseen resolución por debajo de 1 μ m.

Esta técnica se fundamenta en la aceleración de electrones de alta energía (1-50 keV) desde un emisor, por ejemplo un filamento de tungsteno o LaB₆ que funciona como cátodo hacia una muestra conductora que actúa como ánodo. El haz de electrones es focalizado y direccionado en su trayecto por lentes condensadoras magnéticas y bobinas de barrido, las que orientan al haz en los ejes x e y para lograr el barrido de toda la superficie de muestreo secuencialmente. La muestra, en alto vacío, puede ser posicionada para analizar diferentes zonas, incluso, desde diferentes ángulos, a las que el mero barrido de posición del haz de electrones no tendría alcance.

Cuando el haz impacta en la muestra ocurre la dispersión del mismo en la que se pueden dar fenómenos elásticos donde los electrones mantienen la energía con la que colisionaron en la superficie y son retrodispersados, e interacciones inelásticas donde estos pierden parte de la energía que contenían. Esta pérdida de energía generará electrones secundarios, electrones Auger y fluorescencia de rayos X. En SEM son los electrones secundarios los que aportan la mayor parte de la información para la generación de una imagen aunque

también pueden ser detectados los electrones retrodispersados. Estos son formados por la interacción (transferencia de energía) de los electrones de alta energía del haz y los electrones de baja energía de la banda de conducción de la muestra, generalmente de la capa K. Dada su baja energía, alrededor de 5eV, sólo los electrones provenientes de la superficie de la muestra llegan al detector, por lo que la información obtenida es meramente topográfica. Debido a su baja energía es necesaria su aceleración para la posterior detección con un cristal centelleador. Toda la cámara se encuentra en alto vacío ya que la presencia de gases en ésta no sólo es perjudicial para los emisores de electrones, sino también para la detección de los electrones secundarios, que serían atenuados en su trayectoria al detector. Si la muestra es conductora, mayor será la probabilidad de generación de electrones secundarios. Es importante mencionar que el diámetro del haz retrodispersado, junto con los electrones secundarios generados, es mucho mayor al diámetro del haz incidente. Así la resolución de la imagen en un SEM es inversamente proporcional al diámetro del haz de electrones proveniente de la muestra.

Cuando las muestras de interés no son conductoras puede recurrirse al recubrimiento con oro. Este recubrimiento es de unos pocos nm con el fin de no enmascarar detalles de la muestra. Puede realizarse por evaporación al vacío o electrodeposición, entre otras técnicas. La conductividad de la muestra también ayuda a disipar el calor y evitar la degradación térmica, a lo que son sensibles muchas muestras de origen biológico. Existen SEM que no necesitan que la muestra sea conductora, son los llamados SEM ambientales o ESEM (del inglés Environmental Scanning Electron Microscopy). En estos el vacío sólo se mantiene en el camino óptico del haz de electrones hasta su direccionamiento. La muestra se halla en un

recinto con presión de alrededor de 1 a 50 Torr y alta humedad relativa (hasta 100%) lo que hace necesario el uso de un detector capaz de trabajar en presencia de vapor de agua.

Durante el bombardeo electrónico, los electrones de las capas internas de los átomos de la muestra pueden ser arrancados de sus órbitas y dar lugar a un hueco en dicho orbital. Cuando esto sucede, un electrón de la capa más externa migra para ocupar su lugar liberando el exceso de energía por medio de un fotón característico de la diferencia de energía entre los niveles electrónicos del elemento de procedencia. La detección de este fotón da lugar a la Espectroscopía de Energía Dispersiva por Rayos X (EDX). Esta técnica es utilizada para obtener información cuali-cuantitativa de la composición elemental de la superficie muestreada. Usualmente esta técnica aprovecha el haz de electrones proveniente de la fuente de SEM para generar el haz de fotones que será detectado por el detector del EDX. Estos equipos suelen tener como detector un espectrómetro de energía dispersiva o un detector de longitud de onda dispersiva.

EDX permite la identificación sencilla de elementos ya que las transiciones electrónicas $2p_{3/2,1/2} \rightarrow 1s$ (línea $K_{\alpha 1,2}$), $3d_{5/2,3/2} \rightarrow 2p_{3/2}$, $1s$ (línea $L_{\alpha 1,2}$) y $4f_{7/2,5/2} \rightarrow 3d_{5/2}$ (línea $M_{\alpha 1,2}$) son más probables para elementos de Z bajos, medios y altos respectivamente. Mediante la imagen obtenida por SEM se puede sectorizar la superficie a analizar y conocer diferencias de composición de zonas muy cercanas. La cuantificación se realiza por comparación con un material de referencia. Los límites de detección se encuentran entre 0,01 y 0,1%, lo que hace que EDX no sea una técnica para el análisis de trazas. Por otra parte, en átomos de Z bajo la cuantificación pierde precisión por la alta probabilidad de generación de electrones Auger en vez de fotones de rayos X. En el análisis de superficies la información obtenida siempre implica volumen. Esto significa que además del área investigada se debe tener en

cuenta la penetración del haz utilizado para el muestreo. La distancia total que un electrón viaja en su trayectoria puede expresarse como:

$$R=0,0064 * (E_0^{1,68}-E_c^{1,68})/\rho$$

donde R es el rango o distancia, E_0 es la energía cinética inicial (keV), E_c la energía crítica necesaria para excitar un estado electrónico (keV) y ρ la densidad del sólido (g/cm^3). Esta expresión muestra que la trayectoria de un electrón en un sólido es de micrones y que a menor densidad mayor será la distancia recorrida. Este factor es importante meros o materiales inorgánicos, como por ejemplo polisacáridos o dióxido de silicio. Si la superficie a analizar es poco densa y de pocos micrones de espesor el haz de electrones interaccionará no sólo con ella sino también con el material en el cual esté apoyada, revelando en el espectro de EDX elementos provenientes del soporte.

CARACTERIZACIÓN DE SÓLIDOS A PARTIR DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

La caracterización de un sólido considera dos aspectos relacionados entre sí: la superficie específica y la porosidad. La superficie específica de un sólido representa el área que el material posee por cada gramo de sustancia. La existencia de poros o cavidades en ciertos tipos de sólidos les confiere a éstos grandes valores de superficie específica. La porosidad, por su parte, se define como la fracción de espacio vacío que presenta un material sólido.

La IUPAC establece una clasificación del tamaño de los poros según sea el valor de su diámetro promedio; se señalan los siguientes tres grupos:

- *Microporos*: poros con diámetros medios inferiores a 2 nm
- *Mesoporos*: poros con diámetros medios comprendidos entre 2 y 50 nm
- *Macroporos*: poros con diámetros medios superiores a 50 nm.

La principal metodología tendiente a entregar información de los volúmenes de poros y su distribución de tamaño se basa en la adsorción de gases.

Una vez fijada la pareja sorbato-sorbente, y si la adsorción se realiza a temperatura constante, la adsorción sólo es una función de la presión del sorbato. La representación gráfica de la cantidad adsorbida, a temperatura constante en función de la presión del sorbato se denomina isoterma de adsorción. En estas isotermas se representa la cantidad adsorbida x en función de las presiones relativas P/P_0 . La presión relativa expresada como P/P_0 corresponde a la presión absoluta o presión de equilibrio del gas (P), dividida por la presión de saturación del sorbato, o presión de vapor del sorbato considerado como líquido a la temperatura de adsorción (P_0). Al utilizar el concepto de presión relativa es posible comparar diferentes isotermas, realizando la adsorción desde presiones muy bajas hasta lograr presión atmosférica, esto es, hasta alcanzar una presión de 760 mmHg correspondiente a la presión de saturación del nitrógeno (P_0).

Los microporos son los primeros en ser llenados por el sorbato y en general se acepta que a valores de presiones relativas de 0,3 estos microporos han sido completamente llenados. Luego se inicia el llenado de los mesoporos, que se acepta que son llenados a presiones relativas cercanas a la unidad (P/P_0 entre 0,95 y 0,97). Finalmente sólo es posible llenar a los macroporos a presiones relativas mayores a

la unidad. Como la gran mayoría de los equipos de adsorción trabajan hasta un rango de presiones relativas de 1 el estudio de los macroporos no suele realizarse por adsorción. Técnicas como SEM o porosimetría de mercurio permiten la evaluación de la macroporosidad de un sólido.

Modelo de BET

Uno de los modelos más aplicados con el objeto de representar las isotermas de adsorción y calcular la superficie específica de las muestras es el modelo de adsorción en multicapas desarrollado por Brenauer, Emmett y Teller (1938). Este modelo considera la superficie del sólido como un arreglo de sitios de adsorción y postula un equilibrio dinámico en el que la velocidad con la cual las moléculas provenientes de la fase gaseosa condensan sobre los sitios vacíos es igual a la velocidad con que las mismas se evaporan a partir de los sitios ocupados. El modelo considera las siguientes suposiciones simplificadas

- En todas las capas, con excepción de la primera, el calor de adsorción es igual al calor de licuefacción del sorbato a la temperatura de adsorción
- En todas las capas excepto en la primera, las condiciones de evaporación-condensación son idénticas
- Cuando la presión iguala a la de saturación (p_0) el sorbato condensa sobre la superficie en un número infinito de capas

La ecuación de Bett está dada por

$$\frac{\frac{p}{p_0}}{\left[n\left(1 - \frac{p}{p_0}\right)\right]} = \frac{1}{n_m c} + \frac{(c-1)\left(\frac{p}{p_0}\right)}{n_m c} \quad (\text{A1})$$

Donde n es la cantidad de moles adsorbidos por unidad de masa de la muestra, n_m es la capacidad de la monocapa, es decir, la cantidad de sorbato expresada en moles por unidad de moles de adsorbente, que cubre la superficie total con una capa molecular única.

El parámetro c tiene en cuenta las interacciones sorbato-sorbente. La ecuación (A1) expresada en función del volumen adsorbido V_a y el volumen correspondiente a una monocapa V_m resulta:

$$\left(\frac{p}{p_0}\right) / \left[V_a \left(1 - \left(\frac{p}{p_0}\right)\right)\right] = \frac{1}{V_m c} + \frac{(c-1)\left(\frac{p}{p_0}\right)}{V_m c} \quad (\text{A2})$$

Si el número de capas moleculares se restringe a un número finito de capas η , la ecuación anterior se transforma en la siguiente:

$$\frac{V_a}{V_m} = \frac{c\left(\frac{p}{p_0}\right)}{1 - \left(\frac{p}{p_0}\right)} = \frac{1 - (\eta + 1)\left(\frac{p}{p_0}\right)^\eta + \eta\left(\frac{p}{p_0}\right)^{\eta+1}}{1 + (c-1)\left(\frac{p}{p_0}\right) - c\left(\frac{p}{p_0}\right)^{\eta+1}} \quad (\text{A3})$$

Esta última se reduce a la ecuación de Langmuir para el caso de $\eta=1$

$$\frac{V_a}{V_m} = \frac{c \left(\frac{p}{p_0}\right)}{1 - \left(\frac{p}{p_0}\right)} \quad (\text{A4})$$

Determinación de la superficie específica de un sólido de acuerdo al modelo de BET

La forma más conveniente de aplicar el modelo de BET a los datos experimentales es mediante la ecuación A2. Si se representa $(p/p_0)/[V_a(1-p/p_0)]$ en función de la presión relativa p/p_0 para un rango de presiones relativas entre 0,005 y 0,35 se obtendrá una recta si el modelo de BET es válido. A partir de la ordenada al origen y la pendiente de esta recta es posible estimar el volumen adsorbido correspondiente a una monocapa V_m y la constante c de acuerdo con:

$$V_m = \frac{1}{s + i} \quad (\text{A5})$$

$$c = \frac{s}{i + 1} \quad (\text{A6})$$

donde s es pendiente e y es la ordenada al origen.

El valor de c es característico de la intensidad de las interacciones sorbato-sorbente. Como el parámetro c está relacionado con el calor diferencial de adsorción, cuanto más fuertes sean las interacciones sorbato-sorbente, más alto será su valor, independiente mente de las

características del sólido. El valor de c afecta notablemente la forma de la isoterma en las regiones de bajas presiones, independientemente del valor V_m . El valor de este último es directamente proporcional a la superficie específica del adsorbente. Esta es, entonces, igual al área ocupada por una molécula de sorbato multiplicada por el número de molécula de sorbato contenidas en V_m

$$S_{BET} = \frac{\alpha_m V_m N_A 10^{-20}}{v_M} \quad (A7)$$

donde S_{BET} es la superficie específica expresada en m^2/g , V_m la capacidad de la monocapa expresada como volumen de gas en condiciones normales de presión y temperatura, α_m es el área promedio ocupada por una molécula de sorbato, N_A el número de Avogadro y v_M representa el volumen molar del sorbato, en CNPT ($22414 \text{ cm}^3/\text{mol}$).

El valor de α_m se estima considerando un arreglo de moléculas adsorbidas en estado líquido sobre una superficie plana mediante la siguiente ecuación:

$$\alpha_m = f \frac{M^{\frac{2}{3}}}{N_A \delta_1} \quad (A8)$$

siendo f el factor de empaquetamiento molecular, M el peso molecular del sorbato y δ_1 la densidad del sorbato en estado líquido. El valor de f es 1,09 cuando se considera un empaquetamiento de 12 moléculas vecinas a la molécula considerada en estado líquido y 6

sobre el plano central. En el caso de adsorción con nitrógeno, a la temperatura del nitrógeno líquido, el valor más frecuentemente empleado es $16,2 \text{ \AA}^2$.

Adsorción en microporos

La región microporosa se puede dividir en dos subregiones. En ambas la adsorción a una determinada presión relativa es mayor que la que ocurriría sobre una superficie abierta equivalente. La subregión constituida por poros de tamaño similar al de la molécula de sorbato, ultramicroporos, se relaciona con las presiones más bajas en la isoterma. Esta se caracteriza por un aumento considerable en el potencial de interacción y, por ende, de la entalpía de adsorción. En consecuencia, los poros se llenan completamente a presiones relativas muy bajas y la isoterma crece rápidamente desde el origen. La entalpía de adsorción depende, fundamentalmente, de la naturaleza de las interacciones sorbato-sorbente y de la polaridad del sorbato. La subregión de los microporos de mayor tamaño se caracteriza porque en ella los incrementos de la energía de interacción y de la entalpía de adsorción son relativamente menores.

En los microporos de tamaño similar al de la molécula de sorbato, la adsorción se produce por la superposición de las fuerzas de atracción que ejercen las paredes del poro. En este caso, las moléculas de sorbato comienzan a llenar el volumen de los microporos, en vez de cubrir la superficie capa sobre capa. El fenómeno que tiene lugar se asemeja al de condensación capilar que ocurre en poros más grandes, a presiones parciales altas. Sin embargo la fase adsorbida en los microporos es diferente, encontrándose en estado más ordenado dado el efecto de los campos de fuerza ejercidos por las paredes del poro. En este tipo de microporos la difusión sigue un proceso activo, acompañada por energías de

activación relativamente altas. Este se representa mediante una expresión tipo ley de Arrhenius:

$$D_m = D_{m0} e^{-E_a/RT} \quad (A9)$$

donde D_m es el coeficiente de difusión en microporos, D_{m0} el factor pre exponencial y E_a la energía de activación del proceso de difusión.

Curva característica para un determinado par sorbato-sorbente

La curva característica para un determinado par sorbato-sorbente expresa el volumen adsorbido en función del potencial de adsorción de la siguiente manera:

$$V_a = V_a \left(\frac{A}{\beta} \right) \quad (A10)$$

siendo V_a volumen adsorbido por unidad de masa (cm^3/g), A potencial de adsorción o trabajo molar de adsorción y β coeficiente de afinidad.

La curva característica originalmente define el potencial de adsorción del sorbato como el trabajo isotérmico requerido para comprimir el vapor, desde la presión de equilibrio hasta la presión de saturación. Este se expresa mediante la siguiente ecuación

$$A = RT \ln \left(\frac{P}{P_0} \right) \quad (A11)$$

Para vapores de diferentes sustancias y un mismo sorbente las fuerzas de atracción entre las

moléculas de vapor y las del sorbente son diferentes. Según la teoría de las fuerzas de dispersión, la relación de las fuerzas es aproximadamente igual a la relación entre las polaridades de las moléculas de vapor (π) la que a su vez coincide con el cociente de los potenciales de adsorción. De esta manera, para un mismo volumen adsorbido de diferentes vapores en un mismo sorbente los potenciales de adsorción muestran una relación constante β denominada coeficiente de afinidad.

$$\beta = \frac{A}{A_0} = \frac{\pi}{\pi_0} \quad (\text{A12})$$

Este coeficiente es el responsable de que las curvas características para diferentes sorbatos coincidan con la correspondiente a algún sorbato considerado como estándar.

Ecuación de Dubinin-Radushkevich: estimación del volumen de microporos

Dubinin-Radushkevich supusieron una distribución gaussiana para la curva característica

$$V_x = V_0 \exp\left(-\rho \left(\frac{A}{\beta}\right)^2\right) \quad (\text{A13})$$

donde V_0 es el volumen total de microporos del sólido y ρ un parámetro que caracteriza la distribución del tamaño de poros relacionado con el ancho de la distribución gaussiana de la curva característica. Combinando las ecuaciones (A11) y (A13) se obtiene la siguiente expresión:

$$V_{\alpha} = V_0 \left(\frac{-p}{\beta^2} \right) (RT \ln \left(\frac{p}{p_0} \right))^2 \quad (\text{A14})$$

Linealizando la ecuación (A14) resulta:

$$\log V_{\alpha} = \log V_0 - (\rho/\beta^2) 2,303 R^2 T^2 \log \left(\frac{p}{p_0} \right)^2 \quad (\text{A15})$$

Si se representa el logaritmo de V_{α} en función de $[\log(p/p_0)]^2$ se obtiene, a partir de la ordenada al ordenada al origen el volumen total de microporos del sólido. Esta ecuación puede expresarse en términos de fase líquida o gaseosa. El volumen expresado en fase líquida se relaciona se relaciona con el volumen en fase gaseosa v_0 , mediante la relación de densidades del gas y del líquido

$$V_0 = v_0 \left(\frac{\delta_g}{\delta_l} \right) \quad (\text{A16})$$

donde V_0 es el volumen total de microporos del sistema en fase líquida, δ_g y δ_l las densidades del sorbato en fase gaseosa y líquida respectivamente.

Para un gran número de sistemas sorbato-sorbente el gráfico de Dubinin-Radushkevich es una línea recta. Sin embargo puede desviarse de la linealidad, especialmente en la región de presiones altas a causa de la adsorción en multicapas y la condensación capilar en mesoporos. En este caso el valor del volumen de microporos debe extrapolarse desde la región de presiones bajas donde la curva resulta lineal y debe corregirse por la adsorción en mesoporos.

Referencias

Referencias

1. Al-Degs, Y; Khraisheh, MAM; Allen, SJ and Ahmad, MN. Effect of carbon surface chemistry on the removal of reactive dyes from textile effluent. *Water Research*, 34, 927 (2000).
2. Hao, OJ; Kim, H and Chiang, P-C. Decolorization of Wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 30, 449 (2000).
3. Pinheiro, HM; Touraud, E and Thomas, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments*, 61, 121 (2004).
4. Mathur, N; Bhatnagar, P and Bakre, P. Assessing mutagenicity of textile dyes from Pali (Rajasthan) using Ames bioassay. . *Applied ecology and environmental research*, 4, 111 (2005).
5. Puvaneswari, N; Muthukrishnan, J and Gunasekaran, P. Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, 618 (2006).
6. Pereira, L; Coelho, AV; Viegas, CA; Correia dos Santos, MM; Robalo, MP and Martins, LO. Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. *Journal of Biotechnology*, 139, 68 (2009).
7. Pereira, L; Coelho, AV; Viegas, CA; Ganachaud, C; Lacazio, G; Tron, T; Robalo, MP and Martins, LO. On the Mechanism of Biotransformation of the Anthraquinonic Dye Acid Blue 62 by Laccases. *Advance Synthesis and Catalysis*, 351, 1857 (2009).
8. Forgacs, E; Cserhádi, T and Oros, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International*, 30, 953 (2004).
9. van der Zee, FP and Villaverde, S. Combined anaerobic–aerobic treatment of azo dyes—A short review of bioreactor studies. *Water Research*, 39, 1425 (2005).

10. Kaushik, P and Malik, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environment International*, 35, 127 **(2009)**.
11. Arslan, I and Balcioglu, IA. Degradation of commercial reactive dyestuffs by heterogenous and homogenous advanced oxidation processes: a comparative study. *Dyes and Pigments*, 43, 95 **(1999)**.
12. Zhou, M and He, J. Degradation of azo dye by three clean advanced oxidation processes: Wet oxidation, electrochemical oxidation and wet electrochemical oxidation—A comparative study. *Electrochimica Acta*, 53, 1902 **(2007)**.
13. Rodríguez Couto, S. Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 227 **(2009)**.
14. Pandey, A; Singh, P and Iyengar, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59, 73 **(2007)**.
15. Mondal, S. Methods of Dye Removal from Dye House Effluent—An Overview. *Environmental Engineering Science*, 25, 383 **(2008)**.
16. Vandevivere, PC; Bianchi, R and Verstraete, W. Review: Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 72, 289 **(1998)**.
17. Robinson, T; McMullan, G; Marchant, R and Nigam, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77, 247 **(2001)**.
18. Anjaneyulu, Y; Sreedhara Chary, N and Samuel Suman Raj, D. Decolourization of Industrial Effluents – Available Methods and Emerging Technologies – A Review. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 4, 245 **(2005)**.

19. Hai, FI; Yamamoto, K and Fukushi, K. Hybrid Treatment Systems for Dye Wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, 315 **(2007)**.
20. Hao, J; Song, F; Huang, F; Yang, C; Zhang, Z; Zheng, Y and Tian, X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 233 **(2007)**.
21. Allen, SJ and Koumanova, B. Decolorization of water/wastewater using adsorption (Review) *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40, 175 **(2005)**.
22. Weber, JW; Pirbazari, M and Melson, G. Biological growth on activated carbon: an investigation by scanning electron microscopy. *Environmental Science & Technology*, 12, 817 **(1978)**.
23. McKay, G; Porter, JF and Prasad, GR. The Removal of Dye Colours from Aqueous Solutions by Adsorption on Low-cost Materials. *Water, Air, & Soil Pollution*, 114, 423 **(1999)**.
24. Amin, NK. Removal of reactive dye from aqueous solutions by adsorption onto activated carbons prepared from sugarcane bagasse pith. *Desalination*, 223, 152 **(2008)**.
25. Gomes, JR, ed., *Estrutura e propriedades dos corantes*, Barbosa e Xavier Lda., Braga-Portugal, 2001.
26. Zhao, X and Hardin, IR. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes and Pigments*, 73, 322 **(2007)**.
27. Ali, H. Biodegradation of Synthetic Dyes—A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 213, 251 **(2010)**.
28. Fu, Y and Viraraghavan, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology*, 79, 251 **(2001)**.
29. Zollinger, H, ed., *Colour chemistry - Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments*, VCH, New York, 1987.

30. Kuhad, RC; Sood, N; Tripathi, KK; Singh, A and Ward, OP, in *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, 2004, pp. 185.
31. O'Neill, C; Hawkes, FR; Hawkes, DL; Lourenço, ND; Pinheiro, HM and Delée, W. Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 74, 1009 **(1999)**.
32. Razo-Flores, E; Luijten, M; Donlon, BA; Lettinga, G and Field, JA. Complete Biodegradation of the Azo Dye Azodisalicylate under Anaerobic Conditions. *Environmental Science & Technology*, 31, 2098 **(1997)**.
33. Brinker, CJS, G, ed., *The physics and chemistry of sol-gel processing* Academic Press, Boston, 1990.
34. Ciriminna, RF, A. ; Pandarus, V. ; Béland, F. ; Ilharco, L.M. ; Pagliaro, M. The sol-gel route to Advanced silica-based materials and recent applications. *Chemical Reviews*, 113, 6592 **(2013)**.
35. Coradin, TL, P.J. Biogenic silica patterning: simple chemistry or subtle biology? . *ChemBioChem*, 4, 251 **(2003)**.
36. Monton, MRNF, E.M. ; Brennan, J.D. Tailoring sol-gel derived silica materials for Optical biosensing. *Chemistry of Materials*, 24, 796 **(2011)**.
37. Baca, HK; Carnes, E; Singh, S; Ashley, C; Lopez, DM and Brinker, CJ. Cell-directed assembly of Bio/Nano interfaces-A new scheme for cell immobilization. *Accounts Chemical Research*, 40, 836 **(2007)**.
38. Depagne, CM, S.; Link, T. ; Coradin, T. Bacteria survival and growth in multi-layered silica thin films. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 12457 **(2012)**.
39. Barbé, CJB, J.; Kong, L.; Finnie, K.; Lin, H.Q.; Larkin, M.; Calleja, S., Bush, A.; Calleja, G. Silica particles: A novel drug-delivery system. *Advanced Materials*, 16, 1959 **(2004)**.

40. Stöber, WF, A. ; Bohn, E., . Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26, 62 **(1968)**.
41. Lee, K; Sathyagal, AN and McCormick, AV. A closer look at an aggregation model of the Stober process. *Colloids and Surfaces A*, 114, 115 **(1998)**.
42. Bogush, GH; Tracy, MA and Zukoski, CF. Preparation of monodisperse silica particles: control of size and mass fraction. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 104, 95 **(1988)**.
43. Gulari, TMAE. Dynamics of growth of silica particles from ammonia-catalyzed hydrolysis of tetra-ethyl-orthosilicate. *Journal of Colloid And Interface Science*, 124, 252 **(1988)**.
44. Gulari, TMAE. Monomer-addition growth with a slow initiation step: a growth model for silica particles from alkoxides. *Journal of Colloid And Interface Science*, 132, 13 **(1989)**.
45. West, LLHaJK. The Sol-Gel process. *Chemical Reviews*, 90, 33 **(1990)**.
46. Han, SLaM-Y. Silica-coated metal nanoparticles. *Chemistry*, 5, 36 **(2010)**.
47. Vansant, EF; Voort, PVD and Vrancken, KC, eds., *Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface*, Elsevier Science, New York, 1995.
48. Branda, F; Silvestri, B; Luciani, G and Costantini, A. The effect of mixing alkoxides on the Stöber particles size. *Colloids and Surfaces A*, 299, 252 **(2007)**.
49. Bein, JKaT. Porous thin films of functionalized mesoporous silica nanoparticles. *ACS Nano*, 2, 2324 **(2008)**.
50. Suzuki, TM; Nakamura, T; Fukumoto, K; Yamamoto, M; Akimoto, Y and Yano, K. Direct synthesis of amino-functionalized monodispersed mesoporous silica spheres and their catalytic activity for nitroaldol condensation. *Journal of Molecular Catalysis A*, 280, 224 **(2008)**.

51. Rahman, IA; Jafarzadeh, M and Sipaut, CS. Synthesis of organo-functionalized nanosilica via a co-condensation modification using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Ceramics International*, 35, 1883 (2009).
52. Copello, GJ; De Marzi, MC; Desimone, MF; Malchiodi, EL and Díaz, LE. Antibody detection employing sol-gel immobilized parasites. *Journal of Immunological Methods*, 335, 65 (2008).
53. Desimone, M; Degrossi, J; D'Aquino, M and Diaz, L. Sol-gel immobilisation of *Saccharomyces cerevisiae* enhances viability in organic media. *Biotechnology Letters*, 25, 671 (2003).
54. Pope, EA; Braun, K and Peterson, C. Bioartificial Organs I: Silica Gel Encapsulated Pancreatic Islets for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 8, 635 (1997).
55. Boninsegna, S; Bosetti, P; Carturan, G; Dellagiacomma, G; Dal Monte, R and Rossi, M. Encapsulation of individual pancreatic islets by sol-gel SiO₂: A novel procedure for perspective cellular grafts. *Journal of Biotechnology*, 100, 277 (2003).
56. Nassif, N; Bouvet, OMM; Rager, MN; Roux, C; Coradin, T and Livage, J. Living bacteria in silica gels. *Nature Materials*, 1, 42 (2002).
57. Alvarez, GS; Foglia, ML; Camporotondi, DE; Tuttolomondo, MV; Desimone, MF and Diaz, LE. A functional material that combines the Cr(vi) reduction activity of *Burkholderia* sp. with the adsorbent capacity of sol-gel materials. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 6359 (2011).
58. Alvarez, G; Foglia, M; Copello, G; Desimone, M and Diaz, L. Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol-gel-derived silica matrices. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 639 (2009).

59. Inama, L; Diré, S; Carturan, G and Cavazza, A. Entrapment of viable microorganisms by SiO₂ sol-gel layers on glass surfaces: Trapping, catalytic performance and immobilization durability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 30, 197 **(1993)**.
60. Hong, E; Bescher, E; Garcia, L and Mackenzie, JD. Detection of *Cryptosporidium parvum* in antibody-doped gels. *MRS Proceedings*, 435, 449 **(1996)**.
61. Nassif, N; Roux, C; Coradin, T; Rager, M-N; Bouvet, OMM and Livage, J. A sol-gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria. *Journal of Materials Chemistry*, 13, 203 **(2003)**.
62. Copello, GJ; Teves, S; Degrossi, J; D'Aquino, M; Desimone, MF and Diaz, LE. Antimicrobial activity on glass materials subject to disinfectant xerogel coating. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 343 **(2006)**.
63. Böttcher, H; Jagota, C; Trepte, J; Kallies, KH and Haufe, H. Sol-gel composite films with controlled release of biocides. *Journal of Controlled Release*, 60, 57 **(1999)**.
64. Villanueva, ME; Salinas, A; Copello, GJ and Díaz, LE. Point of zero charge as a factor to control biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in sol-gel derivatized aluminum alloy plates. *Surface and Coatings Technology*
65. Copello, GJ; Teves, S; Degrossi, J; D'Aquino, M; Desimone, MF and Díaz, LE. Proving the antimicrobial spectrum of an amphoteric surfactant-sol-gel coating: a food-borne pathogen study. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35, 1041 **(2008)**.
66. Arcos, D and Vallet-Regí, M. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 6, 2874 **(2010)**.
67. Slowing, II; Trewyn, BG; Giri, S and Lin, VSY. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications. *Advanced Functional Materials*, 17, 1225 **(2007)**.

68. Alvarez, GS; Helary, C; Mebert, AM; Wang, X; Coradin, T and Desimone, MF. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of Materials Chemistry B* (2014).
69. Kim, D; Lee, JS; Barry, CMF and Mead, JL. Effect of fill factor and validation of characterizing the degree of mixing in polymer nanocomposites. *Polymer Engineering & Science*, 47, 2049 (2007).
70. Rahman, IA and Padavettan, V. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites; A Review. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 15 (2012).
71. Chvapil, M; Kronentahl, RL and van Winkle, JW. Medical and surgical applications of collagen. *International Review of Connective Tissue Research*, 1 (1973).
72. Chvapil, M. Collagen sponge: theory and practice of medical applications. *Journal of Biomedical Material Research*, 721 (1977).
73. Bloomfield, SE; Miyata, T; Dunn Buese, MW; Bueser, N; Stenzel, KH and Rubin, AL. Soluble gentamicin ophthalmic inserts as a drug delivery system. *Ophthalmol*, 96, 885 (1978).
74. Miller, EJ. Chemistry of collagens and their distribution. *Extracellular Matrix Biochemistry*, 41 (1984).
75. Lee, HB; Kim, SS and Khang, G, eds., *Polymeric biomaterials*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995.
76. Olde Damink, LHH; Dijkstra, PJ; van Luyn, MJA; van Wachem, PB; Nieuwenhuis, P and J., F. Changes in the mechanical properties of dermal sheep collagen during in vitro degradation. *Journal of Biomedical Material Research*, 29, 139 (1995).

77. K. Anselme, HP, D. Herbage, Inhibition of calcification in vivo by acyl azide crosslinking of a collagen–glycosaminoglycan sponge. Inhibition of calcification in vivo by acyl azide crosslinking of a collagen–glycosaminoglycan sponge. *Matrix*, 12, 264 **(1992)**.
78. Kincl, FA and Ciaccio, LA. Suppression of immune responses by progesterone. *Endocrinologia Experimentalis*, 14, 27 **(1980)**.
79. Linsenmeyer, TF, in *Immunology of purified collagens and their use in localization of collagen types in tissue*, ed. J.B. Weiss, MIVJ, Churchill Livingstone, 1982, pp. 244.
80. Steffen, C; Timpl, R and Wolff, I. Immunogenity and specificity of collagen. V. Demonstration of three different antigenic determinants on calf collagen. *Immunology*, 15, 135 **(1968)**.
81. Ellingsworth, LR; DeLustro, F; Brennan, JE; Sawamura, S and McPherson, J. The human response to reconstituted bovine collagen. *Journal of Immunology*, 136, 877 **(1986)**.
82. Knapp, TR; Luck, E and Daniels, JR. Behaviour of solubilised collagen as a bioimplant. *Journal of Surgical Research*, 23, 96 **(1977)**.
83. DeLustro, F; Condell, RA; Nguyen, MA and McPherson, JM. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *Journal of Biomedical Material Research*, 20, 109 **(1986)**.
84. Heinemann, S; Coradin, T and Desimone, MF. Bio-inspired silica–collagen materials: applications and perspectives in the medical field. *Biomaterials Science*, 1 **(2013)**.
85. Okada, T; Hayashi, T and Ikada, Y. Degradation of collagen suture in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 13, 448 **(1992)**.
86. Deyl, Z and Adam, M, eds., *Preparation of insoluble collagen*, D.A. Hall Oxford, 1976.

87. Singh, MP; Stefko, J; Lumpkin, JA and Rosenblatt, J. The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. *Pharmaceutical Research*, 12, 1205 (1995).
88. Cooperman, L and Michaeli, D. The immunogenicity of injectable collagen. II. A retrospective review of seventy-two tested and treated patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 10, 647 (1984).
89. Labow, TA and Silver, DN. Late reactions at Zyderm skin test sites. *Cutis*, 35, 154 (1985).
90. Desimone, MF; Helary, C; Rietveld, IB; Bataille, I; Mosser, G; Giraud-Guille, MM; Livage, J and Coradin, T. Silica-collagen bionanocomposites as three-dimensional scaffolds for fibroblast immobilization. *Acta Biomaterialia*, 6, 3998 (2010).
91. Foglia, ML; Alvarez, GS; Catalano, PN; Mebert, AM; Diaz, LE; Coradin, T and Desimone, MF. Recent Patents on the Synthesis and Application of Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Recent Patents on Biotechnology*, 5, 54 (2011).
92. Cellesi, F and Tirelli, N. Sol-gel synthesis at neutral pH in W/O microemulsion: A method for enzyme nanoencapsulation in silica gel nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 288, 52 (2006).
93. Lou, M-y; Jia, Q-l; Wang, D-p; Liu, B and Huang, W-h. The preparation and properties of monodisperse core-shell silica magnetic microspheres. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 217 (2008).
94. Sierra, L and Guth, J-L. Synthesis of mesoporous silica with tunable pore size from sodium silicate solutions and a polyethylene oxide surfactant. *Microporous and Mesoporous Materials*, 27, 243 (1999).

95. Sierra, L; Lopez, B and Guth, J-L. Preparation of mesoporous silica particles with controlled morphology from sodium silicate solutions and a non-ionic surfactant at pH values between 2 and 6. *Microporous and Mesoporous Materials*, 39, 519 **(2000)**.
96. Chang, C-L and Fogler, HS. Controlled Formation of Silica Particles from Tetraethyl Orthosilicate in Nonionic Water-in-Oil Microemulsions. *Langmuir*, 13, 3295 **(1997)**.
97. Lopez-Quintela, MA. Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 137 **(2003)**.
98. Rostamian, R; Najafi, M and Rafati, AA. Synthesis and characterization of thiol-functionalized silica nano hollow sphere as a novel adsorbent for removal of poisonous heavy metal ions from water: Kinetics, isotherms and error analysis. *Chemical Engineering Journal*, 171, 1004 **(2011)**.
99. Atia, AA; Donia, AM and Al-Amrani, WA. Adsorption/desorption behavior of acid orange 10 on magnetic silica modified with amine groups. *Chemical Engineering Journal*, 150, 55 **(2009)**.
100. Wang, J; Zheng, S; Liu, J and Xu, Z. Tannic acid adsorption on amino-functionalized magnetic mesoporous silica. *Chemical Engineering Journal*, 165, 10 **(2010)**.
101. Schultz, N; Hogley, T and Syldatk, C. Spectrophotometric assay for online measurement of the activity of lipase immobilised on micro-magnetic particles. *Biotechnology Letters*, 29, 365 **(2007)**.
102. Mateo, C; Palomo, JM; Fernandez-Lorente, G; Guisan, JM and Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1451 **(2007)**.

103. Ó'Fágáin, C. Enzyme stabilization - Recent experimental progress. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 137 (2003).
104. Sheldon, RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349, 1289 (2007).
105. Hsieh, H-C; Kuan, IC; Lee, S-L; Tien, G-Y; Wang, Y-J and Yu, C-Y. Stabilization of d-amino acid oxidase from *Rhodospiridium toruloides* by immobilization onto magnetic nanoparticles. *Biotechnology Letters*, 31, 557 (2009).
106. Goodarzi, A; Sahoo, Y; Swihrt, M and Prasad, P. Aqueous ferrofluid of citric acid coated magnetite particles. *Materials Research Society Symposia Proceedings*, 789 (2004).
107. Wu, Z; Xiang, H; Kim, T; Chun, M-S and Lee, K. Surface properties of submicrometer silica spheres modified with aminopropyltriethoxysilane and phenyltriethoxysilane. *Journal of Colloid And Interface Science*, 304, 119 (2006).
108. Hartono, SB; Qiao, SZ; Liu, J; Jack, K; Ladewig, BP; Hao, Z and Lu, GQM. Functionalized Mesoporous Silica with Very Large Pores for Cellulase Immobilization. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 8353 (2010).
109. Desimone, MF; Matiacevich, SB; Buera, MdP and Díaz, LE. Effects of relative humidity on enzyme activity immobilized in sol-gel-derived silica nanocomposites. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 583 (2008).
110. Lai, CM and Tabatabai, MA. Kinetic parameters of immobilized urease. *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 225 (1992).
111. Gotic, M and Music, S. Mössbauer, FT-IR and FE SEM investigation of iron oxides precipitated from FeSO₄ solutions. *Journal of Molecular Structure*, 834-836, 445 (2007).

112. Kahani, SA and Jafari, M. A new method for preparation of magnetite from iron oxyhydroxide or iron oxide and ferrous salt in aqueous solution. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1951 **(2009)**.
113. Ashutosh Tiwari, SA, Srikanth Pilla, Shaoqin Gong. An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles. *Talanta*, 78, 1401 **(2009)**.
114. Rajesh, VB, Wataru Takashima, Keiichi Kaneto. An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease onto an electrochemically prepared copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Biomaterials*, 26, 3683 **(2005)**.
115. Chen, JP and Chiu, SH. Preparation and characterization of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis. *Bioprocess Engineering*, 21, 323 **(1999)**.
116. Liang, Z; Feng, Y; Meng, S and Zhang, W. Preparation of glutaraldehyde cross-linked chitosan beads under microwave irradiation and properties of urease immobilized onto the beads. *Transactions of Tianjin University*, 11, 79 **(2005)**.
117. Yang, H-H; Zhang, S-Q; Chen, X-L; Zhuang, Z-X; Xu, J-G and Wang, X-R. Magnetite-Containing Spherical Silica Nanoparticles for Biocatalysis and Bioseparations. *Analytical Chemistry*, 76, 1316 **(2004)**.
118. Zhang, X; van Leeuwen, J; Wichers, HJ and Flurkey, WH. Characterization of Tyrosinase from the Cap Flesh of Portabella Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 374 **(1999)**.
119. Huang, J; Zhao, R; Wang, H; Zhao, W and Ding, L. Immobilization of glucose oxidase on Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanoparticles. *Biotechnology Letters*, 32, 817 **(2010)**.

120. Ranjbakhsh, E; Bordbar, AK; Abbasi, M; Khosropour, AR and Shams, E. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 179, 272 **(2012)**.
121. Rostamian, R; Najafi, M and Rafati, AA. Synthesis and characterization of thiol-functionalized silica nano hollow sphere as a novel adsorbent for removal of poisonous heavy metal ions from water: Kinetics, isotherms and error analysis. *Chem Eng J*, 171, 1004 **(2011)**.
122. Desimone, MF; De Marzi, MC; Alvarez, GS; Mathov, I; Diaz, LE and Malchiodi, EL. Production of monoclonal antibodies from hybridoma cells immobilized in 3D sol-gel silica matrices. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 13865 **(2011)**.
123. Brown, D. Effects of colorants in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 13, 139 **(1987)**.
124. Raghavacharya, C. Colour removal from industrial effluents. *Chemical Engineering World*, 32, 53 **(1997)**.
125. Banat, IM; Nigam, P; Singh, D and Marchant, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: A review. *Bioresource Technology*, 58, 217 **(1996)**.
126. Qu, Y; Cao, X; Ma, Q; Shi, S; Tan, L; Li, X; Zhou, H; Zhang, X and Zhou, J. Aerobic decolorization and degradation of Acid Red B by a newly isolated *Pichia* sp. TCL. *Journal of Hazardous Materials*, 223-224, 31 **(2012)**.
127. Jain, K; Shah, V; Chapla, D and Madamwar, D. Decolorization and degradation of azo dye Reactive Violet 5R by an acclimatized indigenous bacterial mixed cultures-SB4 isolated from anthropogenic dye contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 213-214, 378 **(2012)**.

128. Lloret, L; Eibes, G; Feijoo, G; Moreira, MT and Lema, JM. Degradation of estrogens by laccase from *Myceliophthora thermophila* in fed-batch and enzymatic membrane reactors. *Journal of Hazardous Materials*, 213-214, 175 **(2012)**.
129. Gou, M; Qu, Y; Zhou, J; Ma, F and Tan, L. Azo dye decolorization by a new fungal isolate, *Penicillium* sp. QQ and fungal-bacterial cocultures. *Journal of Hazardous Materials*, 170, 314 **(2009)**.
130. Anjaneya, O; Souche, SY; Santoshkumar, M and Karegoudar, TB. Decolorization of sulfonated azo dye Metanil Yellow by newly isolated bacterial strains: *Bacillus* sp. strain AK1 and *Lysinibacillus* sp. strain AK2. *Journal of Hazardous Materials*, 190, 351 **(2011)**.
131. Stormo, KE and Crawford, RL. Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 727 **(1992)**.
132. Brinker, CJ and Scherer, GW, *Sol-Gel science*, Academic Press, San Diego, USA, 1990.
133. Baccile, N; Babonneau, F; Thomas, B and Coradin, T. Introducing ecodesign in silica sol-gel materials. *Journal of Materials Chemistry*, 19, 8537 **(2009)**.
134. Avnir, D; Lev, O and Livage, J. Recent bio-applications of sol-gel materials. *Journal of Materials Chemistry*, 16, 1013 **(2006)**.
135. Coradin, T; Allouche, J; Boissière, M and Livage, J. Sol-gel biopolymer/silica nanocomposites in biotechnology. *Current Nanoscience*, 2, 219 **(2006)**.
136. Desimone, MF; Alvarez, GS; Foglia, ML and Diaz, LE. Development of sol-gel hybrid materials for whole cell immobilization. *Recent Patents on Biotechnology*, 3, 55 **(2009)**.
137. Léonard, A; Dandoy, P; Danloy, E; Leroux, G; Meunier, CF; Rooke, JC and Su, BL. Whole-cell based hybrid materials for green energy production, environmental remediation and smart cell-therapy. *Chemical Society Reviews*, 40, 860 **(2011)**.

138. Livage, J and Coradin, T. Living cells in oxide glasses. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64, 315 (2006).
139. Carturan, G; Campostrini, R; Diré, S; Scardi, V and De Alteriis, E. Inorganic gels for immobilization of biocatalysts: inclusion of invertase-active whole cells of yeast (*saccharomyces cerevisiae*) into thin layers of SiO₂ gel deposited on glass sheets. *Journal of Molecular Catalysis*, 57, L13 (1989).
140. Meunier, CF; Dandoy, P and Su, BL. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials. *Journal of Colloid And Interface Science*, 342, 211 (2010).
141. Blondeau, M and Coradin, T. Living materials from sol-gel chemistry: Current challenges and perspectives. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 22335 (2012).
142. Desimone, MF; Helary, C; Mosser, G; Giraud-Guille, MM; Livage, J and Coradin, T. Fibroblast Encapsulation in Hybrid Silica-Collagen Hydrogels. *Journal of Materials Chemistry*, 20, 666 (2010).
143. Catalano, PN; Bourguignon, NS; Alvarez, GS; Libertun, C; Diaz, LE; Desimone, MF and Lux-Lantos, V. Sol-gel immobilized ovarian follicles: Collaboration between two different cell types in hormone production and secretion. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 11681 (2012).
144. Dandoy, P; Meunier, CF; Leroux, G; Voisin, V; Giordano, L; Caron, N; Michiels, C and Su, BL. A Hybrid Assembly by Encapsulation of Human Cells within Mineralised Beads for Cell Therapy. *PLoS ONE*, 8 (2013).
145. Nieto, A; Areva, S; Wilson, T; Viitala, R and Vallet-Regi, M. Cell viability in a wet silica gel. *Acta Biomaterialia*, 5, 3478 (2009).

146. Dickson, DJ and Ely, RL. Evaluation of encapsulation stress and the effect of additives on viability and photosynthetic activity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 encapsulated in silica gel. *Applied Microbiology Biotechnology*, 91, 1633 (2011).
147. Harper, JC; Lopez, DM; Larkin, EC; Economides, MK; McIntyre, SK; Alam, TM; Tartis, MS; Werner-Washburne, M; Brinker, CJ; Brozik, SM and Wheeler, DR. Encapsulation of *S. cerevisiae* in poly(glycerol) silicate derived matrices: Effect of matrix additives and cell metabolic phase on long-term viability and rate of gene expression. *Chemistry of Materials*, 23, 2555 (2011).
148. Perullini, M; Amoura, M; Roux, C; Coradin, T; Livage, J; Japas, ML; Jobbágy, M and Bilmes, SA. Improving silica matrices for encapsulation of *Escherichia coli* using osmoprotectors. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 4546 (2011).
149. Conroy, JFT; Power, ME; Martin, J; Earp, B; Hosticka, B; Daitch, CE and Norris, PM. Cells in sol-gels I: a cytocompatible route for the production of macroporous silica gels. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 18, 269 (2000).
150. Desimone, MF; De Marzi, MC; Copello, GJ; Fernández, MM; Malchiodi, EL and Diaz, LE. Efficient preservation in a silicon oxide matrix of *Escherichia coli*, producer of recombinant proteins. *Applied Microbiology Biotechnology*, 68, 747 (2005).
151. Pannier, A; Oehm, C; Fischer, AR; Werner, P; Soltmann, U and Böttcher, H. Biodegradation of fuel oxygenates by sol-gel immobilized bacteria *Aquicola tertiarycarbonis* L108. *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 291 (2010).
152. Brányik, T; Kuncová, G; Páca, J and Demnerová, K. Encapsulation of Microbial Cells into Silica Gel. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 13, 283 (1999).
153. Sannino, F; Pirozzi, D; Aronne, A; Fanelli, E; Spaccini, R; Yousuf, A and Pernice, P. Remediation of waters contaminated with MCPA by the yeasts *lipomyces starkeyi*

- entrapped in a sol-gel zirconia matrix. *Environmental Science and Technology*, 44, 9476 **(2010)**.
154. Kabaivanova, L; Emanuilova, E; Chernev, G; Samuneva, B; Djambazki, P and Miranda Salvado, IM. Comparative study of two types of hybrid biocatalysts applied in a biodegradation process. *Minerva Biotechnologica*, 19, 57 **(2007)**.
155. Al-Saraj, M; Abdel-Latif, MS; El-Nahal, I and Baraka, R. Bioaccumulation of some hazardous metals by sol-gel entrapped microorganisms. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 248, 137 **(1999)**.
156. Soltmann, U; Raff, J; Selenska-Pobell, S; Matys, S; Pompe, W and Böttcher, H. Biosorption of heavy metals by sol-gel immobilized bacillus sphaericus cells, spores and S-layers. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 26, 1209 **(2003)**.
157. Ramachandran, S; Coradin, T; Jain, PK and Verma, SK. Nostoc calcicola immobilized in silica-coated calcium alginate and silica gel for applications in heavy metal biosorption. *Silicon*, 1, 215 **(2010)**.
158. Desimone, MF; Degrossi, J; D'Aquino, M and Diaz, LE. Ethanol tolerance in free and sol-gel immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 24, 1557 **(2002)**.
159. Alvarez, GS; Desimone, MF and Diaz, LE. Immobilization of bacteria in silica matrices using citric acid in the sol-gel process. *Applied Microbiology Biotechnology*, 73, 1059 **(2007)**.
160. Chacko, JaS, K. Enzymatic degradation of Azo Dyes - A review. *International Journal of Enviromental Sciences*, 1, 1250 **(2011)**.
161. Zimmermann, T; Kulla, HG and Leisinger, T. Properties of Purified Orange II Azoreductase, the Enzyme Initiating Azo Dye Degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of Biochemistry*, 129, 197 **(1982)**.

162. Shanmugam, V; Kumari, M and Yadav, KD, *n-Propanol as a substrate for assaying the ligninperoxidase activity of Phanerochaete chrysosporium*, 1999.
163. Claus, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35, 93 (2004).
164. Hatvani, N and Mecs, I. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. *Process Biochemistry*, 37, 491 (2001).
165. Castillo, G, *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*, IDRC, Canada, 2004.
166. Zajkoska, P; Rebroš, M and Rosenberg, M. Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 97, 1441 (2013).
167. Nassif, N; Roux, C; Coradin, T; Bouvet, OMM and Livage, J. Bacteria quorum sensing in silica matrices. *Journal of Materials Chemistry*, 14, 2264 (2004).
168. Bruna de Campos Ventura-Camargo, MAM-M. Azo Dyes: Characterization and Toxicity– A Review *Textiles and Light Industrial Science and Technology*, 2, 85 (2013).
169. Brown, MA and De Vito, SC. Predicting azo dye toxicity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 23, 249 (1993).
170. Zhang, Z; Li, G and Shi, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 90 (2005).
171. Bowes, JH and Kenten, RH. The amino-acid composition and titration curve of collagen. *Biochemical Journal*, 43, 358 (1948).
172. Bornstein, P and Sage, H. Structurally Distinct Collagen Types. *Annual Review Biochemistry*, 49, 957 (1980).

173. Glanville, RW; Breitskreutz, D; Meitinger, M and Fietzek, PP. Completion of the amino acid sequence of the alpha 1 chain from type I calf skin collagen. Amino acid sequence of alpha 1(I)B8. *Biochemical Journal*, 215, 183 **(1983)**.
174. Piez, KA; Eigner, EA and Lewis, MS. The Chromatographic Separation and Amino Acid Composition of the Subunits of Several Collagens*. *Biochemistry*, 2, 58 **(1963)**.
175. Eastoe, JE. The Amino Acid Composition of Mammalian Collagen and Gelatin. *Biochemical Journal*, 61, 589 **(1955)**.
176. Trut, DCP, ed., *Reactive dyes for textile fibers*, Society of Dyers and Colourists, 1999.
177. Agarwal, D; Sen, K and Gulrajani, ML. Dyeing of silk with bifunctional reactive dyes: the relationship between exhaustion and fixation. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 113, 174 **(1997)**.
178. Hossain, KUaS. A comparative study on silk dyeing with acid dye and reactive dye. *International Journal of Engineering & Technology*, 10, 22 **(2010)**.
179. Haroun, AA. Evaluation of modified leather dyeing technique using black dyestuffs from the economical view. *Dyes and Pigments*, 67 215 **(2005)**.
180. Kantouch, A; Allam, O; El-Gabry, L and El-Sayed, H. Effect of pretreatment of wool fabric with keratin on its dyeability with acid and reactive dyes. *Indian journal of fibre and textile research*, 37, 157 **(2011)**.
181. Lewis, HJCaDM. Reactive dyeing systems for wool fibres based on hetero-bifunctional reactive dyes. Part 1: Application of commercial reactive dyes. *Coloration technology*, 118, 198 **(2002)**.
182. Trelstad, RL; Catanese, VM and Rubin, DF. Collagen fractionation: Separation of native types I, II and III by differential precipitation. *Analytical Biochemistry*, 71, 114 **(1976)**.

183. Einbinder, JS, Maxwell Binding of mucopolysaccharides and dyes by collagen. *Journal of biological chemistry*, 188, 335 **(1951)**.
184. Mocan, E; Tagadiuc, O and Nacu, V. Aspects of Collagen Isolation Procedure. *Curierul medical*, 2, 3 **(2011)**.
185. Bergman, I and Loxley, R. Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline. *Analytical Chemistry*, 35, 1961 **(1963)**.
186. Galindo Gonzalez, C; Alvarez, GS; Camporotondi, DE; Foglia, ML; Aimé, C; Diaz, LE; Coradin, T and Desimone, MF. Preliminary evaluation of median lethal concentrations of Stöber silica particles with various sizes and surface functionalities towards fibroblast cells. *Silicon*, IN PRESS **(2014)**.
187. Cao, H and Xu, S-Y. Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage. *Food Chemistry*, 108, 439 **(2008)**.
188. Marshall, R; Urist, M and Basil, SS. Bone Morphogenetic Protein. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 467, 3051 **(2009)**.
189. Taotao Qiang, ML, Qiaoqiao Bu, Xuechuan Wang. Adsorption of an acid dye on hyperbranched aminated collagen fibers. *Chemical Engineering Journal*, 197, 343 **(2012)**.
190. Copello, GJ; Villanueva, ME; González, JA; López Egües, S and Diaz, LE. TEOS as an improved alternative for chitosan beads cross-linking: A comparative adsorption study. *Journal of Applied Polymer Science*, n/a **(2014)**.
191. Donnaperna Lucio, DL, Gadiou Roger. Adsorption of Remazol Black B dye on Activated Carbon Felt. *Carbon – Science and Technology*, 1, 66 **(2008)**.

192. Dada, AO, Olalekan, A.P, Olatunya, A.M., DADA, O. Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of Zn²⁺ Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk. *Journal of Applied Chemistry*, 3, 38 (2012).
193. Foo, KY and Hameed, BH. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*, 156, 2 (2010).

Resumen

Estudio de métodos alternativos sustentables de remediación

Resumen

El impacto de los residuos generados por la actividad del ser humano sobre el ecosistema ha sido motivo en los últimos años de innumerables esfuerzos en busca de soluciones. En este sentido, una de las áreas que más crecimiento experimentó es el desarrollo de nuevos biosorbentes para ser utilizados como sorbentes en remediación ambiental para la remoción de metales y/o contaminantes orgánicos, tanto en aguas naturales como en efluentes industriales.

Existen más de 100.000 tipos de colorantes que se utilizan comercialmente en industrias, implicando esto el uso de más de 700.000 toneladas al año de los mismos. Pequeñas cantidades (1ppm) en agua de algunos colorantes ya modifican el color de la misma y la hacen no consumible. Muchos de ellos resultan poseer estructuras químicas estables térmicamente y resistentes a la biodigestión aeróbica. En particular, los azo colorantes son los colorantes más utilizados por la industria en la actualidad. Su estructura química particular los convierte en ideales para mantener el color de telas, alimentos, medicamentos, etc., inalterados por mucho tiempo. Se los conoce como colorantes recalcitrantes, es decir que permanecen en el ecosistema mucho más tiempo que colorantes con otra estructura. Es muy difícil que sean degradados por la luz o por los procesos estándares de las plantas de tratamientos de efluentes. Las aguas coloreadas llevan a un cambio total de la flora y la fauna, llegando en casos a la eutroficación. La remoción de azo colorantes de los cursos de agua es de primordial atención.

El presente plan de tesis se dirige hacia promover el avance y la aplicación de la investigación científica relacionada con el manejo de contaminantes del medio ambiente,

como también la formación de recursos humanos en el área de química ambiental y consolidar la inserción de esta temática de alta incumbencia social para el bienestar humano y ecológico.

Los resultados obtenidos en el **primer capítulo** están referidos a la inmovilización de biomoléculas en nanopartículas magnéticas de silicio obtenidas mediante microemulsión inversa por la técnica sol-gel. Ellos nos muestran que el material obtenido es monodisperso, con nanopartículas core/shell donde el interior posee el ferrofluido magnético y el exterior puede ser modificado sin perder las propiedades magnéticas. La enzima (ureasas como modelo) inmovilizada en la superficie de las nanoesferas mantiene su actividad en un largo período de tiempo. Por otro lado, el costo de las enzimas necesarias para decolorar azo colorantes y la necesidad de formar una cadena de reacción para que la decoloración vaya acompañada de una detoxificación mostraron ser económicamente inviables.

El **segundo capítulo** trata de la inmovilización de microorganismos (*Pseudomonas* sp.) capaces de decolorar azo colorantes (negro de Remazol, naranja de metilo y naranja de bencilo) en una matriz de sílica obtenida por la técnica sol-gel. Los resultados obtenidos muestran que las células son capaces de mantener la viabilidad dentro del material polimérico, que el gel no impide la entrada de nutrientes ni la salida de enzimas y productos de desecho y que las bacterias mantienen la viabilidad por largos períodos de tiempo. Puede observarse también que la capacidad de decolorar los colorantes azoicos ensayados se acompaña también de la detoxificación de los mismos, dado que el ensayo realizado con semillas de lechuga mostró mejoras en la germinación de dichas semillas luego del tratamiento con el residuo decolorado.

El **tercer capítulo** trata de la utilización de un biopolímero abundante, biodegradable y de muy bajo costo para la adsorción de azo colorantes reactivos (Remazol black) en solución

acuosa. En el capítulo se muestra la excelente capacidad de adsorción del hidrogel de colágeno tipo I para este tipo de colorantes, el estudio de las interacciones entre sorbente y sorbato y la comparación entre diferentes azo colorantes con otras estructuras químicas (rojo Congo y marrón de Bismarck). Asimismo se muestra el efecto del agregado de nanopartículas de silicio obtenidas por la técnica sol-gel en las propiedades mecánicas del hidrogel de colágeno y como repercute este agregado en la adsorción de azo colorantes reactivos.

En definitiva, el presente trabajo de tesis permitió, por un lado, abordar aspectos básicos relacionados con la técnica sol-gel y describir una nueva forma de obtener nanopartículas magnética huecas, por otro lado trabajar sobre la inmovilización de biomoléculas en superficie e inmovilización de microorganismos por atrapamiento y finalmente describir el uso de un biopolímero de muy bajo costo y muy abundante para abordar el tema de remediación de los azo colorantes en los cursos de agua. Cada capítulo incluye el análisis de costo de fabricación de cada material para realizar la comparación final entre ellos desde el punto de vista económico.