



Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
Facultad de Química/Kimika Fakultatea

Grado en Química

TRABAJO DE FIN DE GRADO

“Inmovilización de biocatalizadores en reactores estructurados para la eliminación de fenoles y tintes en aguas”

Autor: Aitor Ontoria

Dirigido por: Prof. Oihane Sanz y Dra. Ana Beloqui.

San Sebastián, septiembre del 2022

Índice

1	Resumen/ <i>Abstract</i>	4
2	Introducción	5
3	Objetivos	11
4	Apartado experimental	12
4.1	Materiales y métodos	12
4.2	Preparación de monolitos de Fecralloy con SBA-15	13
4.2.1	Preparación de los monolitos.....	13
4.2.2	Síntesis de SBA-15	14
4.2.2.a	Caracterización del SBA-15.....	14
4.2.3	Recubrimiento de los monolitos	15
4.2.3.a	Caracterización de los monolitos	16
4.3	Monolitos de polidimetilsiloxano.....	16
4.3.1	Caracterización de los monolitos	17
4.4	Síntesis e inmovilización de biocatalizadores	17
4.4.1	Síntesis de los SEN.....	17
4.4.1.a	Caracterización de los SEN	19
4.4.2	Síntesis de los INR	20
4.4.2.a	Caracterización de los INR.....	21
4.4.3	Inmovilización de los biocatalizadores sobre monolitos.....	21
4.5	Caracterización de la actividad de los monolitos.....	21
5	Resultados y discusión	23
5.1	Depósito de SBA-15 sobre monolitos de Fecralloy	23
5.1.1	Propiedades del SBA-15 sintetizado.....	23
5.1.2	Preparación de la suspensión de SBA-15	24
5.1.3	Recubrimiento de monolitos de Fecralloy	27
5.2	Monolitos de polidimetilsiloxano.....	29
5.3	Síntesis de nanogeles de una única enzima (SEN) y de nanoreactores integrados (INR). 31	
5.3.1	SEN	31
5.3.2	INR.....	33
5.4	Inmovilización de los biocatalizadores.....	33
5.5	Actividad de los monolitos	34
6	Conclusiones/ <i>conclusions</i>	40
7	Referencias.....	41

8	Anexo.....	44
---	------------	----

1 Resumen/Abstract

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de un soporte mesoporoso de sílica, para la inmovilización de biocatalizadores en reactores estructurados. La gran área superficial de este soporte, así como su distribución de poro, dan lugar a un entorno ideal para la llevar a cabo catálisis en continuo. También se han inmovilizado biocatalizadores en monolitos de polidimetilsiloxano de manera exitosa. Estos monolitos presentan grandes ventajas como su transparencia, que los hace ideales para la fotocatalisis. Se han llevado diferentes reacciones dependiendo del biocatalizador inmovilizado. Los monolitos con glucosa oxidasa inmovilizada, llevaron a cabo exitosamente la reacción de formación de peróxido de hidrógeno. En el caso del tándem las enzimas de glucosa oxidasa con peroxidasa de rábano y los nanoreactores integrados se llevaron a cabo la eliminación de pirogalol y azul de metileno de mezclas acuosas de manera exitosa. Estas reacciones de eliminación se dieron a modo de cascada, utilizando como únicos sustratos la glucosa y el contaminante a eliminar.

Herein, the synthesis and characterization of a mesoporous silica based support for the immobilization of biocatalysts are shown. The large surface area and the pore distribution led to a great environment for flow catalysis. Biocatalysts were also immobilized in polydimethylsiloxane monoliths successfully. These monoliths show some great advantages like the transparency that provides the possibility to carry out photocatalysis. Different reactions were carried out depending on the biocatalyst immobilized. The monoliths with glucose oxidase carried out the reaction of formation of hydrogen peroxide. Both the tandem of glucose oxidase with horseradish peroxidase and the integrated nanoreactors performed the reactions of elimination of pyrogallol and methylene blue from aqueous mixtures successfully. The elimination reactions occurred in cascade mode, using as only substrates glucose and the pollutant.

2 Introducción

La superpoblación es uno de los problemas con mayor impacto en el medio ambiente del planeta. El agua es un elemento esencial para la vida. Un 3% del agua del mundo es dulce, pero tan solo el 0,01% de esta agua dulce está disponible para consumo humano. Por desgracia debido al crecimiento demográfico, la urbanización y la agricultura el agua para consumo está bajo un alto riesgo de contaminación¹. Siendo los contaminantes orgánicos unos de los contaminantes más peligrosos por su persistencia. Dentro de estos contaminantes podemos encontrar los compuestos fenólicos siendo el bisfenol A un claro ejemplo. Otro tipo de contaminantes orgánicos son los tintes.

Una gran fuente de contaminación de aguas por el bisfenol A son los efluentes de la industria papelera². Este compuesto trae consigo grandes problemas de salud para los ecosistemas acuáticos. Estos problemas van desde deformidades hasta la feminización o la inhibición del crecimiento³.

En el caso de los peces cebra, a concentraciones tan bajas como 100 µg/L, el bisfenol A es capaz de causar deformidades embrionarias o hemorragias. Aumentando algo la concentración del contaminante, los peces machos sufren una inhibición del crecimiento. En el caso de las ranas, el bisfenol A es capaz de matar a los individuos en estado embrionario teniendo un LD₅₀ de 210 µM. En las ranas este compuesto es capaz de inducir también la feminización, siendo este un gran problema ambiental ya que las colonias afectadas por este contaminante desaparecen tras esa generación. Este contaminante también puede llegar a afectar a reptiles como los caimanes, si los huevos son expuestos a este compuesto se induce la feminización del individuo³. Resaltar además que el bisfenol A no solo afecta a organismos acuáticos, también puede afectar a organismos terrestres como las ratas. En estos organismos la exposición al bisfenol A puede causar desde aumento de peso, hasta aumento de la presión sanguínea y una respuesta de vasodilatación menor a la normal⁴.

La industria textil también contribuye en gran medida a la contaminación de aguas, entre sus residuos se encuentran los tintes. En los procesos de tintado de los textiles no todo el tinte se adhiere a las fibras, una parte de estos tintes es liberada y esto da lugar a un efluente contaminado. El uso de tintes es indispensable en la industria debido a que el color es un factor limitante en las decisiones de compra de los productos. Hoy en día se estima que más de cien mil químicos son sintetizados con el fin de ser usados como tintes⁵. Los efluentes contaminados con tintes son unos de los efluentes más problemáticos.

La presencia de tintes en los ecosistemas causa diversos problemas. El primero de estos es el aumento de las demandas química y biológica de oxígeno. El aumento de estas demandas de oxígeno puede causar grandes problemas como por ejemplo la anoxia del entorno, que lleva consigo la muerte de una gran parte de especies. Además de esto, el color que tienen los tintes los hace también unos contaminantes reconocibles por el ojo humano (Imagen 1). El color también afecta a la fotosíntesis de las algas, impidiendo la penetración de ciertas longitudes de onda al agua. La presencia de grupos aromáticos en estos tintes también los hace tóxicos para los ecosistemas acuáticos⁶. Estos compuestos son diseñados para tener una gran estabilidad, esto provoca que puedan quedar atrapados en los sedimentos lo que los hace un peligro latente: Si los sedimentos son movidos se libera el contaminante incluso tiempo después del vertido.



Imagen 1. Contaminación de un río africano a causa de los tintes⁷

Por los grandes problemas que pueden causar estos contaminantes orgánicos es importante el desarrollo de sistemas capaces de eliminar estos compuestos de los efluentes. Existen diferentes métodos de eliminación de los tintes de aguas. Entre estos métodos se encuentran la adsorción, la fotocatalisis y la oxidación, la descomposición microbiológica y la descomposición enzimática⁸. Las enzimas se utilizan por su capacidad de catalizar en condiciones suaves y su alta selectividad. La descomposición de los tintes con enzimas es un campo ampliamente estudiado. Por ejemplo, se ha demostrado la capacidad de la peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) en la descomposición de tintes azo⁸ como por ejemplo el azul de metileno.

También existen publicaciones que demuestran la capacidad de la enzima HRP para la oxidación del bisfenol A y su polimerización⁹. La HRP es capaz de oxidar diversos contaminantes orgánicos usando como sustrato el peróxido de hidrógeno. Además, ésta puede combinarse con la capacidad de la glucosa oxidasa (GOx) de generar peróxido de hidrógeno se para eliminar, mediante la acción conjunta de estas enzimas, estos contaminantes del agua con tan solo glucosa como sustrato.

En los últimos años se ha tratado de imitar sistemas biológicos mediante diferentes técnicas en el laboratorio, tales como la obtención de enzimas artificiales o sistemas que las imiten. Existen diferentes enfoques para el desarrollo de estos sistemas, entre ellos se encuentra encerrar en micelas grupos que tengan actividad catalítica proporcionando así un entorno que imite los bolsillos hidrofóbicos de ciertas enzimas¹⁰. También existe la posibilidad de formar hidrogeles que sean capaces de coordinar grupos con actividad catalítica¹¹. Otro enfoque es utilizar las propiedades de las enzimas para lograr otros fines como, por ejemplo, el desarrollo de nanonadadores capaces de moverse en fluidos gracias a la conversión de energía química en energía mecánica¹². Además, es posible combinar los avances de en estos campos para obtener enzimas artificiales que sean híbridos entre metales y enzimas. Gracias a estos híbridos se pueden llevar a cabo diferentes reacciones en cascada catalizadas por enzimas y metales¹³. Así, el grupo de investigación de la Dra. A. Beloqui utiliza un método en el que se encapsula la enzima GOx en nanogeles, para posteriormente modificar estos nanogeles y otorgarles la una actividad tipo peroxidasa¹⁴. Gracias a esta encapsulación es posible llevar a cabo una reacción que necesita dos enzimas tan solo utilizando estos híbridos. En la Figura 1 se muestra un esquema de la la síntesis de estos nanogeles, que tiene dos pasos principales, primero la formación del nanogel y después la modificación del nanogel para otorgarle la actividad peroxidasa.

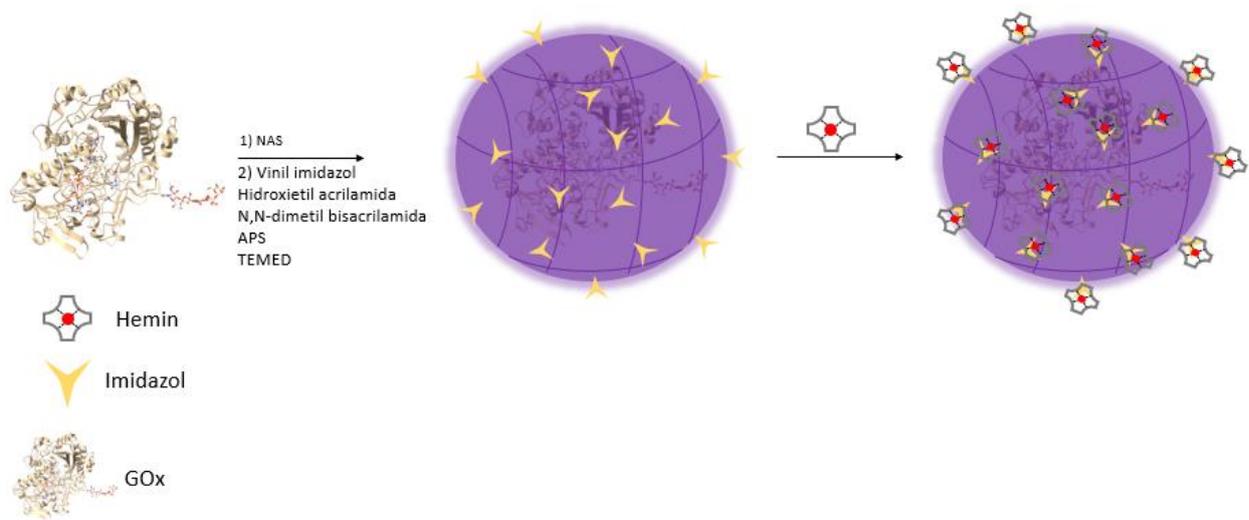


Figura 1. Esquema de la encapsulación de la enzima GOx en nanogel con actividad peroxidasa

Estos nanogel no solo otorgan otra actividad catalítica al sistema, también otorgan protección. Además de no envenenarse, gracias a estos nanogel se evitan interacciones directas entre la proteína y el soporte (tras la inmovilización), lo que ayuda a proteger la proteína; además también otorgan protección ante disolventes orgánicos. Un factor importante para evitar el envenenamiento de los catalizadores es mantener las concentraciones de los reactivos a concentraciones no demasiado altas. Esta aproximación mantiene la cantidad de peróxido de hidrógeno en disolución baja, ya que tras generar el peróxido de hidrógeno la GOx la cápsula del nanogel lo consume evitando así problemas de difusión y de envenenamiento. Estos nanomateriales se han denominado nanoreactores integrados (*"Integrated nanoreactors"*, INR por sus siglas en inglés). En la Figura 2 se muestran las reacciones llevadas a cabo por los diferentes componentes de los INR.

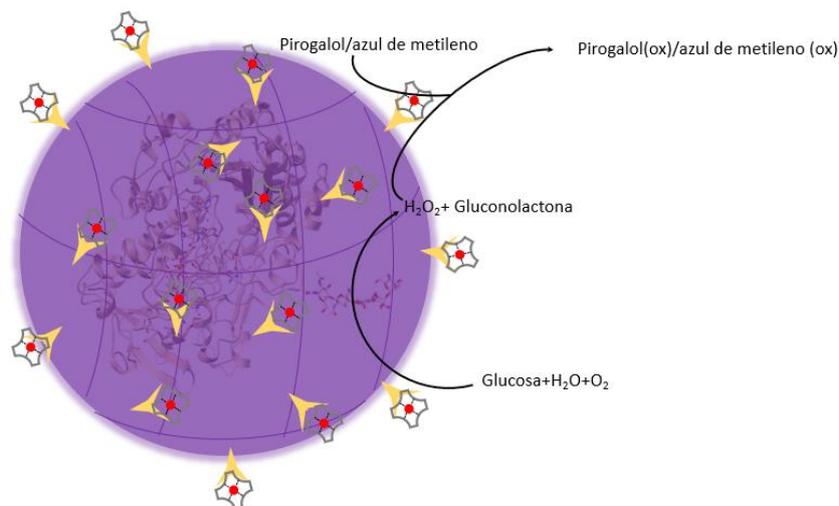


Figura 2. Reacciones llevadas a cabo por los INR.

Las reacciones enzimáticas son biocatalíticas en fase homogénea, es decir, tanto sustratos como catalizador se encuentran en la misma fase generalmente acuosa. En todos los procesos los catalizadores son recuperados al final de la reacción, pero en el caso de la catálisis homogénea muchas veces es difícil separar el catalizador de los productos, lo que genera productos menos puros o residuos indeseados. En los sistemas tradicionales de biocatalizadores, los reactores de tanque agitado son el método más común, ya que éste es el tipo de reactor más ampliamente disponible. El agitador proporciona la energía mecánica necesaria para mezclar o combinar los reactivos. Sin embargo, en este tipo de métodos la productividad volumétrica es relativamente baja y las colisiones de la enzima con los agitadores puede degradar la enzima¹⁵.

En la catálisis heterogénea el catalizador y los reactivos o productos se encuentran en fases diferentes, lo que hace la separación sea más fácil, por ejemplo, mediante filtración. Los problemas del uso de enzimas libres pueden reducirse significativamente si se inmoviliza el biocatalizador en soportes sólidos, convirtiendo el biocatalizador en catalizador heterogéneo. Estos soportes pueden tener más o menos actividad catalítica¹⁶, y entre otras cosas estos soportes tienen una gran área superficial, lo que hace que se pueda inmovilizar más cantidad de catalizador en un volumen reducido.

Uno de los soportes más utilizados son los materiales mesoporosos basados en sílica, siendo la *Santa Barbara Amorphous* (SBA) una familia de éstos. Esta familia de soportes se sintetizó por primera vez en 1998 y causó un gran interés en la comunidad científica por varios motivos entre los que se encuentran, una estructura de los poros bien definida, un tamaño de poro adecuado (4,6-30 nm) y unas paredes de poro resistentes. Por todas estas razones estos materiales son adecuados para muchos usos como catálisis o inmovilización. Dentro de esta familia uno de los más estudiados es el SBA-15. Este material es muy interesante ya que además de mesoporos contiene microporos. Estos microporos son formados en el proceso de síntesis del material, ya que se utiliza un copolímero que dirige el crecimiento de los poros, pero pequeñas zonas de este copolímero quedan imbuidas en el material final, haciendo que al eliminarlo se formen los microporos. Además, es posible funcionalizar el material para así adquirir nuevas características¹⁷. Los materiales de este tipo tienen una gran cantidad de utilidades, entre las que se encuentra el uso en vacunas para mejorar las inmunoterapias,¹⁸ o como anteriormente se ha mencionado como soportes para inmovilizar catalizadores.

Existen diferentes métodos de inmovilización de enzimas en soportes sólidos: adsorción física, enlace iónico, enlace por afinidad, enlace covalente, entrecruzamiento y atrapamiento. La adsorción física tiene algunas ventajas como su bajo coste, fácil preparación y poca limitación de difusión, pero presenta una gran desventaja y es que la adhesión del biocatalizador al soporte es limitada lo que provoca poca inmovilización, así como la liberación de los catalizadores con el tiempo¹⁹.

La adsorción física se basa en interacciones no específicas como fuerzas de Van Der Waals o interacciones hidrofóbicas. Con esta técnica se pueden mantener unas condiciones suaves y evitar el uso de disolventes orgánicos, lo que hace que la posibilidad de que ocurran cambios conformacionales en la enzima sea pequeña¹⁹. A pesar de que sobre SBA-15 sin modificar es posible inmovilizar enzimas por adsorción física como se muestra en la literatura²⁰, también es posible modificar el material para así mejorar la afinidad de este o incluso para enlazar los biocatalizadores covalentemente. Uno de los compuestos más utilizados para esta modificación es el (3-Aminopropil)trietoxisilano (APTES) el cual permite anclar los biocatalizadores covalentemente a los soportes.

Aunque la inmovilización de las enzimas en estos soportes facilita la separación del medio de reacción, debido a los grandes volúmenes de los efluentes industriales a tratar, esta disposición del reactor (lecho de partículas de biocatalizador) produce grandes pérdidas de carga, que se traducen en un mayor coste energético. Una de las maneras de reducir la pérdida de carga es depositar el biocatalizador inmovilizado sobre reactores estructurados. Los reactores estructurados son estructuras rígidas con grandes poros o canales que aseguran una baja pérdida de carga y que exponen una elevada área superficial lateral sobre la que se puede pegar una delgada película de catalizador. Algunos tipos de catalizadores estructurados son los monolitos, espumas y mallas. (Imagen 2)

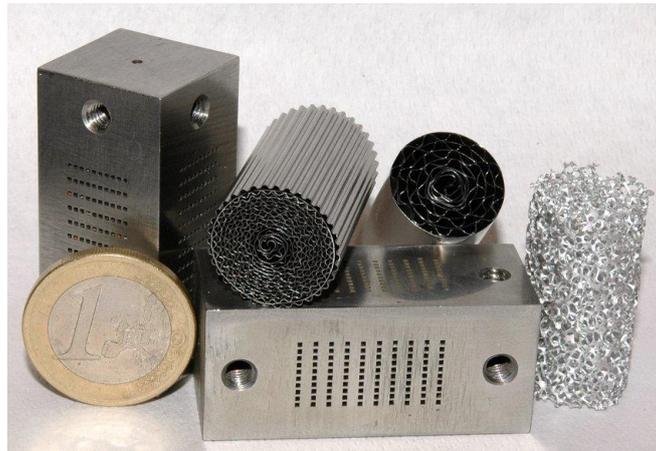


Imagen 2. Reactores estructurados²¹.

Entre todos los reactores estructurados los monolitos tienen una aplicación prometedora debido a su superficie geométrica alta y su gran fracción vacía, lo que proporciona accesibilidad de los reactivos al biocatalizador con baja pérdida de carga. Existen diferentes materiales para la fabricación de estos monolitos, entre ellos se encuentran los metálicos (aluminio, latón, acero, etc.)²² y los plásticos (ácido poliláctico PLA, polidimetilsiloxano PDMS, etc.)

Los metálicos, entre ellos los aceros de aleaciones como el FeCrAl, son los más estudiados debido a que tienen grandes aplicaciones en la catálisis térmica como los reactores de los coches para la eliminación del hollín y la reducción de los NOx.

Entre los plásticos se encuentra el PDMS. Éste es un polímero termoplástico muy utilizado en el mundo de la microfluídica, debido a su facilidad de fabricación, su transparencia que permite la monitorización de los microcanales y su biocompatibilidad. La transparencia de estos dispositivos nos permite poder llevar a cabo reacciones fotocatalizadas²³ o para mejorar técnicas espectroscópicas²⁴. Los primeros dispositivos de microcanales se fabricaban con cristal y la incorporación de esta silicona en el campo fue un gran avance²⁵. Gracias a este material es fácil añadir diferentes componentes al dispositivo, como por ejemplo calentadores que puedan ayudar a mantener una temperatura ideal para la catálisis. Este material es un avance para la microfluídica permitiendo que avancen los dispositivos *Lab on a chip*. Este tipo de dispositivos

son muy interesantes para llevar a cabo ensayos con volúmenes mucho más pequeños de lo que sería posible a una escala normal.

3 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo y comparación de dos sistemas de inmovilización de biocatalizadores, en monolitos estructurados para la eliminación de contaminantes orgánicos de agua. Para lograr este objetivo principal hay varios objetivos secundarios. El primero de estos objetivos es la encapsulación de los biocatalizadores en nanogeles. Otro de estos objetivos es la inmovilización del biocatalizador sobre SBA-15 posteriormente depositarlo sobre monolitos metálicos y por último la inmovilización de los biocatalizadores en monolitos plásticos.

4 Apartado experimental

4.1 Materiales y métodos

El poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol) (Pluronic P123), el Ludox AS30, hidroxietilacrilamida (HEAA), el vinil imidazol (VIm) y el Tween 20 fueron obtenidos de Sigma. El ácido nítrico; el fosfato monobásico y dibásico; la glucosa oxidasa (GOx); la glucosa; la N, N, N', N'-tetrametilendiamina (TEMED); la N, N-dimetilbisacrilamida (Bis); el hidróxido sódico y tris fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El Tetraetil ortosilicato (TEOS) fue obtenido de Acros Organics. La horseradish peroxidase (HRP) fue obtenida de Thermoscientific. El ABTS, sacarosa, hemin fueron obtenidos de Alfa Aesar. La N-Acrlaxisuccinimida (NAS) y el ácido trifluoroacético (TFA) fueron obtenidos de Scharlab. El dimetilsulfóxido (DMSO), el persulfato amónico (APS) y el acetonitrilo fueron obtenidos de Scharlau. La acrilamida fue obtenida de Biorad. El azul de metileno fue obtenido de VWR. Las planchas de acero de FeCrAl (Fecralloy) se obtuvieron de Goodfellow.

Para las medidas texturales mediante fisiorción de N₂ el equipo utilizado fue el Micromeritics ASAP 2020.

El molino de bolas utilizada fue de la marca Retsch modelo PM 100.

Para las medidas de potencial Z el equipo elegido fue de la marca Malvern modelo Zetasizer Nano-ZS.

El estudio de la viscosidad de la suspensión se realizó con un viscosímetro TA instrument AR1500ex.

Para estudiar el tamaño de partícula del soporte sintetizado se utilizó un Mastersizer 2000.

Los estudios visuales de las diferentes superficies se realizaron con un microscopio electrónico de barrido marca Hitachi modelo TM3030Plus.

El equipo elegido para medir las concentraciones de las proteínas fue el NanoPhotometer NP80 de la marca Impln.

Para las medidas de absorbancia de los tintes el equipo escogido fue un plate reader BioTek Synergy neo2.

El equipo utilizado para medir el FTIR de los nanogeles fue de la marca PerkinElmer modelo Frontier con un accesorio para medidas de reflectancia total atenuada.

Para la cuantificación del pirogalol se utilizó un HPLC Shimadzu Nexera Series. La columna utilizada en el HPLC fue una columna ACE 3 C18-PFP (longitud de 150 mm y un diámetro interno de 4,6 mm). El flujo de la fase móvil fue de 0,3000 mL/min. El detector fue un detector Photo Diode Array (PDA) marca Shimadzu modelo SPD-M40. La fase móvil fue variando en el proceso y se utilizó un gradiente. Se utilizaron dos fases móviles diferentes, ácido tricloroacético 0,1% (v/v) (fase A) y acetonitrilo (fase B). La variación de la fase móvil fue la siguiente desde el inicio hasta 0,3 min 10 % de fase B, en el intervalo 0,3-6,3 min la fase B aumento hasta el 95%, en el intervalo 6,3-8,3 min se mantuvo la fase B al 95% y por último desde el minuto 8,3 hasta el final se mantuvo la fase B al 10%. El auto muestreador fue un Shimadzu SIL-40C. El pistón un Shimadzu LC-40D. El horno para la columna fue un Shimadzu CTO-40C, la temperatura se mantuvo a 40 °C durante todo el proceso.

4. 2 Preparación de monolitos de Fecralloy con SBA-15

A continuación, se presenta la metodología utilizada para la preparación de biocatalizadores sobre monolitos metálicos de Fecralloy. Inicialmente, se prepararon los monolitos de acero. Posteriormente, tras las síntesis de SBA-15 se depositó mediante el método de recubrimiento por inmersión sobre la superficie de los monolitos.

4. 2. 1 Preparación de los monolitos

Para la preparación de los monolitos de Fecralloy (aleación Fe22Cr5Al) lo primero es cortar láminas (grosor de 50 μm) de las dimensiones adecuadas para después formar los monolitos. Los monolitos tienen una geometría cilíndrica con una altura de 2 cm y un diámetro de 14,5 mm. Para cada monolito se necesitan dos láminas de longitud diferente ya que una de las láminas será posteriormente ondulada (Imagen 3). La lámina que será ondulada posteriormente tiene una longitud de 40 cm, en cambio la lisa tiene una longitud de 29 cm.

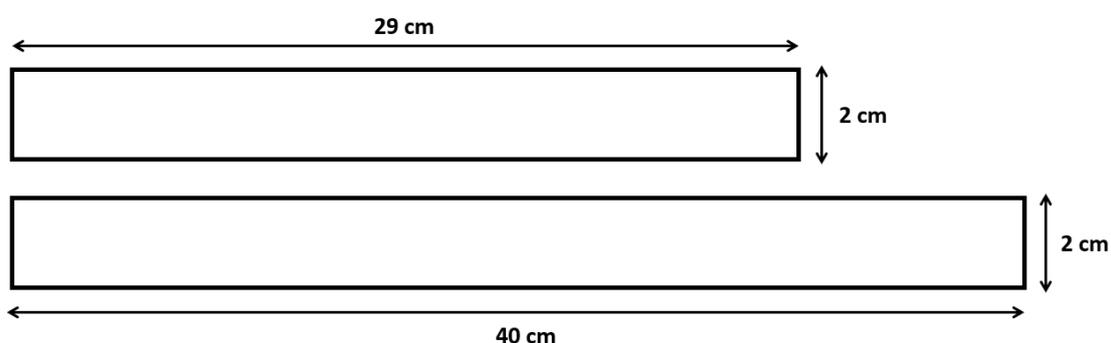


Imagen 3. Dimensiones de las láminas de Fecralloy

Una vez cortadas las láminas se ondula la de mayor longitud y se superponen formando así los canales. Para finalizar, se pliegan las láminas sobre si mismas formando así una espiral concéntrica, que da lugar a la geometría cilíndrica del monolito (Imagen 4). Finalmente, los monolitos fueron calcinados a 900 °C durante 22 h para la formación de una superficie rugosa de Al_2O_3 para mejorar la adherencia del SBA-15.



Imagen 4. Monolito de Fecralloy

4. 2. 2 Síntesis de SBA-15

La síntesis de SBA-15 se realizó siguiendo el método reportado en la literatura²⁶. En una síntesis típica de SBA-15 se utilizan 9,6 g de Pluronic P 123, 225 g de agua MiliQ, 150 g de ácido nítrico 0,5 M y 20 g de tetraetilortosilicato (TEOS), siendo esta última la fuente de silicio del soporte.

El sistema utilizado para la síntesis se presenta en la Imagen 5 y el procedimiento es el siguiente:

Se disuelve la totalidad del P123 (9,6 g) en agua y ácido nítrico 0,5 M (225 g y 150 g respectivamente), dejándolo en agitación y al baño maría a 35 °C durante 4 h. Después, se aumenta la agitación y se añade el TEOS (20 g). Tras 1 min se reduce la agitación al valor inicial y se mantiene durante 24 h a 35 °C tapando el recipiente con papel de parafina. Tras las 24 h se debe sellar el bote herméticamente y mantenerlo a 80 °C durante 72 h (en esta etapa se lleva a cabo el tratamiento hidrotérmico). Una vez pasado el tratamiento hidrotérmico se enfría la muestra y se filtra el sólido. El sólido filtrado se lava con abundante agua hasta obtener un pH neutro. El sólido limpio se seca a 80 °C durante 24 h y posteriormente se calcina a 500 °C durante 6 h, con una rampa térmica de 1 °C/min.



Imagen 5. Montaje para la síntesis de SBA-15

4. 2. 2. a Caracterización del SBA-15

Para caracterizar las propiedades texturales del SBA-15 sintetizado se utilizaron las isoterma de adsorción/desorción a 77 K. Mediante esta técnica y con el método de Brunauer-Emmet-Teller (BET) se calculó el área superficial del sólido, así como las dimensiones de los meso y microporos presentes. Para el cálculo del volumen poroso se utilizó el método BJH. Para llevar a cabo el análisis se tomaron aproximadamente 200 mg de muestra por cada ensayo. Previo a la medida de las propiedades texturales las muestras se sometieron a una etapa de desgasificación (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de desgasificación de la muestra.

Condiciones de desgasificación					
Fase de evacuación		Fase de calentamiento	Fases de evacuación y calentamiento		
Rampa de temperatura	10 °C/min	Rampa de temperatura	10 °C/min	Mantener presión	10 mmHg
Temperatura objetivo	180 °C	Temperatura objetivo	180 °C		
Velocidad de evacuación	3 mmHg/s	Tiempo de espera	180 min		
Evacuación sin restringir desde	5 mmHg				
Objetivo de evacuación	100 μmHg				
Tiempo de evacuación	120 min				

Para seleccionar el pH adecuado que asegure una buena estabilidad de la suspensión de SBA-15 se llevó a cabo la medida del potencial Z de la muestra. Para ello, se midió el potencial Z a diferentes pH entre 2 y 10. Para esta medida, se tomaron aproximadamente 20 mg de muestra y se dispersaron en 50 mL de una disolución acuosa de NaCl 0,03 M a diferentes pH. El pH de las disoluciones se ajustó con ácido nítrico y amoniaco.

Para estudiar la reología de la suspensión se midió la viscosidad de la suspensión previamente preparada. Se tomaron 6,06 mL de muestra y se ensayaron a diferentes velocidades de cizalladura que iban desde 0 s⁻¹ hasta 3600 s⁻¹.

Se estudió el tamaño de partícula del SBA-15 sintetizado. Este parámetro es importante para la posterior deposición del soporte sobre el monolito. Cuanto menor sea el tamaño de partícula, más homogénea es la deposición sobre los monolitos. Por tanto, la muestra se molió diferentes tiempos hasta obtener el tamaño de partícula deseado. Para la molienda se pesaron 2,58 g de muestra y se fueron extrayendo muestras de 150 mg a diferentes tiempos. Una vez terminada la molienda se dispersó el sólido en agua a pH 8 y de midió el tamaño de partícula. La medida del tamaño se estudió por difracción laser.

Por último, para observar la morfología de las partículas se analizó el sólido con un microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés).

4. 2. 3 Recubrimiento de los monolitos

Para el recubrimiento de los monolitos metálicos de Fecralloy se siguió el procedimiento de recubrimiento por inmersión (*washcoating*) reportado en la literatura ²⁶. Los monolitos fueron sumergidos en la suspensión de SBA-15 a una velocidad de 3 cm/min, se mantuvieron sumergidos durante 1 min y se sacaron de la suspensión a la misma velocidad (Imagen 6). Para evitar posibles bloqueos de los microcanales, una vez sacados de la suspensión se centrifugaron a 400 rpm durante 1 min. Después de centrifugar los monolitos se secaron en una estufa a 120 °C (393 K). Este procedimiento se repite hasta obtener la cantidad de SBA-15 depositado deseado. Una vez los monolitos tienen la cantidad adecuada de SBA-15 depositado se calcinan a 500 °C (773 K) durante 2 h con una rampa de temperatura de $2 \frac{K}{min}$.



Imagen 6. Montaje para el proceso de recubrimiento por inmersión.

Para preparar la suspensión de SBA-15 se escaló un procedimiento anteriormente reportado en la literatura²⁶. Se preparó una suspensión de SBA-15 al 15% de contenido en sólidos. Para la preparación de la suspensión se utilizó el SBA-15 sintetizado y Ludox AS30, un coloide comercial como aglutinante con un contenido de SiO₂ amorfo del 30% en peso. El ratio de $\frac{SiO_2}{SBA-15+SiO_2}$ fue de 0,16. Para preparar una suspensión con un peso final de 50 g son necesarios los siguientes componentes, SBA-15 (6,3 g), Ludox AS30 (4 g, que equivalen a 1,2 g de SiO₂) y agua a pH 8 (39,7 g). Para preparar la suspensión se añade la totalidad de SBA-15 lentamente al agua en agitación magnética, una vez añadido todo el SBA-15 se añade el coloide. A las 24 h y 96 h desde que se prepara la suspensión se mide la viscosidad de ésta.

4. 2. 3. a Caracterización de los monolitos

Para los monolitos de Fecralloy la principal característica que se estudió mediante SEM fue la superficie de la aleación, antes y después de calcinar.

Tras recubrir los monolitos de Fecralloy con el SBA-15, se analizaron sus propiedades texturales mediante las isotermas de adsorción/desorción a 77 K.

Los monolitos de Fecralloy se sometieron también a un test de adherencia en éter de petróleo. Para realizar el test se sumergieron los monolitos en éter de petróleo y se mantuvieron 30 minutos en un baño de ultrasonidos. La adherencia se calculó con la diferencia de masas tal y como se refleja en Ecuación 1.

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo de la adherencia

$$Adherencia = \frac{Masa \text{ de SBA - 15 tras ultrasonidos}}{Masa \text{ inicial de SBA - 15}} * 100$$

4. 3 Monolitos de polidimetilsiloxano

A continuación, se muestra el método para la obtención de biocatalizadores depositados sobre monolitos de plástico (polidimetilsiloxano). Los monolitos fueron adquiridos del grupo del Dr. Ismael Pellejero de la Universidad Pública de Navarra e InaMat.

4.3.1 Caracterización de los monolitos

Las principales características que se estudiaron de estos monolitos fueron la distribución y el tamaño de los microcanales así como la morfología de la superficie. Este estudio se llevó a cabo mediante SEM.

4.4 Síntesis e inmovilización de biocatalizadores

A continuación, se describe la síntesis de los nanogeles de una única enzima (*single enzyme nanogels*, SEN) así como la síntesis de los nanoreactores integrados (*integrated nanoreactors*, INR). Y, finalmente, la inmovilización tanto en monolitos de Fecralloy como en monolitos de PDMS.

4.4.1 Síntesis de los SEN

En la síntesis de los *single enzyme nanogels* (SENs) podemos distinguir dos fases. La primera fase consiste en acrilóilar la glucosa oxidasa (GOx). Para acrilóilar la enzima se calculó la cantidad de residuos de lisina presentes en la proteína. Para ello, se utilizó el software Chimera X para estudiar la secuencia de la proteína. La glucosa oxidasa se trata de un dímero de dos cadenas iguales y cada una de estas cadenas tiene 15 lisinas. Una vez calculados los residuos se añadieron 10 equivalentes de N-acriloxisucínimida (NAS) por cada residuo de lisina. Es necesario acrilóilar la proteína para asegurar un buen anclaje del nanogel a la proteína. Antes de acrilóilar se dializó la enzima para eliminar las posibles impurezas. Se preparó una disolución de 5 mg/mL de GOx en agua y se disolvió la cantidad necesaria de NAS en dimetilsulfóxido (DMSO). La relación agua/DMSO fue 85/15 y, tal y como se refleja en la Tabla 2, el ratio de NAS/GOx fue de 300. Se vertió la disolución de NAS sobre la de GOx y se dejó en agitación durante la noche a 37 °C. En la Tabla 2 se muestran las cantidades necesarias para acrilóilar la GOx.

Tabla 2. Cantidades y ratios empleados para acrilóilar la GOx

	GOx	NAS
Ratio (n_x/n_{GOx})	1	300
Cantidad (mg)	7,28	2,31

El siguiente paso consiste en la encapsulación de la GOx acrilóilada. Para ello, se modificó un procedimiento anteriormente reportado en la literatura¹⁴. Los iniciadores de la polimerización utilizados fueron persulfato amónico (APS) y tetrametilendiamina (TEMED); estos iniciadores son sensibles al oxígeno por tanto se burbujearon todas las disoluciones con nitrógeno y las reacciones se dieron en entornos herméticos para así evitar posibles interferencias con el oxígeno.

Los compuestos utilizados para sintetizar los nanogeles fueron los siguientes:

Hidroxietilacrilamida (HEAA), N, N-dimetilbisacrilamida (BIS), Vinil imidazol (VIm), APS, TEMED, GOx, DMSO, sacarosa, agua, buffer fosfato 300 mM. Y sus cantidades se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cantidades para la síntesis de los SEN y ratio de moles de monómero/moles de proteína.

compuesto	Cantidad
HEAA 10% (μL ; n/n_{prot})	30,22; 600
BIS 10% (μL ; n/n_{prot})	26,97; 400
VIm 10% (μL ; n/n_{prot})	15,85; 4000
APS 10% (μL)	39,93
TEMED (μL)	1,31
GOx (mg)	7
DMSO (μL)	30
Sacarosa (mg)	109,37
Agua (μL)	1087,58
Buffer fosfato 300 mM (μL)	120,84

La función de los monómeros HEAA, BIS, VIm es proporcionar un entorno favorable para la próxima coordinación de los grupos hemo. La función de la sacarosa es favorecer las interacciones entre los monómeros y la proteína.

Para la síntesis de los nanogeles se prepararon disoluciones al 10% (m/v) de los monómeros y del APS en agua. La disolución de BIS se preparó en DMSO desoxigenado por burbujeo de N_2 y la disolución de APS se burbujeo con N_2 para desoxigenarla. En la Imagen 7 se muestra el montaje para la síntesis de los nanogeles.



Imagen 7. Montaje para la síntesis de los SEN

El procedimiento utilizado para la síntesis fue un procedimiento escalado de la literatura¹⁴. Las cantidades utilizadas están reflejadas en la Tabla 3. Primero se disolvió la sacarosa en la mezcla del agua, DMSO y buffer fosfato 300mM. Por otra parte, se mezcló la cantidad necesaria de monómeros y TEMED. La mezcla de monómeros y TEMED se añade sobre la sacarosa y se deja 45 min burbujando. Una vez pasado el tiempo se añade la cantidad de enzima necesaria y se burbujea por media hora más. Hasta este punto se mantuvieron las mezclas en frío.

Una vez pasada la media hora, se añade el APS necesario y en este momento comienza la polimerización. Para la polimerización de los nanogeles se mantuvo a 37 °C durante 2 h y con una agitación de 600 rpm en un termo agitador. Una vez pasadas las dos horas se metió el producto de reacción en diálisis y se dejó durante la noche.

4. 4. 1. a. Caracterización de los SEN

La primera prueba para caracterizar los SEN fue una prueba de coordinación con níquel. El fin de esta prueba es determinar si se ha encapsulado la proteína en el nanogel, para ello aprovechamos la capacidad de coordinación del níquel a los grupos imidazol del nanogel. Cuando los nanogeles y el níquel se coordinan se forma un precipitado. Para la prueba se hace una disolución que contiene 5 mM de nitrato de níquel, 0,25 mg/mL de SEN en un buffer de Tris 5 mM pH7, tras mezclar todos los componentes de la disolución en un vial se centrifuga a 10000 G 10 minutos.

Para ver si toda la proteína ha sido encapsulada se hace una electroforesis en gel de acrilamida. De esta manera podemos observar si hay más de un componente en el producto, así como el tamaño que tiene cada componente. El gel de acrilamida consta de dos fases diferentes, la primera la *stacking gel*, la función de esta primera fase es proporcionar a todas las calles un mismo punto de partida. La segunda fase es la *resolving gel*, en esta fase es donde se diferencian las muestras por tamaño. Las cantidades para formar el gel de acrilamida están reflejadas en la

Tabla 4. En la Imagen 8 se muestra el montaje para la electroforesis.

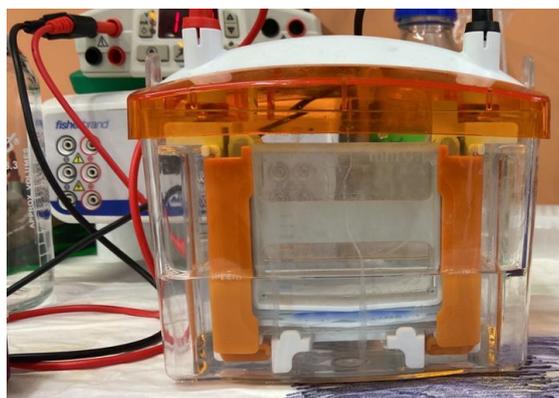


Imagen 8. Montaje para la electroforesis en gel de acrilamida.

Tabla 4. Cantidades necesarias para formar un gel de acrilamida.

componente	Resolving	Stacking
H ₂ O (mL)	3,2	2,6
Acrilamida 30% (mL)	2,67	1
Tris pH 8,8 (mL)	2	1,25
SDS 10% (μL)	80	50
APS (μL)	80	50
TEMED (μL)	8	5

El procedimiento es el siguiente:

Primero se debe preparar el gel de *resolving*, para ello se prepara una disolución al 10% (m/v) de APS. Se mezclan todos los componentes exceptuando el APS y TEMED en un vaso de precipitados. Tras mezclar los componentes se añaden el APS y TEMED al vaso y se introduce la

mezcla en el soporte. Es importante que tras añadir la mezcla al soporte se ponga una pequeña cantidad de etanol encima, este etanol hará que el frente del gel quede liso. Una vez polimerizado se limpia el frente con abundante agua.

Para el gel de *stacking* se debe preparar una disolución al 10% (m/v) de APS. Se mezclan todos los componentes excepto el APS y TEMED en un vaso de precipitados. Tras mezclar bien los componentes se añade el APS y TEMED y se introduce la mezcla en el soporte. Una vez polimerizado el gel se puede conservar en el frigorífico.

Una vez preparado el gel se preparan las muestras para cargarlas en los pocillos, para ello hay que mezclar 2 µg de SEN con 5 µL de loading buffer (de composición: 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 300 mM DTT, 30% glicerol y 0,02% azul de bromofenol) y agua hasta 20 µL. Después hay que desnaturalizar la proteína, para ello se calienta la muestra a 95 °C durante 5 minutos y después se centrifuga. Se carga el gel y se deja correr a un voltaje constante de 120 V. La electroforesis se da por concluida cuando el frente con color sale del gel.

Para la electroforesis se carga en el primer carril un marcador de pesos moleculares y en las demás las muestras correspondientes.

Una vez terminada la electroforesis se tiñe el gel con Imperial protein stain para revelar la proteína.

Otra técnica para caracterizar los SEN fue mediante FTIR para ello se formó una fina capa de SEN sobre un porta objetos y tras secarse se llevó al espectrofotómetro.

4. 4. 2 Síntesis de los INR

Para la síntesis de los INR se siguió el procedimiento reportado en la literatura¹⁴. Se hicieron pruebas con diferentes ratios de hemin, los ratios estudiados de hemin/SEN fueron, 50, 200, 500 y 700.

Para asegurar que la coordinación había sido exitosa se prepararon muestras de control sin proteína. Para la coordinación de los hemin a los nanogeles se incubaron disoluciones de 1,5 µM de SEN en buffer fosfato con la cantidad necesaria de hemin. El hemin se añadió como una disolución 30 mM de hemin en una mezcla de 230 mM de hidróxido sódico y 5mM de tris. Los nanogeles se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y 600 rpm. Las muestras de control siguieron el mismo procedimiento con la diferencia de que no se les añadieron los nanogeles. En la Tabla 5 se reflejan las cantidades utilizadas para la síntesis.

Tabla 5. Cantidades para la síntesis de los INR. Las muestras nombradas con una "C" son las muestras de control

Muestra	SEN 46,5 µM (µL)	Hemin 30 mM (µL)	Tris 5 mM (µL)
50	16,1	1,25	482,6
50C	0	1,25	498,75
200	16,1	5	478,9
200C	0	5	495
500	16,1	12,5	471,4
500C	0	12,5	487,5
700	16,1	17,5	466,4
700C	0	17,5	482,5

4. 4. 2. a Caracterización de los INR

La caracterización de los INR fue mediante espectroscopia UV-Vis. Para observar la coordinación del hierro al imidazol de la superficie del nanogel se prepararon disoluciones de 1,5 μM de INR. Para ello se compararon las muestras con unas disoluciones de control.

4. 4. 3 Inmovilización de los biocatalizadores sobre monolitos

Para inmovilizar el biocatalizador en los monolitos se incubaron en una disolución de 0,25 mg/mL de proteína en buffer fosfato 10 mM pH6 durante una noche a temperatura ambiente. Para conseguir una inmovilización homogénea, durante este tiempo, los monolitos estuvieron girando en una noria a 10 rpm. Una vez pasado el tiempo de incubación los monolitos se lavaron con buffer fosfato 10 mM pH 6 hasta que el monolito dejó de liberar proteína.

Por cada tipo de monolito se estudiaron tres casos diferentes. El primero de ellos se cargó con glucosa oxidasa libre, el segundo con una combinación de glucosa oxidasa y Horseradish peroxidase (HRP) en proporción 1/1, y el tercer caso con los INR.

Para determinar la presencia de proteína en los lavados se hicieron pruebas de actividad de los mismos. Estas pruebas de actividad se llevaron a cabo añadiendo a 170 μL del líquido del lavado 20 μL de ABTS, 10 μL de glucosa y 1 μL de HRP 5 mg/mL.

Se utiliza ABTS para realizar las pruebas de actividad debido al cambio de coloración que sufre al oxidarse. Al añadir glucosa al medio de reacción, la GOx oxida esta glucosa obteniendo como subproducto peróxido de hidrógeno que, posteriormente, la HRP utiliza como reactivo para oxidar el ABTS. El ABTS no oxidado tiene una tonalidad verde muy clara, pero al oxidarse adquiere un tono verde muy oscuro.

El proceso de inmovilización de los biocatalizadores fue prácticamente el mismo para ambos tipos de monolito. Debido a la hidrofobicidad del PDMS y al tamaño reducido de los canales, la única variación realizada fue que a las disoluciones utilizadas para los monolitos poliméricos se les añadió un 0,01% en volumen de un tensoactivo llamado Tween 20. De esta manera se aumenta la capacidad de mojado, para así conseguir un mejor flujo dentro de los canales del monolito.

4. 5 Caracterización de la actividad de los monolitos.

Antes de caracterizar los monolitos se lavaron todos hasta que dejaron de liberar biocatalizador.

Se realizó un estudio preliminar para optimizar las mejores condiciones de reacción de los monolitos. Para ello se hizo pasar una disolución 25 mM de glucosa por un monolito de PDMS con GOx inmovilizada. Se realizaron 30 ciclos recogiendo alícuotas en los ciclos 5, 10 y a partir de estos cada 2 ciclos hasta el ciclo 30. Una vez recogidas las alícuotas, se midió el peróxido presente en estas. Para ello, se realizó una prueba con ABTS 1 mM y HRP 5 mg/ml.

En este caso se optimizaron las condiciones de reacción para facilitar su cuantificación. Se aumentó el tiempo de residencia de la mezcla de reacción y se aumentó la temperatura. En este caso, se mantuvo la mezcla de reacción en el monolito por 50 minutos a una temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$, se repitieron 5 ciclos. Se midió el peróxido presente realizando una prueba con ABTS 1 mM y HRP de concentraciones 5 mg/ml a para los monolitos de PDMS y 1 mg/ml para los de Fecralloy. En el caso de los monolitos de PDMS se utilizó 10 μL de muestra, en cambio para los de Fecralloy tan solo 1 μL .

Una vez optimizado el proceso con los monolitos de GOx, se ensayaron los monolitos con GOx+HRP inmovilizadas y INR para la eliminación de pirogalol de mezclas acuosas. Para ello, se preparó una mezcla de 100 mM de glucosa y 1 mM de pirogalol en acetato de sodio 100 mM pH 6. Se aumentó el tiempo de residencia de la mezcla de reacción a 30 minutos por ciclo, se realizaron 4 ciclos a 42 °C. En este caso la cuantificación se llevó mediante HPLC para evitar posibles contribuciones de las especies oxidadas a la absorbancia de la muestra.

Por último, se ensayó la eliminación de tintes de agua. Para esto el tinte utilizado fue azul de metileno. Se hizo un ensayo preliminar con 10 µM de tinte, 100 mM de glucosa en acetato de sodio 100 mM pH 6, el tiempo de residencia fue de 20 minutos y la temperatura 42 °C. Tras este ensayo se comprobó la capacidad de eliminación del tinte con una mezcla de 100 µM de tinte, 100 mM de glucosa en acetato de sodio 100 mM pH 6, el tiempo de residencia fue de 30 minutos y se realizaron varios ciclos. Se calculó el porcentaje de decoloración con la fórmula reflejada en la Ecuación 2.

Ecuación 2. Porcentaje de decoloración

$$\text{Decoloración (\%)} = \frac{\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia a } t=x}{\text{Absorbancia inicial}} * 100$$

5 Resultados y discusión

5.1 Depósito de SBA-15 sobre monolitos de Fecralloy

5.1.1 Propiedades del SBA-15 sintetizado

En la Figura 3 se pueden observar tanto la isoterma de adsorción/desorción de N₂ a 77 K (Figura 3.a) como la distribución del tamaño de poro (Figura 3.b) del SBA-15 sintetizado

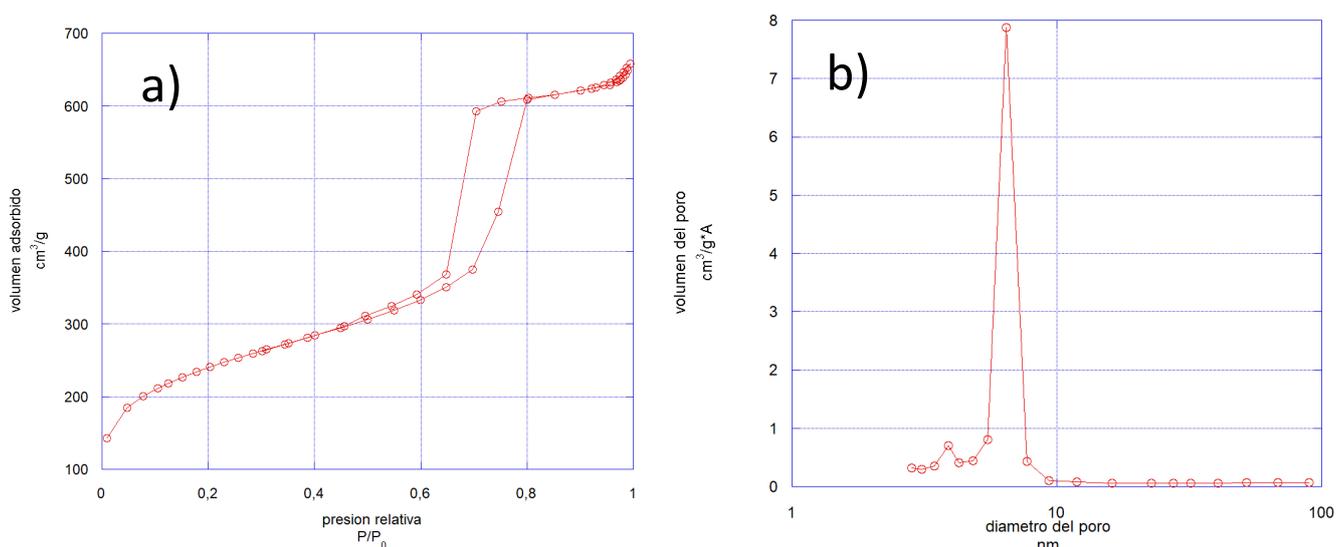


Figura 3. a) Isotherma de adsorción-desorción a 77 K del SBA-15 tras molerlo 20'. b) distribución del tamaño del poro del SBA-15 tras molerlo 20'

En la Figura 3.a se presenta la isoterma de adsorción/desorción del SBA-15, en esta isoterma se observa una histéresis. Esta isoterma es típica de materiales mesoporosos^{26,27}. La Figura 3.b confirma que se trata de un material mesoporoso, ya que en esta se muestra una distribución de tamaño de poro centrado a 6 nm. También se puede apreciar una pequeña cantidad de poros más pequeños. Éstos pueden deberse a la utilización de P-123 en la síntesis del material. Este copolímero utilizado forma micelas sobre las que posteriormente se forma la sílica, y en esta sílica pueden quedar atrapadas las colas del surfactante. Este fenómeno puede dar lugar a que tras la calcinación del soporte se formen poros de menor tamaño, ya que han sido formados por las colas hidrofílicas del P-123²⁸.

Mediante el método BET se calculó el área superficial del material, obteniendo un valor de 809,8 m²/g. La superficie obtenida, siguiendo este procedimiento, se corresponde a la reportada en la bibliografía¹⁷. La distribución del tamaño de poro también se corresponde a lo reportado en la bibliografía¹⁷, así como la presencia de microporos²⁸.

Se realizaron diferentes síntesis de SBA-15 y para estudiar la reproducibilidad de las propiedades texturales de las diferentes síntesis se calculó la desviación estándar, así como la desviación estándar relativa de las áreas superficiales, con la Ecuación 3.

Ecuación 3. Ecuación para obtener la desviación estándar relativa

$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

La desviación estándar de las medidas fue de 47,8 m²/g y la RSD fue del 5,65%. Esto demuestra una buena reproducibilidad del proceso de síntesis.

En la Imagen 9 se observan dos diferentes micrografías del SBA-15 sintetizado. En la micrografía a, se observan las agujas completas de SBA-15, en la b se observan 15 detalladamente los diferentes agregados de SBA-15.

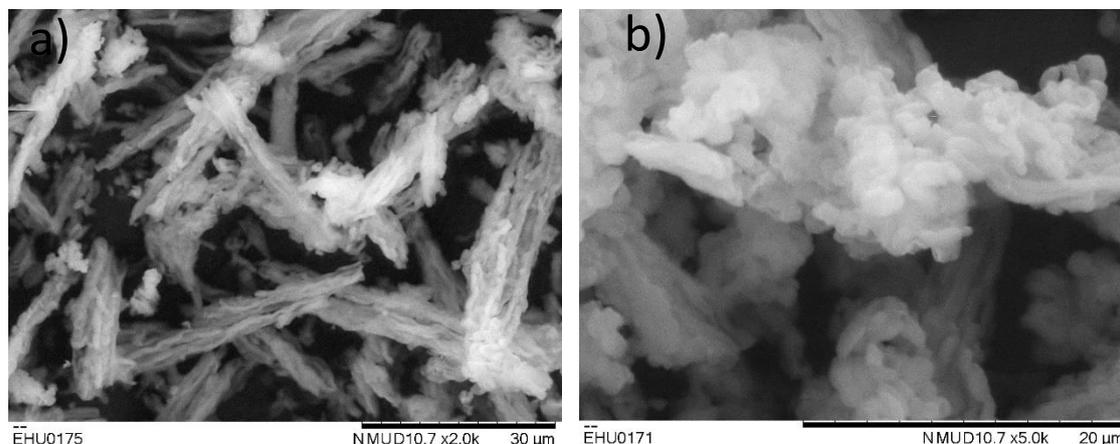


Imagen 9. Micrografías del SBA-15 sintetizado

En la Imagen 9.a se pueden apreciar a la perfección las agujas formadas por el SBA-15, estas agujas son características del SBA-15 sintetizado con agitación²⁹. En el caso de la Imagen 9.b se puede ver a la perfección los agregados de partículas de SBA-15 que forman las agujas.

Estudiando las micrografías junto con las isothermas de adsorción/desorción y distribución del tamaño de poro, así como comparando todos estos datos con la bibliografía^{26,29}, se puede considerar que la síntesis del soporte ha sido exitosa.

5. 1. 2 Preparación de la suspensión de SBA-15

Influencia del pH. Cuando un sólido es dispersado en el seno de un líquido, es importante medir el potencial zeta de la dispersión, ya que este determina la estabilidad de dicha dispersión. El potencial zeta es la diferencia de potencial entre la superficie de la partícula y los iones que la rodean y están fuertemente unidos, tanto que, si la partícula se mueve, éstos se mueven con ella formando una entidad única. Cuanto más se aleje de cero este potencial, mayor será la repulsión entre partículas y por tanto mayor será la estabilidad de la dispersión. Decimos que la dispersión será más estable ya que gracias a las repulsiones se evita que las partículas se coagulen o floculen. Para potenciales zeta de entre 20 y 50 mV (o -20 y -50 mV) las dispersiones se consideran estables³⁰. A la dispersión preparada se le midió el potencial zeta a cinco pH diferentes.

En la Figura 4 se ve reflejado el potencial zeta de las dispersiones acuosas de SBA-15 preparadas en este trabajo a diferentes pH.

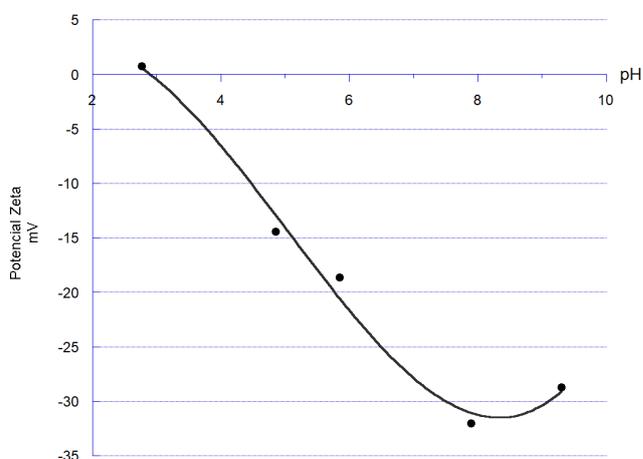


Figura 4. Potencial Zeta de la suspensión de SBA-15

En este caso se observa claramente que el pH de menor potencial zeta y por tanto el más estable es el pH 8, debido a esto, todas las dispersiones preparadas de SBA-15 se prepararon en agua a pH 8.

Otro dato interesante que arroja la medida del potencial zeta es el punto isoeléctrico de la dispersión. En este caso el punto isoeléctrico fue a un pH alrededor de 3, esto se ajusta a lo reportado por la bibliografía³¹.

Tamaño de partícula. Para el proceso de recubrimiento de los monolitos es importante el tamaño de partícula del soporte, siendo el tamaño ideal está entre los 5 y 10 μm ²². Para confirmar este hecho, se midió el tamaño de partícula del SBA-15, el cual fue de 17,8 μm (Tabla 6). Para obtener el tamaño de partícula deseado se realizó una molienda con un molino de bolas a diferentes tiempos (Tabla 6, Figura 5). En el caso de las moliendas de 5-20 minutos, la disminución del tamaño de partícula es directamente proporcional al tiempo de molienda. En cambio, las moliendas de 30' y 1 hora se aprecia como tienen un mayor tamaño de partícula que la de 20 minutos, esto puede deberse al calor formado por la fricción durante la molienda. Los sólidos, si son sometidos a altas temperaturas, pueden llegar a sinterizar, lo que explicaría el aumento del tamaño de partícula.

Tabla 6. tamaño de partícula promedio de SBA-15 tras los diferentes tiempos de molienda.

Tiempo (min)	Tamaño de partícula (μm)
0	17,8
5	10,2
10	9,80
20	8,04
30	9,01
60	10,4

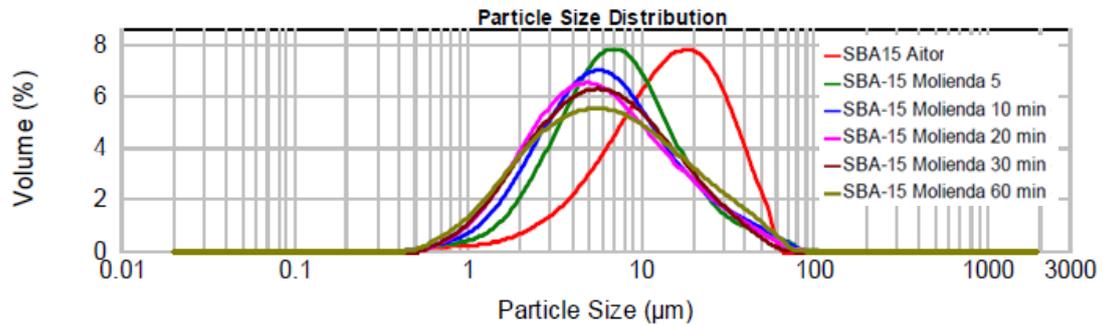


Figura 5. Distribución del tamaño de partícula de las diferentes moliendas de SBA-15.

Otro factor importante es la distribución del tamaño de partícula. Tal y como se observa en la Figura 5, el tamaño de partícula tiene una distribución gaussiana. Cuanto menor anchura tenga esta distribución normal, habrá una menor variedad de tamaños en la mezcla. Es fácil apreciar como en la Figura 5 cuanto mayor es el tiempo de molienda mayor es la anchura de la distribución. Esto no siempre es malo ya que las partículas más pequeñas de la mezcla pueden intercalarse con las más grandes rellenando así los huecos y haciendo así que el recubrimiento sea mejor.

Tras obtener los datos de los tamaños de partícula, se decidió que el tiempo óptimo de molienda serian 20 minutos, ya que a este tiempo las partículas tenían un tamaño de 8,04 µm, lo que está dentro del rango ideal.

Viscosidad de la dispersión. La viscosidad de la suspensión influye en la estabilidad de las dispersiones preparadas. Un medio muy viscoso reduciría la velocidad de sedimentación, favoreciendo la estabilidad de la suspensión. Sin embargo, la suspensión se emplea para recubrir los monolitos, y es necesario que no sea demasiado viscosa para que pueda fluir a través de los canales, y asegurar así una buena calidad de recubrimiento, ya que las suspensiones muy viscosas pueden generar acumulaciones²².

Para estudiar la reología de la suspensión de SBA-15 junto con el coloide de SiO₂ (Ludox) y a pH 8 se midió la viscosidad a una misma velocidad de cizallamiento con 84 h de diferencia. En la Tabla 7 se muestran los valores de viscosidad.

Tabla 7. Viscosidad y velocidad de cizallamiento a diferentes tiempos.

	12 h	96 h
Velocidad de cizallamiento (s ⁻¹)	3400	3400
Viscosidad (Pa*s)	0,01085	0,0097

La viscosidad de la suspensión se mantuvo prácticamente constante y adecuada (0,005-0,012 Pa*s) para obtener recubrimientos adherentes y homogéneos^{22,26}.

5. 1. 3 Recubrimiento de monolitos de Fecralloy

En la Imagen 10 se puede ver la superficie de la placa de Fecralloy utilizado para la preparación de monolitos antes de calcinar, en ella se observa cómo es un sólido completamente liso. En la Imagen 10.d se pueden observar unas pequeñas arrugas, estas, probablemente se deban a el método de conformado de las láminas de la aleación.

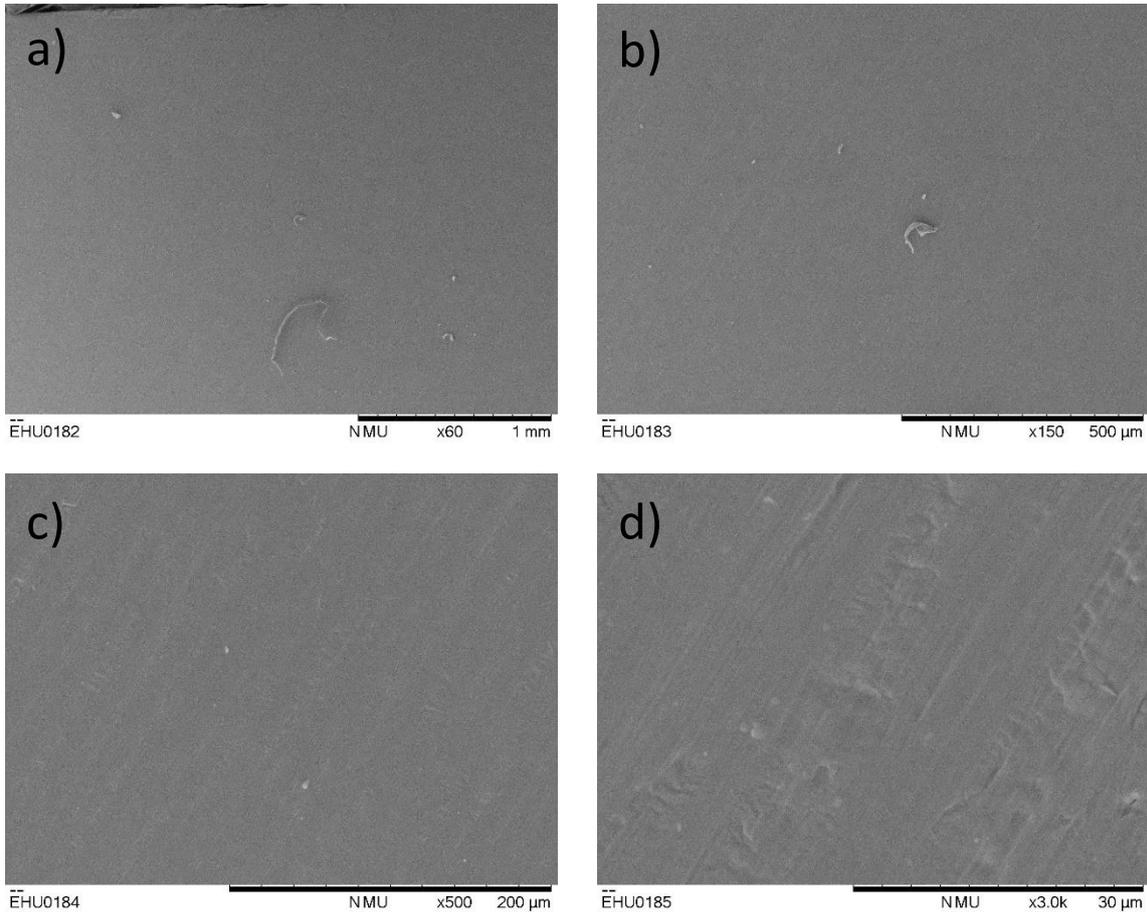


Imagen 10. Micrografías de la superficie del fecralloy antes de calcinar

Tras calcinar los monolitos se apreció una diferencia de peso en estos. Al calcinar a altas temperaturas los monolitos el aluminio de la aleación se oxida junto con el oxígeno para formar alúmina rugosa (Al_2O_3). Se puede calcular la cantidad de alúmina formada gracias a la diferencia de pesada. Se calcinaron ocho monolitos, y la media fue de $0,46 \pm 0,03 \text{ mg}_{\text{Al}_2\text{O}_3}/\text{cm}^2$.

En la Imagen 11 se puede ver la superficie de los monolitos de Fecralloy calcinados a diferentes aumentos.

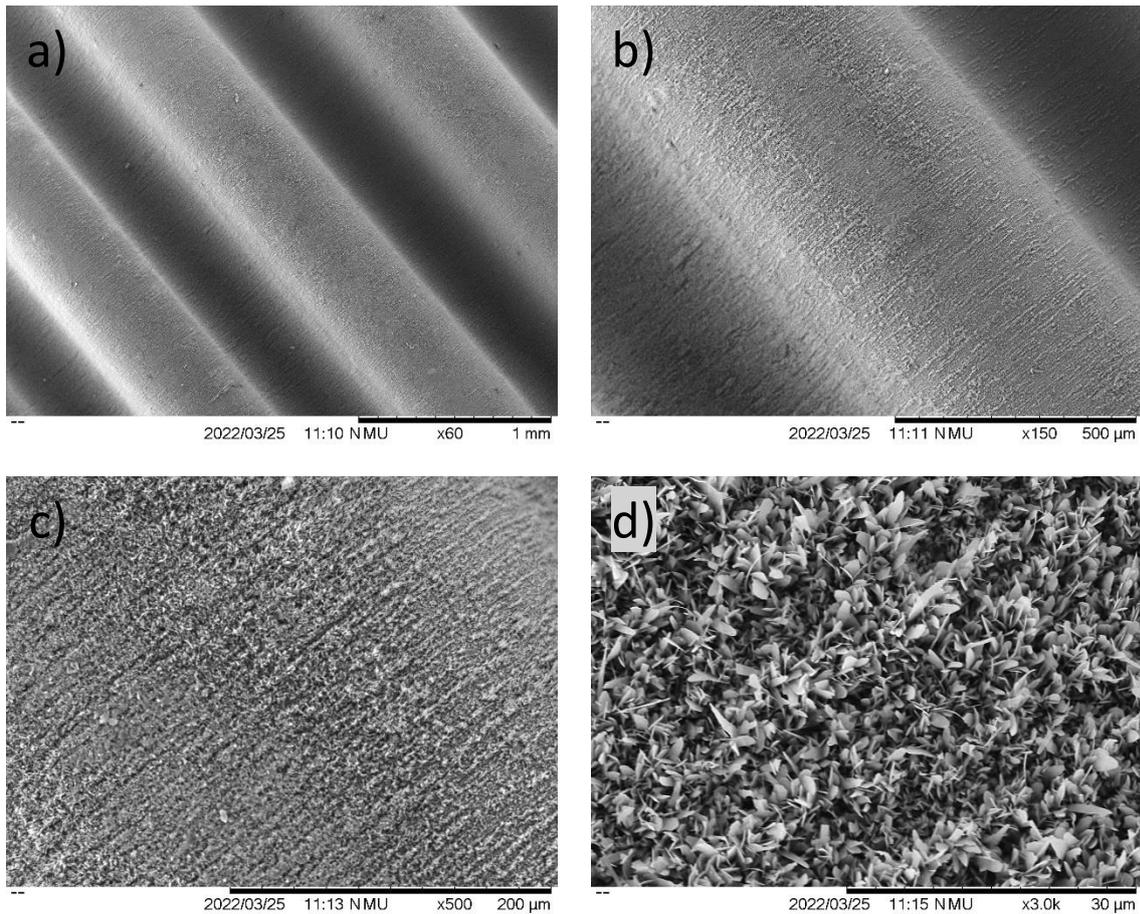


Imagen 11. Micrografías de la superficie de los monolitos de feccralloy calcinados.

La Imagen 11.a muestra los microcanales de los monolitos, como se puede ver estos microcanales son muy homogéneos tanto en separación como en forma. Tanto en la Imagen 11.c, como en la Imagen 11.d, se puede observar cómo la superficie de la aleación no es lisa, se aprecian rugosidades. Estas rugosidades se deben a la formación de agujas de alúmina. Como se puede ver la superficie de los monolitos calcinados difiere bastante de los monolitos sin calcinar. Esto otorga la ventaja de una superficie más rugosa sobre la que puede adherir mejor el SBA-15.

Una vez calcinados, los monolitos fueron recubiertos mediante la técnica de recubrimiento por inmersión. Fueron necesarios alrededor de dos recubrimientos para obtener una carga de unos 75 mg de SBA-15 por monolito.

Tras la calcinación de los monolitos recubiertos de SBA-15 se realizó el test de adherencia. La adherencia obtenida fue de un 80%. Es una buena adherencia ya que para la realización de este test se somete al monolito a las condiciones más extremas posibles.

En la Figura 6.a se puede ver la isoterma de adsorción/desorción de un monolito recubierto con SBA-15 y de los materiales utilizados para la preparación de este.

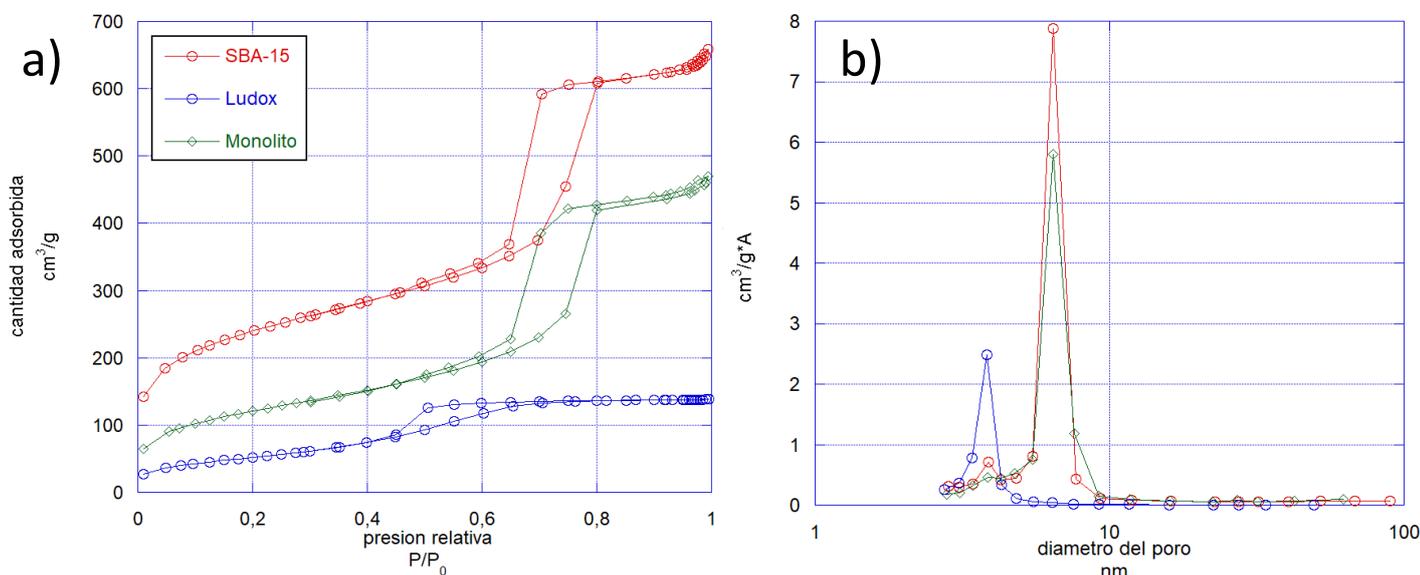


Figura 6. a) Isotherma de adsorción/desorción de un monolito de Fecralloy recubierto de SBA-15

Se puede observar cómo la histéresis de los materiales porosos (tipo IV) se mantiene. En la Figura 6.b se puede ver la distribución de tamaño de poro de un monolito con SBA-15 depositado. Esta gráfica confirma que los poros del SBA-15 se mantienen intactos, ya que vemos que la mayor parte de volumen de poro se corresponde a poros de un diámetro de 6 nm. El monolito recubierto presenta unas propiedades texturales menores a las del SBA-15 de partida (Figura 6, Tabla 8). Esto se debe a la incorporación de Ludox a la suspensión de SBA-15 depositado sobre los monolitos.

Tabla 8. Resumen de características superficiales de diferentes muestras

Muestra	S_{BET} (m²/g)	Diámetro de poro (nm)	V_{Poros} (cm³/g)
SBA-15	809,8	5,0	1,02
Ludox	194,5	4,4	0,214
Monolito recubierto	427,6	6,8	0,728

5.2 Monolitos de polidimetilsiloxano

En el proceso de fabricación se utiliza un negativo impreso en 3D del monolito que está compuesto de acrilonitrilo butadieno estireno (ABS). Este negativo se sumerge en PDMS, que posteriormente se cura, y el ABS se disuelve con acetona. Conocer el proceso de fabricación de los monolitos es de suma importancia para posteriormente poder explicar la morfología de los mismos. En la Figura 7 se muestra un esquema del proceso de fabricación de los monolitos poliméricos.

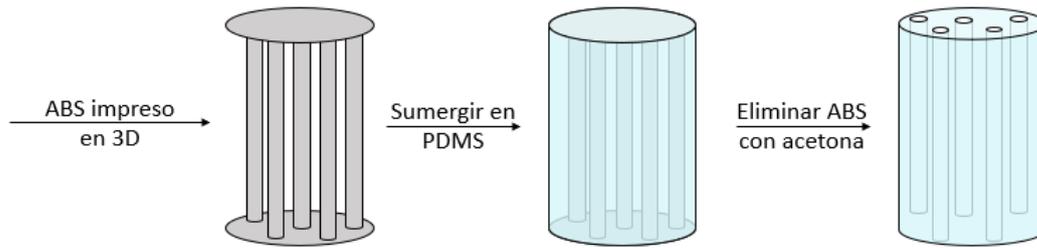


Figura 7. Esquema del proceso de fabricación de los monolitos de PDMS

En la Imagen 12 se muestran varias micrografías de los monolitos de PDMS.

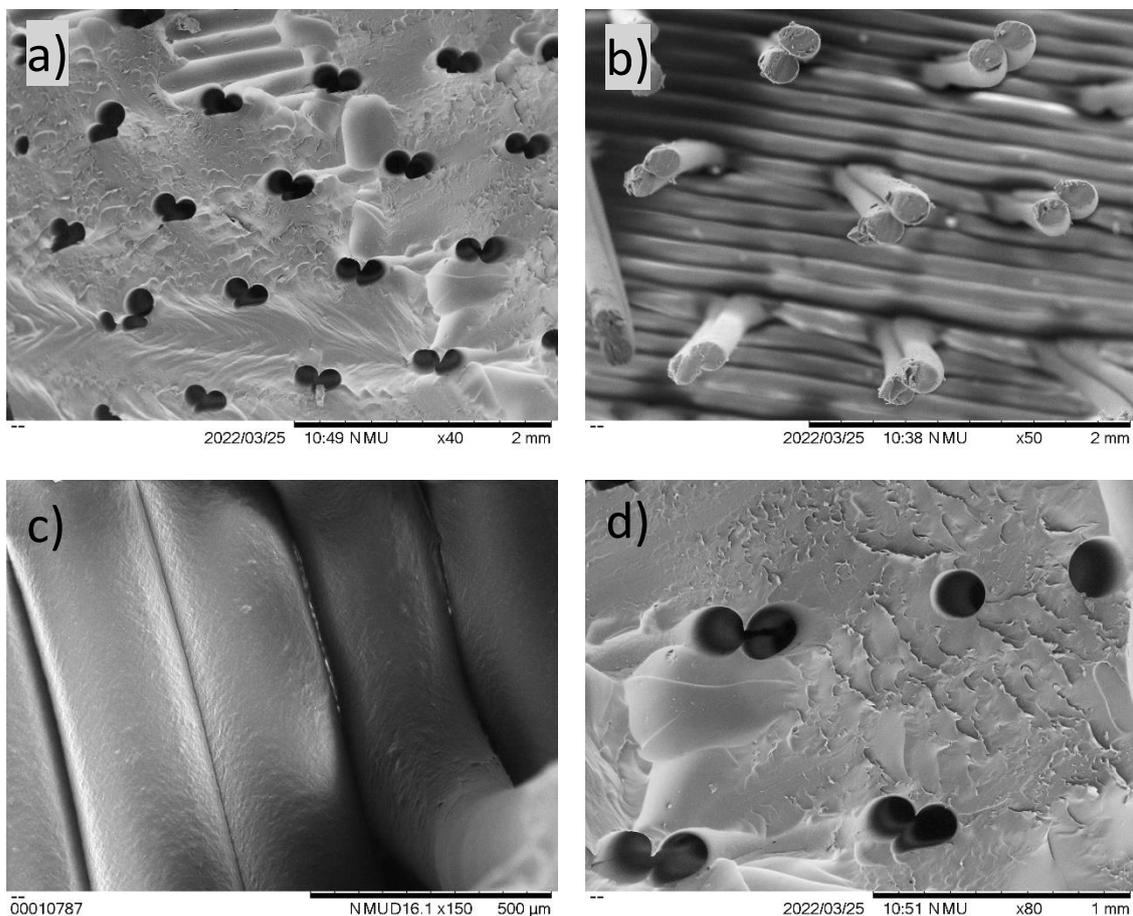


Imagen 12. Micrografías de los monolitos de PDMS. a) superficie del monolito. b) negativo del monolito. c) negativo del monolito. d) superficie del monolito

La Imagen 12.a muestra la superficie de la parte superior del monolito. Esta imagen tiene varios aspectos a destacar. El primero de ellos es la morfología de los microcanales, que están agrupados en grupos de dos. Esto se debe a que en el proceso de impresión del negativo de ABS los filamentos se agruparon en parejas como se puede ver en la Imagen 12.b, lo que dio lugar a esta morfología tan característica. Cabe destacar que no todos los microcanales se encuentran agrupados. También hay microcanales individuales como se puede ver en la Imagen 12.d. Otro aspecto importante de esta superficie, es la presencia de unas ondulaciones. Estas ondulaciones

también son producto del proceso de fabricación de los monolitos. Al imprimir en 3D los negativos de los monolitos, los filamentos de la base se orientan todos en la misma dirección como se puede ver en la Imagen 12.c. Esto crea este patrón tan característico que se muestra en la Imagen 12.a.

Gracias a las micrográficas se pudo calcular la fracción hueca de los monolitos siendo ésta 0,108. Esta fracción hueca es menor a la de los monolitos de Fecralloy, con una fracción hueca de 0,83.

5.3 Síntesis de nanogeles de una única enzima (SEN) y de nanoreactores integrados (INR).

5.3.1 SEN

Capacidad de agregación en presencia de sales metálicas. El primer ensayo de caracterización realizado a los SEN fue un ensayo con nitrato de níquel para observar la coordinación de los SEN al níquel. El resultado de este ensayo se muestra en la Imagen 13.



Imagen 13. Precipitado formado por la coordinación del níquel con los SEN

En la Imagen 13 se puede observar un precipitado amarillo, lo que sugiere que la glucosa oxidasa, que es amarilla, ha sido encapsulada en los nanogeles. En caso de no haber conseguido sintetizar los nanogeles no se formaría ningún precipitado.

Efecto en la movilidad electroforética. En la Imagen 14 se muestra una electroforesis en gel de acrilamida para comprobar la encapsulación de la GOx en los nanogeles. Como se puede ver, hay gran diferencia entre la enzima libre y la enzima encapsulada: mientras que la enzima libre avanza hasta los 80 kDa la encapsulada prácticamente no avanza. La glucosa oxidasa es un dímero de peso 160 kDa y al desnaturalizar la proteína, previo a la electroforesis, se separan cada uno de los monómeros y por tanto el peso se reduce a la mitad. Como se puede ver en la imagen no se muestra banda a 80 kDa en el caso de la muestra de SEN, esto sugiere que toda la proteína ha sido encapsulada en los nanogeles.

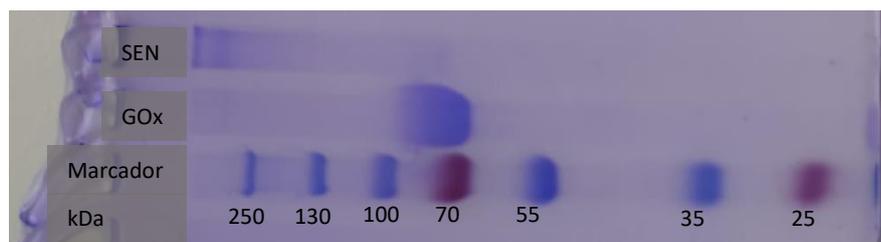


Imagen 14. Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE).

Composición química. En la Figura 8 se muestra el espectro FTIR de los SEN sintetizados.

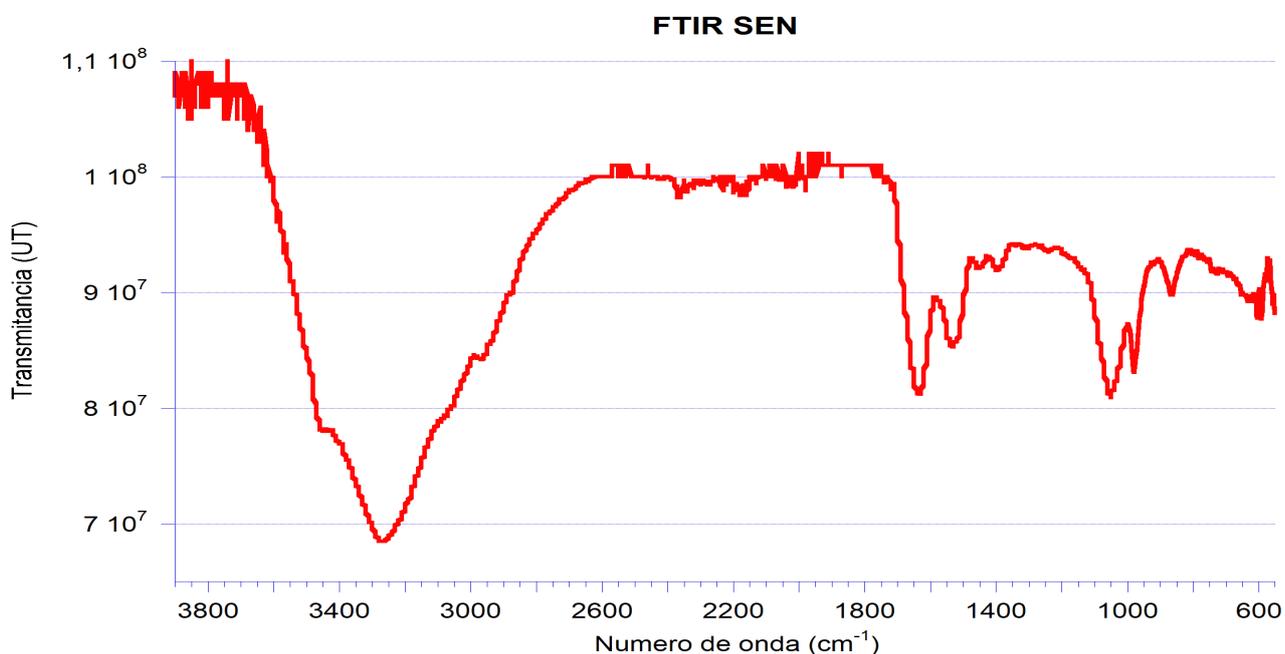


Figura 8. FTIR de los SEN sintetizados.

A 1642 cm^{-1} se muestra la banda correspondiente a las aminas primarias. A 1060 cm^{-1} se encuentra la banda correspondiente a los grupos polivinilo terminales que se han introducido en el proceso de síntesis de los SEN. Para confirmar la presencia de los grupos imidazol del nanogel hay dos bandas importantes: la primera de ellas a 650 cm^{-1} , la segunda se vería a 917 cm^{-1} pero en este caso se ve eclipsada por la banda del enlace fosforo oxigeno de los fosfatos. La presencia de estas bandas en el espectro sugiere que la síntesis de los nanogeles ha sido exitosa.

5.3.2 INR

Para la formación de los INR es necesario coordinar hemin a los SEN. Para caracterizar la coordinación del hemin en los SEN se realizaron espectros UV-Vis de las diferentes muestras y controles. En la Figura 9 se pueden ver los diferentes espectros.

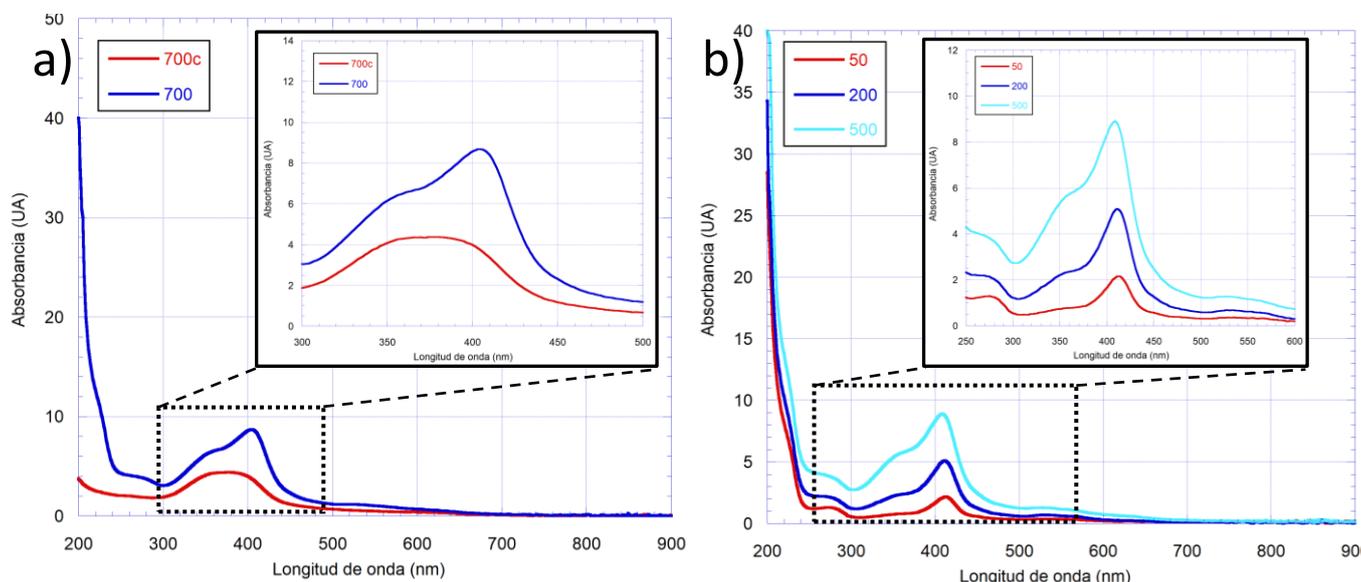


Figura 9. a) espectro UV-Vis de las muestras de ratios 700 y 700c (control). b) Comparación de los espectros UV-Vis de las muestras de ratios 50, 200 y 500

Inicialmente se estudiaron los ratios hemin/proteína de 50, 200 y 500. Como se puede ver en la Figura 9.b aumentando el ratio de hemin la señal de 410 nm aumenta. Esta señal se debe a la coordinación del hierro con los imidazoles de la cápsula¹¹. Al observar esta tendencia, se decidió ensayar el ratio de 700, ya que cuanto mayor es la cantidad de hemin coordinado, mayor es la actividad peroxidasa del sistema. En el caso del ratio 700, la coordinación del hemin fue total, se filtraron los INR y en las aguas madres no se halló presencia de hemin. Como se puede observar en la Figura 9.a hay una clara diferencia entre los espectros de la muestra con SEN y la muestra control. En el caso de la muestra control no se observa pico a 410 nm lo que indica que no hay presencia de hierro coordinado.

5.4 Inmovilización de los biocatalizadores.

Se inmovilizaron los biocatalizadores en 6 monolitos diferentes: tres de ellos eran de Fecralloy y el resto de PDMS. En la Tabla 9 se muestran los biocatalizadores inmovilizados en cada monolito.

Tabla 9. Biocatalizadores inmovilizados en cada monolito.

Monolito	Características	Biocatalizadores inmovilizados
MF II	Fecralloy, SBA-15	Glucosa oxidasa
MF IV	Fecralloy, SBA-15	Glucosa oxidasa + HRP
MF V	Fecralloy, SBA-15	INR
M II	PDMS	Glucosa Oxidasa
M III	PDMS	Glucosa oxidasa + HRP
M IV	PDMS	INR

Estudiando la actividad de los lavados se puede estudiar la adherencia de los biocatalizadores en los monolitos. Mientras los lavados sigan teniendo actividad, el monolito sigue desprendiendo biocatalizador y, por tanto, peor es la adherencia de éste. En la Tabla 10 se muestra el número de lavados realizados a los monolitos.

Tabla 10. Lavados realizados a los monolitos.

Monolito	Lavados necesarios
MF II SBA-15 GOx	16
MF IV SBA-15 GOx HRP	12
MF V SBA-15 INR	5
M II GOx	11
M III GOx HRP	11
M IV INR	4

En la Tabla 10 se reflejan los lavados realizados a cada monolito hasta que éstos dejaron de liberar biocatalizador. En esta tabla se pueden observar varias tendencias. Como se puede ver el biocatalizador que mejor adherencia presenta son los INR ya que son los que menos lavados necesitaron. Otra tendencia a tener en cuenta es que la adhesión en los monolitos de PDMS es mejor que la adhesión en los monolitos de Fecralloy. El método de inmovilización de los biocatalizadores utilizado se basa en interacciones débiles, como por ejemplo interacciones electrostáticas, de Van der Waals, hidrofóbicas etc³². En el caso del PDMS se trata de un material cuya superficie sin tratar es hidrofóbica, y ésta puede ser la razón de la mejor adhesión de los biocatalizadores al PDMS que al SBA-15 cuya superficie es más hidrofílica.

5.5 Actividad de los monolitos

Generación de peróxido.

Inicialmente se ensayó la capacidad de los monolitos de GOx para generar peróxido. En el ensayo preliminar del monolito M II SBA-15 GOx, la eficiencia catalítica resulto baja tras los 30 ciclos (resultados no mostrados) tan solo se obtuvo 0,08 mM de H₂O₂. Por ello se decidió aumentar el tiempo de residencia de la mezcla de reacción en los monolitos hasta 50 minutos y también su temperatura hasta 42 °C. Y tras aumentar el tiempo de residencia y la temperatura las cantidades de H₂O₂ obtenidas fueron mayores como se refleja en la Figura 10.

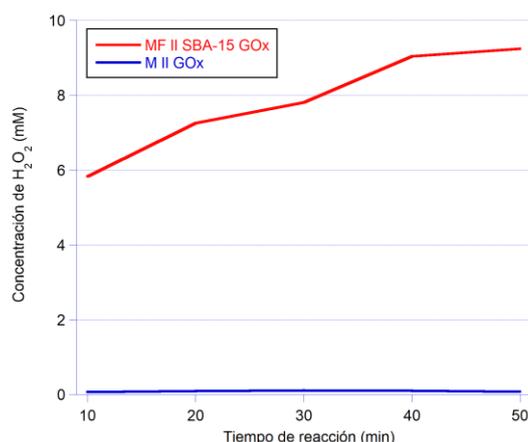


Figura 10. Peróxido de hidrógeno producido por los diferentes monolitos a diferentes tiempos de reacción.

Mientras que el monolito de Fecralloy fue capaz de producir $9,2500 \pm 0,7000$ mM de peróxido de hidrógeno, el monolito de PDMS tan solo fue capaz de producir $0,1074 \pm 0,0002$ mM de peróxido de hidrógeno. Esta gran diferencia puede deberse a dos factores. El primero, la mayor cantidad de área superficial del monolito de Fecralloy gracias al SBA-15. Esta mayor área permitiría una mayor inmovilización de la enzima en comparación con el de PDMS. El otro factor que puede afectar es la mayor capacidad de transmisión del calor, ya que los metales tienen una mejor conductividad térmica que los plásticos.

Degradación de pirogalol

Los monolitos MF IV SBA-15 GOx HRP, MF V INR, M III GOx HRP y M IV INR se ensayaron para eliminar pirogalol de mezclas acuosas. En la Figura anexa 1 se muestran los cromatogramas de los calibrados de pirogalol.

Como se muestra en la Figura anexa 1, el tiempo de retención del pirogalol es de alrededor de 8 minutos. Con estos calibrados se trazó una recta de calibrado para la posterior cuantificación de las muestras que se refleja en la Figura anexa 2.

Los monolitos M III GOx HRP y MF IV SBA-15 GOx HRP, tras media hora de reacción, mostraron una eliminación completa del pirogalol del medio. En la oxidación del pirogalol se forman una gran cantidad de productos de reacción, por ello es importante analizar estos compuestos mediante HPLC para evitar interferencias. Estos productos no solo incluyen diferentes especies oxidadas, sino que también un polímero de pirogalol que puede precipitar como un sólido negro. Mediante el HPLC fue posible aislar algún producto de oxidación. Estos productos se midieron a 317 nm y tuvieron un tiempo de retención de alrededor de 10 minutos. Se observó que estos productos también tenían cierta absorbancia a 267 nm como se muestra en la Figura 11, por lo que aislar el pirogalol antes de medir la absorbancia es indispensable.

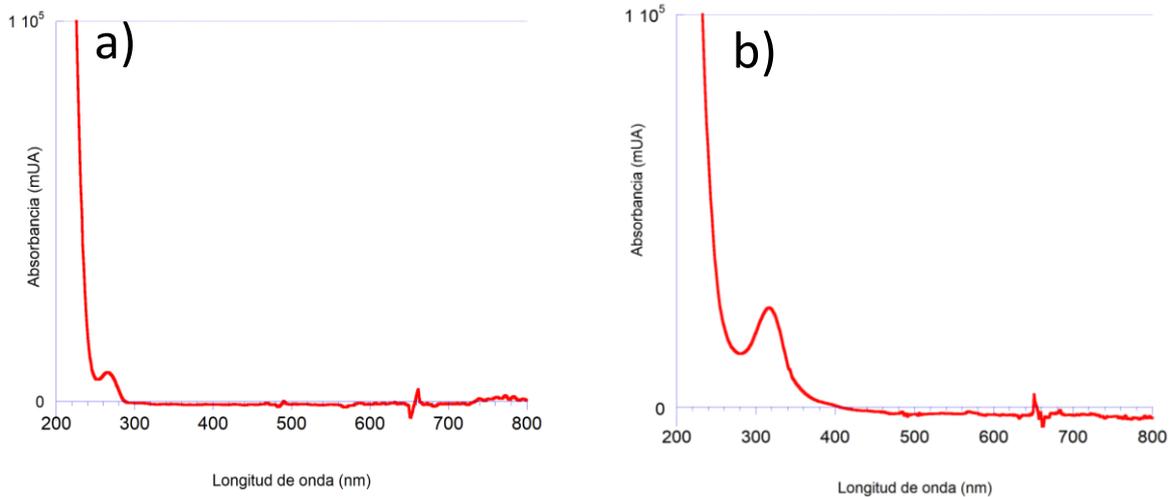


Figura 11. a) Espectro UV-Vis pirogalol. b) Espectro UV-Vis de un producto de oxidación

En la Figura 12 se muestran los cromatogramas de los monolitos con INR inmovilizados.

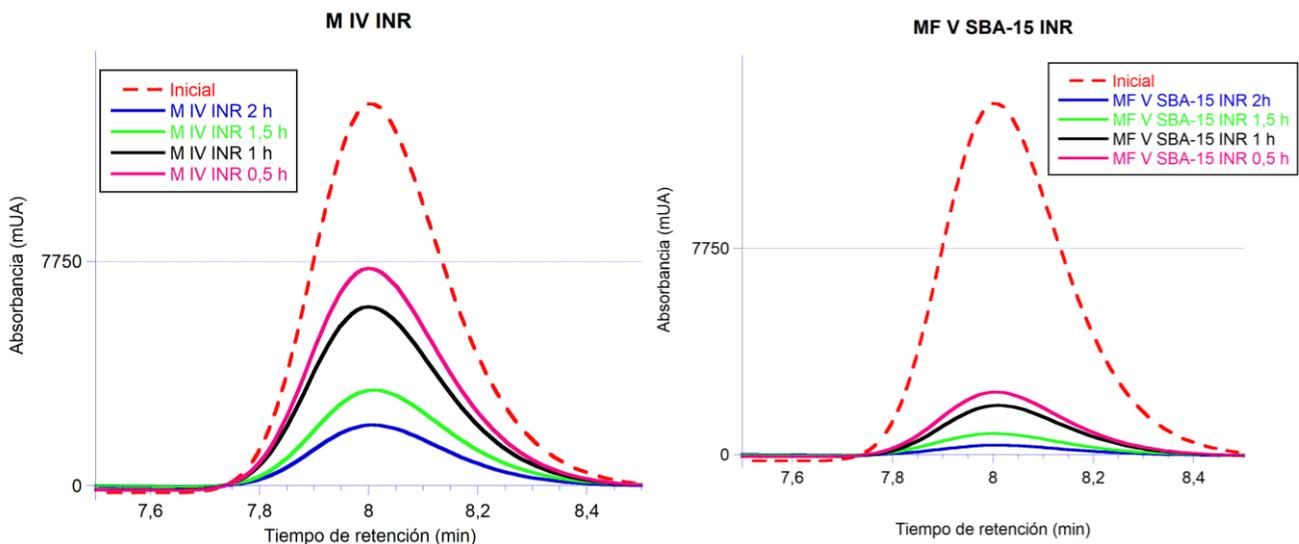


Figura 12. A la izquierda el cromatograma del pirogalol presente a varios tiempos de la reacción del monolito M IV INR medido a 267 nm. A la derecha el cromatograma del pirogalol presente a varios tiempos de la reacción del monolito MF V INR medido a 267 nm

En el caso de estos monolitos la eliminación de pirogalol fue casi completa tras 2 h. Se pueden apreciar diferencias en la velocidad de eliminación de pirogalol, estas diferencias se ven reflejadas en la Tabla 11. Para esta reacción el monolito de Fecralloy arroja mejores resultados. Estos mejores resultados pueden deberse a varios factores. El primero de estos factores es la superficie, debido al recubrimiento de los monolitos con SBA-15 el área superficial de estos es mucho mayor lo que permite que se inmovilice una mayor cantidad de INR. Otro factor es la temperatura, el calor específico del PDMS y del Fecralloy difieren bastante siendo este segundo menor, por lo que es posible que el interior del monolito de Fecralloy estuviese a una mayor temperatura y, por tanto, el biocatalizador estuviese en unas mejores condiciones para catalizar la reacción. La diferencia entre monolitos es bastante notable, el monolito de Fecralloy tras 1 h eliminó prácticamente la misma cantidad de pirogalol que el monolito de PDMS tras 2 h.

Tabla 11. Concentraciones de pirogalol de los diferentes monolitos a diferentes tiempos.

Monolito	Tiempo de reacción (h)	Concentración de pirogalol (mM)
M IV INR	0,5	0,5512
	1	0,4490
	1,5	0,2229
	2	0,1348
MF V SBA-15 INR	0,5	0,1599
	1	0,1236
	1,5	0,0397
	2	0,0062

Los cálculos de concentraciones se realizaron utilizando la recta de calibrado reflejada en la Figura anexa 2.

Eliminación de azul de metileno

Los monolitos M III GOx HRP, M IV INR, MF IV SBA-15 GOx HRP y MF V INR se ensayaron también para la eliminación de tintes, el tinte escogido fue el azul de metileno. Primero se ensayó la capacidad de degradación con 10 μ M de sustrato. En la Figura 13 se muestran los espectros de los productos de reacción de los monolitos con 10 μ M de azul de metileno.

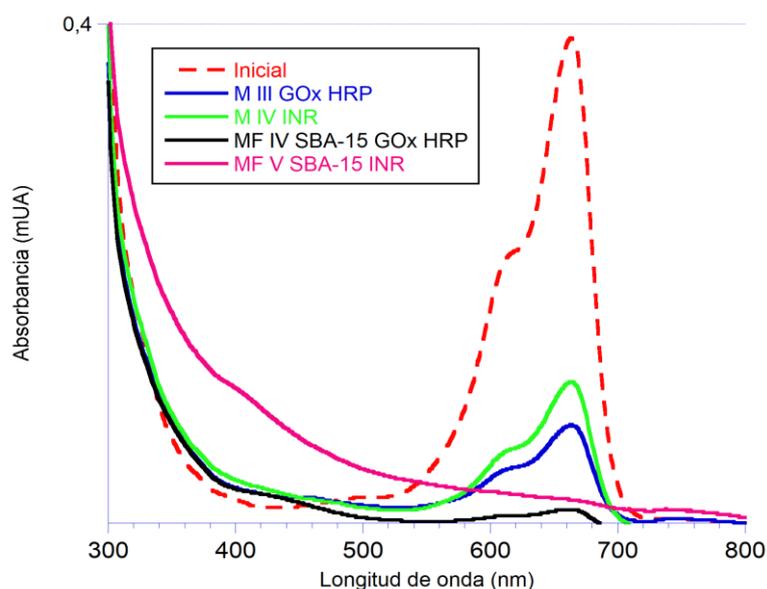


Figura 13. Espectros de los productos de reacción de los monolitos con 10 μ M de azul de metileno.

Tras 20 minutos de degradación, la decoloración se apreciaba perfectamente a la vista. Los medios de reacción estaban prácticamente incoloros, por lo que se decidió parar la reacción y cuantificar la decoloración. Para los monolitos de PDMS M III GOx HRP y M IV INR los porcentajes de decoloración fueron del 69,5% y 61,8%, respectivamente medidos a 264 nm. Para los monolitos de Fecralloy MF IV SBA-15 GOx HRP y MF V INR, los porcentajes de decoloración fueron del 84,9% y 83,1% medidos a la misma longitud de onda. Aquí también se ve la misma tendencia que en el caso de la oxidación del pirogalol, los monolitos más activos son los de Fecralloy y la mejor combinación de catalizadores es el tándem de GOx y HRP. Las razones de la mayor actividad de estos monolitos pueden ser las mismas que en el caso anterior. Y la razón de

la mayor actividad de esa combinación de enzimas es que la HRP tiene mayor actividad que los hemin coordinados a la superficie de los nanogeles.

En la Imagen 15 se muestran los productos de reacción de los diferentes monolitos.

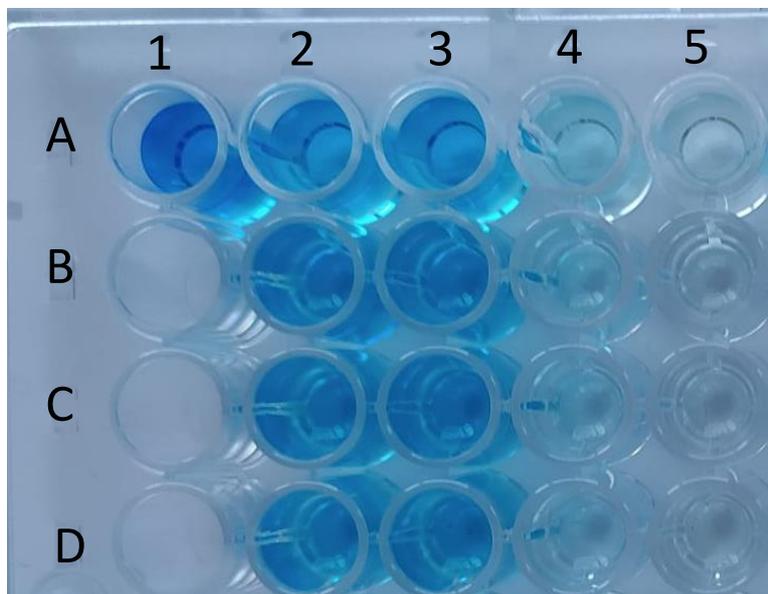


Imagen 15. Productos de reacción de los diferentes monolitos, en el pocillo 1-A la disolución inicial. En la columna 2 los 4 productos de reacción del monolito M III GOx HRP (2-A=0,5 h, 2-B= 1 h, 2-C= 1,5 h y 2-D= 2 h). En la columna 3 los 4 productos de reacción del monolito M IV INR (3-A=0,5 h, 3-B= 1 h, 3-C= 1,5 h y 3-D= 2 h). En la columna 4 los 4 productos de reacción del monolito MF IV SBA-15 GOx HRP (4-A=0,5 h, 4-B= 1 h, 4-C= 1,5 h y 4-D= 2 h). En la columna 5 los 4 productos de reacción del monolito MF V INR (5-A=0,5 h, 5-B= 1 h, 5-C= 1,5 h y 5-D= 2 h).

A simple vista ya se aprecian ciertas tendencias en los productos de reacción, pero en la Figura 15 se pueden ver los espectros de los productos de reacción de los diferentes monolitos y con esos espectros se pueden confirmar las tendencias. Comparando los monolitos de diferentes materiales se mantiene la misma tendencia que para la eliminación de pirogalol, los de Fecralloy muestran una mayor actividad. Con respecto a la combinación de biocatalizadores se puede observar una tendencia diferente a la de la reacción de eliminación del pirogalol. Para todas las reacciones se utilizaron los mismos monolitos y esta reacción de eliminación fue la última que se les realizó. Para la eliminación de azul de metileno, el biocatalizador que mejores resultados presenta son los INR, esto puede deberse a que tras todos los ensayos realizados a los monolitos los biocatalizadores se envenenaron. Gracias a la encapsulación de la proteína en los INR se obtiene una mayor estabilidad y una mejor resistencia al envenenamiento. En la Figura 14 se muestran los porcentajes de degradación del azul de metileno a diferentes tiempos de reacción de los diferentes monolitos.

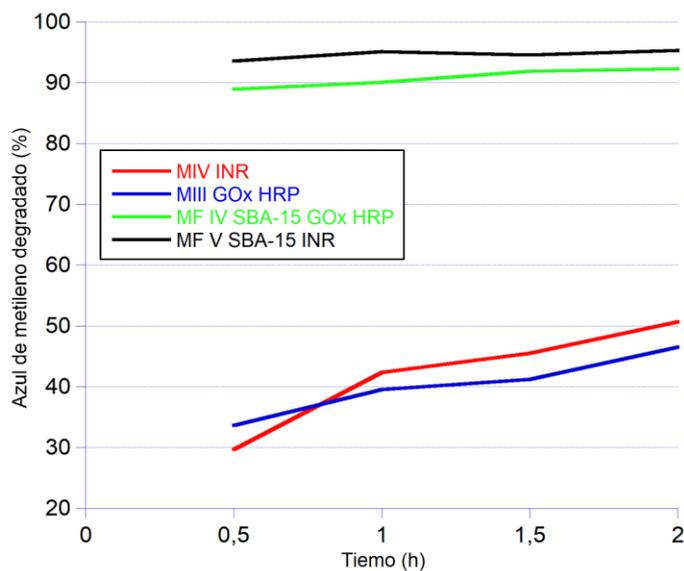


Figura 14. Porcentajes de degradación del azul de metileno a diferentes tiempos de reacción.

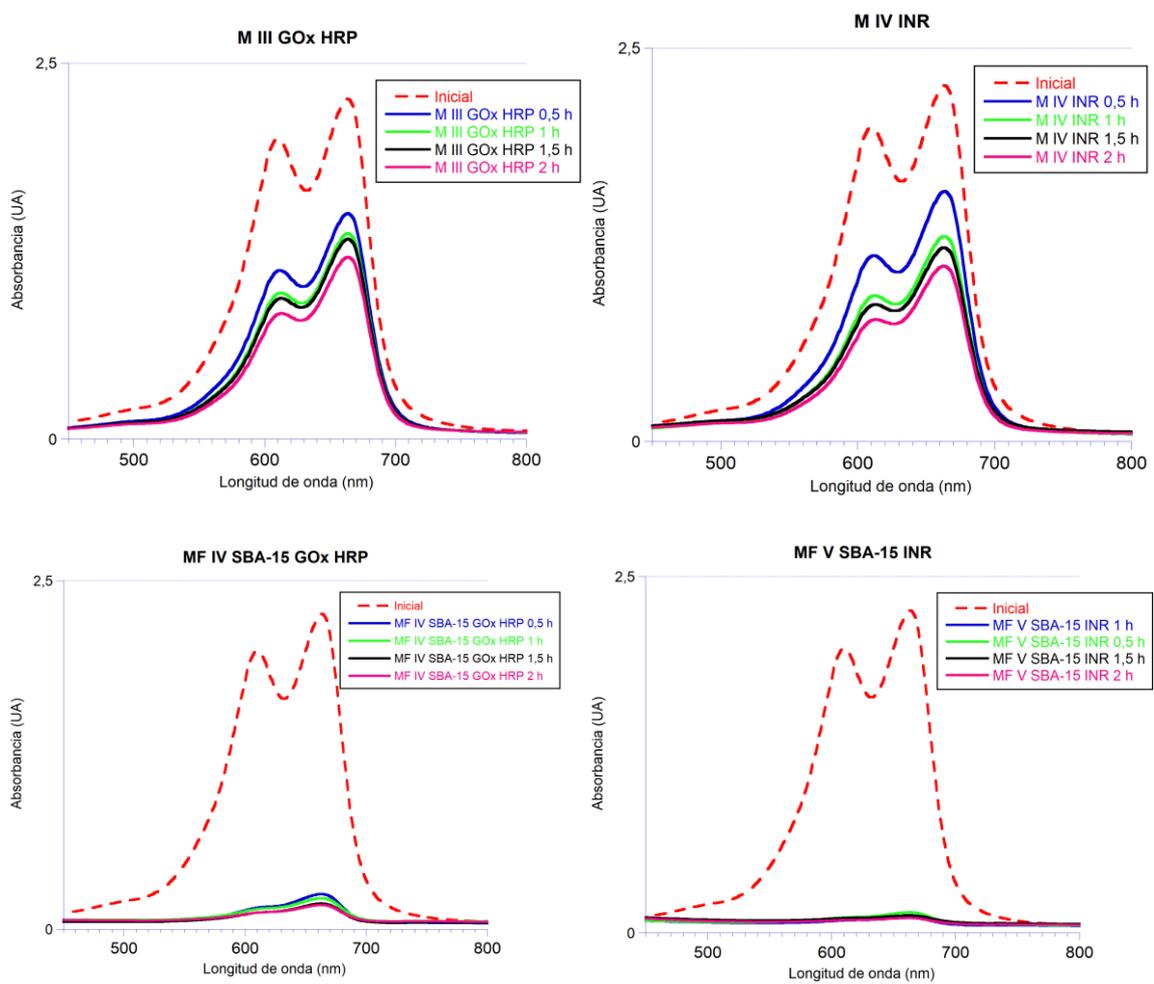


Figura 15. Espectros de los productos de reacción de los diferentes monolitos tras la reacción con $100 \mu\text{M}$ de azul de metileno.

6 Conclusiones/conclusions

En el presente trabajo se ha desarrollado un método de inmovilización de biocatalizadores en dos tipos de reactores estructurados. A pesar de haberse inmovilizado los biocatalizadores, tanto la cantidad inmovilizada como la adhesión no han podido ser optimizadas. Se requiere más trabajo y el desarrollo de otros métodos como el anclaje covalente de los biocatalizadores a la superficie, para así aumentar la actividad de los monolitos. Tanto la síntesis del soporte mesoporoso como su caracterización ha sido exitosa. Y por último se sintetizó con éxito los INR.

Los monolitos de Fecralloy han mostrado una mayor actividad que los de PDMS en todos los ámbitos. Por tanto, utilizando estas condiciones, parecen ser los más adecuados. Tanto los INR como las enzimas tras la inmovilización siguen siendo activas, pero la protección que les otorga la encapsulación a los INR hace que sean los más adecuados para la catálisis heterogénea y evitar el envenenamiento de los catalizadores.

In this work It has been described a biocatalyst immobilization method in two types of structured reactors. Despite immobilization has been successful the amount of biocatalyst immobilized and the adherence of it were not very high. It is needed more work in the development of new anchoring methods like covalent binding to the surface, to get a better immobilization of the biocatalyst and to achieve higher catalytic activity of the reactors. The synthesis and characterization of the mesoporous silica has been successful. Finally, we synthesized successfully the INR.

The Fecralloy monoliths shown a higher activity than the PDMS ones in all fields, so this type of monolith is the most suitable for this immobilization method. Both INR and enzymes kept the catalytic activity after immobilization, but the protection that acquired the encapsulated glucose oxidase makes them more suitable for heterogeneous catalysis and to prevent the catalyst poisoning.

7 Referencias

- (1) Azizullah, A.; Khattak, M. N. K.; Richter, P.; Häder, D. P. Water Pollution in Pakistan and Its Impact on Public Health — A Review. *Environ Int* **2011**, *37* (2), 479–497. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2010.10.007>.
- (2) Fürhacker, M.; Scharf, S.; Weber, H. Bisphenol A: Emissions from Point Sources. *Chemosphere* **2000**, *41* (5), 751–756. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00466-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00466-X).
- (3) Kang, J. H.; Aasi, D.; Katayama, Y. Bisphenol A in the Aquatic Environment and Its Endocrine-Disruptive Effects on Aquatic Organisms. <http://dx.doi.org/10.1080/10408440701493103> **2008**, *37* (7), 607–625. <https://doi.org/10.1080/10408440701493103>.
- (4) Friques, A. G. F.; Santos, F. D. N.; Angeli, D. B.; Silva, F. A. C.; Dias, A. T.; Aires, R.; Leal, M. A. S.; Nogueira, B. v.; Amorim, F. G.; Campagnaro, B. P.; Pereira, T. M. C.; Campos-Toimil, M.; Meyrelles, S. S.; Vasquez, E. C. Bisphenol A Contamination in Infant Rats: Molecular, Structural, and Physiological Cardiovascular Changes and the Protective Role of Kefir. *J Nutr Biochem* **2020**, *75*, 108254. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2019.108254>.
- (5) Dassanayake, R. S.; Acharya, S.; Abidi, N. Recent Advances in Biopolymer-Based Dye Removal Technologies. *Molecules* **2021**, *Vol. 26*, Page 4697 **2021**, *26* (15), 4697. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26154697>.
- (6) Aksu, Z. Application of Biosorption for the Removal of Organic Pollutants: A Review. *Process Biochemistry* **2005**, *40* (3–4), 997–1026. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.04.008>.
- (7) *La moda rápida tiñe de contaminación el agua de África*. <https://www.elagoradiario.com/agua/contaminacion-agua-rios-africa-industria-textil-moda-rapida/> (accessed 2022-09-01).
- (8) Forgacs, E.; Cserhádi, T.; Oros, G. Removal of Synthetic Dyes from Wastewaters: A Review. *Environ Int* **2004**, *30* (7), 953–971. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2004.02.001>.
- (9) Huang, Q.; Weber, W. J. Transformation and Removal of Bisphenol A from Aqueous Phase via Peroxidase-Mediated Oxidative Coupling Reactions: Efficacy, Products, and Pathways. *Environ Sci Technol* **2005**, *39* (16), 6029–6036. <https://doi.org/10.1021/ES050036X/ASSET/IMAGES/LARGE/ES050036XF00007.JPEG>.
- (10) Gharibi, H.; Moosavi-Movahedi, Z.; Javadian, S.; Nazari, K.; Moosavi-Movahedi, A. A. Vesicular Mixed Gemini-SDS-Hemin-Imidazole Complex as a Peroxidase-like Nano Artificial Enzyme. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115* (16), 4671–4679. https://doi.org/10.1021/JP112051T/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2010-12051T_0009.JPEG.
- (11) Wang, Q.; Yang, Z.; Zhang, X.; Xiao, X.; Chang, C. K.; Xu, B. A Supramolecular-Hydrogel-Encapsulated Hemin as an Artificial Enzyme to Mimic Peroxidase. *Angewandte Chemie - International Edition* **2007**, *46* (23), 4285–4289. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200700404>.
- (12) Khezri, B.; Villa, K. Hybrid Photoresponsive/Biocatalytic Micro- and Nanoswimmers. *Chem Asian J* **2022**, *2022*, e202200596. <https://doi.org/10.1002/ASIA.202200596>.

- (13) Li, X.; Cao, X.; Xiong, J.; Ge, J.; Li, X.; Cao, X.; Xiong, J.; Ge, J. Enzyme–Metal Hybrid Catalysts for Chemoenzymatic Reactions. *Small* **2020**, *16* (15), 1902751. <https://doi.org/10.1002/SMLL.201902751>.
- (14) Rodriguez-Abetxuko, A.; Muñumer, P.; Okuda, M.; Calvo, J.; Knez, M.; Beloqui, A. Nanoconfined (Bio)Catalysts as Efficient Glucose-Responsive Nanoreactors. *Adv Funct Mater* **2020**, *30* (35), 2002990. <https://doi.org/10.1002/adfm.202002990>.
- (15) Visscher, F.; van der Schaaf, J.; Nijhuis, T. A.; Schouten, J. C. Rotating Reactors - A Review. *Chemical Engineering Research and Design* **2013**, *91* (10), 1923–1940. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2013.07.021>.
- (16) Fecheté, I.; Wang, Y.; Védrine, J. C. The Past, Present and Future of Heterogeneous Catalysis. *Catal Today* **2012**, *189* (1), 2–27. <https://doi.org/10.1016/J.CATTOD.2012.04.003>.
- (17) Chaudhary, V.; Sharma, S. An Overview of Ordered Mesoporous Material SBA-15: Synthesis, Functionalization and Application in Oxidation Reactions. **2016**. <https://doi.org/10.1007/s10934-016-0311-z>.
- (18) Kim, J.; Li, W. A.; Choi, Y.; Lewin, S. A.; Verbeke, C. S.; Dranoff, G.; Mooney, D. J. Injectable, Spontaneously Assembling, Inorganic Scaffolds Modulate Immune Cells in Vivo and Increase Vaccine Efficacy. *Nature Biotechnology* **2014**, *33* (1), 64–72. <https://doi.org/10.1038/nbt.3071>.
- (19) Zhu, Y.; Chen, Q.; Shao, L.; Jia, Y.; Zhang, X. Microfluidic Immobilized Enzyme Reactors for Continuous Biocatalysis. *React Chem Eng* **2019**, *5* (1), 9–32. <https://doi.org/10.1039/C9RE00217K>.
- (20) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review. *Adsorption* **2014**, *20* (5–6), 801–821. <https://doi.org/10.1007/S10450-014-9623-Y/FIGURES/5>.
- (21) Mario Montes's lab | Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). <https://www.researchgate.net/lab/Mario-Montes-Lab> (accessed 2022-09-01).
- (22) Sanz, O.; Echave, F. J.; Romero-Sarria, F.; Odriozola, J. A.; Montes, M. Advances in Structured and Microstructured Catalytic Reactors for Hydrogen Production. *Renewable Hydrogen Technologies: Production, Purification, Storage, Applications and Safety* **2013**, 201–224. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56352-1.00009-X>.
- (23) Castedo, A.; Mendoza, E.; Angurell, I.; Llorca, J. Silicone Microreactors for the Photocatalytic Generation of Hydrogen. *Catal Today* **2016**, *273*, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.02.053>.
- (24) Lafuente, M.; Pellejero, I.; Clemente, A.; Urbiztondo, M. A.; Mallada, R.; Reinoso, S.; Pina, M. P.; Gandía, L. M. In Situ Synthesis of SERS-Active Au@POM Nanostructures in a Microfluidic Device for Real-Time Detection of Water Pollutants. *ACS Appl Mater Interfaces* **2020**, *12* (32), 36458–36467. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C06725/ASSET/IMAGES/LARGE/AMOC06725_0008.JPEG.

- (25) Raj M, K.; Chakraborty, S. PDMS Microfluidics: A Mini Review. *J Appl Polym Sci* **2020**, *137* (27). <https://doi.org/10.1002/APP.48958>.
- (26) Pérez, H.; Navarro, P.; Montes, M. Deposition of SBA-15 Layers on Fecralloy Monoliths by Washcoating. *Chemical Engineering Journal* **2010**, *158* (2), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.01.032>.
- (27) Donohue, M. D.; Aranovich, G. L. Classification of Gibbs Adsorption Isotherms. *Adv Colloid Interface Sci* **1998**, *76–77*, 137–152. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00044-X](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00044-X).
- (28) Shin, Y.; Liu, J.; Wang, L. Q.; Nie, Z.; Samuels, W. D.; Fryxell, G. E.; Exarhos, G. J.; Yang, C. M.; Liu, P. H.; Ho, Y. F.; Chiu, C. Y.; Chao, K. J. Consecutive Generation of Mesopores and Micropores in SBA-15. *Angew. Chem., Int. Ed* **2002**, *102* (10), 3739–3741. <https://doi.org/10.1021/cm031109j>.
- (29) Shakeri, M.; Shal, Z. K.; van der Voort, P. An Overview of the Challenges and Progress of Synthesis, Characterization and Applications of Plugged Sba-15 Materials for Heterogeneous Catalysis. *Materials* **2021**, *14* (17). <https://doi.org/10.3390/MA14175082>.
- (30) Vallar, S.; Houivet, D.; el Fallah, J.; Kervadec, D.; Haussonne, J. M. Oxide Slurries Stability and Powders Dispersion: Optimization with Zeta Potential and Rheological Measurements. *J Eur Ceram Soc* **1999**, *19* (6–7), 1017–1021. [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(98\)00365-3](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(98)00365-3).
- (31) Kosmulski, M. PH-Dependent Surface Charging and Points of Zero Charge II. Update. *J Colloid Interface Sci* **2004**, *275* (1), 214–224. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2004.02.029>.
- (32) Kim, D.; Herr, A. E. Protein Immobilization Techniques for Microfluidic Assays. *Biomicrofluidics* **2013**, *7* (4), 041501. <https://doi.org/10.1063/1.4816934>.

8 Anexo

Calibrados de pirogalol

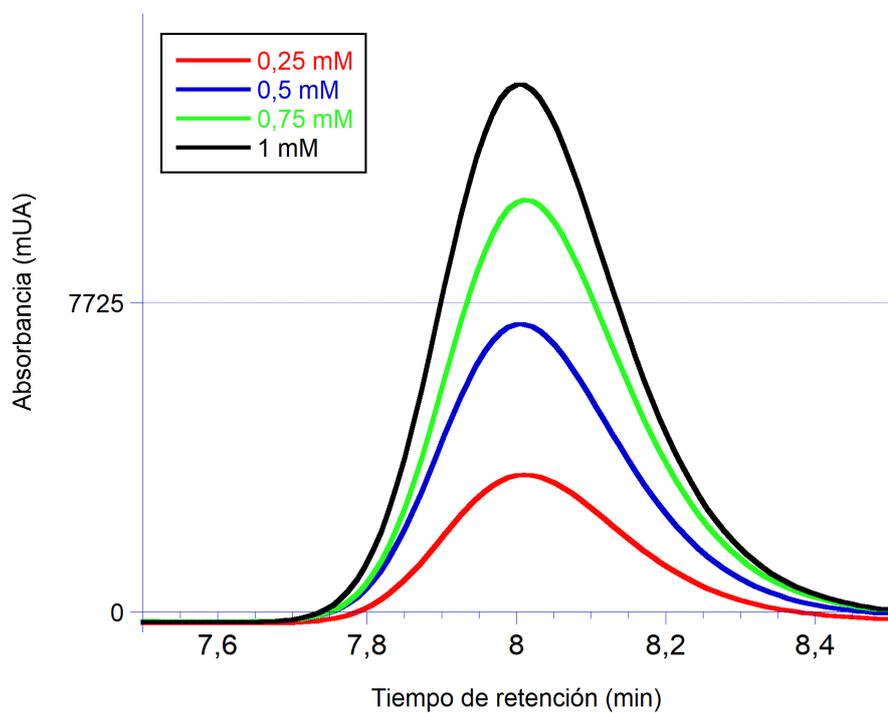


Figura anexa 1. Cromatogramas de los calibrados del pirogalol

Recta de calibrado para el pirogalol

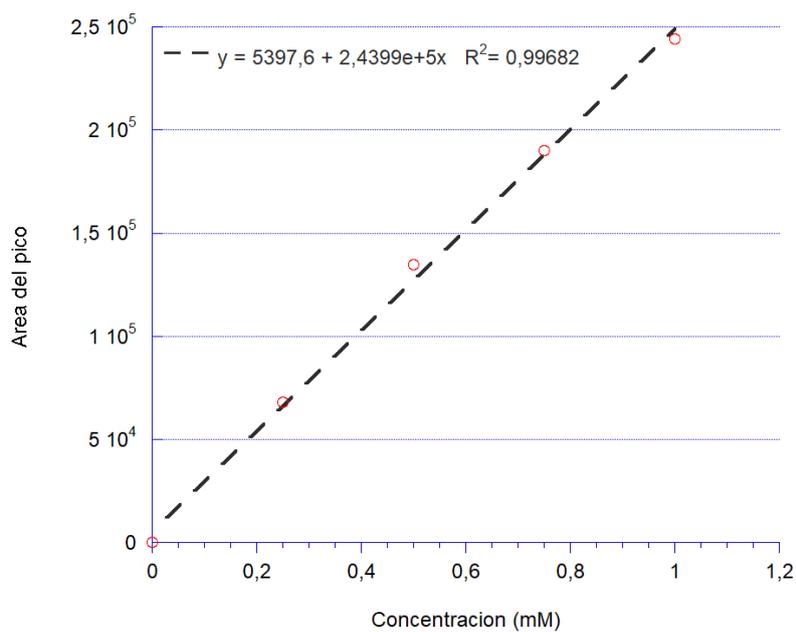


Figura anexa 2. Línea de calibrado del pirogalol