



APLICACIÓN DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA AL ESTUDIO DE LA RUGOSIDAD DE UN BIOCATALIZADOR COMERCIAL

Mariela Theiller (1), María Victoria Toledo (1), Laura E. Briand (1)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas-Dr. Jorge J. Ronco. Universidad Nacional de La Plata, CONICET, CCT La Plata. Calle 47 N° 257, B1900AJK La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Email: mtheiller@quimica.unlp.edu.ar

Desde hace varios años, nuestro grupo de investigación utiliza el biocatalizador comercial Novozym® 435 en la esterificación enantioselectiva de fármacos como el S/R-ibuprofeno y S/R-ketoprofeno a los fines de obtener el enantiómero con actividad farmacológica. Este catalizador está compuesto por esferas de una resina macroporosa de polimetilmetacrilato sobre las que se encuentra la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada físicamente. En el proceso de esterificación enantioselectiva, el profeno racémico reacciona con un alcohol en presencia del biocatalizador para producir el éster del enantiómero R(-) y agua, lo cual permite la separación del S(+)-enantiómero [1]. Los alcoholes de cadena corta tales como metanol, etanol, 1 y 2-propanol utilizados en la esterificación difunden en el interior de las esferas del biocatalizador provocando la disgregación-disolución del polimetilmetacrilato que constituye el soporte de la enzima CALB. Este fenómeno produce la desorción de la enzima y además, modifica la estructura interna de las esferas de biocatalizador. Este problema se utilizó como un "caso de estudio" para la búsqueda de parámetros que caractericen cuantitativamente la superficie de los materiales. En este sentido, diferentes caminos son utilizados para el estudio de las superficies. Por un lado se encuentran los modelos que permiten establecer correlaciones de altura y por otro, y se encuentra también el estudio de la textura de las imágenes de estas superficies de una manera indirecta. Los valores entre los distintos métodos pueden no coincidir, no obstante el comportamiento fractal de la muestra se mantiene en la textura de la imagen correspondiente. Esta afirmación se fundamenta en el trabajo de Pentland quien demostró matemáticamente que los niveles de gris en la imagen óptica digitalizada de una superficie fractal muestra el mismo comportamiento fractal que la superficie fractal real. Posteriormente Skands, encontró una marcada correlación lineal entre las propiedades topográficas de las superficies y los electrones secundarios emitidos desde la mismas en un SEM [2].

En este contexto, se utilizó la microscopía electrónica de barrido y el posterior análisis de las imágenes para caracterizar la textura interna del biocatalizador y obtener más evidencias de ese fenómeno. Las esferas de Novozym® 435 se embebieron en resina y luego se seccionaron en finas láminas con un micrótopo. De estos cortes se obtuvieron imágenes en un microscopio electrónico de barrido ambiental ESEM FEI Quanta 400 en modalidad alto vacío y con una magnificación 20000X (ver Figura 1, imágenes A, B, C y D) y en un Philips SEM 505 en la misma modalidad con una magnificación de 8400X (ver Figura 1, imagen E). El análisis de la textura de dichas imágenes fue realizado por medio de un programa interactivo de fácil manejo llamado FERImage [3]. Con los datos de la varianza que otorga el programa se obtienen luego los valores de varios parámetros. En este caso particular, se determinaron los D y de d_{min} que se calculan sumando todos los delta de grises al cuadrado resultantes del barrido de la imagen según X y según Y. Como estos dos parámetros no necesariamente son constantes en diferentes direcciones si la imagen es anisotrópica se toma un valor promedio de los valores obtenidos para dichos parámetros en cada diferente rotación entre 0° y 90° . Los valores de d_{min} y D que se presentan en este trabajo corresponden al promedio de cinco rotaciones entre 0° y 90° .

En la Tabla 1 se presentan los valores de dimensión fractal D y de d_{min} , determinados a partir de las imágenes del biocatalizador antes y después del contacto con los alcoholes.

El biocatalizador (sin contacto previo con alcohol) posee una dimensión fractal $D = 2.8347 \pm 0.0027$ lo que indica una textura rugosa como se observa en la Figura 1. Sin embargo, el prolongado contacto con los diversos alcoholes provocan una disminución de la dimensión fractal lo cual, evidencia cierto alisado de la textura interna de las esferas del biocatalizador.

Así mismo, la disminución del parámetro D está acompañada por el aumento de la longitud del patrón que describe la textura (d_{min}). Este fenómeno sólo pudo producirse por la difusión del alcohol al interior de las esferas como se comentó anteriormente.

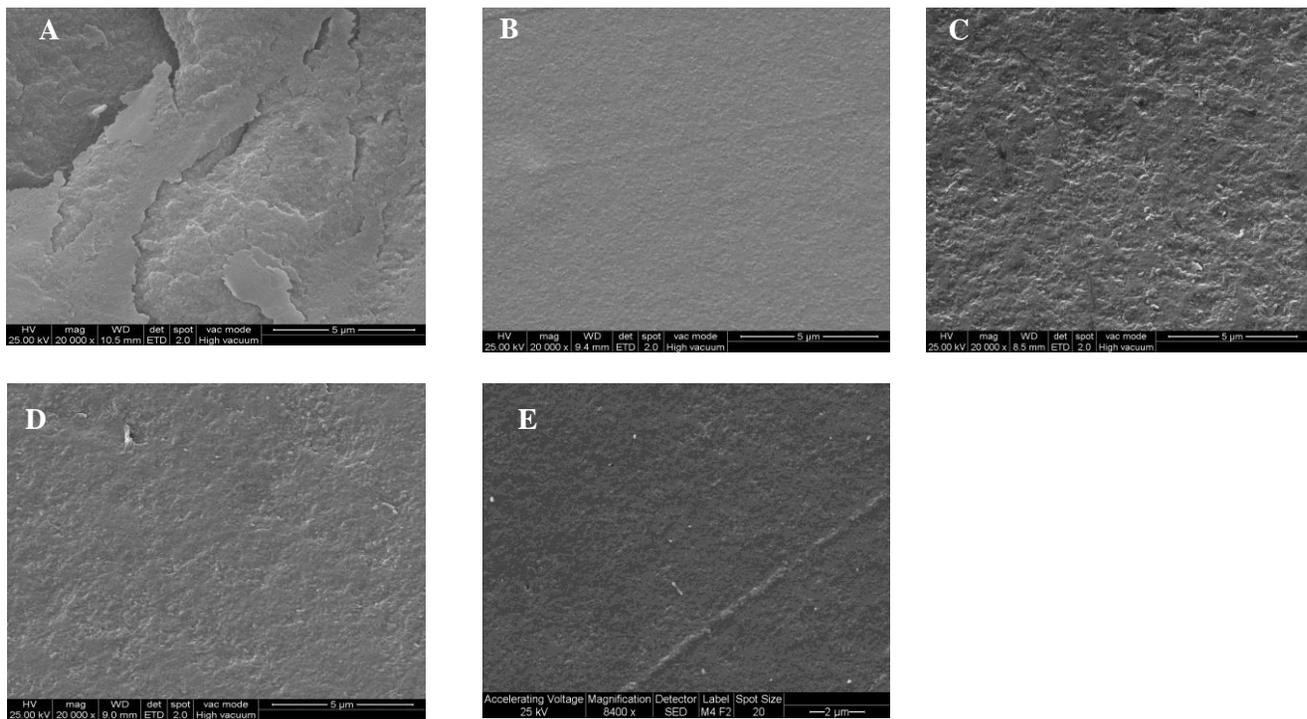


Figura 1. Imágenes obtenidas en un microscopio ESEM (x20000) de la sección transversal de las esferas del biocatalizador Novozym® 435 antes (A) y después del contacto con metanol (B), etanol (C), 1-propanol (D) y 2-propanol (E).

Tabla 1. Estimadores de textura D y d_{\min} obtenidos del análisis de las imágenes del microscopio electrónico de barrido.

Estimadores de textura	Novozym® 435	Biocatalizador tratado con alcohol			
		metanol	etanol	1-propanol	2-propanol
Dimension fractal D	2.8347 ± 0.0027	2.595 ± 0.054	2.665 ± 0.004	2.460 ± 0.042	2.727 ± 0.022
d_{\min} [μm]	0.0582 ± 0.0022	0.05952 ± 0.0017	0.1015 ± 0.022	0.0692 ± 0.017	0.0651 ± 0.0032

REFERENCIAS

- [1] Toledo M.V., José C., Collins S.E., Ferreira M.L., Briand L.E., (2015) "Towards a green enantiomeric esterification of R/S-ketoprofen: A theoretical and experimental investigation" J. Mol. Catal. B: Enz. 118: 52-61. 457-463.
- [2] Skands U., (1996) Quantitative methods for the analysis of electron microscope images. Ph D Thesis, Technical University of Denmark, Institute of Mathematical Modeling (IMM) ISSN 0909-3192, pp 73-77.
- [3] Bonetto R.D. and Ladaga, J.L., (1998) "The variogram method for characterization of SEM images" Scanning 20(6): 457-463.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Laboratorios de Microscopía Electrónica y Microanálisis del Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física- LIMF de la Facultad de Ingeniería de la UNLP y de CINDECA (UNLP-CONICET) por el compromiso y dedicación.