



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

PROGRAMA EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

Inmovilización sobre nanotubos de carbono de la enzima LiP y su evaluación preliminar sobre la degradación de la lignina del nopal (*Opuntia ficus indica*)

T E S I S

Que presenta

MARIA SELENE LUNA MARTÍNEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN

NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

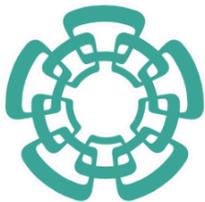
Directores de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Pérez Robles

Dra. Maria Del Carmen Montes Horcasitas

Ciudad de México

Marzo, 2021



**CENTER OF RESEARCH AND ADVANCED STUDIES
OF THE NATIONAL POLYTECHNIC INSTITUTE**

UNITY ZACATENCO

PROGRAM IN NANOSCIENCES AND NANOTECHNOLOGY

**Immobilization of LiP enzyme on carbon nanotubes and its
preliminary evaluation on lignin degradation in nopal (*Opuntia
ficus indica*)**

T H E S I S

Presented by

MARIA SELENE LUNA MARTÍNEZ

To obtain the grade of

Doctor of Science

in

Nanoscience and Nanotechnology

Thesis Directors:

Dr. Juan Francisco Pérez Robles

Dra. Maria Del Carmen Montes Horcasitas

Mexico City

March, 2021

Agradecimientos:

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis de doctorado.

Agradezco el apoyo de mis directores de tesis Dra. Carmen Montes Horcasitas y al Dr. Juan Francisco Pérez Robles. Así como a mis sinodales, por el tiempo dedicado para la revisión de la tesis y sugerencias para la mejora la calidad de este trabajo.

También reconozco y agradezco a los investigadores de la Universidad Autónoma de Querétaro, la Dra. Alejandra Álvarez López y el Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa por su ayuda en la realización de las pruebas biológicas. Al Dr. Aaron Rodríguez López de la Universidad Politécnica de Santa Rosa Jauregui por la facilidad para el acceso a laboratorios de investigación, el uso de las instalaciones y equipos para realización de pruebas espectrofotométricas UV.

A mi compañera del doctorado y amiga Marlen Alexis, gracias por ayudarme en la realización y análisis de las pruebas en la producción de los nanotubos de carbono.

Gracias al personal técnico de los laboratorios de Nanomateriales y Biocatálisis; Luz Ma Áviles y Jesús por las facilidades para la realización de pruebas, así como sus observaciones y consejos.

Dedico esta tesis a mi gran tesoro Maria Joskua Rojas Luna; gracias por tu paciencia, tus cartas motivacionales, por enseñarme que siempre puedo lograr mis sueños y por tu cariño incondicional. También dedico este logro a mis padres Martha y Antonio, y mis hermanos Ana y Antonio que siempre me han apoyado en cada proyecto de mi vida.

Índice

Agradecimientos:	1
Lista de Figuras.....	5
Resumen	9
Abstract	10
Antecedentes y Objetivos.....	11
1 Nanotubos de Carbono	13
1.1 Enlace entre Carbonos.....	13
2 Clasificación de Nanotubos de Carbono	17
2.1 Nanotubos de Capa simple	18
2.2 Nanotubos de Carbono Multicapa.....	18
3 Técnicas de síntesis.....	19
3.1 Arco descarga.....	20
3.2 Ablactación laser	21
3.3 Deposición de vapor químico (CVD).....	22
4 Mecanismos de crecimiento	25
5 Catalizadores	26
6 Precursores de Carbono para Nanotubos.....	29
7 Purificación y Funcionalización de NTC	32
8 Lignocelulosa	34
8.1 Celulosa.....	35
8.2 Hemicelulosa	36
8.3 Lignina.....	37
9 Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica	39

9.1	Tratamientos físicos.....	41
9.2	Tratamientos Químicos	42
9.3	Pretratamientos biológicos	43
10	Tratamientos Enzimáticos y la degradación de la lignina	44
10.1	Lacasa.....	45
10.2	Manganeso Peroxidasa (MnP).....	46
10.3	Versátil Peroxidasa	48
10.4	Lignina Peroxidasa.....	51
11	Inmovilización Enzimática	55
11.1	Métodos de inmovilización enzimática.....	56
11.1.1	Adsorción Física.....	56
11.1.2	Enlace covalente	58
11.1.3	Entrampamiento	60
11.1.4	Encapsulación	61
11.1.5	Entrecruzante.....	62
11.2	Factores que afectan las interacciones enzima-nanopartícula (NP)	65
11.2.1	Unión enzimática a MWCNTs via diimide- amidación activada	66
12	Metodología	68
12.1	Preparación de Catalizador	68
12.2	Síntesis de Nanotubos de Carbono.....	68
12.3	Purificación y Funcionalización de MWCNT	68
12.4	Caracterización de MWCNT	69
12.5	Inmovilización de enzimas sobre MWCNTs.....	69
12.6	Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad LiP.....	70

12.7	Determinación del potencial zeta de los MWCNTs y las enzimas LiP inmovilizadas.	70
12.8	Actividad de LiP	71
12.9	Preparación de muestra de Nopal.....	71
12.10	Proceso de delignificación enzimática.....	71
13	Resultados y discusiones	72
13.1	Catalizador.....	72
13.2	Calidad de los MWCNT sintetizados.....	74
13.3	Limpieza de MWCNT's.....	76
13.4	Funcionalización de MWCNT	77
13.5	Efectos de la LiP inmovilizada sobre MWCNTs modificados.....	85
13.6	Evaluación de la Enzima LiP inmovilizada	89
13.7	Tratamiento de nopal con enzima LiP inmovilizada	94
14	Conclusiones	98
15	Perspectivas	100
16	Referencias.....	101
17	Anexos.....	111
	Lista de artículos publicados	111

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Formas Alotrópicas del Carbono.</i>	15
Figura 2. <i>La red de carbono y las formas en que puede enrollarse el tubo en zigzag, sillón o quiral.</i>	16
Figura 3. <i>Representación de SWCNT (superior) y MWCNT (inferior).</i>	18
Figura 4. <i>Esquema del equipo de Arco Descarga.</i>	20
Figura 5. <i>Esquema de equipo de ablación laser</i>	22
Figura 6. <i>Diagrama esquemático del equipo térmico de CVD</i>	24
Figura 7. <i>Diagrama esquemático de mecanismos de crecimiento a) disolución de partícula metálica, b) precipitación del carbono en forma de filamento.</i>	26
Figura 8. <i>Precursores de carbono comúnmente utilizados: monóxido de carbono, metano, acetileno, etileno y etano de izquierda a derecha (negro: carbono, rojo: oxígeno, blanco: hidrógeno).</i>	30
Figura 9. <i>Energía libre de Gibbs de reacción por mol de carbono para la formación de carburos metálicos y materia prima. “cr” y “g” respectivamente en estado cristalino y gaseoso</i>	32
Figura 10. <i>Estructura química de las cadenas de celulosa</i>	36
Figura 11. <i>Estructura química de los componentes de la hemicelulosa (xilano y glucomanano).</i>	37
Figura 12. <i>Estructura de moléculas de celulosa incrustadas en matriz de hemicelulosa y lignina</i>	38
Figura 13. <i>Los componentes de la estructura de la Lignina</i>	39
Figura 14. <i>Modelos Ribbon de la lacasa de Trametes versicolor (pdbid: 1KYA); Rigidoporus lignosus (pdbid: 1V10); y Botrytis aclada (pdbid: 3V9E) muestran un patrón de pliegue similar.</i>	45
Figura 15. <i>Reacción general catalizada por lacasa</i>	46
Figura 16. <i>Estructura molecular y sitio activo de MnP.</i>	47
Figura 17. <i>Ciclo catalítico de la MnP.</i>	48
Figura 18. <i>Estructura de espacio hemo de la peroxidasa versátil, en centro de hemoporfirina es indicada en color azul</i>	50

Figura 19. <i>Esquema del ciclo catalítico de la versátil peroxidasa adaptado de Salvachúa et. al.</i>	51
Figura 20. <i>Estructura tridimensional listón de la LiP a) detalle del hemo ambiente, b) entrada ILGA.</i>	52
Figura 21. <i>La estructura de β-O-4 de la lignina y la ruta de división de $C_{\alpha} - C_{\beta}$ por LiP (Adaptado de Hammel et. al., 2008).</i>	53
Figura 22. <i>Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa, A es un sustrato donador de electrones (modificado de Wan y Li, 2013)</i>	54
Figura 23. <i>Método de Adsorción Física.</i>	58
Figura 24. <i>Inmovilización enzimática covalente.</i>	59
Figura 25. <i>Inmovilización de entrapamiento enzimático</i>	61
Figura 26. <i>Inmovilización enzimático por encapsulamiento.</i>	62
Figura 27. <i>Inmovilización de entrecruzamiento</i>	63
Figura 28. <i>Los parámetros que determinan la actividad del conjugado enzima-NP (adaptado de Othman, et.al., 2016).</i>	66
Figura 29. <i>Conjugación teórica de proteínas en NTC carboxilados utilizando EDC en presencia o ausencia de Sulfo-NHS.</i>	67
Figura 30. <i>Análisis Termogravimétrico (TGA) del catalizador Fe:Ni 3:1.</i>	73
Figura 31. <i>FTIR del catalizador Fe:Ni 3:1.</i>	74
Figura 32. <i>Estudio SEM de muestra MWCNT con una relación Fe:Ni 3:1.</i>	74
Figura 33. <i>Espectroscopía Raman de los MWCNT a partir de la aleación Fe:Ni 3:1</i>	76
Figura 34. <i>Comparativa de espectroscopia Raman de los MWCNT's con tratamiento térmico y limpieza con HCl al 50%.</i>	77
Figura 35. <i>SEM de MWCNT para A) Tratamiento térmico y B) Purificados con HCl al 50%.</i>	77
Figura 36. <i>Espectroscopia Raman después de normalización de los tratamientos con ácidos concentrados con variación de tiempo de 24, 48 y 80 horas de contacto.</i>	79

Figura 37. Espectroscopia FTIR para MWCNT con tratamiento térmico (T T), tratamiento de purificación con HCl y tratamiento oxidativo con mezcla de ácidos concentrados H ₂ SO ₄ : HNO ₃ 3:1 para 24, 48 y 80 horas de tiempo de contacto. .	81
Figura 38. Espectros XPS para C 1s y O 1s para MWCNTs, A) sin tratamiento ácido, B) 24 h de tratamiento ácido, C) 48 h de tratamiento ácido y D) 80 h tratamiento ácido.	82
Figura 39. Espectro XPS correspondiente al carbono (C 1s) de MWCNTs a) Originales, B) Tratamiento Ácido 24 h, C) Tratamiento Ácido 48 h y D) Tratamiento Ácido 80 h.	83
Figura 40. Espectro XPS correspondiente al carbono (O 1s) de MWCNTs, A) Originales, B) Tratamiento Ácido 24 h, C) Tratamiento Ácido 48 h y D) Tratamiento Ácido 80 h.	84
Figura 41. A) Efecto del pH sobre la actividad de la LiP, B) Efecto de la temperatura sobre la actividad de LiP.	88
Figura 42. Potencial Zeta en solución buffer de fosfatos y pH de 5.5. A) MWCNTs térmicamente tratados y funcionalizados y B) Con enzima LiP inmovilizada sobre MWCNTs.....	91
Figura 43. Espectros Raman comparativos de MWCNTs con tratamiento ácido y enzima LiP inmovilizada para tratamiento con mezcla ácida a) 24 horas, B) 48 horas y C) 80 horas.	93
Figura 44. Análisis SEM para NTC con tiempo de contacto de tratamiento ácido A)24 horas, B) 48 horas y C) 80 horas. Enzima inmovilizada sobre nanotubos funcionalizados D) 24 horas, E) 48 horas y F) 80 horas.	94
Figura 45. Espectros FTIR de solución de nopal posterior tratamiento para A) 0 h, B) 24 h y D) 72 h con enzima LiP inmovilizada sobre MWCNT de 48 h de tratamiento ácido.	95
Figura 46. Espectro UV-Vis a 205 nm, para lignina soluble con enzima inmovilizada sobre nanotubos de carbono de 48 horas de oxidación, para tiempos de degradación de 0, 24,48 y 72 horas, a pH de 5, temperatura de 35.5 °C y agitación constante.....	97
Figura 47. Ruta metabólica de la enzima LiP sobre estructura G-S.	98

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Comparación entre los SWCNT y MWCNT</i>	19
Tabla 2. <i>Catalizadores comúnmente utilizados en la producción de CNT</i>	28
Tabla 3. <i>Características de varios procesos de purificación de NTC's</i>	33
Tabla 4. <i>Efecto del pretratamiento sobre la modificación en la composición y la estructura de la biomasa lignocelulósica.</i>	40
Tabla 5. <i>Evaluación comparativa de las ventajas y desventajas de varias estrategias de inmovilización enzimática</i>	64
Tabla 6. <i>Contenido de elementos de los diferentes MWCNTs analizados por XPS.</i>	82
Tabla 7. <i>Porcentaje de enzima inmovilizadas sobre MWCNTs funcionalizados.</i>	86
Tabla 8. <i>Comparativa del desempeño de pH y temperatura de la enzima LiP inmovilizada en NTC por la unión covalente NHS-EDAC y otras técnicas aplicadas.</i>	89
Tabla 9. <i>Bandas de FTIR para el tratamiento con enzima LiP de solución de nopal.</i>	96

Resumen

El uso de material lignocelulósico para la generación de biocombustibles resulta limitante debido a la estructura de la lignina que presenta una resistencia a la degradación durante el proceso de fermentación. La enzima lignina peroxidasa (LiP) tiene la capacidad de degradar sustratos aromáticos tales como la lignina, y la aplicación de técnicas de inmovilización enzimática pueden mejorar sus características catalíticas y estabilidad, además de su recuperación y reuso que permitirán su aplicación en procesos industriales.

El objetivo del presente estudio es obtener MWCNTs con diferentes grados de funcionalización por tratamiento ácido para 24, 48 y 80 h de exposición, y valorar la eficiencia en la inmovilización covalente de la enzima LiP utilizando como entrecruzante de NHS-EDAC. Además de evaluar los efectos sobre la estabilidad y capacidad catalítica de la enzima LiP posterior a la inmovilización mediante pruebas sobre muestras de lignina soluble obtenidas del nopal (*Opuntia ficus-indica*) en condiciones controladas de pH, temperatura, en solución buffer y tiempos de exposición variable de 24 a 72 horas.

Los resultados muestran que la enzima LiP presenta el mayor porcentaje de inmovilización con un valor aproximado del 74% para MWCNTs con 48 horas de oxidación, presentándose en este soporte la mayor actividad de la enzima inmovilizada a un pH de 5 y temperatura de 35 °C. La prueba espectroscopia UV demuestra que la enzima inmovilizada presenta la degradación de la estructura de la lignina de la muestra nopal durante las 72 horas de la prueba.

Se concluye que los nanotubos de carbono funcionalizados en un lapso menor a 48 h resultan ser buenos soportes sólidos para la inmovilización covalente de la enzima LiP, mejorando sus propiedades catalíticas debido a su modificación física, que promueve la degradación continua de la superficie de la lignina de las muestras de nopal. Además, los residuales metálicos que permanecen dentro de la estructura MWCNT posterior a su funcionalización resultan eficientes para facilitar su recuperación del medio a través de la exposición a un imán.

Abstract

The use of lignocellulosic material for the generation of biofuels is limiting due to the structure of lignin, which is resistant to degradation during the fermentation process. The enzyme lignin peroxidase (LiP) can degrade aromatic substrates such as lignin, and the application of enzyme immobilization techniques can improve its catalytic characteristics and stability, in addition to its recovery and reuse that will allow its application in industrial processes.

The present study aims to obtain MWCNTs with different degrees of functionalization by acid treatment for 24, 48, and 80 h of exposure and to evaluate the level of covalent immobilization of the LiP enzyme using NHS-EDAC as a crosslinker. In addition to evaluating the effects on the stability and catalytic capacity of the LiP enzyme after immobilization by testing on soluble lignin samples obtained from prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) under controlled conditions of pH, temperature, in buffer solution and exposure times varying from 24 to 72 hours.

The results show that the LiP enzyme presents the highest percentage of immobilization with an approximate value of 74% for MWCNTs with 48 hours of oxidation, presenting in this support the highest activity of the immobilized enzyme at a pH of 5 and temperature of 35 °C. The UV spectroscopy test shows that the immobilized enzyme presents the degradation of the lignin structure of the prickly pear cactus sample during the 72 hours of the test.

It is concluded that the functionalized carbon nanotubes in less than 48 h turn out to be good solid supports for the covalent immobilization of the LiP enzyme, improving its catalytic properties due to its physical modification, which promotes the continuous degradation of the lignin surface of the prickly pear cactus samples. Moreover, the metal residues remaining inside the MWCNT structure after its functionalization are efficient to facilitate its recovery from the medium through exposure to a magnet.

Antecedentes y Objetivos

El principal objetivo de biotecnología verde es reducir la dependencia a los combustibles fósiles e incrementar el uso de materiales renovables, dentro de estos se encuentran los materiales lignocelulósicos compuestos de celulosa, hemicelulosa y lignina[1], dentro de ellos, *Opuntia ficus-indica*, conocida comúnmente como nopal es un material lignocelulósico resistente a la sequía, que se encuentra comúnmente en todo el mundo en regiones áridas y semiáridas. Debido a sus mecanismos de adaptación puede tolerar una amplia gama de condiciones edáficas y climáticas. El nopal tiene un bajo costo de producción y posee una eficiencia de utilización del agua cinco veces superior en comparación con el maíz y caña de azúcar, convirtiéndolo en una materia prima de segunda generación para la producción de biocombustible[2]. En nuestro país la producción de nopal es de alrededor de 350 mil toneladas al año y se cultiva en amplias zonas del Estado de México San Luis Potosí y en algunas alcaldías de la Cd de México como Milpa Alta, en donde está muy poco industrializada y generalmente se da como alimento al ganado, sin embargo, es posible que se pueda utilizar en diferentes industrias: Alimentos y bebidas, farmacéutica, cosmética, suplementos alimenticios, aditivos, construcción, agricultura, textil, turismo y energética [3].

Su aplicación en esta última está restringida debido a que es necesario primero eliminar la lignina, por su compleja estructura construida por heteropolimeros de fenilpropanoides, crea una barrera que limita el acceso enzimático de celulasas para la conversión de celulosa afectando la producción de biocombustibles [4], para lo que cual se han desarrollado diversos métodos de pretratamiento: físicos, químicos y biológicos, siendo estos últimos los de menor impacto ambiental. Algunos hongos de podredumbre blanca han demostrado su capacidad de degradación de la lignina debido a la presencia de catalizadores naturales conocidas como enzimas tales como lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y laccasa (Lac) [5]. LiP es una hemo peroxidasa que posee un alto potencial redox para la oxidación de estructuras no fenólicas las cuales constituyen el 90% de la lignina, además de la capacidad de oxidar un amplio rango de compuestos aromáticos y compuestos fenólicos utilizando como cosustrato (H_2O_2) [6], [7].

Si bien estos catalizadores naturales son sostenibles, selectivos y eficientes, no están perfectamente adaptados para las aplicaciones industriales. Para promover su uso en estos procesos, además de mantener su estabilidad y capacidad de reúso, emerge la inmovilización enzimática como una tecnología clave [8]. La inmovilización enzimática se presenta cuando una enzima está covalentemente unida o adsorbida sobre la superficie de un soporte insoluble[9]. Los nanomateriales pueden servir como un excelente material de soporte para la inmovilización de enzimas debido a que ofrece una gran área superficial, resistencia a la transferencia de masa y carga efectiva de la enzima, así como el posible aumento en la estabilidad térmica y amplía su rango de operación de pH [10].

Un importante requisito para la inmovilización de proteínas es que la matriz debe proporcionar una biocompatibilidad y un ambiente inerte, esto quiere decir que no debe interferir con la estructura original de la proteína, lo que podría comprometer su actividad biológica [11]. Entre las diversas nanoestructuras, los nanotubos de carbono (CNT's por sus siglas en inglés) se han reconocido como un buen soporte biomolecular, siendo unos andamios prometedores para péptidos, proteínas y enzimas [8][9] [12].

Los CNT's han sido objeto de numerosas investigaciones debido a su estructura única, alta conductividad eléctrica, estabilidad mecánicas y térmica, gran área superficial externa de 50 a 500 m^2g^{-1} , tolerancia contra al efecto de envenenamiento, la posibilidad de cambiar su composición química mediante dopaje, flexibilidad de funcionalización de superficies y cambio de hidrofobicidad, pH, propiedades como aceptor-donador de electrones y propiedades químicas específicas sobre la superficie, mayor resistencia a los cambios por efecto hidrolítico en comparación a otros materiales de soporte como la sílice, que los convierten en un material muy atractivo para varias aplicaciones en la ciencia y medicina [13] [14][15][16].

El actual proyecto tiene por objetivo desarrollar un pretratamiento enzimático de la biomasa lignocelulósica de *Opuntia ficus-indica*, a través de la inmovilización covalente de la enzima Lignina Peroxidasa (LiP), utilizando una enzima comercial

pura, y nanotubos de carbono multicapa (MWCNT por sus siglas en inglés) funcionalizados como soporte. También se evaluarán los efectos de esta inmovilización en la degradación de la lignina en muestras de nopal. Considerando las ventajas de la inmovilización enzimática, nos permitirá aumentar la estabilidad, recuperación y reusó de las enzimas, y además su aplicación en otros procesos biológicos.

1 Nanotubos de Carbono

1.1 Enlace entre Carbonos

El carbono es el sexto elemento de la tabla periódica y tiene el menor número atómico de cualquier elemento del grupo IV de la tabla periódica. Cada átomo de carbono tiene seis electrones los cuales ocupan los orbitales atómicos $1s^2$, $2s^2$ y $2p^2$. El orbital $1s^2$ contiene dos electrones fuertemente unidos al núcleo, y cuatro electrones más están débilmente ocupando los orbitales de valencia $2s$, $2px$, $2py$, y $2pz$ los cuales son de importancia en la formación de enlaces covalentes en los materiales de carbono. Debido a que la diferencia de energía entre los niveles superiores $2p$ y el nivel inferior $2s$ en el carbono es pequeña, estos cuatro electrones con capaces de mezclarse uno con otro, por lo tanto, cambian su ubicación de $2s$ y 3 orbitales atómicos $2p$ para combinarse con sus átomos vecinos, originando la hibridación sp^n con $n=1,2,3$ [17].

Existen varias formas alotrópicas de carbono conocidas en la naturaleza. Los alotropos de carbono difieren con base a la forma de enlace de los átomos con cada uno y el arreglo entre ellos dentro de la estructura (Figura 1). Como la forma de los alotropos varia, estos también tienen diferentes propiedades físicas y químicas [18].

El diamante y el grafito son considerados como dos formas naturales cristalinas del carbono puro. En un diamante, los átomos de carbono presentan una hibridación sp^3 , en la cual cuatro enlaces están orientados hacia las esquinas de un tetraedro regular. La red tridimensional resultante (diamante) es extremadamente rígida, esta es una razón de su dureza. En el grafito, ocurre una hibridación sp^2 , en la cual cada átomo está conectado con tres carbonos (120°) en el plano xy , y un enlace π está

presente en eje z. La hibridación sp^2 forma una red hexagonal (forma de panal) [17][19].

Existen otras formas de carbono que contienen proporciones variables enlaces de átomos de carbono sp^2 y sp^3 . El carbono amorfo es formado cuando un material que contiene carbono es incinerado sin suficiente oxígeno para ser quemado completamente. Este hollín negro es conocido como negro de humo, gas negro o canal negro y puede de hecho, contener otras impurezas elementales. El carbono amorfo en general no es considerado como forma alotrópica de carbono porque su estructura esta pobremente definida [18].

Los fullerenos pueden ser considerados como una estructura de carbono cerrada y unidimensional. Los fullerenos junto con los CNT's son considerados formas alotrópicas puras (sin terminaciones de hidrógeno). Tratados con presiones hidrostáticas (a un nivel de 25 GPa) pueden convertirse en formas alotrópicas de carbono duras y transparentes [18].

La estructura de un CNT es similar al del grafito (Figura 1), con la diferencia que las hojas forman un tubo. En un caso ideal, un nanotubo de carbono consiste tanto de una película cilíndrica de grafito (nanotubo de carbono de capa simple) o varias redes de cilindros (nanotubos de carbono multicapa) con un espacio entre películas de 0.34 a 0.36 nm, cercano al espacio atómico típico del grafito. Los enlaces C-C tienen una longitud de 0.14 nm, los cuales son menores que en el diamante, indicando que el material es más fuerte que este último [18] [20].

Las propiedades de los nanotubos pueden cambiar dependiendo de los diferentes tipos de nanotubos (definidos por el diámetro, longitud, y ángulo quiral) y la calidad (definida por la concentración de defectos)[18].

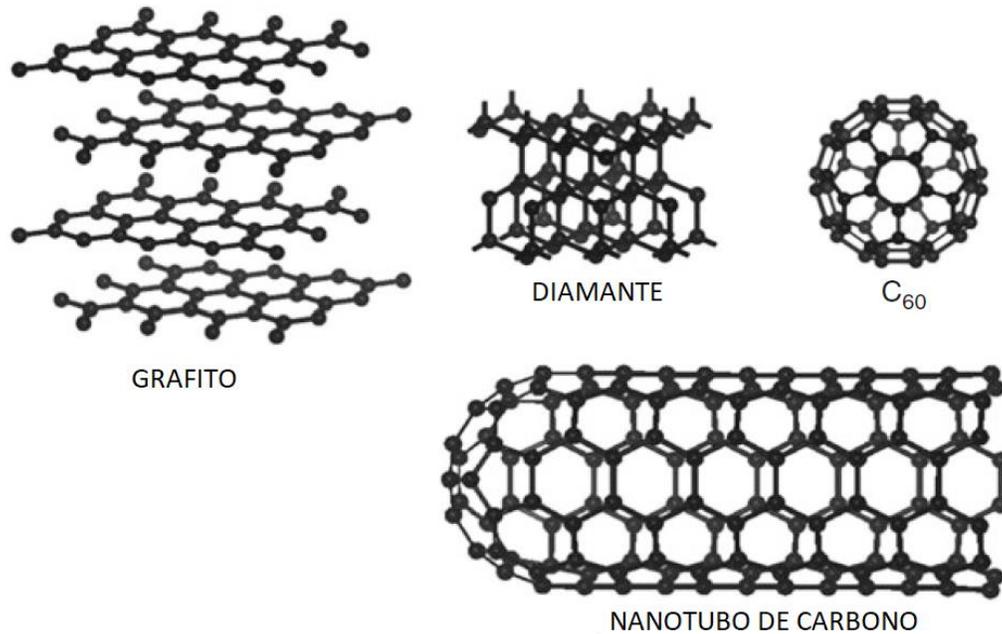


Figura 1. *Formas Alotrópicas del Carbono [18].*

El enrollado de la red hexagonal puede efectuarse en diferentes formas. La hoja puede ser enrollada a lo largo de uno de los ejes simétricos, produciendo tantos tubos en zigzag o en forma de sillón. También es posible que el enrollado de la hoja en una dirección difiere del eje simétrico, entonces un nanotubo quiral puede ser obtenido. Además del ángulo quiral, la circunferencia del cilindro puede también variar. Considerando el enrollado de la hoja como punto de partida del átomo a (0,0) del átomo (n,m), los tubos pueden ser clasificados utilizando el par de enteros (Figura 2), el vector (n,m) especifica la orientación a lo ancho, registrando el número de paso a lo largo de las direcciones de a y b [20].

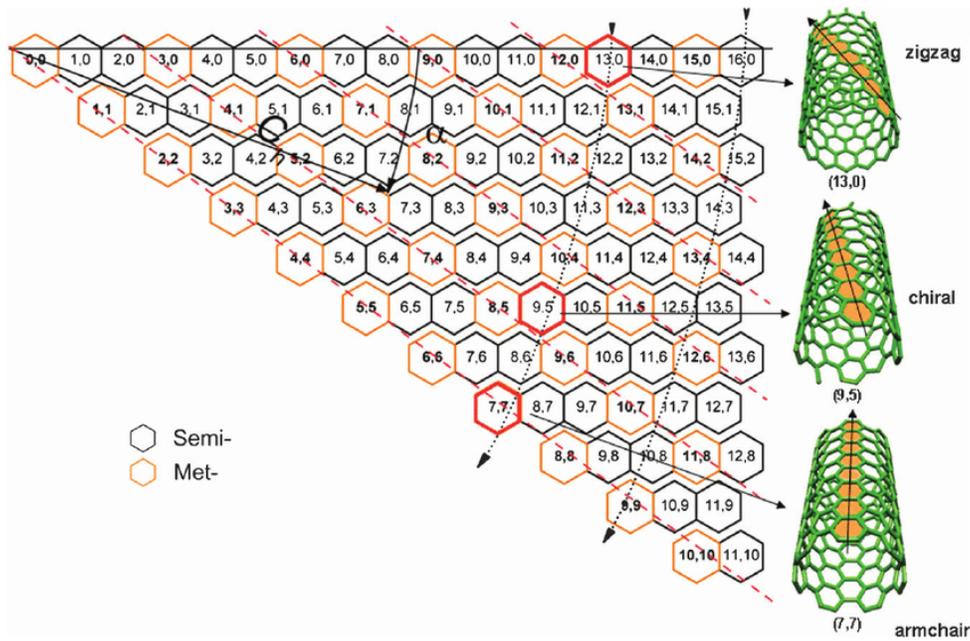


Figura 2. La red de carbono y las formas en que puede enrollarse el tubo en zigzag, sillón o quiral [21].

El vector quiral C determinado por dos enteros (n,m) es ubicado desde el primero átomo hacia el segundo y está definido por la relación:

$$C = na_1 + ma_2$$

Donde: n y m son enteros, a_1 y a_2 son los vectores unitarios de red bidimensional formado por las películas de grafeno. La dirección de los ejes en los CNT es perpendicular a este vector quiral. Por ejemplo; para producir un CNT con los índices $(6,3)$, la hoja esta enrollada en el átomo nivelado $(0,0)$ esta superpuesta sobre el nivel uno $(6,3)$.

La longitud del vector quiral C es la circunferencia de los CNT y está dada por la relación correspondiente

$$c = |C| = a\sqrt{(n^2 + nm + m^2)}$$

Donde el valor de a es la longitud del vector de unidad de la celda a_1 o a_2 . La longitud a esta relacionada con la longitud del enlace carbono-carbono a_{cc} por la relación:

$$a = |a_1| = |a_2| = a_{cc}\sqrt{3}$$

Para el grafito, la longitud del enlace carbono-carbono es $a_{cc} = 0.1421$ nm. El mismo valor es a veces utilizado para los CNT's. Pero debido a la curvatura del tubo el valor es ligeramente mayor tal como $a_{cc}=0.144$ nm.

Utilizando una longitud de circunferencia c , el diámetro del CNT esta dado por la relación:

$$d = c/\pi$$

El ángulo entre el vector quiral y en nanotubo con eje en zig-zag es el ángulo quiral θ . Con los enteros n y m introducidos con anterioridad, este ángulo puede ser definido como:

$$\theta = \tan^{-1} (m\sqrt{3} / (m + 2n))$$

Los nanotubos de carbono están solo descritos por un par de enteros (n,m) los cuales están relacionados con el vector quiral. Como puede observarse en la Figura 2 estos tres tipos de CNT's son revelados con estos valores:

$m= 0$ para los tubos en zig-zag ($\theta =30^\circ$);

$n = m$ para todos los tubos en forma de silla y ($\theta =0^\circ$);

De otra forma, cuando $n=m$ son llamados tubos quiral y ($0^\circ < \theta < 30^\circ$).

El valor de (n,m) determina la quiralidad de los CNT's y afecta las propiedades ópticas, mecánicas y electrónicas. CNT's con $|n-m| = 3$ son tubos metálicos como en $(10,10)$, y aquellos con $|n-m| = 3i \pm 1$ los tubos son semiconductores como en $(10,0)$, (i es un entero)[22].

2 Clasificación de Nanotubos de Carbono

Los dos principales tipos de CNT son los nanotubos de capa simple (SWCNT) y de capa múltiple (MWCNT)[17][22], pero existe otros tipos raros tales como fullerita, nanotorus, nanobrotes y nanonudos [22][23].

2.1 Nanotubos de Capa simple

Un nanotubo de carbono de capa simple (SWCNT) (Figura 3) está formado por una capa simple de grafito enrollado (llamado película de grafeno), generalmente tiene una relación longitud/radio cercano a 1000 y puede ser considerados una estructura casi unidimensional. La mayoría de los SWCNT tienen un diámetro cercano a 1 nm. Más detalladamente un SWCNT consiste en dos regiones separadas con diferentes propiedades físicas y químicas. La primera es el pared del tubo y la segunda es la tapa terminal del tubo[22].

2.2 Nanotubos de Carbono Multicapa

Los nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs) (Figura 3) consiste en un arreglo coaxial de SWCNTs concéntricos (consiste en varias películas de grafito enrollados en sí mismos formando un tubo) con diferentes diámetros. La longitud y diámetro de estas estructuras difieren en mucho de los SWCNTs y, por su puesto sus propiedades también [22]. La distancia inter película en los MWCNT es cercana a la distancia entre las películas de grafeno en el grafito, aproximadamente 3.3 Å [17][22]. El resumen de las principales características de ambos CNT's se presenta en la Tabla 1.

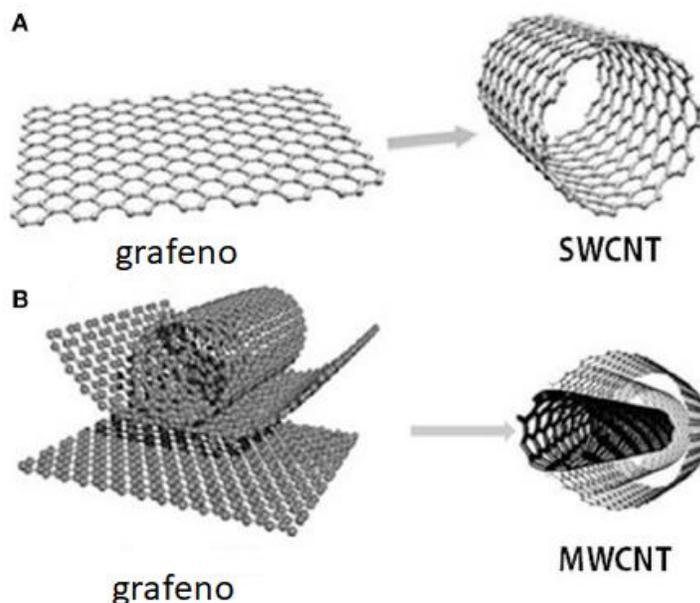


Figura 3. Representación de SWCNT (superior) y MWCNT (inferior) [24].

Tabla 1. Comparación entre los SWCNT y MWCNT [25][26][27].

SWCNT	MWCNT
Una sola capa de grafeno	Capas múltiples de grafeno
Catalizador es requerido para la síntesis	Puede ser producido sin catalizador
La síntesis a granel es difícil ya que requiere control apropiado sobre el crecimiento y condiciones atmosféricas	Fácil síntesis a granel
No es totalmente disperso, y forma estructuras abultadas	Dispersiones homogéneas sin aparente formación de aglomerados
La resistividad usualmente se encuentra en un rango de 10^{-4} a $10^{-3} \Omega \cdot m$.	Resistividad usualmente en un rango de 1.8×10^{-5} – $6.1 \times 10^{-5} \Omega \cdot m$
Pureza es baja. Comúnmente el contenido de SWCNT en muestras preparada por método CVD es cercana a un 30-50 %. Sin embargo, una pureza por encima del 80% ha sido reportada por síntesis del método de arco descarga	Pureza alta. El contenido de MWCNT en muestras preparadas por método CVD está entre 35-90% peso.
Una posibilidad de defecto es posible durante la funcionalización	La posibilidad de defectos es menor especialmente cuando se sintetizan por método de arco descarga
La caracterización y la evaluación es fácil	Tienen una estructura muy compleja
Puede fácilmente torcerse y doblarse	No puede torcerse fácilmente
Porosidad (cm^3/g) Microporosa	Porosidad (cm^3/g) Mesoporosa
Diámetro 0.5-2 (1-1.5) nm	Diámetro 5-200 (10-40) nm
Módulo de Young ~ 1 TPa	Módulo de Young ~ 1 -1.2 TPa
Fuerza de tensión ~ 60 GPa	Fuerza de tensión ~ 0.15 TPa
Conductividad Térmica ~1750 – 5800 W/mK	Conductividad Térmica >3000 W/mK

3 Técnicas de síntesis

Existen varias técnicas utilizadas para el crecimiento de los CNT's. Los tres métodos populares son arco descarga, ablación laser y deposición química de vapor (CVD por sus siglas en inglés). La característica en común de estas técnicas es proveer energía a la fuente de carbono para la creación de átomos de carbono que generan los CNT's. La fuente de energía es una corriente en arco descarga, alta intensidad de luz de un láser en ablación por láser y calor de un horno en CVD [23].

3.1 Arco descarga

El método de arco descarga es el primer procedimiento establecido para la producción de CNT's [28], pertenece a los métodos que utiliza altas temperaturas (por encima de los 1700°C) para su síntesis, comúnmente resulta en el crecimiento de CNT's con pocos defectos estructurales en comparación con otras técnicas. Inicialmente este método fue utilizado para la preparación de fullerenos C60, pero durante la producción de estos se observó el crecimiento de CNT's [23].

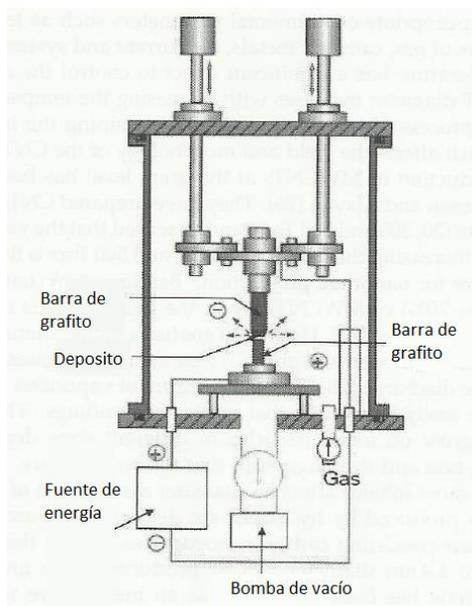


Figura 4. Esquema del equipo de Arco Descarga [23].

El equipo de arco descarga consiste en un horno, una cámara de vacío de acero inoxidable, electrodos de grafito, trampa de agua fría y fuente de alimentación de alto voltaje (Figura 4) [23]. Comúnmente, el método de arco descarga utiliza el arco de vaporización de dos electrodos de carbono ubicado a una distancia pequeña uno del otro, ~1-2 mm en una cavidad llena de gas inerte a baja presión o líquidos. La alta temperatura de los electrodos facilita el rompimiento del medio (gas o líquido) que llena la cámara. El medio de ionización resulta en la forma de plasma entre los electrodos. La temperatura alta del ánodo sublima el carbono y lo evapora. Los gases de carbono se mueven a lo largo del gradiente de temperatura hacia el cátodo relativamente frío, condensándose en carbono líquido y posteriormente se cristaliza, formando una deposición en forma de barra sobre el cátodo, compuesto por CNT's.

Uno de los factores que afectan el crecimiento de los CNT's es el catalizador. Experimentalmente se ha demostrado que la presencia de un catalizador metálico favorece el crecimiento de SWCNTs, más que para el caso de los MWCNTs, donde el tamaño del catalizador determina el diámetro de distribución. Tanto el Ni como el Fe pueden ayudar a incrementar la producción y la calidad de los SWCNTs [28]. Si los electrodos de grafito son dopados con catalizador metálico (Fe, Co, etc.) y utilizados como ánodo con un cátodo de grafito puro, los SWCNT son generados en forma de hollín. Los MWCNTs son encontrados sobre la superficie e incluso dentro del cátodo [23].

El resultado de la descarga, incluyendo la distribución del diámetro y la formación de aglomerados de CNT's, dependen de la temperatura y la uniformidad del arco del plasma. La distribución del diámetro de los CNT's está determinada con la densidad del vapor del carbono en plasma. Por otra parte, la presión del gas inerte determina la estructura del producto de carbono. Por ejemplo, a una presión de 1000 torr, son producidos los *onions* de carbono, mientras la caída de presión a 500 torr permite la formación de nanotubos. Además, a una presión de 100 y 20 torr el resultado son fullerenos y producción de grafito amorfo, correspondientemente [29].

3.2 Ablactación laser

En 1996, Smalley y colaboradores produjeron grandes cantidades de SWCNT's (>70%) por ablación laser (vaporización) de barras de grafito con pequeñas cantidades de Ni y Co a 1100 - 1200°C, los nanotubos mostraron una uniformidad remarcada en diámetros formando manojos de 5-20 nm en diámetro y con decenas hasta cientos de micrómetros de largo. Los NTC's mostraron ser metálicos con base a la formación de tubo (10,10) como componente dominante. Los átomos metálicos deben tener una electronegatividad alta para prevenir la formación de fullerenos y deben ser altamente efectivos para el crecimiento de nanotubos [20] [30].

El sistema de síntesis consiste de un horno, un tubo de reactor de cuarzo y una fuente de rayo láser [18]. Las condiciones de crecimiento pueden ser mantenidas sobre un gran volumen y por más tiempo. Este esquema provee una vaporización

más uniforme y mejor control en las condiciones de crecimiento. El rango de los nanotubos puede ser controlado por variación de la temperatura de reacción. Un flujo de gas argón o nitrógeno barre los nanotubos del horno hacia el colector de cobre enfriado con agua ubicado justo fuera del horno (Figura 5). La desventaja de este método es que requiere de láseres caros [20].

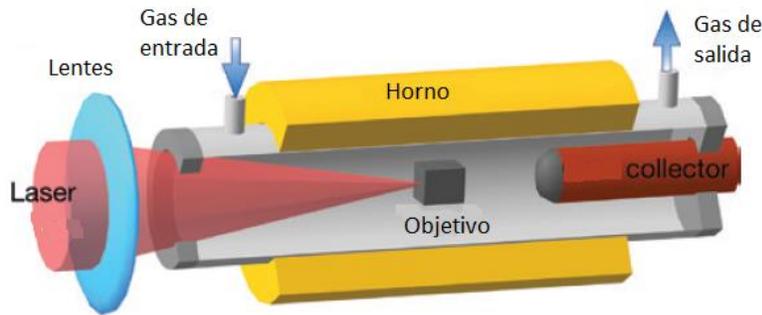


Figura 5. Esquema de equipo de ablación laser [28].

El catalizador es esencial en la formación del nanotubo para prevenir la formación de fullerenos por el ataque adicional de partículas de carbono. Un solo átomo o grupo de átomos adsorben las moléculas de carbono transformándolos en hojas de grafeno enrollados hasta que una cantidad suficiente de catalizador se acumula al final del nanotubo. Esto resulta en un tubo con una tapa de fullereno o átomo de catalizador al final del nanotubo. La mayoría de las aplicaciones utilizan los catalizadores Ni, Fe y Co y sus mezclas en una relación 1:1, donde los catalizadores bimetálicos presentan una productividad mayor. La aplicación de otras partículas catalíticas, por ejemplo, platino, azufre, molibdeno o itrio, no ha demostrado una buena producción y calidad de CNT's [28].

3.3 Deposición de vapor químico (CVD)

El método más común actualmente aceptado en la síntesis de CNT's es el método de deposición de vapor químico (CVD por sus siglas en inglés) debido a su simplicidad y bajo costo. Este método fue originalmente desarrollado en 1960s - 1970s y ha sido exitosamente utilizado en la producción de fibras de carbono y

nanofibras de carbono. En 1996 el CVD surge como método potencial para producción y síntesis a gran escala de los CNT's [26].

Este método involucra la pirolisis de hidrocarburos (acetileno, etileno, propileno, metano, benceno, tolueno, etc.), u otra fuente de carbono (polímeros y monóxido de carbono). La evaporación de un hidrocarburo sólido puede ser realizado convenientemente en otro horno a una baja temperatura antes de entrar al horno de reacción a una alta temperatura. El material catalítico puede sólido, líquido o gaseoso y puede ser colocado dentro del horno o alimentado continuamente desde el exterior. Las especies de carbono descompuestas se disuelven en las nanopartículas metálicas, pero debido a una solubilidad finita del carbono en las partículas metálicas, la sobresaturación será alcanzada seguida de la precipitación de carbono en forma de un domo de fullereno en la punta del cilindro de carbono.

El proceso de CVD está basado en uso de una fuente de energía (por ejemplo, un horno con un calentador de resistencia o inductivo (Figura 6), filamento caliente o lámpara infrarroja, para descomponer los gases precursores y calentar la muestra (nucleación CNT y crecimiento). En el CVD térmico, el calor del horno es responsable de la descomposición de los gases precursores además de afectar la función catalítica del sustrato. Otros sistemas de configuración tales como CVD acoplado a plasma (PECVD por sus siglas en inglés) utiliza plasma como auxiliar en la descomposición del gas, que a veces permiten el crecimiento de los CNT a bajas temperaturas que puede producir defectos en la estructura de los nanotubos [31].

Los principales parámetros para el crecimiento de CNT's en el CVD son la atmósfera, la fuente de carbono, el catalizador y la temperatura de crecimiento. A baja temperatura (300-800 °C) produce MWCNT's, mientras que altas temperaturas (600-1150°C) la reacción favorece el crecimiento de SWCNT's [26].

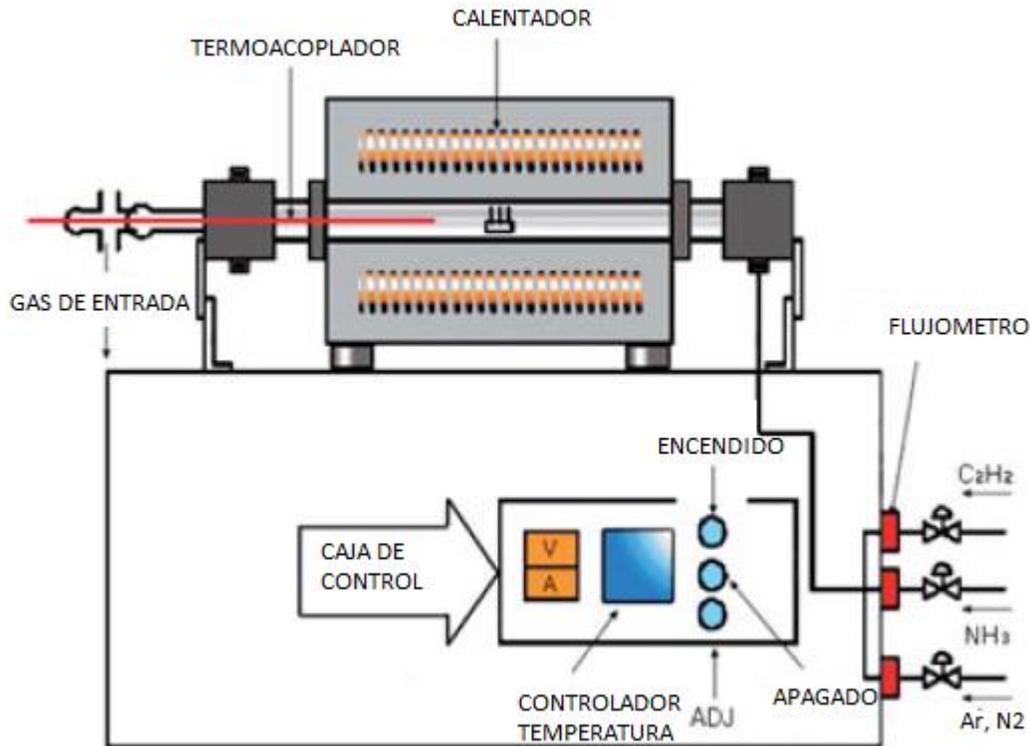


Figura 6. Diagrama esquemático del equipo térmico de CVD [31].

El método de CVD utiliza una mezcla de hidrocarburo y gas de proceso (nitrógeno, hidrógeno o amoníaco), el cual reacciona en la cámara sobre un sustrato por un periodo usualmente entre 15-60 minutos [26] [28], calentando el reactor a un rango de temperatura para la síntesis es de 500-1200°C. Un sustrato es cubierto con partículas metálicas catalíticas, tales como Fe, Ni, Co u otra combinación, la impregnación del sustrato con el catalizador permite el crecimiento de CNT's en una posición particular. Después de la reacción el catalizador permanece en la punta o raíz del CNT's producido [18].

Actualmente hay dos mecanismos de crecimiento de los CNT's, VLS (vapor-líquido-sólido) y VSS (vapor-sólido-sólido). En el mecanismo VLS primero el gas hidrocarburo se adsorbe y disocia sobre la superficie de la partícula del catalizador para formar átomos de carbono elemental, posteriormente los átomos de carbono se disuelven en las nanopartículas del catalizador para formar un carburo líquido metaestable y después se difunden dentro de la partícula. Por último, el carbono

sólido se precipita al final de la partícula para formar el nanotubo. En el mecanismo VSS el gas de hidrocarburo primero se disocia y posteriormente los átomos de carbono disociado se difunden sobre la partícula del catalizador y finalmente el carbono precipita en la formación del nanotubo de carbono [26].

El uso del método CVD presenta muchas ventajas en comparación con la técnica de arco descarga y ablación laser, a continuación se resumen algunas ventajas[32]:

1. El CVD es relativamente una tecnología flexible y sin complicaciones, en la cual se pueden aplicar muchas variaciones, el proceso de reacción y el diseño del reactor es simple, además de ser de fácil control y manipulación.
2. La materia prima está disponible fácil y abundantemente en forma de gases.
3. Con el CVD, es posible cubrir casi cualquier forma y tamaño de CNT's
4. A diferencia de otras películas delgadas, las técnicas como la deposición de CVD pueden ser utilizados también para producir, nanotubos alineados verticalmente, fibras, monolitos, espumas y polvos.
5. El CVD es económicamente competitivo.

4 Mecanismos de crecimiento

Existen dos mecanismos básicos propuestos para el crecimiento de los nanotubos por el método de CVD relacionado con el catalizador ligado al sustrato (Figura 7) que son ampliamente reconocidos.

En la difusión superior de carbono a través de partícula catalítica (modelo de crecimiento de punta). La descomposición de la fuente de carbono sobre la superficie expuesta del metal catalítico resulta en la formación de especies de hidrógeno y carbono. El carbono se disuelve en la partícula y se difunde a través de esta hasta precipitarse al final en la forma de filamentos de grafeno. La partícula catalítica se sitúa siempre en la parte superior del crecimiento del nanotubo.

La difusión inferior de carbono a través de la partícula catalítica (modelo de crecimiento de base). En este modelo la partícula catalítica permanece en el sustrato de crecimiento. La especie de carbono se disuelve en la partícula y difunde a través de esta hasta que precipita en la superficie de la partícula metálica en la

forma de filamentos de grafeno. La difusión del carbono depende de las dimensiones de las partículas, las características del metal utilizado como catalizador, la temperatura de los hidrocarburos y los gases involucrados en el proceso.

Cuando la interacción sustrato-catalizador es fuerte, los NTC's crecen arriba de la partícula catalítica enraizado en su base (modelo de crecimiento base). Cuando la interacción es débil, la partícula catalítica es levantada por el crecimiento del nanotubo y continua para promover el crecimiento de NTC en su punta (modelo de crecimiento de punta). La formación de SWCNT o MWCNT está gobernada por el tamaño de la partícula catalítica. Si el tamaño de la particular es de algunos nanómetros, se forman SWCNT, si las partículas de algunas decenas de nanómetros se ven favorecidos los MWCNT [18].

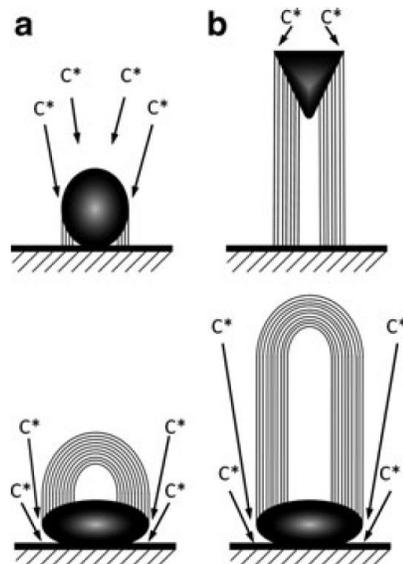


Figura 7. Diagrama esquemático de mecanismos de crecimiento a) disolución de partícula metálica, b) precipitación del carbono en forma de filamento[18].

5 Catalizadores

Los catalizadores usados en la producción de CNT's son usualmente metales de transición, tales como Fe, Co, Ni, Mo u otras mezclas de estos metales[33][34]. Los catalizadores son generalmente soportados sobre materiales inorgánicos porosos, tales como Al_2O_3 , SiO_2 , MgO , CaCO_3 y zeolitas [33] [35].

Para un eficiente crecimiento de los NTC's, la interacción catalizador-substrato debe ser investigado con extremo cuidado. La reacción metal-sustrato (formación de enlaces químicos) podría detener el comportamiento catalítico del metal. El sustrato del material, su morfología superficial y las propiedades de la textura afectan considerablemente la producción y la calidad de los NTC's resultantes. En consecuencia, el estado químico y la estructura del sustrato son más importantes que el metal catalizador [36].

En estudios recientes de NTC's utilizando diferentes catalizadores metálicos (Fe, Co, Ni) por separado. Se encontró que el hierro tiene un efecto altamente catalítico en la descomposición de los hidrocarburos produciendo depósitos grandes de NTC's con baja grafitización. Por otra parte, el catalizador de cobalto resulto en un mejor grafitizado de los NTC's pero la producción fue baja. Por lo tanto, la mezcla de dos metales presenta ventajas adicionales debido a que los NTC's pueden crecer en un punto fusión menor 550°C, esto es debido a que el punto de fusión de la mezcla de Fe y Co es mejor que sus puntos de fusión por separado. Además, las aleaciones son conocidas por ser mejores catalizadores que los metales puros[36].

Ha sido establecido experimentalmente que los metales de transición son necesarios para el crecimiento de SWCNT's pero no son necesarios para MWCNT's. Este hecho sugiere diferentes mecanismos de crecimiento para ambos casos [30]. Elementos débilmente activos o no activos son frecuentemente mezclados como co-catalizadores, notablemente previenen o controlan el engrosamiento del catalizador. Incluyen Mo y Mg mezclados con Fe o Co [34].

El tamaño de las nanopartículas del catalizador determina el diámetro final del nanotubo, por lo que se hace necesario el control de este parámetro. El uso de un sustrato de crecimiento o soporte de catalizador está basado en dos razones. La primera es que, para algunas aplicaciones es deseable cubrir directamente en una superficie particular con los nanotubos. La segunda, para una producción a gran escala de nanotubos, es deseable anclar el catalizador metálico firmemente al soporte para impedir la formación de grandes agrupaciones de catalizador. Grandes cantidades de agrupaciones son el resultado de sinterización/coalescencia de las

partículas de catalizador metálico debido a la alta movilidad superficial de los átomos de metal y sus fuertes fuerzas cohesivas. A una temperatura de crecimiento entre 500 a 900°C, estas partículas metálicas tienen suficiente movilidad para coalescer en grandes partículas. Este efecto es especialmente indeseable si la estructuras de un diámetro particular o pequeño son requeridas[37].

En los estudios de Fonseca et al.[38] se muestran algunos parámetros para la selección del catalizador para la producción de nanotubos. Estos parámetros incluyen: la naturaleza del catalizador, el método de preparación del catalizador, el tamaño de poro del soporte, la concentración del catalizador, el tamaño y diámetro de nanopartículas, la cantidad de partículas de catalizador activas, la interacción entre el soporte-metales, la forma de las nanopartículas, la cantidad inicial de catalizador, el punto de fusión, la adición de un promotor. En la Tabla 2 se muestran algunos catalizadores utilizados y sus características en la producción de CNT.

Tabla 2. *Catalizadores comúnmente utilizados en la producción de CNT [39].*

Catalizador	Comentarios	Propiedades
Fe, Co, Ni	Más comunes; Fe tiene alta actividad catalítica, pero los CNT depositados tendrán baja grafitización. Comparando el Fe y Ni: Ni es más eficiente y muestra mayor actividad a bajar temperaturas, 500-600 °C. Además de estos catalizadores, Co es menos común debido a su baja actividad. Sus actividades siguen el orden: Fe>Ni>Co, pero su desarrollo de crecimiento es Ni > Co > Fe.	Dependiendo de otros factores, tales como sustrato o temperatura, y método de preparación, los resultados pueden ser MWCNT o SWCNT, en sustratos Fe sobre SiO ₂ o alúmina resulta en MWCNT.
Bimetálicos Fe/Co, Ni/Co y Fe/Mo	CNT pueden crecer a temperaturas más bajas; en aleaciones Fe/Mo crecen exitosamente SWCNT.	Fe/Mo y Ni/Co produce MWCNT, Co/Mo sobre cuarzo produce SWCNT.
Elementos de metales de transición comunes y no	Actúan de la misma forma que los metales de transición, sin embargo, no actúan tan eficientemente. Producen SWCNT. Cu y Pb han	Actúan de la misma forma que los metales de transición. Obteniendo SWCNT y MWCNT.

comunes tales como Zr, Rh, Ru, Cd, W	mostrado ser superior para el crecimiento de CNT sobre sustratos de silicón y cuarzo, sin contaminaciones metálicas	
Au, Ag, Pt, Pd, Rh, Os	Los metales nobles tales como Au, Ag no proveen resultados en términos de la conversión del metano en la descomposición catalítica del mismo.	A temperaturas donde el modelo VSL (vapor-líquido-sólido) se espera sea válido, estos exhiben una baja solubilidad de y la formación de carburos.
Semiconductores tales como Si o Ge	Nanopartículas deben ser calentadas en la presencia de aire antes del proceso por CVD; el crecimiento de CNT toma lugar solo cuando el oxígeno está presente	Además de los catalizadores no metálicos para la producción CNT, SiC es el más comúnmente utilizado es uno de los primeros en explorarse. Las primeras investigaciones incluyen la temperatura de recocido (>1500°C) de SiC y fue utilizado por Kusunoki et. al., para la producción de SWCNT.
Introducción del promotor en catalizador bimetalico, por ejemplo: Cu actúa como promotor en Ni-Al ₂ O ₃ o la adición Pd cuando un catalizador metálico	Aumenta la capacidad del carbono, prolongado la vida del catalizador	Una traza de haluro como un promotor en un catalizador de sulfuro de hierro, se obtienen resultados comparables en estructura integral perfecta de nanotubos de carbono de doble capa; DWCNT han sido sintetizados en gran cantidad; Mo y W puede trabajar como promotores para mejorar la tasa de producción DWCNT.

6 Precursores de Carbono para Nanotubos

Una gran cantidad de moléculas conteniendo carbono pueden ser utilizadas como fuente de carbono para el crecimiento de CNT's: hidrocarburos (gaseoso o líquido), alcoholes, compuestos aromáticos o incluso fuentes de recursos naturales de carbono, hay que recordar que los precursores gaseosos de carbono no solo contienen carbono sino también otros elementos tales como hidrógeno y/u oxígeno.

Sin embargo, la producción de moléculas de hidrógeno y oxígeno tales como H_2 y H_2O pueden impactar la formación de CNT's [34].

Los investigadores han utilizados varios tipos de fuentes de carbono para el crecimiento de CNT's por CVD y los más comúnmente utilizados son metano, acetileno, etanol, benceno, etileno, xileno, monóxido de carbono (Figura 8), isobutano y etanol [26][34][33]. Además de otros compuestos orgánicos, particularmente polímeros, carbonización de poliacrilonitrilo, polifurfurilalcohol y aminodiclorostriazina han sido exitosamente utilizados para el crecimiento de CNT's. Algunas fuentes naturales para la síntesis de CNT son el alcanfor, aceite de trementina, aceite de eucalipto, aceite de castor, aceite de coco y palma[26].

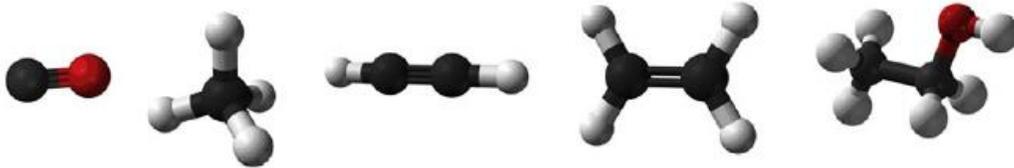


Figura 8. *Precursores de carbono comúnmente utilizados: monóxido de carbono, metano, acetileno, etileno y etano de izquierda a derecha (negro: carbono, rojo: oxígeno, blanco: hidrógeno) [34].*

La estructura molecular de la fuente carbono está fuertemente relacionada con la morfología de los CNT's producidos y una apropiada selección del precursor de CNT y su presión de vapor, tanto la tasa de crecimiento de los CNT's y la vida del catalizador puede ser incrementada. Los hidrocarburos lineales tales como metano, etileno, acetileno, etc., producen CNT's rectos debido a su descomposición térmica en carbonos atómicos o dímeros/trímeros lineales, mientras los hidrocarburos cíclicos como el benceno, xileno, fullereno, ciclohexano, etc., producen CNT's relativamente curvos teniendo paredes puenteadas en el interior. Temperaturas bajas en CVD produce MWCNT's, por otro lado altas temperaturas producen SWCNT's [26].

La estabilidad termodinámica es una característica importante de un precursor, la Figura 9 muestra la energía estándar de Gibbs de formación para diferentes

precursores de carbono en función de la temperatura en una aproximación de Ellingham. Excepto para el metano, todos los precursores se descomponen exotérmicamente. Se observó que el metano es más estable que el grafito a temperaturas menores a 600-700°C. A presión atmosférica, el acetileno, etileno y etanol son menos estables que el grafito en todas las temperaturas, mientras que el monóxido de carbono es más estable que el grafito a temperaturas superiores a aproximadamente 700°C. Es importante recordar que los equilibrios de conversión y las temperaturas de inversión variarían con las presiones parciales de las especies de gases involucrados [34].

Los SWCNT's tiene una energía de formación alta en comparación MWCNT's debido a sus pequeños diámetros. Por lo que en la mayoría de los hidrocarburos se favorece el crecimiento de MWCNT's en comparación con Los SWCNT's, donde SWCNT's crecen en hidrocarburos seleccionados con una estabilidad razonable en temperaturas altas como el metano, el monóxido de carbono, etc. Por otro lado las fuentes eficientes de carbono para MWCNT's (benceno, acetileno, etc.) son inestables a altas temperaturas y por lo tanto conducen a la deposición de grandes cantidades de compuestos carbonáceos en lugar de nanotubos [26].

La pirolisis del metano requiere altas temperaturas para convertirlo en termodinámicamente disponible. Su conversión en compuestos orgánicos superiores está termodinámicamente restringido: experimentalmente, los productos de la descomposición del metano son carbono simple y dihidrógeno. Si se combina con el oxígeno puede formar otros compuestos tales como CO_2 , CO , C_2H_4 y C_2H_6 . En sentido contrario, la descomposición de acetileno, etileno y etanol es termodinámicamente disponible a todas las temperaturas y ocurre fácilmente proporcionando una activación adecuada.

Debido a su alta energía de formación de Gibbs, estos compuestos pueden descomponerse en carbono, dihidrógeno y una gran variedad de compuestos orgánicos volátiles e hidrocarburos poliaromáticos. La reacción es altamente exotérmica, la reacción de equilibrio cambia hacia los reactivos cuando se aumenta la temperatura. Cuando el número de moléculas gaseosas disminuye en la reacción

Boudouard, la conversión de equilibrio también aumenta con el aumento de presión[34].

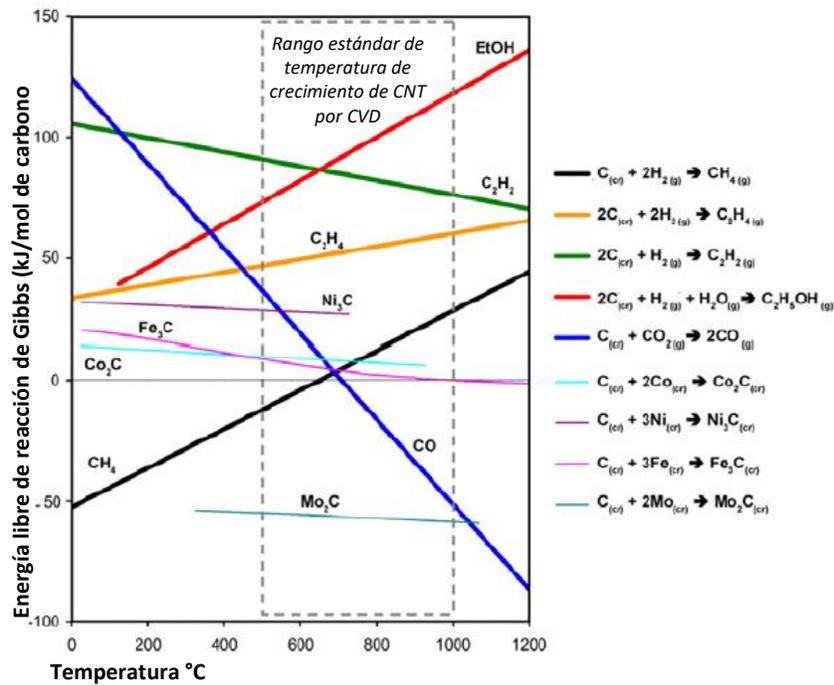


Figura 9. Energía libre de Gibbs de reacción por mol de carbono para la formación de carburos metálicos y materia prima. “cr” y “g” respectivamente en estado cristalino y gaseoso [34].

7 Purificación y Funcionalización de NTC

Todos los NTC's sintetizados por método de CVD contiene impurezas tales como; carbón amorfo, grafito, nanopartículas y catalizador metálico, la presencia de estas impurezas pueden afectar significativamente sus características reduciendo severamente las propiedades mecánicas y eléctricas [19]. Además, debido a las fuertes interacciones intermoleculares de Van der Waals entre los nanotubos, se promueve la formación de agregados lo que reduce su aplicación por su baja dispersión en solventes o polímeros[40].

Durante la purificación de los NTC's se promueve la reducción de la concentración de catalizador residual de los materiales de crecimiento, la apertura de las puntas por la eliminación de fullerenos y mayor área superficial. Se han realizado muchos

esfuerzos para desarrollar las técnicas de purificación, algunos resultados están resumidos en la Tabla 3. Estos métodos se aplican solos o la combinación de estas.

Tabla 3. Características de varios procesos de purificación de NTC's [19].

Proceso	Descripción
Oxidación fase gaseosa	<p>En general, la oxidación química incluye gases en fase de oxidativa (uso de aire, O₂, Cl₂, H₂O, etc).</p> <p>Los tubos son calentados a 330°C una tasa controlada en aire húmedo, vacío u otro agente oxidante por un tiempo amplio.</p> <p>Esta es una buena forma de remover las impurezas carbonáceas.</p> <p>Las desventajas de este método es que a veces las terminaciones de los NTC's son abiertas, cortadas, y la estructura superficial dañada e introduce grupos funcionales oxigenados (-OH, -C=O, -COOH). Las partículas metálicas no pueden ser removidas directamente, y un tratamiento ácido posterior es necesario.</p>
Fase de oxidación líquida (tratamiento ácido)	<p>Usualmente, el tratamiento ácido removerá el catalizador metálico y algunos fullerenos. Se aplica una digestión en HNO₃, HCl, u otros ácidos por un periodo de tiempo entre 4 a 48 horas. El catalizador metálico es solvatado mientras los NTC's permanecen en forma suspendida.</p>
Oxidación electroquímica	<p>Los NTC's con pocos defectos muestran mayor resistencia a la oxidación electroquímica en comparación con los que contienen más defectos. Adecuado para la purificación de arreglos de NTC sin la destrucción de sus alineaciones.</p> <p>El electrodo de NTC es inmerso en solución de HNO₃ 0.2 M (purgando con N₂ por 20 minutos antes de su uso) y el potencial es ciclado entre +1.00 t 2.00 V en una tasa de escaneo de 50 mV/s.</p> <p>Aumenta el área específica de los nanotubos cortando las puntas de los nanotubos y convirtiendo las propiedades de la superficie del estado hidrofóbico a un estado hidrofílico</p>
Centrifugación	<p>La centrifugación de 7,000 mg o más por 30 min a 3 horas. A veces el sobrenadante es removido posterior a la centrifugación y se repite el proceso.</p> <p>Esto remueve nanoesferas, nanopartículas metálicas, otras partículas de carbono, pero algunos métodos producen baja producción de nanotubos, especialmente cuando la centrifugación es repetida varias veces.</p>

Filtración	<p>Esta técnica es a veces utilizada en conjunto con la oxidación. Los productos de la descomposición ácida son altamente solubles en soluciones básicas y los NTC no y por lo tanto son separados utilizando soluciones básicas en un pH de 11 utilizando filtros de 3-5 μm, a veces bajo vacío.</p> <p>Este procedimiento remueve nanoesferas, nanopartículas metálicas, carbonos poliatómicos y fullerenos sin notar efectos negativos.</p>
Ultrasonificación	<p>Los NTC son suspendidos en agua destilada, tolueno o soluciones ácidas y sonicados por 5-30 minutos.</p> <p>Estos separan los tubos de partículas unidas, creando dispersión de los nanotubos y otras partículas. La separación de las partículas es altamente dependiente de los surfactantes, solventes y reactivos utilizados. Los solventes influyen la estabilidad de los tubos dispersos en el sistema.</p>
Magnética	<p>Los NTC son suspendidos en jabón o tolueno y polvos de nanopartícula (ZrO_2, NHCl_4, CaCO_3, diamante) son adicionados. Estas partículas atacarán los NTC y los harán magnéticos.</p> <p>La pasta es sonicada por 2 horas y subsecuentemente las partículas magnéticas son atrapadas utilizando polos magnéticos permanentes.</p> <p>Esto es aplicado después de un tratamiento químico.</p> <p>Esto remueve materiales catalíticos y pequeñas partículas inorgánicas. No se conocen efectos negativos.</p>
Microondas	<p>Los NTC son sonicados, y diluidos en HNO_3 (u otros ácidos)</p> <p>Se aplican microondas de 100-200W a temperatura menor a 200 $^\circ\text{C}$ por 30 minutos.</p> <p>Las microondas remueven el carbono amorfo, metales, y otras nanopartículas, sin efectos negativos conocidos.</p>

8 Lignocelulosa

La biomasa lignocelulósica está compuesta por los tres biopolímeros más abundantes en la tierra la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, los cuales están asociados unos a otros en una matriz etérea con diferentes grados de composición relativa dependiendo del tipo de biomasa, la especie e incluso la fuente [41]. Los polisacáridos de la celulosa y la hemicelulosa son fermentables posterior a la hidrólisis, convirtiéndolos en materiales atractivos para la producción de papel, etanol y combustibles de siguiente generación. Por otro lado, la lignina representa del 15-30% (peso seco) de las paredes celulares vasculares de las plantas, es un

polímero complejo derivado de una variedad de monómeros aromáticos unidos entre sí por medio de enlaces químicos heterogéneos lo que representa un desafío por sus características estructurales y propiedades químicas que la hacen resistentes a la biodegradación por enzimas y microorganismos [42]. Los procesos para la remoción de la lignina y convertir los materiales celulósicos y hemicelulósicos en productos de valor, a menudo dan lugar a la liberación de sustancias aromáticas que pueden ser inhibitorias para el proceso de conversión microbiano. Sin embargo, existe evidencias que los procesos de bioconversión pueden ayudar a convertir la lignina en productos monoméricos útiles [43].

8.1 Celulosa

Es el principal constituyente de la pared celular de la planta, representando entre el 40-60% en peso. Es un polisacárido lineal de polímero de celobiosa (glucosa disacárido) fuertemente unida por enlaces de β -1, 4 glicosídico. Un número de grupos hidroxílicos están presente en las cadenas de celulosa, que conducen a la formación de enlaces de hidrógeno en las mismas cadenas o en las cadenas vecinas (Figura 10). Las cadenas de celulosa están interconectadas por enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Siendo los enlaces de hidrógeno determinantes para la alta resistencia de la cadena [41]. Las moléculas de celulosa tienen diferentes orientaciones a través de la estructura, conduciendo a diferentes niveles de cristalinidad. Por lo tanto, la celulosa consiste en dos regiones, la amorfa (baja cristalinidad) y cristalina (alta cristalinidad). La cristalinidad de la celulosa puede ser caracterizada por el índice de cristalinidad, entre mayor sea este índice, existe mayor dificultad de degradación. Mientras tanto, las microfibrillas de celulosa están también unidas unas con otras por la hemicelulosa y / o pectina, y cubiertas por la lignina. Esta estructura especializada y complicada proporciona a la celulosa resistencia al ataque biológico y químico [42].

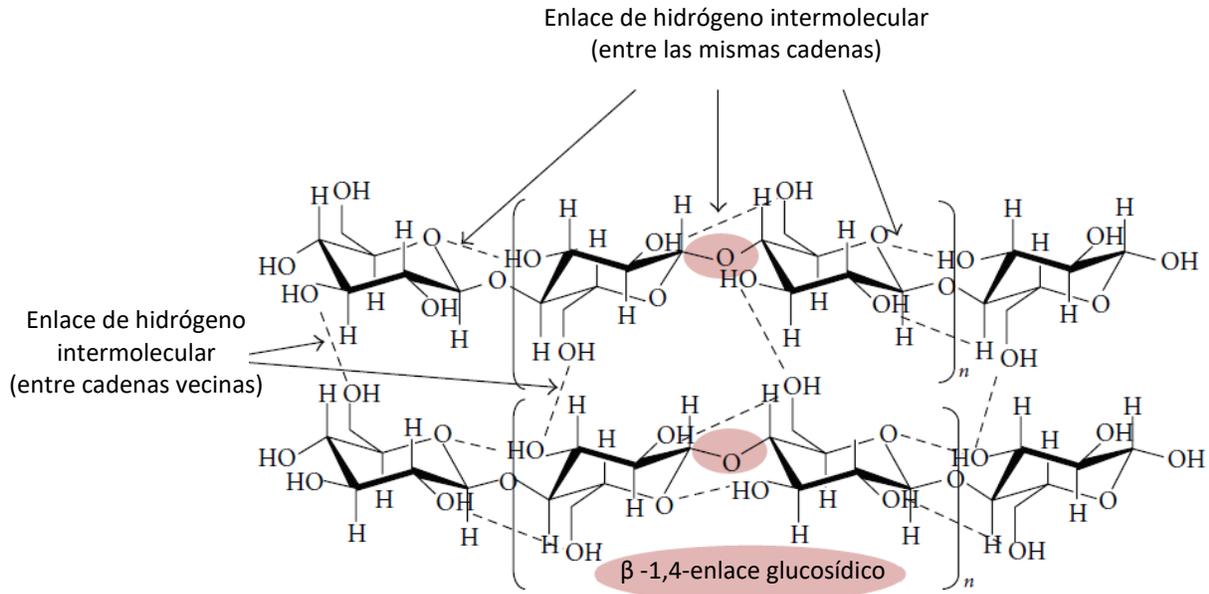


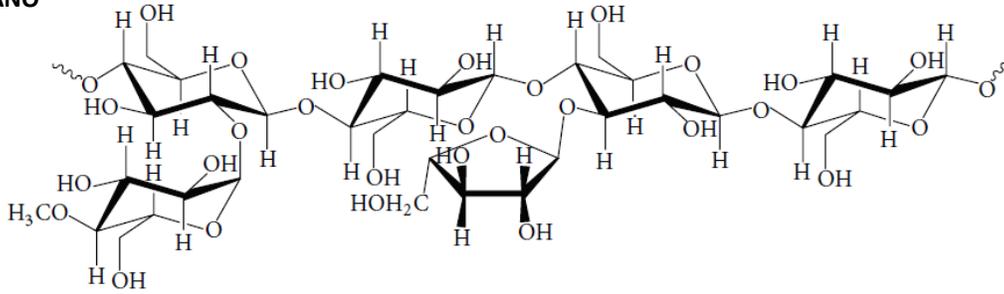
Figura 10. Estructura química de las cadenas de celulosa [44].

8.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es más amorfa, desordenada y formada por polisacáridos heterogéneos ramificados de varias pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa, manosa, y/o ramnosa), y ácidos (ácido glucurónico, ácido metil glucurónico y ácido galacturónico) [42]. Las hemicelulosas difieren en su composición, en la biomasa agrícola tal como paja y pastos están compuestas principalmente de xilano mientras que las hemicelulosas suaves contienen principalmente glucomanano (Figura 11)[41].

Cadenas cortas y ramificadas de hemicelulosas ayuda a construir una red con las microfibrillas de celulosa y la interacción con lignina, formado una matriz extremada rígida de celulosa-hemicelulosa-lignina. Las propiedades amorfas y ramificadas hacen a la hemicelulosa altamente susceptible de hidrólisis biológica, térmica y química de sus monómeros. El contenido de humedad, pH y temperatura con parámetros críticos en la hidrólisis termoquímica de la hemicelulosa, con la formación de productos tales como furfural e hidroximetil furfural que reportan la inhibición del proceso de fermentación. [41], [42].

XILANO



GLUCOMANANO

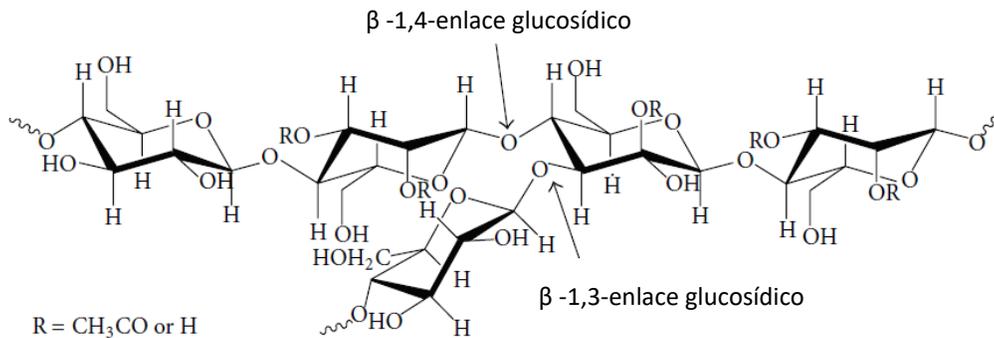


Figura 11. Estructura química de los componentes de la hemicelulosa (xilano y glucomanano) [44].

8.3 Lignina

La lignina descrita por Payen en 1838, y químicamente definida por Schulze en 1865, es una sustancia hidrofílica presente en las paredes celulares de la planta, esta química y físicamente unida a la celulosa y hemicelulosa (Figura 12). La presencia de la lignina en la biomasa lignocelulósica es el principal obstáculo recalcitrante durante el proceso de separación. La unión de estas estructuras dan como resultado un aumento en la impermeabilidad, fuerza mecánica y la rigidez de las paredes celulares, y confiere una mayor resistencia al ataque microbiano, además de jugar un rol crítico en el transporte de agua y nutrientes [45].

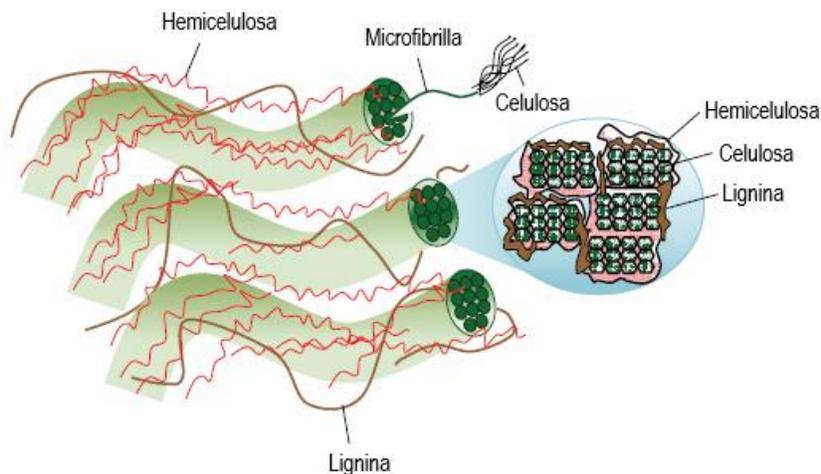


Figura 12. Estructura de moléculas de celulosa incrustadas en matriz de hemicelulosa y lignina [44].

Sin embargo, la distribución de la lignina dentro de las paredes celulares no es uniforme, su concentración en la pared primaria es mayor que en la pared secundaria. No obstante, la mayor cantidad de la lignina está presente en la segunda pared del 75-85 % debido a su considerable volumen. La cantidad de la lignina presente en la planta varía de especie a especie, variando de $20 \pm 4\%$ en maderas duras, y del $28 \pm 3\%$ en maderas suaves y angiospermas, los monocotiledones son los menos lignificados ($15 \pm 4\%$).

Químicamente, la lignina se ve como un complejo polímero fenil propanoide, derivado de tres estructuras monoméricas básicas (monolignoles): alcohol *p*-cumarílico (hidroxifenilo) [**H**], alcohol coniferílico (guaiacil) [**G**] y alcohol sinapílico (siringil) [**S**] (Young Chao Lu, 2020), los cuales varían entre especies y tipo de tejido celular. Las ligninas de maderas duras son predominantemente G y S con unidades traza de H. Las ligninas suaves están compuestas principalmente de unidades G, mientras que las monocotiledonias incorporan cantidades equivalente de G y S junto con grandes cantidades de monolignoles H [46].

A diferencia de otros biopolímeros, los monómeros de la lignina de guaiacil y siringil no están unidos por un solo tipo de enlace químico. Más bien, como monolignoles los radicales se acoplan al polímero en crecimiento, la estructura del enlace

manifestada entre dos unidades de monómero estará caracterizada por uno de los diversos tipos de enlaces típicamente encontrados en la lignina (Figura 13). Resinoles (β - β), 4-O-5 diaril eter, fenilcumaranos (β -5) y de forma más predominante los enlaces β -O-4 aril éter (denominados β -éteres en lo subsecuente), invariablemente los monolignoles se unen en sus posiciones β , los centros quirales son creados por estas posiciones β con cada etapa en el crecimiento de cadena, y con su posición α durante la rearomatización subsecuente. Estas reacciones de acoplamiento no estereoselectivas por lo tanto resultan en enlaces heterogéneos y formando configuraciones esteroquímicamente variables y consecuentemente recalcitrantes biológicamente [43].

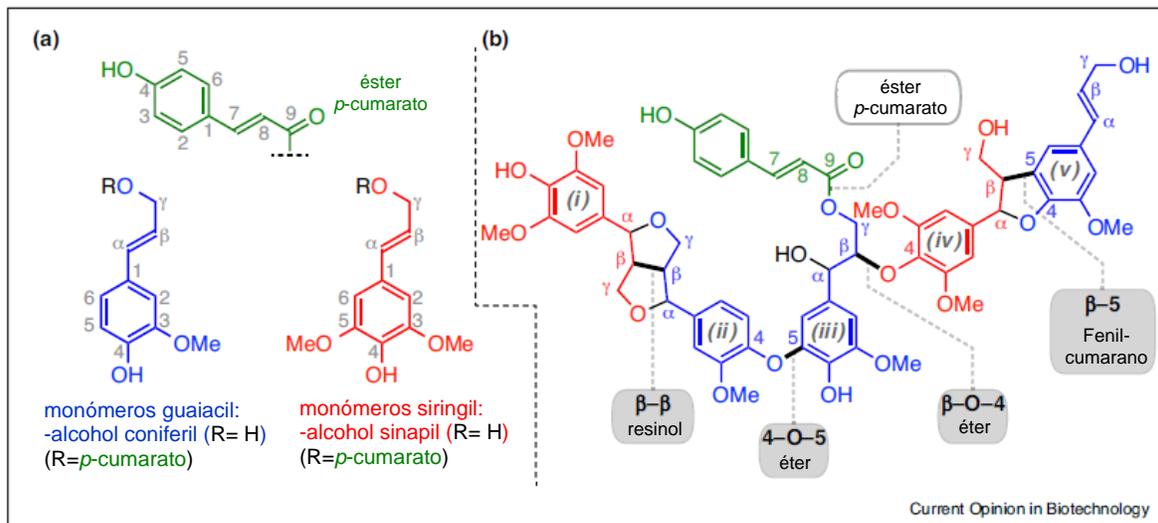


Figura 13. Los componentes de la estructura de la Lignina [43].

9 Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica

Uno de los principales problemas en la aplicación de materiales lignocelulósicos para la producción de biocombustibles es la baja accesibilidad de las enzimas y los microorganismos a la celulosa. Lo anterior es debido a la complejidad y variabilidad de las estructuras químicas, tales como, la cristalinidad de la celulosa, el área superficial accesible, grado de polimerización de la celulosa, presencia de la lignina y hemicelulosa, y grado de acetilación de celulosa.

Por lo tanto, el pretratamiento de la lignocelulosa es un paso crítico para estos materiales, su objetivo es modificar las propiedades recalcitrantes de la lignocelulosa para mejorar la disponibilidad para las enzimas y los microorganismos. Los efectos de las diferentes técnicas de pretratamientos sobre la composición química y las características físicas de la biomasa lignocelulósica son resumidos en la Tabla 4. En general los diferentes métodos de pretratamiento afectan en diferentes grados, sin embargo, todos los métodos han demostrado tener un efecto sobre el área de acceso en la biomasa [42].

Tabla 4. Efecto del pretratamiento sobre la modificación en la composición y la estructura de la biomasa lignocelulósica [42].

Pretratamiento	Aumento en el acceso del área superficial	Decristalización de la celulosa	Solubilidad de la hemicelulosa	Solubilidad de la lignina	Modificación de la estructura de la lignina	Formación de furfural/hidroxi-metilfurfural (HMF)
Mecánico	●	●				
Irradiación	●	○	○			○
Explosión de vapor	●		●	○	●	●
Agua líquida caliente	●	ND	●	○	○	○
Explosión de vapor catalizado	●		●	●/○	●/○	●
Ácido	●		●	○	●	●
Alcalino	●		○	●/○	●	○
Oxidantes	●	ND		●/○	●	○
Líquidos iónicos	●	●	○			
Ácido caliente	●	ND	●			●
Alcalis calientes	●	ND	○	●/○	●	○
Oxidante caliente	●	ND	○	●/○	●	○
Explosión de la fibra de amoniaco	●	●	○	●	●	○
Pretratamiento biológico	●	ND	●	●	●	

●= efecto principal, ○ = menor efecto, ND= no determinado, y blanco= sin efecto.

En los métodos de pretratamiento físicos y químicos, se utiliza una fuerza mecánica, térmica o química para destruir la estructura compacta de la lignocelulosa. Existen prometedores pretratamientos físicos y químicos, pero resultan poco viables debido al alto costo, problemas de corrosión, alta demanda energética y descargas que pueden tener un impacto negativo en el ambiente.

De los pretratamientos, el tratamiento fúngico se ha convertido en un proceso importante debido a su baja demanda de energía, la degradación selectiva de la lignina y huella ambiental mínima, lo que ha generado su interés de estudio y aplicación para la producción de biocombustible en materiales maderables. La principal desventaja del pretratamiento fúngico es la baja tasa de hidrólisis de la biomasa para grandes volúmenes, por lo que la combinación de pretratamiento fúngico con otros métodos de pretratamiento puede reducir el tiempo necesario para la operación de todo el proceso [47].

9.1 Tratamientos físicos

En general, los pretratamientos físicos incluyen métodos mecánicos (moler, astillar, triturar, recortar con cuchillo o tijeras), irradiación con microondas, irradiación ultrasónica de baja frecuencia, explosión de vapor, tratamientos con agua caliente y congelación. Los pretratamientos mecánicos producen una reducción en el tamaño de las partículas entre el 5cm a unos cuantos milímetros los cuales pueden disminuir aún más el grado de cristalinidad de la celulosa y, por lo tanto, un eventual aumento del área superficial y del tamaño de los poros del sustrato, producción de materiales tóxicos durante el pretratamiento mecánico es generalmente mínimo. El molino de bolas y molienda por disco húmedo son dos pretratamientos físicos comunes. La principal desventaja de molienda es el alto requerimiento de energía. El molino de bolas ha reportado producir una alta tasa de glucosa y xilosa posterior de la hidrólisis enzimática.

El pretratamiento por congelación ha sido recientemente estudiado como nuevo método. El principio de este método es que durante el proceso de congelación-descongelación, la capa de hidratación que rodea a las macromoléculas en la célula de la biomasa lignocelulósica podría ser afectada. Lo anterior debido a la formación de cristales durante la congelación también genera una fuerza de ruptura. Esta fuerza rompe la estructura de lignocelulosa[47].

El pretratamiento con irradiación de microondas por periodos cortos es efectivo en la remoción de lignina y hemicelulosa, lo anterior dependerá de la intensidad del microondas, el tiempo de irradiación y la concentración del sustrato [47]. Sin

embargo, los pretratamientos con irradiación ultrasónica y microondas tienen un número de deméritos y esto puede resumirse en térmicos de energía, la producción de posibles ácidos fenólicos inhibitorios como subproductos, procedimientos de operación complejos y monitoreo estricto de los equipos. Por lo que se limita sus aplicaciones comerciales [48].

9.2 Tratamientos Químicos

El uso de ácidos fuertes (HCl, H₂SO₄ y HNO₃), álcalis (NaOH, KOH, Ca(OH)₂, amoníaco e hidracina), solventes orgánicos (benceno, éter, ciclohexano, hexano, etanol y metanol), ozono (O₃), líquidos iónicos (LIs), los métodos de pretratamiento químicos han sido reportados para efectos positivos significantes sobre la estructura original de la biomasa lignocelulósica. Generalmente, los ácidos fuertes no son favorecidos debido a que son más corrosivos y pueden ser costosos. Similarmente, los pretratamientos alcalinos alteran la estructura de la lignina y rompen los enlaces (tales como aril-éter, éster, y enlaces C-C), entre la lignina y otros azúcares o fragmentos de carbohidratos de la biomasa lignocelulósica, por lo que hace que el almidón en la matriz hetera sea abra más. Este método de pretratamiento es un excelente método con biomasa de bajo contenido en lignina como los residuos agrícolas. Los pretratamientos con ozono (O₃) son otra forma de reducir el contenido de lignina y los residuos lignocelulósicos y este tipo de método resulta en un aumento de la digestión *in vitro* de los materiales tratados y no producen residuos tóxicos. Además, los pretratamientos con ácidos pueden ser efectivos cuando se aplican para la remoción de hemicelulosa debido a la ruptura de los enlaces de éter en los complejos de lignina /carbohidratos fenólicos sin disolución de la lignina. Recientemente ciertas sales de líquidos iónicos de imidazol (LIs) son ampliamente utilizados en el fraccionamiento de la biomasa. Generalmente, LIs muestran bajo impacto ambiental debido a su baja volatilidad, baja presión de vapor, poder solvente alto, carácter no tóxico, no inflamable y eco-amigable en contraste con otros solventes orgánicos. Por lo anterior se espera que los LIs reduzcan el costo de los solventes y también puedan ser reciclados. Los LIs pueden realizar una extracción selectiva de la lignina sin alteración de las lignocelulosas mientras que simultáneamente se obtiene una fracción de celulosa altamente degradable [48].

9.3 Pretratamientos biológicos

Actualmente, los pretratamientos biológicos de la biomasa lignocelulósica han sido recibido más y más atención en la investigación por la razón de sus características favorables. El mérito de este proceso son el costo-beneficio, eco-amigables y alta tendencia en la degradación de materiales de la célula de la planta. Una amplia variedad de microorganismos es capaz de degradar la lignina por medio de rutas enzimáticas y/o químicas y hacen la biomasa de planta más disponible a la sacarificación vía las unidades de polisacáridos.

Los microorganismos, incluyendo los hongos de podredumbre blancos, café y suaves, así como algunas bacterias rumiantes, son capaces de degradación de biomasa lignocelulósica. Entre estos, los hongos de podredumbre blancos son los más efectivos para la delignificación debido a sus sistemas ligninolíticos únicos. Algunos hongos tales como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor*, *Cyathus stercoreus*, y *Ceriporiopsis subvermispora*, han sido estudiado para el pretratamiento de un amplio rango de la biomasa.

Los hongos de podredumbre blanca presentan alta selectividad para la degradación de la lignina sobre la celulosa, la degradación es altamente oxidativa y puede incluir oxidantes químicos tales como oxígeno singlete y radical hidroxilo. Las siguientes reacciones están generalmente involucradas: i) oxidativa, ii) desmetilación (o desmetoxilación), iii) oxidación de cadenas laterales, y iv) ruptura de la cadena lateral de propileno. En contraste los hongos de podredumbre café son capaces de esquivar la barrera de la lignina, para remover la hemicelulosa y la celulosa con pequeñas modificaciones de la lignina. En consecuencia, la lignina sigue siendo un componente importante de la pared celular degradada. La lignina restante es desmetilada en grupos arilmetoxi y contiene un mayor número de anillos de grupo hidroxilo [5].

Sin embargo, la tasa de pretratamiento biológico es muy lenta para propósitos industriales. El tiempo de residencia es de 10-14 días, y los requerimientos de condiciones de crecimiento cuidadosas, y se requiere una gran cantidad de espacio para su desarrollo del pretratamiento [41].

10 Tratamientos Enzimáticos y la degradación de la lignina

La degradación de la lignina por basidiomicetes de podredumbre blanca involucra un conjunto de enzimas modificadoras de la lignina (EMLs). La mayoría de las EMLs son secretadas por isoformas múltiples de diversas especies de hongos de podredumbre blanca bajo diversas condiciones. Las EMLs comprenden las fenoloxidasas, la lacasa (Lac, EC 1.10.3.2), y las hemo peroxidasas (peroxidasas clase II con alto potencial de oxidación), tales como la lignina peroxidasa (LiP, EC1.11.1.14), Manganese Peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) y Versátil Peroxidasa (VP, EC 1.11.1.16)[49], [50]. Además de las peroxidasas y las lacasas, los hongos tienen varias enzimas complementarias, incapaces de degradar la lignina por sí solas, pero necesarias para el proceso de degradación de la lignina y/o xenobioticas: incluyendo las oxidasas glioxílicas (GLOX: EC 1.13.) y alcohol oxidasas (AAO: EC 1.1.3.7), las cuales proporcionan peróxido de hidrógeno para reacciones peroxidasas, necesarias para la degradación de la lignina [51].

Las enzimas ligninolíticas extracelulares rompen principalmente varios tipos de enlaces tales como enlace éter β -O-4, enlace bifenol, en compuestos aromáticos se efectúa la oxidación de un electrón para generar un radical catiónico libre. Estos radicales libres pueden sufrir reacciones químicas espontáneas tales como hidroxilación o la división de enlaces C – C resultando en productos hidrofílicos.

Los mecanismos de degradación de las enzimas ligninolíticas son complejas y cuentan con varios cofactores de bajo peso molecular que pueden asistir como mediadores redox. Esta es la ruta multifacética por ejemplo la hidroxilación, oxidación, reducción y metilación de la degradación.

Se ha demostrado que las enzimas ligninolíticas rompen los compuestos de la lignina oxidativamente in vitro. La oxidación por peroxidasa es altamente dependiente del oxígeno como aceptor final de electrones, y el H_2O_2 es usualmente utilizada como fuente de O_2 . Para la oxidación de la lignina por la lacasa, los mediadores químicos, como 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y la N-hidroxi-N-fenilacetamida (NHA), son ampliamente utilizada para la formación de radicales durante la oxidación de las enzimas [5].

10.1 Lacasa

Lacasa (EC 1.10.3.2) es una enzima extracelular clasificada como una multicobre oxidasa, que consiste en glicoproteínas monoméricas, diméricas y tetraméricas, todas muestran una arquitectura similar que consisten en tres arreglos ordenados secuencialmente de una estructura tipo barril β (Figura 14).

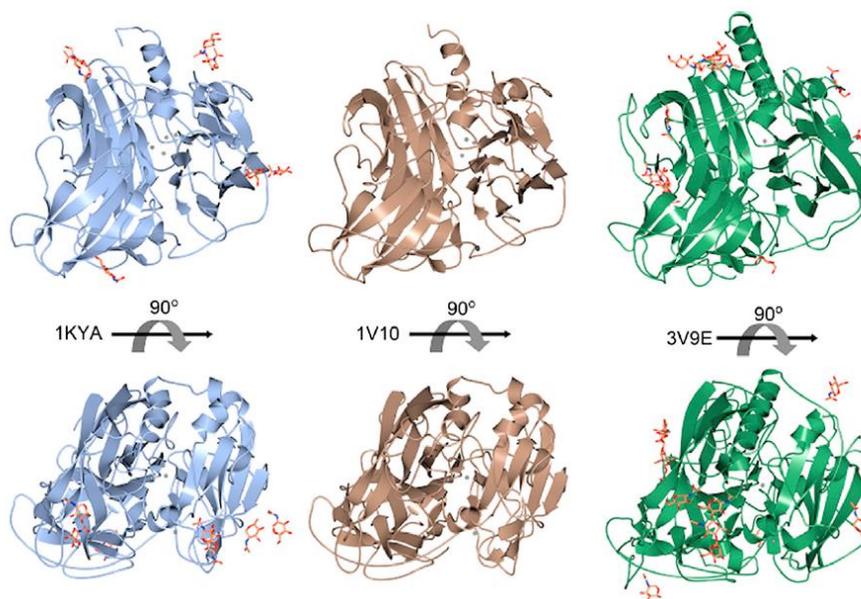


Figura 14. Modelos Ribbon de la lacasa de *Trametes versicolor* (pdbid: 1KYA); *Rigidoporus lignosus* (pdbid: 1V10); y *Botrytis aclada* (pdbid: 3V9E) muestran un patrón de pliegue similar [50].

Las Lacasas están presente principalmente en microorganismos tales como bacterias, hongos y actinomicetes. Se han reportado diferentes isoenzimas con un peso molecular promedio de 50-300 kD [49]. Estas glicoproteínas tienen la habilidad redox de los iones de cobre para catalizar la oxidación de un amplio rango de sustratos aminas y otros sustratos ricos en electrones donde el agua es obtenida como un subproducto a partir de la reducción del oxígeno molecular (Figura 15) [50], [52].

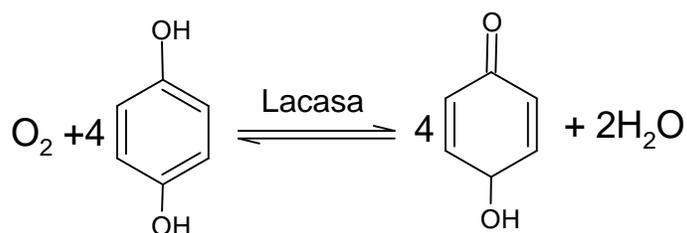


Figura 15. *Reacción general catalizada por lacasa [50].*

La lacasa ataca las subunidades fenólicas de la lignina, conduce a la oxidación de $C\alpha$, la división $C\alpha-C\beta$, y la división aril-alquil. Esta oxidación resulta en un radical libre de oxígeno, que puede convertirse en quinona por una segunda reacción catalizada por enzimas. La quinona y los radicales libres pueden entonces someterse a la polimerización.

La mayoría de las moléculas de las lacasas monoméricas contienen cuatro átomos de cobre en una estructura que pueden clasificarse en tres grupos mediante la espectroscopia de UV/Vis y de resonancia paramagnética de electrones (RPE). El cobre tipo I (T1) es responsable del intenso color azul de las enzimas (con un pico de absorción a 600 nm) y es detectable por EPR. El cobre tipo II (T2) es incoloro, pero es detectable por EPR, y el cobre tipo III (T3) consiste en un par de átomos de cobre que dan una débil absorbancia cerca del espectro UV pero sin señal EPR.

Los sitios de cobre T2 y T3 están ubicados cerca uno del otro y forman un centro trinuclear que está involucrado en el mecanismo catalítico de la enzima. Basándose en las propiedades del cobre tipo T1-T3, las lacasas pueden clasificarse con base en su alto potencial redox (0,6-8,8 V) o bajo (0,4-0,6 V).

10.2 Manganese Peroxidase (MnP)

La enzima manganeso peroxidasa (E.C. 1.11.1.13 Mn^{+2} : H_2O_2 oxidoreductasa) es excretada por microorganismos ligninolíticos en estado sólido y líquido en sus microambientes. Las isoenzimas de MnP tiene masa moleculares promedio de 40-50 kDa, el rango de pH óptimo varia de 4.0 a 7.0 con un pico en 5.5. También se ha encontrado que la enzima MnP es más activa entre 50-60°C, por encima de los

65°C, la enzima pierde rápidamente su actividad [53]. Han sido reportados en varias bacterias, hongos basidiomicetes y algas. La estructura molecular de la enzima MnP tiene dos iones de Ca^{2+} y cinco elementos puente de disulfuro, que son responsables de mantener la estructura del sitio activo de la enzima, como se muestra en la Figura 16. Los microorganismos ligninolíticos tales como los basidiomicetes, hongos de podredumbre blanca y las bacterias oxidan Mn^{2+} en Mn^{3+} en un proceso multietapas [49].

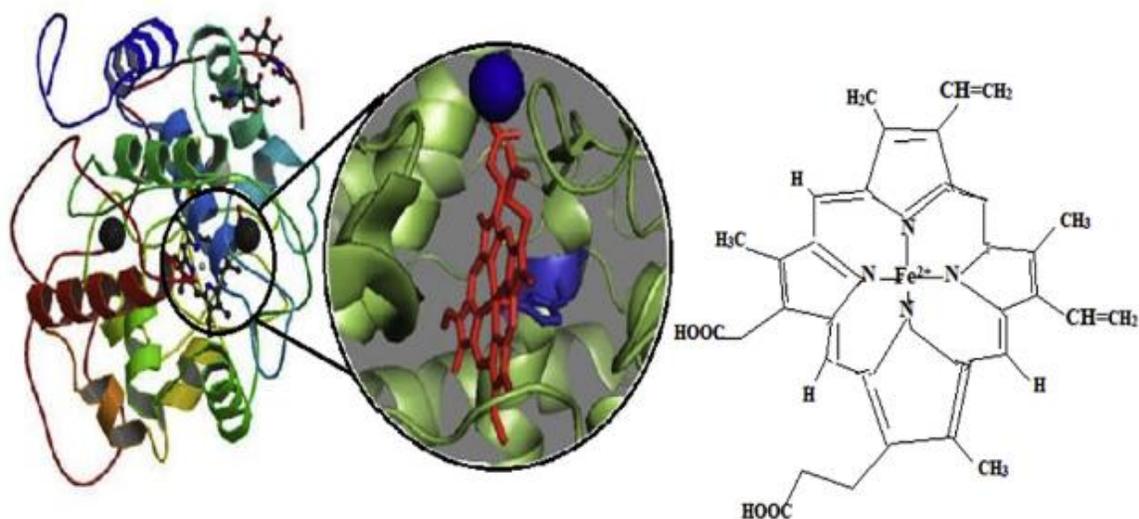


Figura 16. Estructura molecular y sitio activo de MnP [54].

El ciclo catalítico de la MnP es iniciado por H_2O_2 a través de la unión con la enzima férrica sin activar formando un complejo de peróxido de hierro. La ruptura del enlace O – O de la enzima peroxidasa necesita la transferencia de dos electrones de la hemo-porfirina que conduce a la formación de un compuesto intermedio inestable MnP denominado Compuesto I, (Fe^{4+} radical catiónico oxo-porfirina). Consecuentemente, el enlace de dioxígeno es dividido heterolíticamente y una molécula de agua es liberada. Un ion Mn^{2+} quelante es oxidado a Mn^{3+} y actúa como un donador de electrones para esta porfirina para formar un Compuesto II intermedio inestable. La reducción de este Compuesto II intermedio procede en forma similar que el otro Mn^{3+} que es formado a partir del Mn^{2+} que conduce a retorno del estado inactivo de la enzima con la liberación de una segunda molécula de agua, Figura 17.

MnP es en primer lugar considerada como una enzima fenol oxidasa porque Mn^{3+} oxida varios fenoles monorécios y diméricos, incluyendo el modelo de la lignina fenólica. Por lo tanto, un sistema de reacción consistente de MnP de *P. chrysosporium*, malonato de sodio, Mn^{2+} y H_2O_2 cataliza el rompimiento de $C_\alpha-C_\beta$, la oxidación de C_α y alquil-aril de fenoles de siringil tipo β de la estructura de lignina.

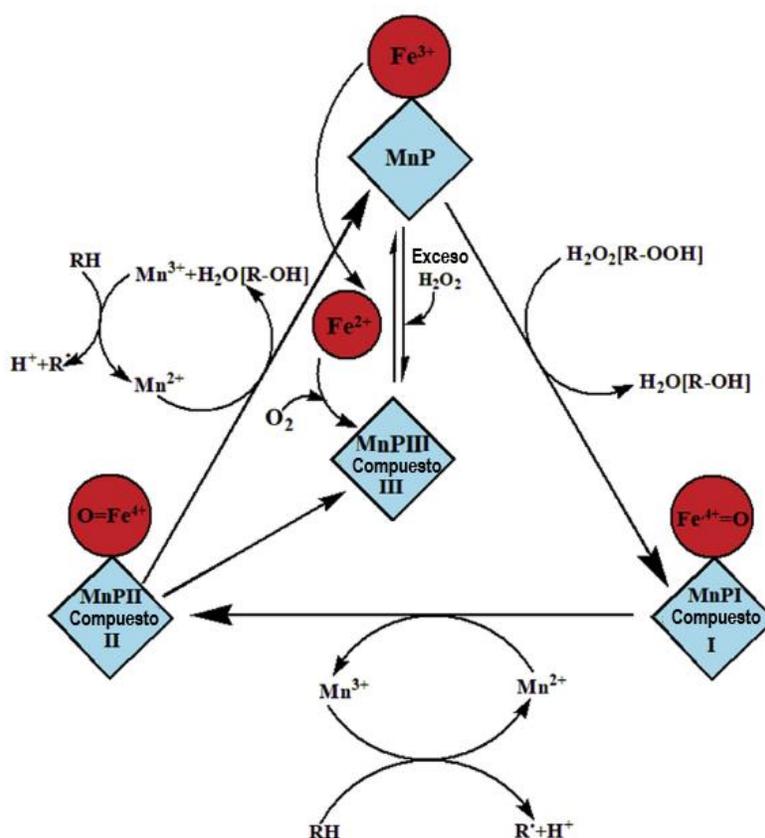


Figura 17. Ciclo catalítico de la MnP (adaptado de [49]).

10.3 Versátil Peroxidasa

La enzima versátil peroxidasa (VP) son un grupo interesante de oxidorreductasas (EC 1.11.1.16; descritas como un Reactivo Negro 5: peróxido oxidorreductasa), esta hemoperoxidasa que realiza una degradación oxidativa de compuestos aromáticos heterogéneos utilizando el peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones.

La enzima VP posee las características catalíticas de la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa en la degradación de los compuestos aromáticos, que la confirma como un híbrido de peroxidasa. Esta enzima tiene una arquitectura

molecular híbrida con las propiedades de la enzima manganeso peroxidasa por la oxidación Mn^{2+} a Mn^{3+} y el alto potencial redox de la enzima lignina peroxidasa.

Esta enzima también exhibe una alta estabilidad entre las peroxidases de basidiomicetes en la oxidación de las unidades de la lignina, mientras que la lignina peroxidasa es inactivada por la alta concentración de compuestos fenólicos. Adicionalmente el manganeso es un cofactor obligatorio para la manganeso peroxidasa mientras que la lacasa y lignina peroxidasa oxidan la estructura no fenólica de la lignina a través de mediadores aromáticos tales como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y alcohol veratrílico respectivamente. La VP supera a la peroxidasa ligninolíticas por su habilidad de oxidar las macromoléculas diméricas de la lignina libre de la presencia de mediadores redox [55].

Estas proteínas son glicoproteínas monoméricas con un peso molecular de aproximadamente 40-50 kDa con cuatro puentes de disulfuro y dos sitios de enlace de calcio, muy característica de las peroxidases vegetales, fúngicas y bacterianas de la clase II.

La VP es única entre las hemo peroxidases por sus sitios activos polivalentes para la oxidación de Mn^{2+} de sustratos de bajo y alto peso molecular. Los elementos estructurales que mantienen esta propiedad revelan que un anillo de hemo porfirina en un espacio central rodeado por dos canales para el acceso por el peróxido de hidrógeno, el activador del complejo enzimático y el ion manganeso. El espacio hemo es estabilizado por dos dominios helicoidales con Ca^{2+} y residuos de histidina básica proximal y distal, Figura 18.

El ciclo catalítico de la enzima versátil peroxidasa para la oxidación de sustratos de bajo potencial redox sigue un mecanismo de oxidación similar a otras hemo peroxidases, pero se destaca por poseer una habilidad adicional para utilizar el manganeso como sustrato. El ciclo catalítico es iniciado por la unión del peróxido de hidrógeno en el espacio hemo central para formar un complejo peróxido de hierro.

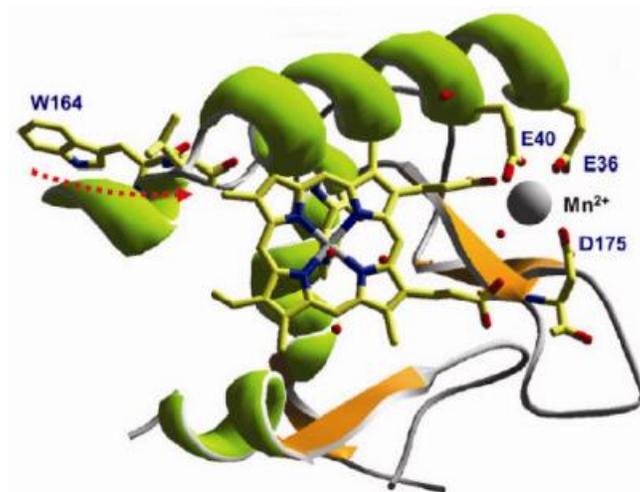


Figura 18. Estructura de espacio hemo de la peroxidasa versátil, en centro de hemoporfirina es indicada en color azul [55].

La enzima en reposo en estado férrico (Fe^{3+}) reacciona con el H_2O_2 o cualquier otro peróxido orgánico en el lado distal del grupo hemo para generar un complejo de un radical de oxoporfirina Fe^{4+} con un hemo activado conocido como compuesto I, un complejo con una deficiencia de dos electrones. El Compuesto I es posteriormente oxidado a partir de dos reacciones consecutivas de un solo electrón, reduciendo los sustratos que producen radicales altamente reactivos y agua.

El primer paso de reducción resulta en la formación de otro intermediario enzimático llamado compuesto II, el cual es finalmente reducido nuevamente a peroxidasa férrica, en la enzima original. Los productos son altamente inestables y pasan por varias reacciones no enzimáticas que dan lugar a la descomposición de enlaces éter, desmetilación, ruptura de anillos aromáticos, la deprotonación e hidroxilación interna para producir productos de descomposición simple (Figura 19).

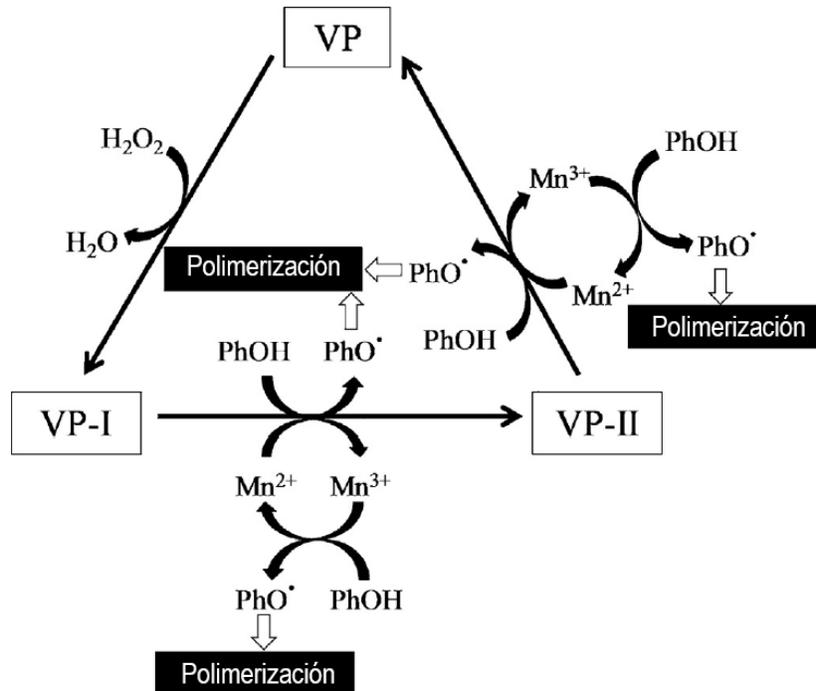


Figura 19. Esquema del ciclo catalítico de la versátil peroxidasa adaptado de Salvachúa et. al. [56].

10.4 Lignina Peroxidasa

Lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), fue descubierta en 1983 en *P. chrysosporium* y posteriormente caracterizada como una ligninasa verdadera por su alto potencial redox. LiP es una glicoproteína monomérica extracelular de 38-46 kDa conteniendo 1 mol de protoporfirina de hierro IX por 1 mol de proteína, contiene 343 residuos de aminoácidos, 370 moléculas de agua, y un grupo hemo, cuatro carbohidratos y dos iones de calcio El hemo esta incrustado en una hendidura entre los dos dominios, pero es accesible desde el solvente a través de dos pequeños canales. La estructura enzimática de la molécula enzimática contiene ocho α -hélices mayores y ocho menores y dos β -hojas anti-paralelas, y está organizada en un dominio proximal y uno distal (Figura 20).

La LiP es dependiente de H₂O₂ para efectuar la catálisis, poseen alto potencial redox (700-1400 mV), un pH optimo entre 3.0 a 4.5, lo cual las hace distintas a otras peroxidases. Tiene la habilidad de catalizar la degradación de un amplio número de

sustratos aromáticos tales como alcohol veratrílico (VA), metoxibencenos y también una variedad de lignina no fenólica también un rango de compuestos orgánicos con un potencial redox arriba de 1.4 V en presencia de H₂O₂ [57] [58].

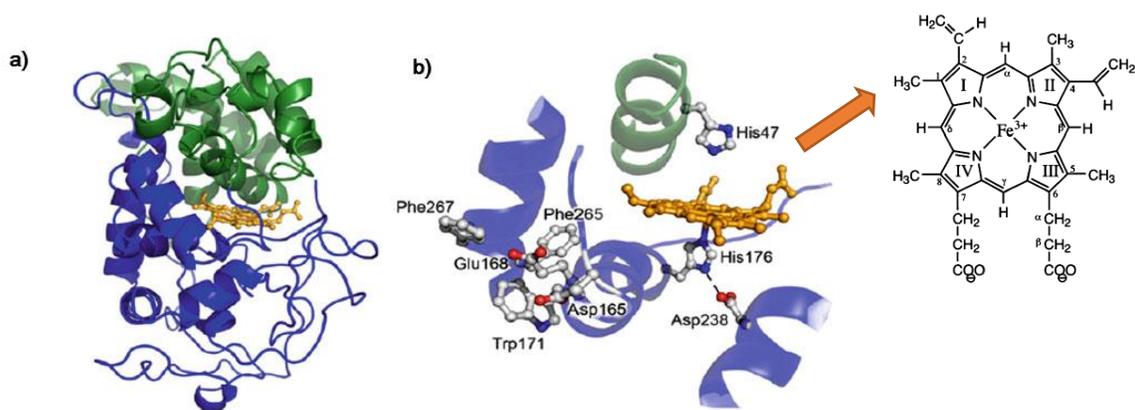


Figura 20. Estructura tridimensional listón de la LiP a) detalle del hemo ambiente, b) entrada ILGA [57][59].

LiPs tienen la habilidad de oxidar un amplio rango de compuestos aromáticos no susceptibles a la acción de las otras peroxidasa incluyendo la lignina y los compuestos análogos de la lignina por mecanismos de oxidación de un electrón bajo la presencia de H₂O₂. Uno de los aspectos más importantes de las LiPs en la degradación de la lignina es que este tipo de enzimas pueden oxidar no solo las unidades fenólicas sino también las no fenólicas, que se comparten con el 90% de la estructura de la lignina.

Las reacciones catalizadas por las LiPs incluyen la división de las cadenas laterales de propileno C α -C β en la lignina y los compuestos del modelo de la lignina Figura 21; la hidroxilación de los grupos metileno bencílicos; la oxidación de los alcoholes bencílicos correspondientes a aldehídos y cetonas; la oxidación de fenoles y cadenas aromáticas de compuestos no fenólicos[60].

La oxidación de la lignina toma lugar vía transferencia de electrón, la ruptura no catalítica de varios enlaces, y la abertura de anillos aromáticos. El ciclo catalítico de las LiPs es similar a las típicas hemo peroxidasa[61], y consisten de un paso de oxidación y dos pasos de reducción (Figura 22).

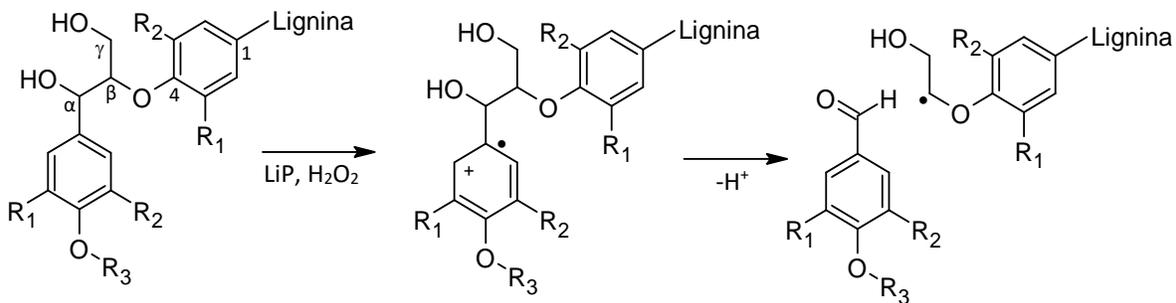


Figura 21. La estructura de β -O-4 de la lignina y la ruta de división de $C_\alpha - C_\beta$ por LiP (Adaptado de Hammel et. al., 2008) [60].

Paso 1. La oxidación de dos electrones de la enzima férrica (nativa) en reposo ([LiP]-Fe(III)) por H_2O_2 para formar el Compuesto I intermedio de oxo-ferrilo [Fe(IV)].

Paso 2. La Reducción del Compuesto I por la reducción del sustrato aromático no fenólico (A) para formar el Compuesto II por la adición de un electrón.

Paso 3. Finalmente, el ciclo de oxidación finaliza cuando el Compuesto II retorna al estado férrico inicial con la ganancia de un electrón más para formar el sustrato reducido A.

En presencia de un exceso de H_2O_2 y la ausencia de un sustrato reducido, el compuesto II intermedio de LiP es también conocido por reaccionar con H_2O_2 para formar una forma catalíticamente inactiva de la enzima, designada como Compuesto III el cual existe como un complejo superoxo-ferrico [Fe(III)O $_2^{\cdot-}$]. El compuesto III puede ser restaurado en la forma de reposo por auto oxidación espontánea o por oxidación con un catión de alcohol veratrílico (VA) mediante el desplazamiento de superóxido del sitio activo [51].

Mientras que las LiPs tienen un ciclo catalítico a las hemo peroxidasas, esta enzima está caracterizada por su habilidad única para oxidar sustratos con alto potencial redox, que permiten la oxidación de los sustratos de la lignina no fenólica. Los análisis de la estructura cristalina de las peroxidasas ligninolíticas revelaron dos

aspectos estructurales importantes que diferencian las ligninas peroxidasa de otras hemo peroxidasa.

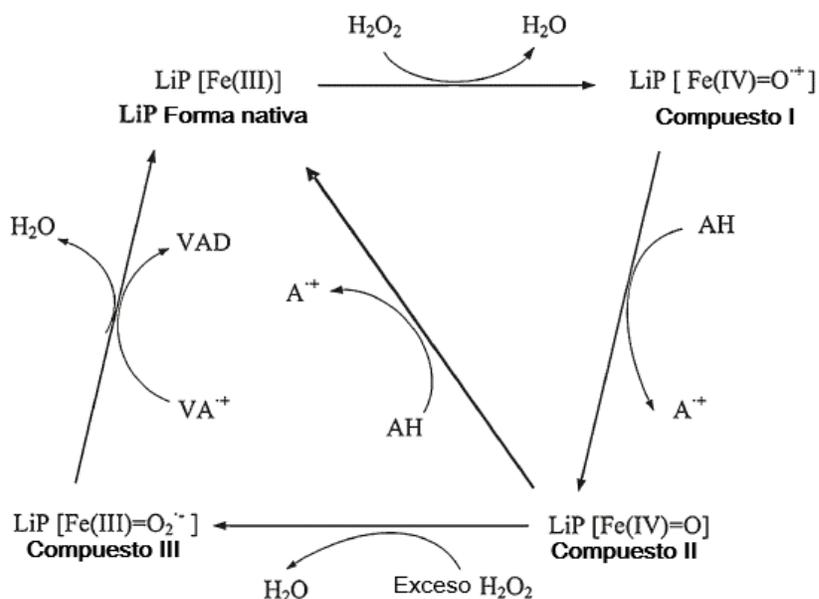


Figura 22. Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa, A es un sustrato donador de electrones (modificado de Wan y Li, 2013) [61].

La primera diferencia fue observada en la estructura molecular alrededor de la región del grupo hemo. En las ligninas peroxidasa el Nε2 de la cadena lateral de un residuo de histidina (la llamada histidina proximal), la cual está localizada fuera del hierro hemo, formando un enlace de hidrógeno significativamente más largo que el formado por otras peroxidasa de redox bajo. La longitud de este enlace de hidrógeno Fe-Nε2 afecta la deficiencia de electrones de hierro y por consiguiente, aumenta el potencial redox del complejo oxo-ferrilo.

La segunda diferencia fue la presencia de sitios de enlace específicos para la oxidación de sustratos específicos, incluyendo los aromáticos no fenólicos. Sobre la superficie de la proteína de la LiP, hay un canal principal que permite tanto al peróxido de hidrógeno y el sustrato reducido acceder al cofactor hemo para la reacción enzimática mediada por LiP. Aunque pequeñas moléculas de sustrato, tales como como pequeños compuestos fenólicos, pueden entrar a la proteína para

la transferencia de electrones directamente al cofactor hemo, un polímero grande de lignina no está habilitada para acceder al canal principal [62].

Por lo tanto, LiPs han desarrollado la habilidad para oxidar estos compuestos sobre la superficie de la proteína utilizando un mecanismo llamado sistema de transferencia de electrones de amplio rango. Estas enzimas utilizan un triptófano expuesto sobre la superficie de la proteína para formar un triptófano-radical libre a través de una reacción con un Hemo Compuesto I, donde ellos pueden directamente interactuar con un polímero de la lignina. Estos substratos son oxidados en la superficie de la enzima, y los electrones son transferidos al hemo a través de los mecanismos de transferencia de electrones de amplio rango [63].

11 Inmovilización Enzimática

Las enzimas encontradas en la naturaleza han sido explotadas en la industria debido a sus propiedades catalíticas inherentes en procesos químicos complejos, condiciones ambientales y experimentales. El objetivo de la industria es a veces difícil de alcanzar utilizando las enzimas en su forma original o nativa. Los desarrollos recientes en la ingeniería de proteínas han revolucionado el desarrollo de enzimas comercialmente disponibles dentro de una catálisis industrial. Las enzimas solubles son a veces inmovilizadas sobre soportes solidos insolubles para ser reutilizadas en un proceso continuo y para facilitar una recuperación económica de la enzima después de la reacción sin la perdida de sus propiedades bioquímicas. La inmovilización confiere considere estabilidad frente a las variaciones de temperatura y solventes orgánicos. La inmovilización en multipuntos o multisubunidades mediante enlaces covalentes de las enzimas sobre soportes apropiadamente funcionalizados por medio de entrecruzantes provee rigidez la estructura de la enzima inmovilizada, obteniendo como resultado una mejor estabilidad de la enzima [64].

Los CNT's han sido utilizados para la inmovilización de enzimas. Los SWCNTs son atractivos por su gran área superficial para la interacción enzimática, pero los MWCNTs son deseables por su fácil dispersibilidad y bajo costo. Las conjugaciones no covalentes y covalentes han sido reportadas para la inmovilización de varias

enzimas. Los enlaces no covalentes preservan las propiedades tanto de los CNT's como de las enzimas, pero la proteína inmovilizada puede ser gradualmente perdida durante el uso del complejo CNT-enzima. La unión covalente provee un enlace duradero, pero la estructura de la enzima puede ser desorganizada. La funcionalización de los CNT's con moléculas orgánicas, poliméricas y biológicas pueden proveer un nanotubo biocompatible con grupos específicos en su superficie, formando compuestos que pueden proveer una base para inmovilización específica de una enzima. No importa el método utilizado, el principal reto es promover la unión estable de las enzimas mientras mantengan su actividad y funcionen como en su estado nativo. La actividad de los complejos CNT-enzima es afectado por la combinación de la química del nanotubo y el método de inmovilización [10].

11.1 Métodos de inmovilización enzimática

Los métodos de inmovilización enzimática pueden dividirse en tres categorías: molécula enzimática unida a un soporte sólido, entrapamiento dentro de una matriz, y entrecruzamiento de moléculas. La unión a un soporte sólido puede ser reversible (adsorción) o irreversible (enlace covalente), y puede ser efectuado utilizando una gran variedad de métodos físicos y químicos. El entrapamiento consiste en la retención de las moléculas de enzima dentro de una matriz polimérica por enlaces covalente o no covalentes. El entrecruzamiento de enzimas emplea reactivos bifuncionales para preparar macropartículas sin portador [65].

11.1.1 Adsorción Física

La inmovilización por adsorción es el método más simple e involucra interacciones no covalente reversibles entre el biocatalizador y el material de soporte. Las fuerzas involucradas son en su mayoría electrostáticas débiles tales como fuerzas de van del Waals, interacciones iónicas y puentes de hidrógeno, aunque los enlaces hidrofóbicos pueden ser significativos (Figura 23). Estas fuerzas son individualmente muy débiles, pero en suficiente grande en número pueden proveer un buen enlace. Por ejemplo, es conocido que las células de levadura tienen una superficie química cargada negativamente así que el uso de un material de soporte cargado positivamente permitirá su inmovilización. La existencia de la química

superficial sobre un biocatalizador y sobre un soporte es utilizada para la adsorción, no es requerida la activamente o modificación del soporte, el daño al biocatalizador es mínimo o nulo.

El procedimiento consiste en el mezclado del biocatalizador y el soporte bajo condiciones adecuadas de pH, fuerza iónica, etc., por un periodo de incubación, seguida de la colección del biocatalizador inmovilizado y un lavado extensivo para la remoción del biocatalizador no enlazado.

La mayor desventaja es la pérdida o desorción del biocatalizador del soporte del material. Esto puede ocurrir bajo circunstancias tales como cambios en el pH, temperatura o fuerza iónica. Algunas veces la desorción de la enzima se efectúa durante la reacción como resultado de la unión con el sustrato, enlace de contaminantes presentes en el sustrato, producción del producto u otra condición que permita el cambio en la conformación (forma molecular) de la enzima adsorbida.

La enzima es unida por la parte externa de un material inerte. Este método es menos usado, como en la adsorción no existe una reacción química, los sitios activos de la enzima inmovilizada puede ser bloqueados por la matriz o cama, reduciendo grandemente la actividad de la enzima.

Las características físicas de los bioreactores tales como tasa de flujo, agitación por burbujeo, abrasión particular-partícula y efecto de limpieza de material particulado sobre las paredes del reactor pueden conducir a la desorción. La desorción puede convertirse en una ventaja si la regeneración del soporte es un régimen operacional para permitir la expulsión rápida de biocatalizador agotado y reemplazarlo por uno nuevo. [66].

Este método de inmovilización involucra la formación de un enlace covalente entre el biocatalizador y el material de soporte. Este enlace es normalmente formado entre grupos funcionales presentes sobre la superficie de un material de soporte y los grupos funcionales sobre residuos de aminoácido de la superficie de una enzima. Un número de grupos funcionales de aminoácidos son adecuados para la participación en la formación del enlace covalente. Los enlaces más involucrados

son el grupo amino (NH_2), el grupo carboxilo (COOH), el grupo hidroxilo (OH) y el grupo límite (SH) (Figura 15).

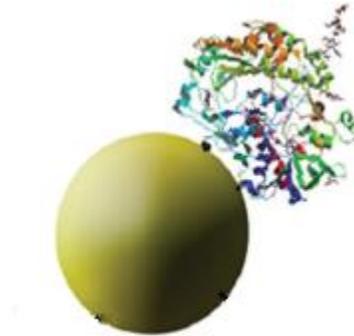


Figura 23. Método de Adsorción Física [67].

11.1.2 Enlace covalente

Existe una gran variedad de materiales de soporte disponible para el enlace covalente y la extensa cantidad de soportes disponibles reflejan que no existe un material de soporte ideal. Por lo tanto, las desventajas y ventajas están dadas por el soporte dado cuando se considera el proceso de un biocatalizador.

Muchos factores pueden influir en la selección de un soporte particular, la hidrofobicidad (atracción al agua) es el factor más importante para mantener la actividad de la enzima en el ambiente de soporte. Consecuentemente, los polisacáridos, los cuales son muy hidrofílicos, son materiales de soporte populares para la inmovilización de enzimas. Por ejemplo, la celulosa, dextrano, almidón y agarosa son a veces utilizados para la inmovilización de la enzima. Los residuos del azúcar en estos polímeros contienen grupos hidroxilos que son adecuados para la activación química para promover la formación de un enlace covalente. Los grupos OH también forman puentes de hidrógeno con las moléculas del agua y por lo tanto crean un ambiente hidrofílico dentro del material de soporte.

Los soportes polisacáridos tienen una debilidad debido a que son susceptibles a la desintegración microbiana y los solventes orgánicos son utilizados en algunos procesos de la reacción y pueden causar encogimiento de los geles polisacáridos. Los materiales de soporte usualmente son usados para formar camas y hay muchos

procedimientos para acoplar una enzima y un soporte en un enlace covalente. Sin embargo, la mayoría de las reacciones caen en las siguientes categorías: formación de un enlace de isourea, formación de enlace diazo, formación de enlace peptídico, una reacción de alquilación (Figura 24).

Es importante elegir un método de reacción que no inactive una enzima por reacción con un residuo de un aminoácido en el sitio activo de la enzima. Además, hay que reconocer que ningún método de inmovilización está restringido a un tipo particular de material de soporte, así que un sin número de permutaciones son posibles.

Básicamente dos pasos están involucrados en el enlace de enzimas en los materiales de soporte. Primero los grupos funcionales sobre el material de soporte son activados por un reactivo químico específico, y segundo, una enzima es adicionada en una reacción de acoplamiento para la formación de un enlace covalente con el material de soporte activado. Normalmente una reacción de activación está diseñada para producir grupos funcionales sobre el soporte fuertemente electrofílicos (deficiencia de electrones).

La reacción de acoplamiento, de estos grupos reaccionaran con los nucleófilos fuertes (donadores de electrones), tales como el grupo amino (NH_2) de ciertos aminoácidos de la superficie de un enzima, para la formación de un enlace

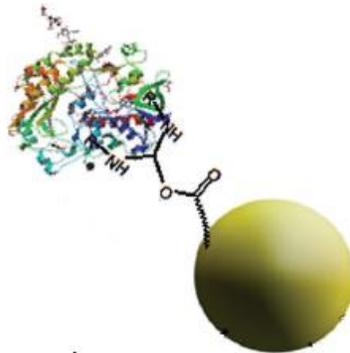


Figura 24. *Inmovilización enzimática covalente [67]*

covalente. Es posible variar las condiciones de acoplamiento permitiendo un enlazamiento de un solo punto o puntos múltiples[66].

11.1.3 Entrampamiento

La inmovilización por entrampamiento difiere de la adsorción y enlace covalente en que las moléculas enzimáticas son libres en solución, pero restringidas al movimiento por la estructura de un gel. La porosidad del gel es controlada para asegurarse que la estructura es suficientemente rígida para prevenir el escape de la enzima o células y al mismo tiempo permitir el libre movimiento del sustrato y el producto (Figura 25). Inevitablemente el soporte actuará como una barrera a la transferencia de masa, y además este puede tener serias implicaciones en la cinética de reacción, puede tener ventajas útiles previniendo el daño de células, proteínas y enzimas con el biocatalizador inmovilizado. Algunos métodos de entrampamiento son:

- Gelación ionotrópica con cationes multivalente (alginato)
- Gelación inducida por temperatura (agarosa, gelatina)
- Polimerización orgánica por reacción química/fotoquímica (poliacrilamida)
- Precipitación a través de solvente inmiscible (poliestireno)

El entrampamiento puede ser alcanzado mezclando una enzima con un polímero poli iónico y un polímero entrecruzante con cationes multivalentes en una reacción de intercambio iónico para la formación de una estructura que atrapa el biocatalizador (gelación ionotrópica). El cambio de la temperatura es un método de simple gelación por transición de fase utilizando soluciones 1-4% de agarosa o gelatina. Sin embargo, los geles formados son suaves e inestables.

Alternativamente, es posible mezclar una enzima con monómeros químicos que posteriormente polimerizan para formar una red de polímero entrecruzante, atrapando la enzima en los espacios intersticiales de la red. El último método es el más ampliamente utilizado y un número de monómeros acrílicos están disponibles para la formación de un copolímero hidrofílico[66].

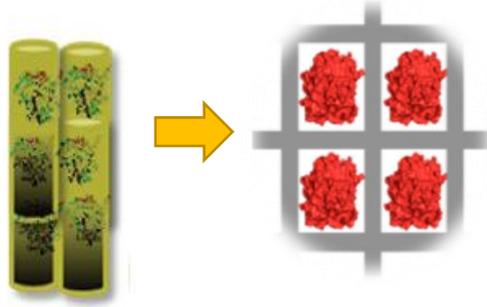


Figura 25. *Inmovilización de entrapamiento enzimático [67][65].*

11.1.4 Encapsulación

La encapsulación de las enzimas y otras células pueden ser realizada envolviendo los componentes biológicos dentro de varias formas de membranas semipermeables (Figura 26). Es similar al entrapamiento en la cual las células/enzimas son libres en solución, pero restringidas en espacio. Grandes proteínas o enzimas no pueden pasar fuera o dentro de la capsula, pero pequeños sustratos y productos pueden pasar libremente a través de la membrana semipermeable. Muchos materiales han sido utilizados para construir microcápsulas variando el diámetro de 10 a 100 μm y membranas de nylon y nitrato de celulosa han sido probadas.

Los problemas asociados con la difusión de los sustratos dentro y productos fuera es la parte complicada y puede resultar en la ruptura de la membrana si los productos de la reacción se acumulan rápidamente. Un problema más puede presentarse si un biocatalizador inmovilizado tiene una densidad similar a la de la solución de la masa y por lo tanto flotara en la solución. Esto puede causar problemas de procesos y puede requerir revaloración de la configuración del reactor y dinámica del flujo[66].

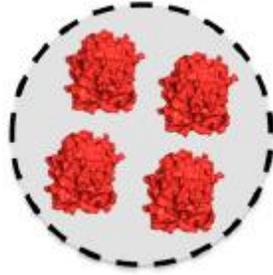


Figura 26. *Inmovilización enzimática por encapsulamiento [65].*

11.1.5 Entrecruzante

Este tipo de inmovilización es libre de soporte e involucra la unión de células (o enzimas) una con otra para formar un gran complejo tridimensional y puede lograrse a través de métodos químicos o físicos (Figura 27). Los métodos químicos de entrecruzamiento normalmente involucran la formación de enlace covalente entre proteínas o células por medio de reactivos bi o multifuncionales tales como el glutaraldehído o disocianato de tolueno. Sin embargo, la toxicidad de tales reactivos es un factor limitante en la aplicación de este método. Tanto la albumina como la gelatina han sido utilizadas para proveer moléculas de proteína adicionales como expansores para minimizar la proximidad cerca o problemas de amontonamiento que pueden ser causadas por el entrecruzamiento de enzimas.

El entrecruzamiento físico de células por floculación es bien conocido en la industria de la biotecnología y produce altas concentraciones de células. Los agentes floculantes tales como poliaminas, polietilenimina, sulfonatos de poliestireno y varios fosfatos han sido usados extensivamente y son bien caracterizados. El entrecruzamiento es raramente utilizado solo como medios de inmovilización debido a la ausencia de propiedades mecánicas y pobre estabilidad. El entrecruzamiento

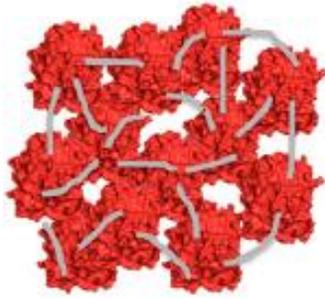


Figura 27. *Inmovilización de entrecruzamiento [65].*

es a veces utilizado para combinar otros métodos de inmovilización por asistencia de la reducción celular o desprendimiento de enzimas en otros sistemas [66].

El entrecruzamiento de enzimas por cristales (CLECs) o agregados (CLEAs) son preparados utilizando un reactivo bifuncional para obtener una macropartícula libre de portador. Esta aproximación ofrece algunas ventajas: alta concentración de actividad enzimática en la catálisis, demostrando alta estabilidad y con bajos costos de producción al excluir el portador. CLECs están basados sobre la cristalización de enzimas puras, seguida de su entrecruzamiento químico, mientras la preparación de CLEAs involucra la agregación de la enzima antes del entrecruzamiento químico. CLEAs son generalmente preferido sobre CLECs debido a que CLEAs no requiere la purificación de enzimas y permite la fácil coinmovilización de algunas enzimas. CLEAs son preparados por la precipitación de la enzima, o la mezcla de enzimas, utilizando polímeros orgánicos (por ejemplo, acetona, etanol, propanol, terbutanol, sales (sulfato de amonio) o polímeros no iónicos (polietilenglicol).

En la Tabla 5 se realiza la evaluación comparativa de las diferentes técnicas de inmovilización enzimática antes mencionadas.

Tabla 5. *Evaluación comparativa de las ventajas y desventajas de varias estrategias de inmovilización enzimática [65].*

Métodos	Ventajas	Desventajas
Adsorción física	Fácil de realizar No se requieren reactivos Sin límites de difusión Pasos de activación mínima involucrados Método barato Menos dañino para las enzimas Corto tiempo para la adsorción física	Baja eficiencia Desorción de enzimas del portador Distorsión de la cinética debido a la partición o fenómeno de difusión y subsecuente alteración del pH estable y pH óptimo de la enzima
Enlace covalente	Ampliamente aplicado Método comparativamente simple Sin desprendimiento o desorción Variedad de soportes/portadores disponibles Fuerte enlazamiento de enzimas a los soportes Disponibilidad multifuncional de soportes/portadores	Efectos de inhibición competitiva Modificación química de las enzimas Pérdida de la conformación funcional de las enzimas
Entrampamiento	Condiciones suaves requeridas Fácil de practicar a pequeñas escalas Rápido método de inmovilización Puede ser usado para aplicaciones de sensores Barato (bajo costos de las matrices) Menor oportunidad de cambios conformacionales	Desprendimiento de la enzima Limitaciones de difusión de poro Oportunidad de contaminación microbiana Bajos niveles de implementación industrial y limitada en operaciones a pequeña escala
Encapsulamiento	Método costo-efectivo Las enzimas son estables a largo plazo Sin pasos de extracción/purificación requeridos Inmovilización en un solo recipiente de enzimas múltiples La conformación de las enzimas nativas es mantenida	Bajas concentraciones de enzimas Generación de productos no deseados Modificación de productos terminales por otras enzimas Limitación por tamaño de poro
Entrecruzamiento	Sin matriz o soporte involucrado Un método comparativamente simple Ampliamente utilizado para aplicaciones industriales Método rápido y barato Grandes cantidades de enzima puede ser entrecruzada al mismo tiempo	Reactivos polifuncionales son requeridos (glutaraldehído) Desnaturalización o modificación estructural por entrecruzamiento

11.2 Factores que afectan las interacciones enzima-nanopartícula (NP)

Las características de la superficie de las NPs dictan la interacción y desempeño de los conjugados NP-enzima. Las propiedades fisicoquímicas del sistema de la NP pueden afectar la actividad enzimática y las características de enlace. Las propiedades y la biocompatibilidad de los recubrimientos aditivos/superficie que fueron utilizados para la estabilización de la NP deben también tomarse en cuenta. La mayoría de las NPs contienen una cubierta en la superficie para incrementar la estabilidad y la dispersabilidad. Estos recubrimientos facilitan la inmovilización de las enzimas vía conjugación con los grupos funcionales de los ligandos superficiales. Por ejemplo, incluye ligandos orgánicos, estabilizadores poliméricos, metales inorgánicos o superficies de óxidos metálicos. Ambas interacciones covalentes y no covalentes (por ejemplo, interacciones electrostáticas, fuerzas van der Waals, enlaces π - π) pueden ser utilizadas para estabilizar las enzimas [67].

En la inmovilización enzimática la estabilización está gobernada por parámetros tales como orientación de la enzima, densidad de enzima (carga), superficie de la NP, forma (morfología) y tamaño (Figura 28). Esta interacción es compleja y los parámetros fundamentales afectan la estabilidad de la enzima en función de la fuerzas interfaciales a nivel molecular no están completamente comprendidas [67].

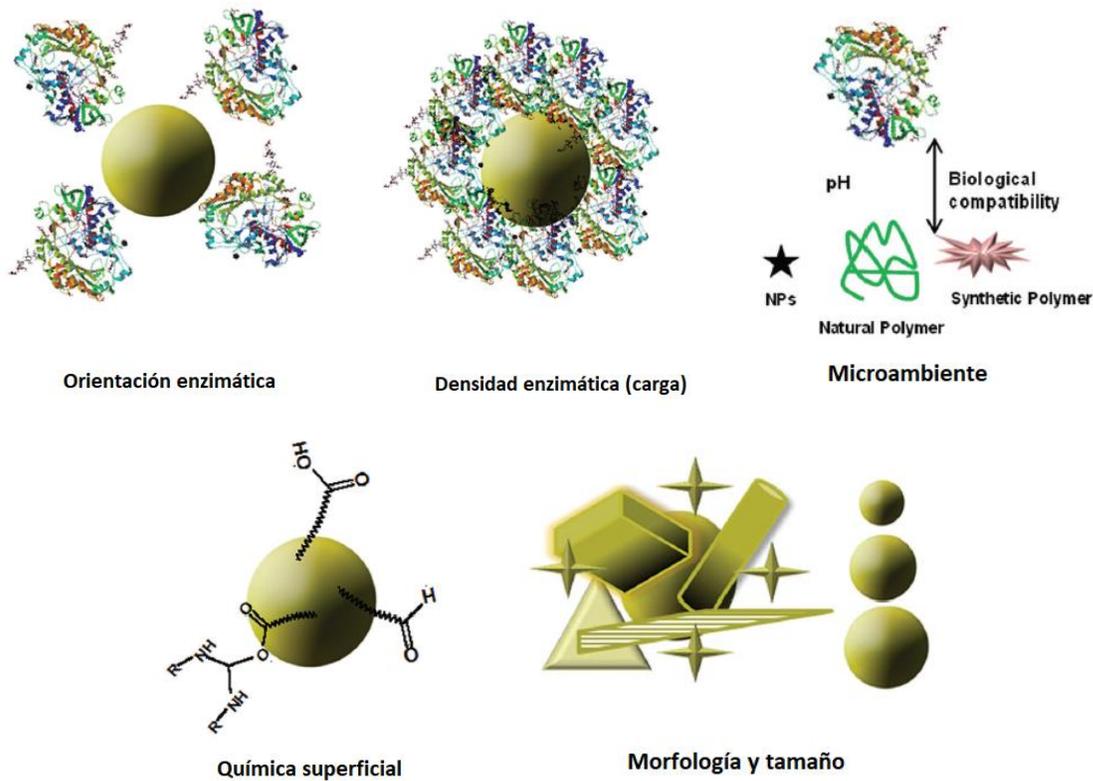


Figura 28. Los parámetros que determinan la actividad del conjugado enzima-NP (adaptado de Othman, et.al., 2016) [67].

11.2.1 Unión enzimática a MWCNTs via diimide- amidación activada

Las aplicaciones biológicas tanto de SWCNTs como MWCNTs han capturado mucha atención. Existen algunas investigaciones recientes concernientes al uso de nanotubos de carbono para propósitos biológicos. Los resultados sugieren que los nanotubos de carbono son buenos sustratos para la inmovilización y crecimiento de biomoléculas por su gran área superficial, especialmente los concerniente a la estructura y anclaje de las moléculas sobre la superficie [68].

Los CNTs presentan la capacidad de cargar una gran cantidad de enzimas e incrementar la actividad catalítica varias veces y estabilizan bajo condiciones pH y térmicas en comparación con las enzimas libres[69].

Debido a la inactividad química de los NTC, cualquier inmovilización covalente de moléculas requerirán modificaciones para crear grupos reactivos sobre su

superficie. Los métodos más comunes incluyen la sonicación de NTC en una mezcla de ácidos o reflujos en ácido nítrico. Estos tratamientos oxidativos crean grupos carboxílicos, estos grupos proveen en teoría, puntos de anclaje para unión covalente de proteínas utilizando un reticulador EDC.

EDC es un reticulador de cero longitudes ampliamente utilizado para conjugación de proteínas. Las reacciones de conjugación ocurren en dos pasos secuenciales Figura 29. EDC primero reacciona con el grupo carboxílico, formando una amina-reactiva *O*-acilisourea intermedia la cual subsecuentemente reacciona con un grupo amina para producir un enlace amida. Sin embargo, la *O*-acilisourea intermedia es inestable y susceptible a hidrólisis. Tal inestabilidad resulta en una eficiencia de acoplamiento bajo. La adición de NHS (N-hidroxisuccinimida o su análogo más soluble en agua Sulfo-NHS) estabiliza el intermediario para convertirlo en un éster NHS amina-reactiva semiestable, por lo que se incrementa la eficiencia de acoplamiento[70].

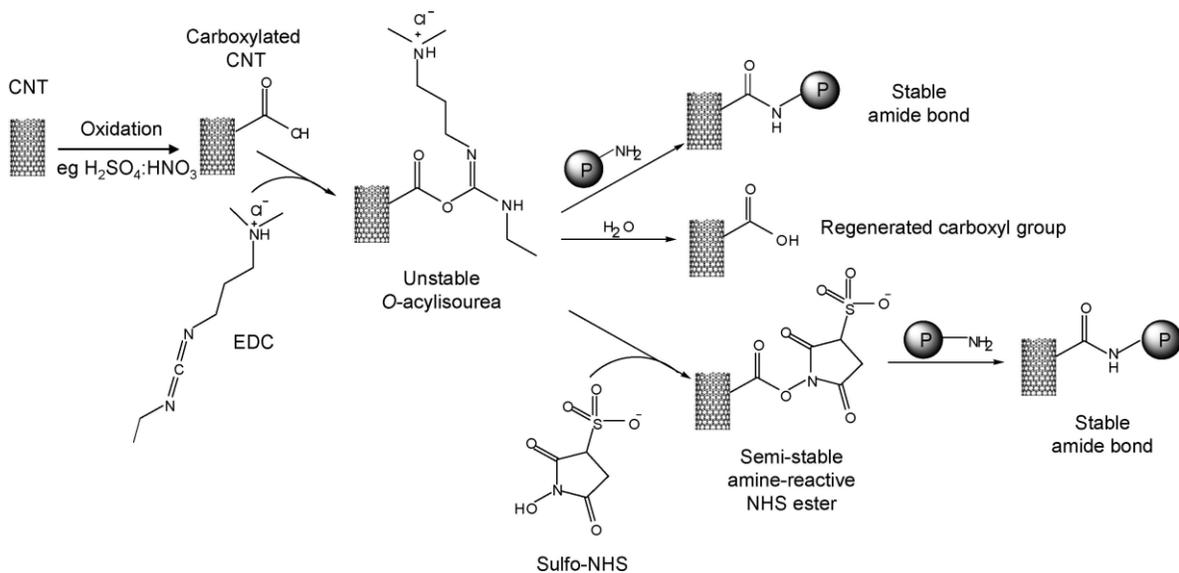


Figura 29. Conjugación teórica de proteínas en NTC carboxilados utilizando EDC en presencia o ausencia de Sulfo-NHS [70].

12 Metodología

12.1 Preparación de Catalizador

Se utiliza un catalizador bimetalico de Fe y Ni soportado sobre SiO₂, mediante el método de sol-gel [71]. Se prepara una solución de tetraetil ortosilicato (TEOS) en etanol, la hidrólisis fue efectuada adicionando agua y ácido nítrico. La composición de la solución TEOS tiene siguiente relación molar:

TEOS/HNO₃/H₂O/EtOH/Fe +Ni nitratos

1/0.02/3/4.3/ η Fe_{nitrato}+ η Ni_{nitrato}

Posteriormente se agrega a la solución de TEOS una solución acuosa de nitratos metálicos de Fe y Ni como sales de nitrato (Fe(NO₃)₃·9H₂O) y (Ni(NO₃)₂·6H₂O), manteniendo una relación 50% en peso entre Si/Me. Después de la gelación y secado cuidadoso en horno rotatorio durante 1 hora a 350°C, el catalizador fue incinerado a 650°C durante 3 horas.

12.2 Síntesis de Nanotubos de Carbono

Después de la preparación del catalizador, se carga una cantidad de catalizador calcinado ~0.5 g en una charola cerámica (40mm x 150mm), dentro de un horno (CVD) a presión atmosférica en la parte central del tubo. El horno fue calentado desde la temperatura ambiente hasta 700°C con un flujo de N₂ (1cc/min) hasta que el reactor alcanza la temperatura de síntesis, subsecuentemente, se vuelve a purga la cámara de reacción para permitir el ingreso de los gases con flujos H₂/N₂: Acetileno 2:2 cc/min con tiempo de 20 y 30 minutos respectivamente. Posterior al crecimiento de NTC, el horno fue enfriado hasta la temperatura ambiente con flujo de gas N₂.

12.3 Purificación y Funcionalización de MWCNT

Los MWCNTs fueron oxidados térmicamente al colocarse en una charola, y calcinados a 450°C durante 30 minutos sin purga de O₂ a presión atmosférica y posteriormente enfriados hasta temperatura ambiente. Se aplicó un tratamiento no oxidativo con una solución HCl al 50% v/v para eliminación de catalizador, colocando las muestras de MWCNT en la solución de ácido diluido en baño

ultrasónico durante 2 horas, diluyendo y filtrando la muestra hasta obtener un pH neutro, secando a 80°C.

Para lograr la funcionalización los MWCNT, las muestras son inmersa en una mezcla de ácidos concentrados de H₂SO₄:HNO₃ en una relación de volumen 3:1 y sonicados durante 3 horas, posteriormente se dejaron en contacto con los ácidos durante tres periodos de tiempo 24 h, 48 h y 80 h. Después los MWCNTs fueron enjuagados varias veces con una mezcla de agua destilada y etanol en una relación 3:1 hasta pH 4 y finalmente con agua destilada hasta un pH neutro. Las muestras fueron secadas a 80°C durante 14 horas.

12.4 Caracterización de MWCNT

La morfología de los NTC antes y después de su modificación fue revisada a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio JEOL JSM-7600F. Se realizaron espectros de FTIR para las muestras de MWCNT antes y posterior a la funcionalización para detectar las principales bandas de defectos y grafitización, se utilizó espectrofotómetro Spectrum GX marca Perkin Elmer en un rango espectral de 400 a 4000 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹, las muestras se forman a partir de pastillas al 5% (w/w) MWCTN y KBr. El análisis de espectroscopía Raman fue ejecutado con un equipo Horiba de alta resolución, modelo Lab Ram HR Evolution, utilizando un láser HeNe 632.8 nm con potencia de salida del 2 mW.

Para realizar el análisis de la composición cualitativa y cuantitativa de los MWCNT's se analizaron por Espectroscopía Fotelectrónica de Rayos X (XPS por sus siglas en inglés). Los análisis fueron desarrollados en un espectrofotómetro Escalab 250Xi (Thermofisher) utilizando una fuente de rayos X de aluminio monocromado (1486.68 eV, WF: 4.2 eV). La composición cuantitativa atómica fue calculada desde las mediciones del espectro de paso energía de 110 eV. Los espectros fueron deconvolucionados utilizando Origin después de la substracción de línea base.

12.5 Inmovilización de enzimas sobre MWCNTs

La inmovilización de enzimas LiP se efectúa mediante dos pasos con la técnica aplicada por Jiang et. al. (2004), como a continuación se describe:

Primer paso: 5.0 mg de MWCNT carboxilados son suspendidos en 5 mL de agua desionizada y mezclado mediante sonicado por un periodo corto de tiempo. Posteriormente 1.0 mL de solución buffer MES 500 mM (pH=6.2) Y 2.3 mL de solución acuosa NHS 500 mg/mL son adicionados sobre la suspensión y mezclada. Mediante agitación rápida, 1.2 mL de solución acuosa de EDAC (10 mg/mL) es adicionada rápidamente, y la mezcla se mantiene en agitación constante a temperatura ambiente durante 30 minutos. La suspensión es centrifugada y enjuagada repetidamente con solución buffer MES para remover el exceso de EDAC y NHS.

Segundo Paso: Los MWNTC estereados son dispersados en 1.0 mL de solución buffer de MES 50 mM (pH= 6.1) y 1.0 mL de concentrado enzimático 1mg/mL en solución buffer de fosfatos es adicionado. Posterior a la agitación de la mezcla sobre una plataforma de agitación a 200 rpm a temperatura ambiente durante 1 h, la suspensión de MWCNTs es centrifugada y lavada con solución buffer de fosfatos tres veces para remover las enzimas sin enlace.

Para determinar el contenido de enzima inmovilizada sobre cada soporte solido se efectuó un microensayo de Bradford utilizando albumina de suero bovino [8], [72].

12.6 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad LiP

El efecto de la variación del pH (3-9) sobre las actividades de la enzima LiP libre e inmovilizada fue investigada utilizando buffer de tartrato de sodio y potasio en un pH 3 a 9 con variaciones de 0.5 unidades. La enzima LiP libre e inmovilizada fueron incubadas a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

Los efectos de la variación de la temperatura sobre la actividad de LiP fueron estudiados con enzimas libres e inmovilizadas en buffer de tartrato de sodio pH 5.5 por 15 min, en rango de temperatura de 15, 25, 35, 35 y 60°C.

12.7 Determinación del potencial zeta de los MWCNTs y las enzimas LiP inmovilizadas.

Para conocer la estabilidad coloidal de nanotubos de carbono antes y después de su funcionalización, así como su comportamiento posterior a la inmovilización enzimática de LiP sobre su superficie se efectúa un análisis del potencial zeta

medido utilizando Zetasizer Nano S (Malvern Instruments) aplicando un análisis de fase de dispersión de luz.

El estudio se realizó dispersando 0.1 mg de MWCNTs en 2 mL solución buffer de fosfatos en rango variación de pH de 5.5 por considerarse el valor de mejor desempeño de la enzima inmovilizada a partir de la prueba 12.5, se aplica una dispersión en baño ultrasonicación por 30 min, se mide el potencial zeta calculada desde la movilidad electroforética aplicando la ecuación de Smoluchowsky con un tiempo de equilibrio de 60 s.

12.8 Actividad de LiP

La actividad de la LiP fue determinada por espectroscopía UV-Vis basada en el cambio de absorbancia a 310 nm a 30°C. El ensayo de la enzima contiene 300 µL de buffer de tartrato de sodio y potasio (100 mmol l⁻¹, pH 3.5), 300 µL de alcohol veratrílico (4 mmol l⁻¹), 150 µL peróxido de hidrógeno (0.2 mol l⁻¹) y 30 µL de enzima-MWCNTs (mg mL⁻¹).

12.9 Preparación de muestra de Nopal

Las muestras de nopal (*Opuntia ficus indica*) fueron obtenidas a partir de cladodios de tercer nivel de crecimiento, con peso aproximado de 500 g cada una. Los cladodios fueron expuestos a tratamiento térmico seco con uso de horno de 125 °C durante 45 min a presión atmosférica con la finalidad de hacer un rompimiento parcial de los enlaces de lignina, se dejan enfriar 24 horas para posteriormente cortarse en tiras y moler hasta obtener una pulpa, la cual deshidratada en un horno a 60 °C aplicando un vacío de 0.2 psi durante 24 horas para obtener una harina fibrosa y homogénea, se caracteriza a través de FTIR desde 400 a 4000 cm⁻¹.

12.10 Proceso de delignificación enzimática

Para determinar la eficiencia del proceso de delignificación se prepararon muestras con 1 g de harina de nopal en 100 mL de solución buffer de fosfatos a un pH de 5.5, las pruebas se efectúan en una variación de tiempo de 24, 48 y 72 h manteniéndose en baño maría a 35.5 °C y agitación constante, la prueba se realizó con enzimas inmovilizadas sobre nanotubos de carbono funcionalizados en 48 h adicionando

H₂O₂ al 200 mM como mediador. Para determinar la cantidad de lignina soluble residual se aplica el método de Lignina de Klason, en la cual los carbohidratos de la muestra son hidrolizados y solubilizados por ácido sulfúrico, la lignina ácido insoluble se filtra y seca. Por otro lado, la lignina ácido soluble puede determinarse en el filtrado de la lignina ácido insoluble por el método espectrofotométrico UV-Vis a 205 nm.

Se realizaron espectros de FTIR para las muestras de nopal antes y posterior a la delignificación para detectar las principales bandas de la lignina, se utilizó espectrofotómetro Spectrum GX marca Perkin Elmer en un rango espectral de 400 a 4000 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹, las muestras se forman a partir de pastillas al 5% (w/w) nopal de lignina soluble y KBr con base a la metodología aplicada por Derkacheva y Sukhov [73].

13 Resultados y discusiones

13.1 Catalizador

Durante la formulación del catalizador se obtuvo un polvo extremadamente fino de color café claro que posterior a su calcinación se convierte a color café oscuro característico de óxidos de hierro y níquel. En el análisis termogravimétrico (Figura 30) se observan dos cambios térmicos acompañados con pérdida de masa, el primer cambio es debido a la pérdida de agua en la mezcla que se alcanza aproximadamente a los 180°C con una pérdida de peso del 35%, la siguiente etapa de transformación se presenta los 300°C con una pérdida del 44% de peso en donde se genera la formación de óxidos de hierro y óxidos de níquel con la correspondiente pérdida de óxidos de nitrógeno, para finalmente obtener a partir de los 650°C óxidos de hierro y níquel (Fe₂O₃, NiO y NiFe₂O₄) y un peso final del 31% de la masa original[74],[75],[76],[77].

Con la información obtenida se establecen las temperaturas para el tratamiento de secado y calcinación del catalizador, por lo que el catalizador es secado a 350°C en el horno rotatorio y calcinado a 650°C para obtener el estado de oxidación deseado del Fe y Ni, de estos compuestos al aplicar su reducción y obtener Fe y Ni en estado

metálico en contacto con H_2/N_2 que durante el proceso de síntesis crecerán los NTC's.

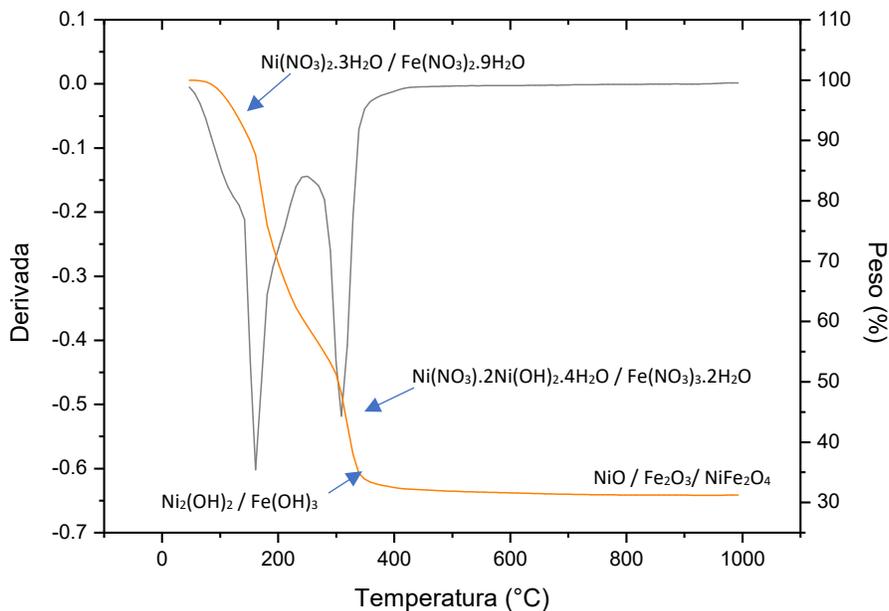


Figura 30. Análisis Termogravimétrico (TGA) del catalizador Fe:Ni 3:1.

Con la finalidad de conocer los estados de oxidación de los metales de Ni y Fe involucrados en la aleación, se efectuó un análisis de FTIR (Figura 31), se observan estados de oxidación diversos de Ni, Fe y Silanol. La señal 470 cm^{-1} es una alargamiento de Ni-O [78], para las señales en $570, 826, 879$ y 926 cm^{-1} corresponden a estados de oxidación del Fe; Fe-O, $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\alpha\text{FeO(OH)}$, $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ [79], [80]. Lo anterior confirma que el tratamiento de calcinación del catalizador contiene los estados de oxidación en los metales Fe y Ni necesarios para realizar la síntesis en CVD con H_2/N_2 como gas reductor.

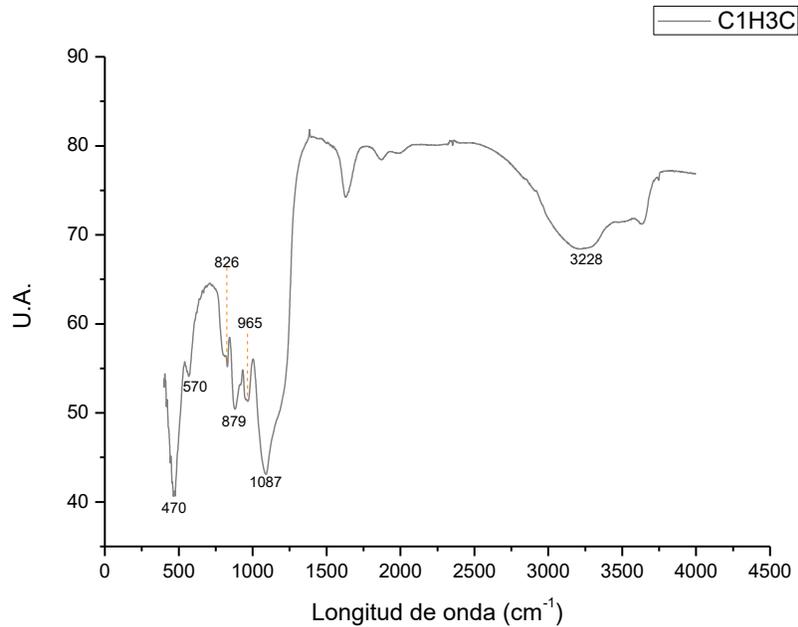


Figura 31. FTIR del catalizador Fe:Ni 3:1.

13.2 Calidad de los MWCNT sintetizados

Durante el proceso de síntesis se pueden observar la formación de NTC con un diámetro promedio de 30 a 20 nm, y algunas fibras mayores a 100 nm. En la mayoría de la estructura se presenta homogeneidad con base en el estudio SEM de la Figura 32. Se confirman residuos de catalizador y silicio en la estructura.

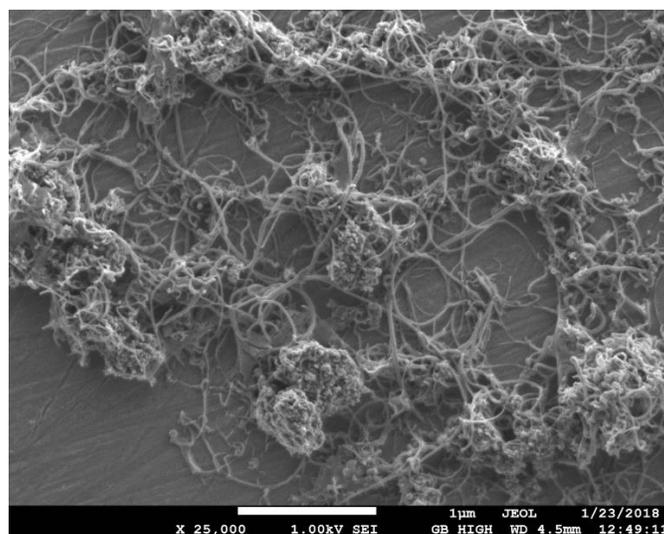


Figura 32. Estudio SEM de muestra MWCNT con una relación Fe:Ni 3:1.

Se aplicó un estudio de Espectroscopia Raman (Figura 33), se analiza la posición, el ancho y la intensidad relativa de las bandas, con la finalidad de proporcionar la información sobre la grafitización, defectos y alineación de los MWCNT [81], [82].

Las bandas de los MWCNT's presentan una similitud a las bandas características al grafito. La banda D en 1350 cm^{-1} es atribuible a la presencia de carbono amorfo desordenado e indicativo de defectos en MWCNT's, relacionadas con impurezas carbonáceas, enlaces sp^3 y enlaces sp^2 rotos en las paredes[83]. Una banda G entre $1580\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a vibraciones tangenciales de los átomos de carbono, resulta de la naturaleza gráfica de la muestra (por ejemplo, cristalinidad, arreglo original de la muestra)[84], además la banda G aparece formada por una señal débilmente asimétrica y ancha la característica de los MWCNTs [85][82].

Existe además una señal débil y ancha G' en los 2700 cm^{-1} es indicativo de un orden de largo alcance en una muestra y surge a partir del segundo fonón [83][86]. Las intensidades de bandas G y D (ID/IG) son utilizadas para evaluar el grado de desorden de materiales. Un aumento en esta relación corresponde a una mayor proporción de carbono sp^3 que es usualmente atribuida a defectos [86].

En la Figura 13.4., se observa una fluorescencia en las primeras señales de la longitud de onda [51], debido a la presencia de material residual, que confirma nuevamente presencia de catalizadores y soporte de silicio.

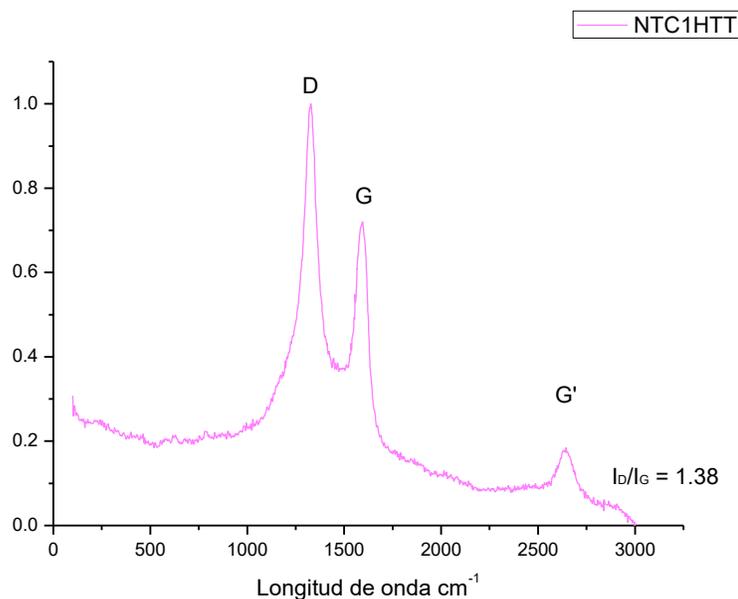


Figura 33. Espectroscopía Raman de los MWCNT a partir de la aleación Fe:Ni 3:1

13.3 Limpieza de MWCNT's

Se aplicó una limpieza con HCl al 50% para eliminar material amorfo, catalizador residual y en menor medida silicio de soporte. En la Figura 34 se presenta una comparativa de los espectros Raman antes y después de tratamiento con ácido diluido, se comprueba que se efectúa una ligera reducción en la señal G que representa un leve aumento en las vacancias formadas por la ligera oxidación sobre las superficies de los NTC, pero también se observa que la intensidad de la banda D y G' se mantienen casi constantes, se deduce que hay una eliminación del material residual con un leve daño sobre las paredes de los NTC, reduciendo además de las señales de las primeras etapas desde 0 hasta 1000 cm⁻¹, esto por la eliminación de elementos que causan fluorescencia tales como Fe y Ni por la solubilización y eliminación por HCl diluido.

La microscopía electrónica de la Figura 35 se presenta una reducción en grumos de NTC y material de la cantidad de catalizadores residuales, el material de soporte de silicio pudo no haberse eliminado en su totalidad, ya que resulta un material resistente al ataque de ácidos débiles. Existe una mayor dispersión y limpieza aparente en la superficie de los NTC.

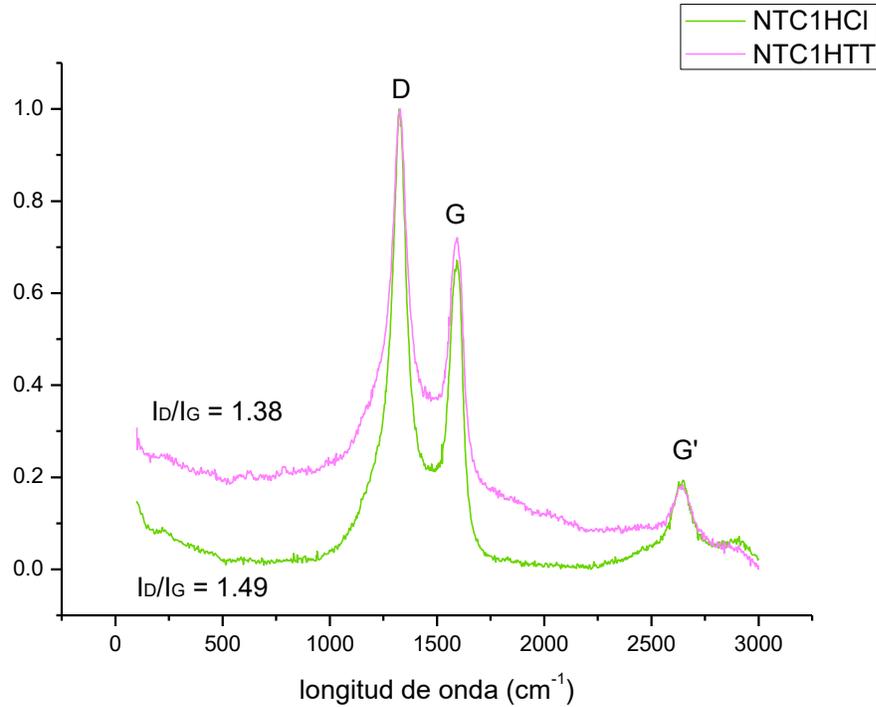


Figura 34. Comparativa de espectroscopia Raman de los MWCNT's con tratamiento térmico y limpieza con HCl al 50%.

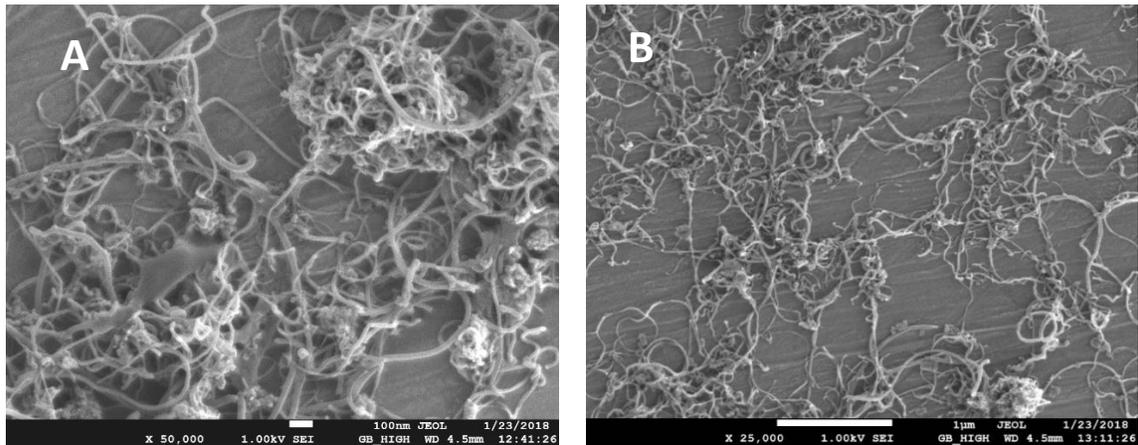


Figura 35. SEM de MWCNT para A) Tratamiento térmico y B) Purificados con HCl al 50%

13.4 Funcionalización de MWCNT

Para la funcionalización de los MWCNT se emplearon una mezcla de ácidos concentrados de H_2SO_4/HNO_3 en una relación 3:1, con la finalidad de obtener NTC's

con suficientes grupos oxigenados que sirvan formar enlaces con la enzima, se aplica el tratamiento con baño ultrasónico y ácidos concentrados por un periodo de 24,48 y 80 horas. Se efectuaron análisis Raman, SEM y FTIR con la finalidad de conocer el grado de afectación sobre la estructura de los nanotubos para cada tiempo de contacto.

En la Figura 36 se muestra espectroscopia Raman para la oxidación de nanotubos de carbonos con variación de periodos de 24 a 80 horas de contacto. Los índices ID/IG varían levemente, un aumento en su valor generalmente indica la formación de defectos debido al rompimiento de los enlaces sp^2 de la red de los nanotubos formada por vacancias, si bien el valor del índice en la oxidación de los NTC's a 24 horas de tratamiento es mayor al tratamiento para las 48 horas, se debe a la presencia de material amorfo que produce una señal mayor de D, una vez reducido este material permite que la señal D disminuye y la señal G aumenta presentando una mayor grafitización de la estructura de la red. Para el valor del índice ID/IG en la muestra de 80 horas de tratamiento ácido se aumenta, debido a que se forman vacancias sobre la estructura formando enlaces sp^3 una vez reducida la red de los nanotubos de carbono.

Por otro lado la señal G' disminuye conforme los MWCNT son expuestos a tratamiento oxidativos más extensos por lo que se sugiere una afectación en las paredes generando defectos en la estructura debido a la ruptura de enlaces sp^2 para la introducción de grupos funcionales tales como carboxílicos y carbonilos debido a la funcionalización del nanotubo [87].

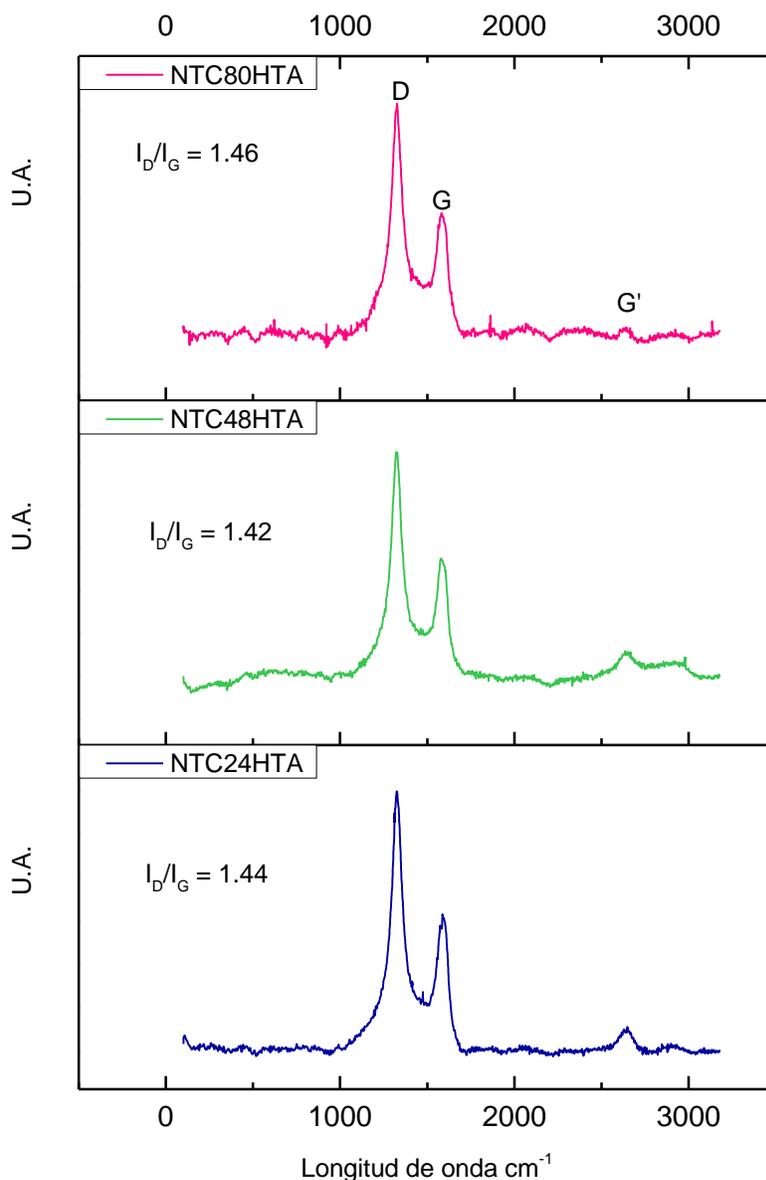


Figura 36. Espectroscopia Raman después de normalización de los tratamientos con ácidos concentrados con variación de tiempo de 24, 48 y 80 horas de contacto.

En la Figura 37 se muestran los espectros comparativos de FTIR en los MWCNTs sin y con tratamiento de limpieza con HCl, así como el efecto de la funcionalización debido a la mezcla de ácidos concentrados y tiempo de contacto variable (24,48 y

80 horas), a excepción del espectro de los MWCNTs con tratamiento térmico (NTCTT), en cada espectro posterior a la exposición con ácidos diluidos y concentrados se presentan una banda ancha en 3437 cm^{-1} , correspondiente a una banda vibracional de alargamiento de grupos -OH aislados en la superficie de los nanotubos y/o -OH en grupos carboxílicos y agua absorbida en el NTC o KBr base [88], se muestra un pico en la banda de 1632 cm^{-1} , el cual es asignado a grupos carbonilo, enlaces C=C en anillos aromáticos y enlaces C=O en grupos carboxilo [64], [89], [90], la banda obtenida en 1384 cm^{-1} es debido a la presencia de C-C, C=O a deformación de C-H en CH_3 [85] debido al rompimiento de los enlaces dobles de la estructura del nanotubo y la formación de vacancias así como enlaces C-O [92]. Los picos en 2922 y 1452 cm^{-1} presentes en la curva de NTC con tratamiento térmico (NTCTT) están relacionadas a estiramiento simétrico de enlaces C-H de la fracción de CH_2 debido a la presencia de material amorfo sobre la superficie del nanotubo [93], posterior al tratamiento con ácidos se reduce su intensidad y la segunda curva es una banda relacionada a una vibración de estiramiento del doble enlace carbono-carbono C=C del anillo aromático de la estructura del nanotubo [94]., el pico característico de ~ 1700 del grupo carboxílico no es visible en el espectro, lo cual puede indicar que las condiciones de oxidación no son suficientemente fuertes, el pico de 1632 cm^{-1} fue atribuido a enlaces C=C en anillos aromáticos y enlaces C=O en grupos carboxilo [89][64], la banda obtenida en 1384 cm^{-1} es debido a la presencia de C-C, C=O ó deformación de C-H en CH_3 [91] y enlaces C-O [92].

Aunque es posible la presencia de grupos carbonilo en lugar del característico grupo carboxilo posterior a cada tratamiento ácido, esto es debido a la adición de alcohol diluido es utilizado como auxiliar para reducir la polaridad y permitir la sedimentación de los MWCNTs para facilitar su separación y limpieza de la suspensión. Se presenta una reacción de esterificación de Fischer, en la que ácidos carboxílicos presentes en la muestra en conjunto con el alcohol, produciendo grupos esterres que se observan entre 1383 y 994 cm^{-1} [95], [96].

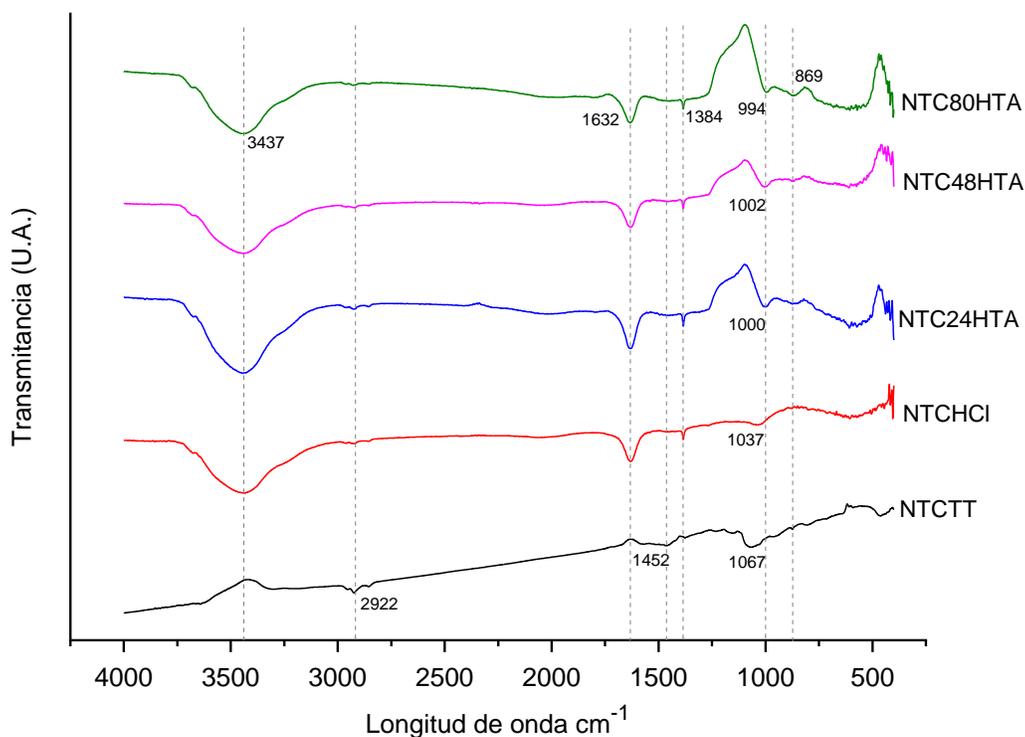


Figura 37. Espectroscopia FTIR para MWCNT con tratamiento térmico (T T), tratamiento de purificación con HCl y tratamiento oxidativo con mezcla de ácidos concentrados H₂SO₄: HNO₃ 3:1 para 24, 48 y 80 horas de tiempo de contacto.

En Figura 38 se muestra el análisis de los espectros XPS para los tratamientos ácidos de 24, 48 y 80 horas utilizados para identificar y cuantificar la composición de los MWCNT's originales y posterior a la funcionalización. Los principales picos observados en los MWCNT's tienen una energía de enlace similar, las energías de enlace de C 1s, O 1s se ubican en 533 y 284 eV respectivamente, valores que coinciden con los reportados por Liang et.al. [97].

El aumento del contenido de oxígeno es claramente observado por la comparación en los cambios en la intensidad del espectro O 1s para los diferentes tratamientos de MWCNTs. El nivel más alto de oxidación se encontró en los MWCNTs con 80h de tratamiento de contacto ácido. El análisis elemental del contenido de C, O, Si, Fe y Ni se reporta en la tabla 6.

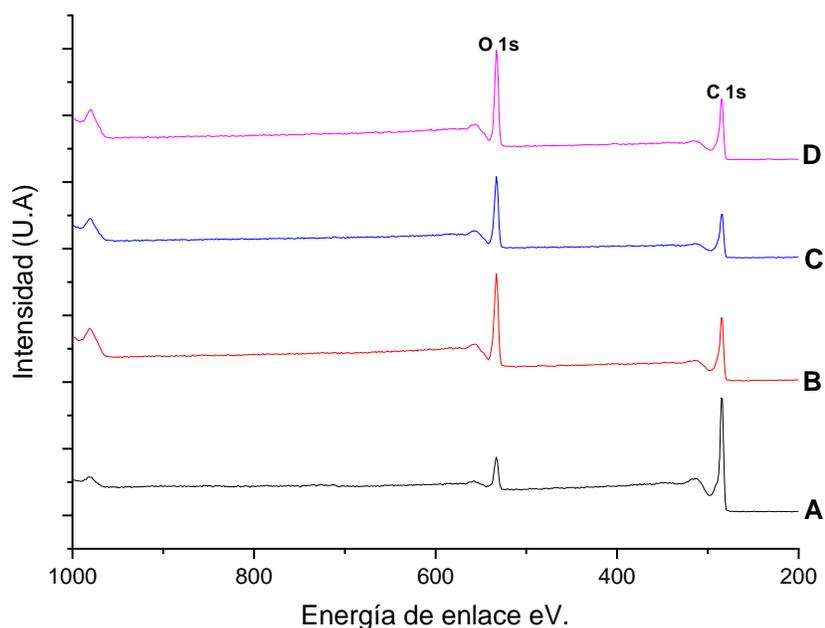


Figura 38. Espectros XPS para C 1s y O 1s para MWCNTs, A) sin tratamiento ácido, B) 24 h de tratamiento ácido, C) 48 h de tratamiento ácido y D) 80 h tratamiento ácido.

La Tabla 6 se observa que los elementos metálicos Fe 2p y Ni 2p utilizados como catalizadores se presentan con mayor conteo de energía de enlace en 711 y 874 eV solo para las muestras de MWCNT's originales estos valores corresponden a lo reportado por Liu et. al. [98]. Posterior a los tratamientos ácidos se presenta una disminución considerable de los metales por su disolución en el proceso de la funcionalización.

Tabla 6. Contenido de elementos de los diferentes MWCNTs analizados por XPS.

Muestra	Contenido de elementos (%)				
	C 1s	O 1s	Si 2p	Fe 2p	Ni 2p
MWCNT's originales	84.69	10.29	4.37	0.4	0.25
MWCNT's 24 horas	55.38	33.9	10.57	0.06	0
MWCNT's 48 horas	54.83	35	10.16	0	0.01
MWCNT's 80 horas	62.84	37.16	0	0	0

Los espectros de los picos C 1s y O 1s fueron deconvulados, y los diferentes contenidos de grupos funcionales son presentados en las Figuras 39 y 40. Los

espectros muestran claramente cambios considerables en los diferentes grupos funcionales en las superficies de los MWCNT's.

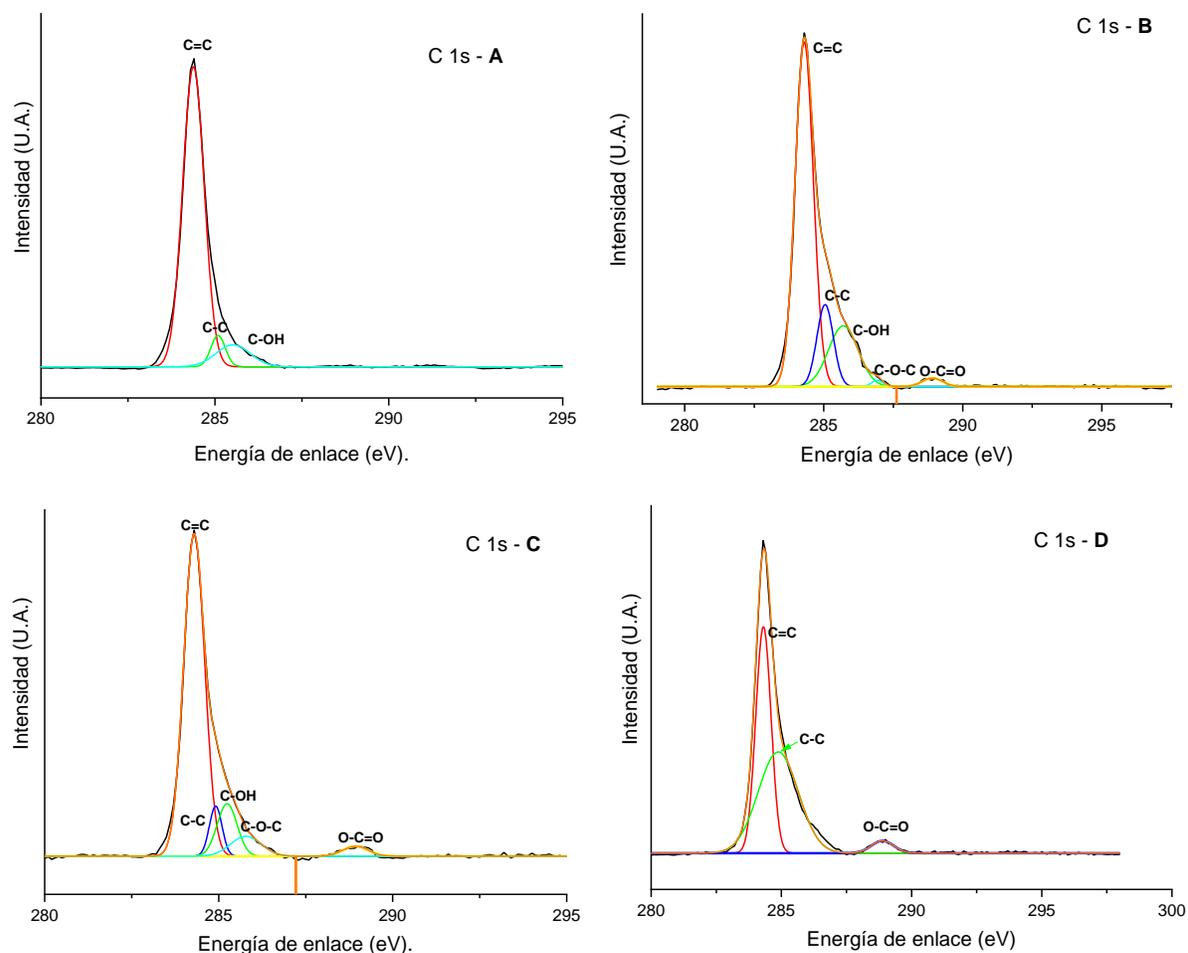


Figura 39. Espectro XPS correspondiente al carbono (C 1s) de MWCNTs a) Originales, B) Tratamiento Ácido 24 h, C) Tratamiento Ácido 48 h y D) Tratamiento Ácido 80 h.

En la Figura 39 A se observa la señal de C=C (284.28 eV) que es característica de los MWCNT's, además se presentan dos registros bajos de C-C (285.05 eV) y C-OH (285.53 eV) formados por vacancias durante su síntesis. La señal más grande es la C=C lo que indica que los MWCNTs presentan una buena grafitización. En las Figuras 39 inciso B, C y D, para cada tratamiento con mezcla de ácidos concentrados se presenta la funcionalización de la superficie, predomina la intensidad de los enlaces C=C de la grafitización de los MWCNTs y un aumento en

señales tales C-C que indican la ruptura del doble enlace entre los carbonos con hibridación sp^2 debido a la acción de degradación en los nanotubos, está señal es mayor para una muestra de 80 h por lo que se infiere un mayor daño en su estructura. Las observaciones antes mencionadas corroboran los resultados de la espectroscopía Raman de la Figura 13.7.

Durante la funcionalización de la superficie se presentan grupos oxigenados tales como C-OH (285.53 eV), C-O-C (286.94), O-C=O (288.92 eV), mismos que se presentan que pueden corresponder a grupos carboxílicos, aldehídos. Estos resultados son consistentes con los publicados por Okpalugo et.al.[99].

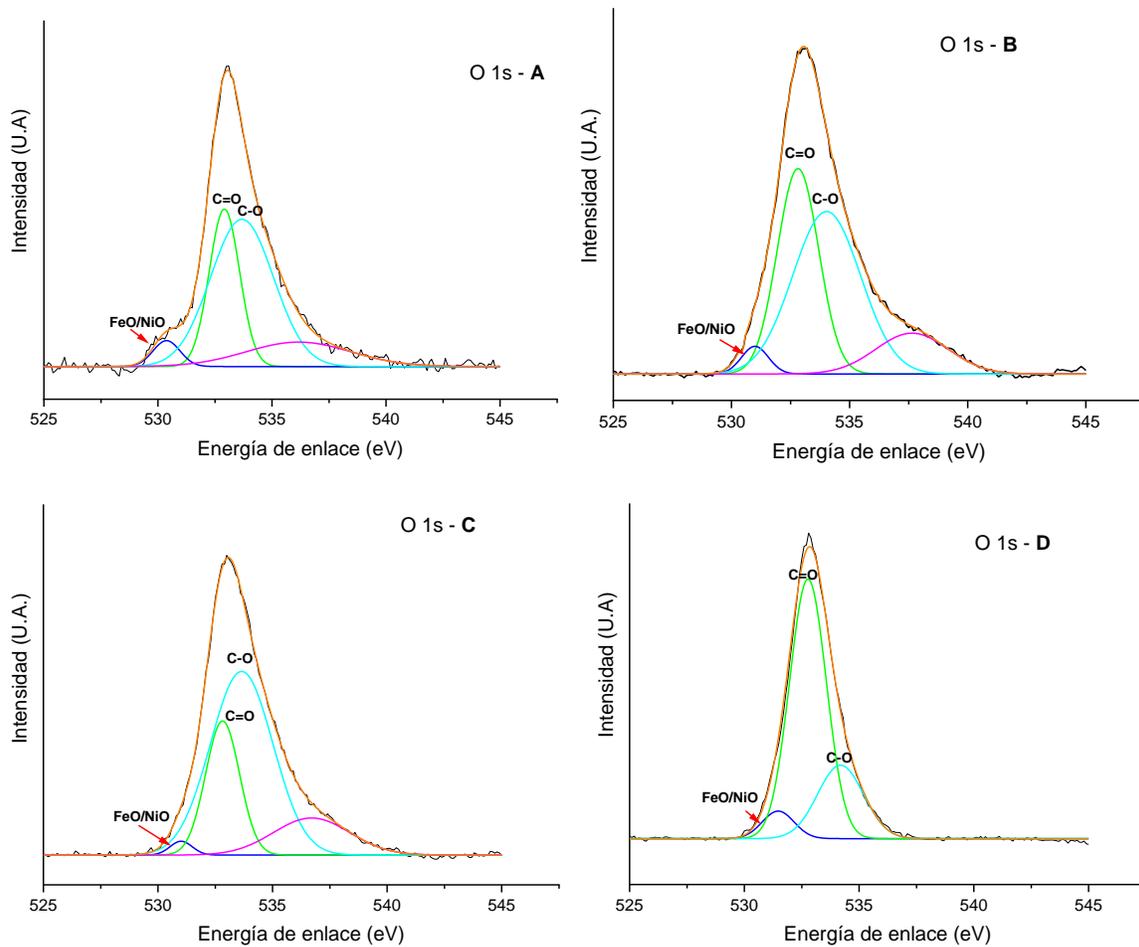


Figura 40. Espectro XPS correspondiente al carbono (O 1s) de MWCNTs, A) Originales, B) Tratamiento Ácido 24 h, C) Tratamiento Ácido 48 h y D) Tratamiento Ácido 80 h.

El análisis elemental de los XPS revela que los MWCNTs originales contienen una cantidad de oxígeno baja, la cantidad de éste aumenta hasta 35% para MWCNTs funcionalizados. En la Figura 40, la región de análisis para O 1s, se observa la señal característica para óxidos metálicos representados por FeO y NiO (530.6 eV) similar a lo reportado con Huan et. al y Guofa et.al. [100], [101]. Aunque la presencia de la señal está presente durante la deconvulación de la O 1s, la señal característica de Fe 2p (740-700 eV) y Ni 2p (890-845 eV) es muy baja como se muestra en la Figura 13.9, lo que puede suponer una presencia de estos metales catalizadores como residuales en el interior de los nanotubos.

Los picos de las señales para C=O (532.9 eV) y C-O (533.68 eV) se presentan como respuesta a funcionalización de los nanotubos de carbonos posteriores a la exposición con ácidos concentrados, estos datos se complementan con los resultados FTIR de la Figura 13.8, que demuestran la presencia de grupos carboxilos y carbonilo correspondientemente.

13.5 Efectos de la LiP inmovilizada sobre MWCNTs modificados

Para poder realizar el anclaje de las enzimas LiP's sobre la estructura de los MWCNT en los diferentes tratamientos, se efectuaron pruebas para el desarrollo de un enlace peptídico entre la LiP y los MWCNT's, utilizando N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidroclicorada (EDAC) y N-hidrosuccinimida (NHS), el NHS estabiliza el intermediario de O-acilisourea susceptible a hidrólisis para convertirlo en un éster NHS amina-reactiva semiestable, por lo que incrementa la eficiencia de acoplamiento[70].

Los efectos en la inmovilización de la LiP sobre los MWCNTs funcionalizados y tratamiento termico se presenta en la Tabla 7. Los valores muestran que en los MWCNTs sin funcionalización tienen una inmovilización mayor en comparación con los nanotubos funcionalizados, esto puede ser debido a la adsorción de la enzima sobre la superficie del soporte por las fuerzas involucradas en su mayoría electrostáticas débiles tales como fuerzas de van del Waals, interacciones iónicas y puentes de hidrógeno, aunque los enlaces hidrofóbicos pueden ser significativos, estas fuerzas son individualmente muy débiles, pero en suficiente grande en número

pueden proveer un buen enlace[67]. Con base en la Figura 13.2A esta inmovilización presenta un desplazamiento en el valor de pH de dos unidades en comparación con la enzima libre para su mejor desempeño, aunque desciende drásticamente su actividad en comparación con la enzima libre y el resto de las enzimas inmovilizadas.

Dentro de los MWCNTs los mejores resultados de inmovilización se obtienen para el periodo de oxidación de 48 horas de hasta un 73%, mismas que al compararlo con la Figura 41 A se obtiene el mayor desempeño de la actividad catalítica de la enzima a un pH de 5.5, incluso superior a la enzima libre para un pH de 3. Por lo que se puede deducir que la modificación física de la enzima durante la inmovilización mejora su desempeño.

Tabla 7. Porcentaje de enzima inmovilizadas sobre MWCNTs funcionalizados.

Tiempo de Oxidación de MWCNTS (h)	Concentración de enzima LiP inicial (21.55038 µg proteína /µL)	µg proteína / µL inmovilizada	% inmovilización
0	0.5 mg/mL	20.5813	95.5035
24	0.5 mg/mL	14.8449	68.8848
48	0.5 mg/mL	15.93023	73.9208
80	0.5 mg/mL	14.2248	66.0071

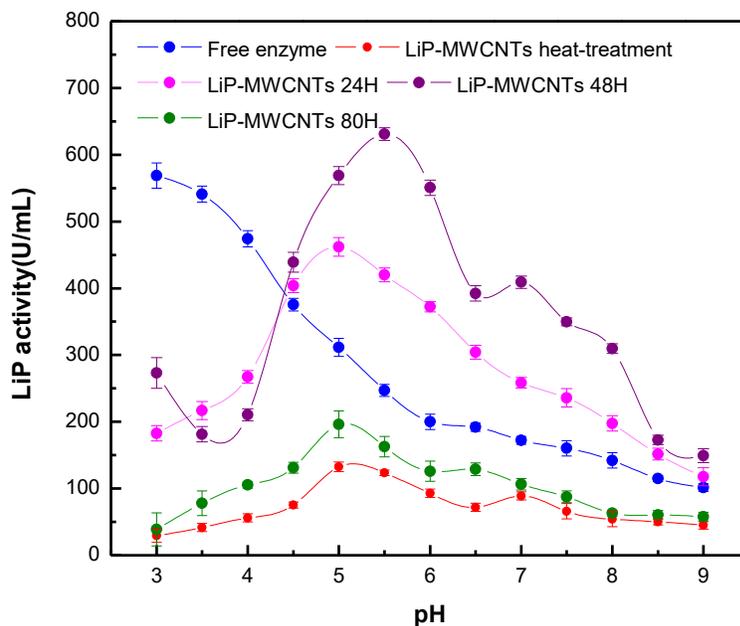
Durante la inmovilización, se efectuaron pruebas sobre la degradación del alcohol veratrílico utilizado para evaluar la actividad de la enzima. Para conocer el efecto del pH sobre la capacidad catalítica de la LiP inmovilizada se aplicó para un rango de pH 3 a 9 con variaciones de 0.5 unidades a una temperatura de 25 °C (Figura 41A). Para el efecto de la variación de temperatura se efectuó rango de 15, 25, 35, 45 y 60°C (Figura 42B) la LiP fue incubada en buffer de tartrato de sodio y potasio pH 5.5. por 15 min sobre la enzima libre e inmovilizada para obtener una comparativa.

En la Figura 41 A se observa que la enzima libre presenta una actividad menor a 600 U/mL en pH de 3 y disminuye al aumentar el pH hasta un valor de 130 U/mL en un pH de 9. La finalidad de la inmovilización de estructuras biológicas sobre nanoportadores como MWCNT es proporcionar estabilidad, accesibilidad,

selectividad y evitar perdida de la enzima[90], se puede ver que mejora la estabilidad de la enzima inmovilizada principalmente para los MWCNT de tratamiento ácido 48 horas obteniendo una actividad de 650 U/mL a un pH 5.5.

Para el resto de las muestras se observa una actividad menor a la enzima libre pero un rango de pH de actividad de 5, siendo muy bajo para la enzima de 80 horas de oxidación por contener un exceso de grupos carbonilo y carboxilo que generan un eclipse de la actividad enzimática, mientras que para los MWCNT sin funcionalización es mucho menor debido a que carece de grupos carboxilos, en este caso la enzima solo se absorbe a la estructura y no forma enlaces covalentes.

El efecto para el caso de la enzima LiP inmovilizada y libre (Figura 41.B) se observa que a 35°C se reporta la mejor actividad tanto para la enzima libre como la inmovilizada, registrando la mayor actividad de 800 U/mL para la enzima inmovilizada MWCNT 48 horas nuevamente, siendo menor para los mismos casos de MWCNT de 80 horas de tratamiento ácido y con tratamiento térmico.



A

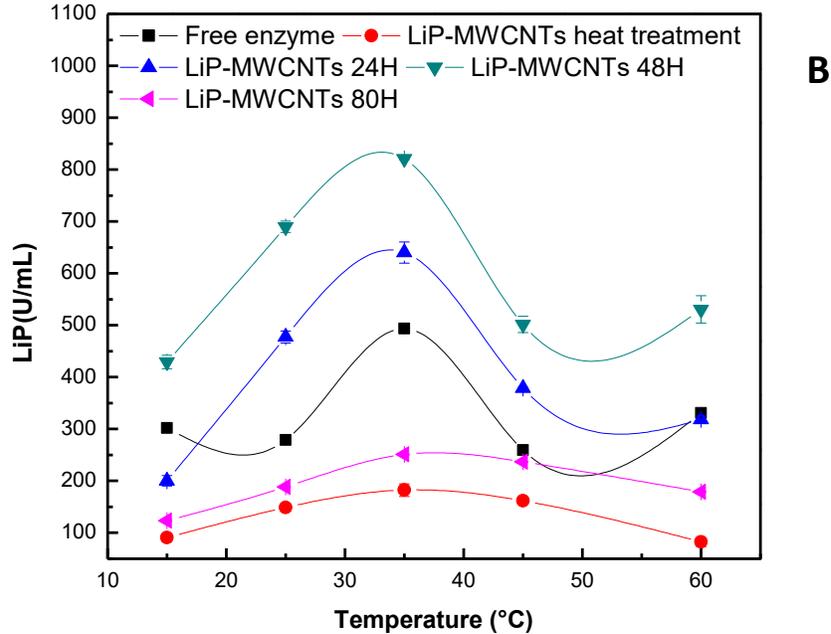


Figura 41. A) Efecto del pH sobre la actividad de la LiP, B) Efecto de la temperatura sobre la actividad de LiP.

En la Tabla 8 se presenta una comparativa entre el método de inmovilización covalente con NHS-EDAC y otros métodos de inmovilización, los resultados demuestran que al igual a todas las técnicas de inmovilización se produce un desplazamiento en el valor de óptimo de actividad de la enzima que de forma libre tiene el mejor desempeño que inicialmente es a un pH de 3 y temperatura 35°C, la diferenciación principal está en que la enzima inmovilizada por las pruebas realizadas opera en un rango de pH superior de casi 1 a 1.5 unidades en comparación con el resto de las técnicas, sin embargo la temperatura de operación no se observa cambio alguno, que para el resto de las técnicas se observa un desplazamiento muy considerable de 60° a 80°C. Aunque esto supusiera una mejor tolerancia térmica, en una aplicación industrial se tendría que aplicar mayor energía para que el proceso de degradación de la lignina se efectuará, por lo que se puede considerar una ventaja que la temperatura se mantenga en nivel original del desempeño de la LiP libre que reduce gastos de operación a nivel piloto o industrial.

Tabla 8. Comparativa del desempeño de pH y temperatura de la enzima LiP inmovilizada en NTC por la unión covalente NHS-EDAC y otras técnicas aplicadas.

Técnica de Inmovilización	Método de inmovilización	pH	Temperatura	Referencia
Inmovilización LiP mediante CLEA's	Entrecruzamiento	4.0	60 °C	Parveen, 2021 [102]
Inmovilización LiP en matriz de Xerogel	Entrampamiento	5.0	80 °C	Muhammad, 2017 [69]
Extracto enzimático LiP inmovilizado sobre NTC	Adsorción	5.0	60 °C	Sabrina, 2016 [8]
Inmovilización LiP sobre NTC con NHS-EDAC	Covalente	5.5	35 °C	Prueba realizada

13.6 Evaluación de la Enzima LiP inmovilizada

Con la finalidad de conocer la influencia en la modificación en la superficie de los MWCNT's durante su oxidación, su comportamiento en dispersión, así como, su efecto en la inmovilización de la enzima LiP, se determina el potencial zeta sobre solución buffer de fosfatos a un pH 5.5. para mantener la actividad de la enzima LiP en su máximo valor de desempeño con base en a los resultados reportados en la sección 13.5. Se analizaron MWCNT con tratamiento térmico y funcionalizados para tiempos de contacto de 24, 48 y 80 horas, así como posterior a la inmovilización de carga enzimática para cada tiempo de oxidación.

En la Figura 42A los MWCNTs presentan valores de -16.46 mV, -46.9 mV, -46.4 mV y -43.23 mV para nanotubos con tratamiento térmico, NTC 24 horas, NTC 48 horas y NTC 80 horas de contacto con mezcla de ácidos concentrados correspondientemente. Los resultados muestran que los MWCNT's funcionalizados exhiben valores de potencial zeta superiores en comparación a la MWCNTs térmicamente tratados. Esto indica que la superficie de los MWCNTs funcionalizados poseen más cargas negativas, estas cargas son debidas a la presencia de grupos oxigenados tales como carbonilos, carboxilos e hidroxilos que al ser ionizados en los solventes resulta en una adsorción de cargas negativas sobre la superficie de los nanotubos como se observa en el espectro FTIR de la Figura 37 [103], [104]. El potencial zeta de mayor tiempo de contacto (80 h) decrece levemente su valor, esto probablemente a que los nanotubos sufren una mayor

degradación y fragmentación que puede corroborarse al observar los estudios Raman de la Figura 36 cuyo índice ID/IG=1.46, por lo tanto la superficie presenta un menor nivel de activación.

Con base a lo indicado por Youssry et.al. [105], si el valor absoluto del potencial zeta es mayor de 15 mV, las partículas coloidales se consideran estables debido a fuerzas electrostáticas. Los valores de los nanotubos funcionalizados para 24 ,48 y 80 horas superan el valor antes referenciado por lo que el comportamiento dentro de suspensión será de alta dispersión, así como su activación superficial.

Una vez inmovilizada la enzima sobre los nanotubos presentan cambios fuertes en sus niveles de potencial zeta (Figura 42B). Para NTC de 28 horas de tiempo de contacto su valor va de -46.9 mV a -6.03 mV, para 48 horas de -46.4 mV a -4.62 mV y finalmente -43.23 mV a -7.28 mV. Las enzimas se ponen en contacto con los nanotubos funcionalizados y el auxiliar (NHS- EDC) para la formación de enlaces covalentes, el mejor valor es para nanotubos con tiempo de contacto de 48 horas, por lo que a pesar de presentar una leve diferenciación las fuerzas de repulsión entre los nanotubos, el auxiliar de enlace y la enzima se ve más favorecida[70].

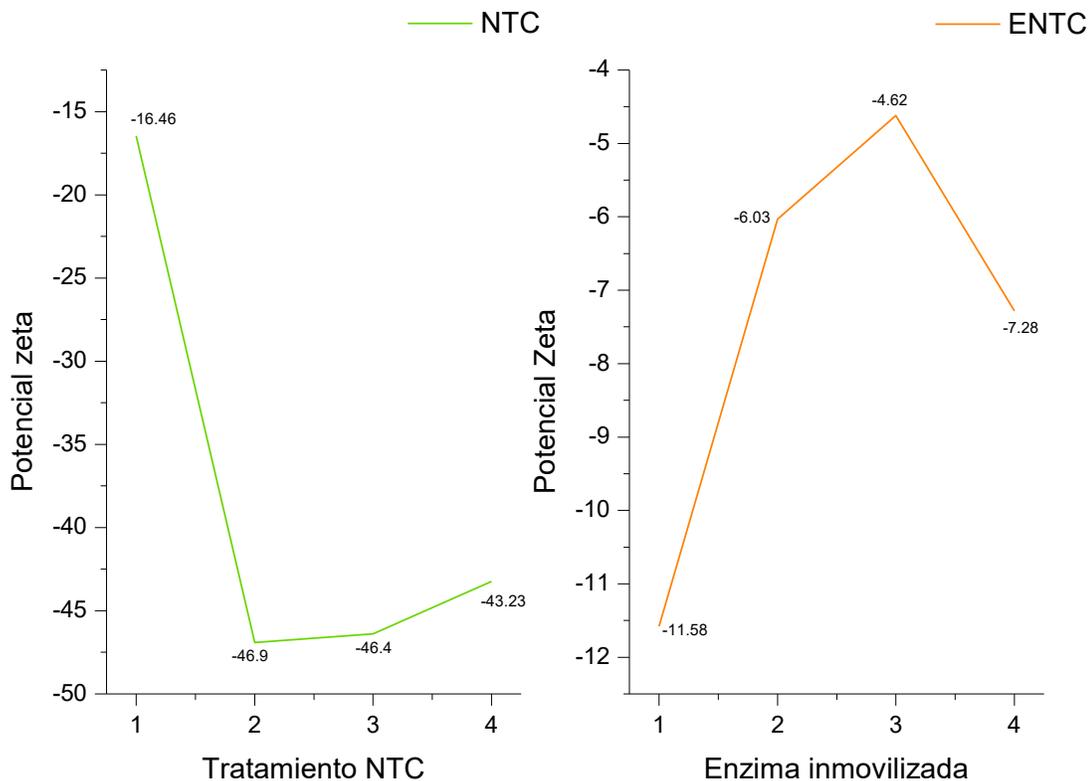


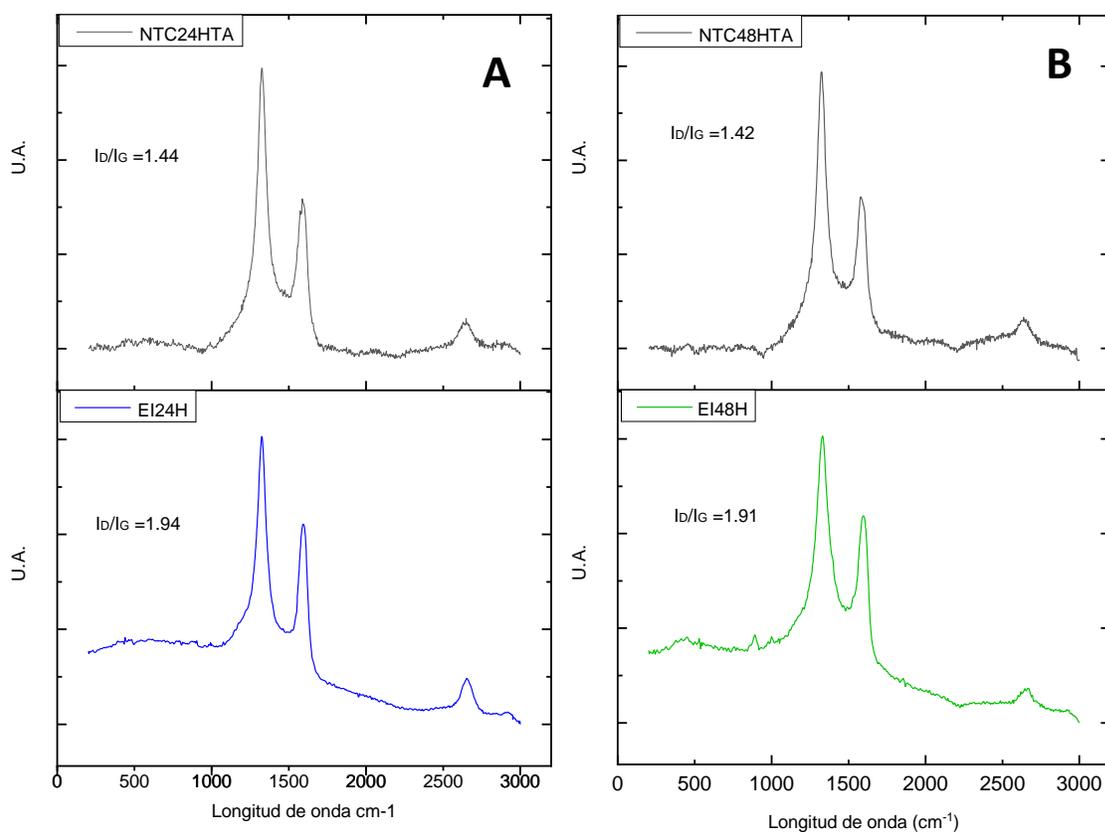
Figura 42. Potencial Zeta en solución buffer de fosfatos y pH de 5.5. A) MWCNTs térmicamente tratados y funcionalizados y B) Con enzima LiP inmovilizada sobre MWCNTs.

En los todos los casos de la enzima LiP inmovilizada el potencial zeta se encuentra por debajo del valor absoluto 15 mV, por lo que la tendencia será disminuir su dispersibilidad por la repulsión eléctrica entre el complejo de NTC- enzima es mínima, por lo que puede precipitar fácilmente [106].

En la Figura 43 se pueden observar los espectros Raman para los NTC funcionalizados y con enzima inmovilizada para cada tiempo de contacto de 24, 48 y 80 horas. Las bandas D y G permanecen posterior a la inmovilización de la enzima, pero en comparación con los espectros de los nanotubos funcionalizados presentan alta luminiscencia espectral en las primeras longitudes de onda para cada caso, presentándose una diferencia significativa en el índice ID/IG esto es atribuido a la presencia de la enzima LiP sobre los nanotubos de carbono, el mismo

comportamiento se ha presentado en el trabajo presentado por Romero et.al. sobre nanoestructuras de carbono y extracto enzimático [107].

Se realizó una caracterización SEM para observar la morfología de los nanotubos y confirmar la inmovilización de la enzima sobre su superficie para los diversos tratamientos de oxidación. La Figura 44 muestra SEM de los nanotubos de carbono funcionalizados, donde no se observa la presencia de material amorfo, una vez efectuado el enlace covalente la enzima inmovilizada se presenta como masas granulosas cubriendo la estructura de los nanotubos para todos los tratamientos con ácidos.



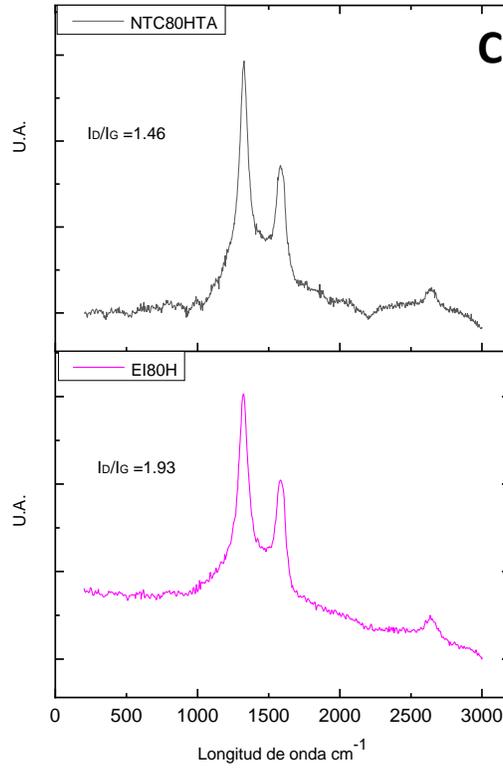
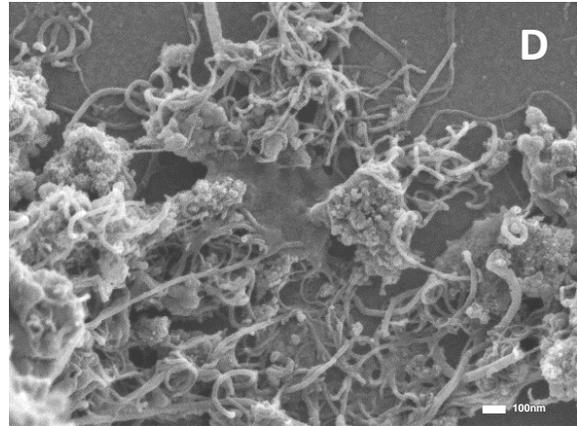
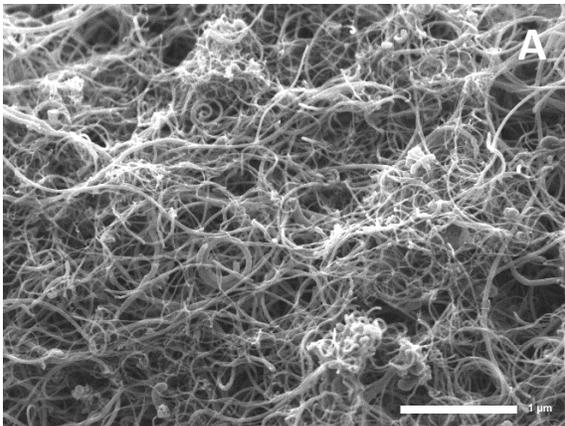


Figura 43. Espectros Raman comparativos de MWCNTs con tratamiento ácido y enzima LiP inmovilizada para tratamiento con mezcla ácida a) 24 horas, B) 48 horas y C) 80 horas.



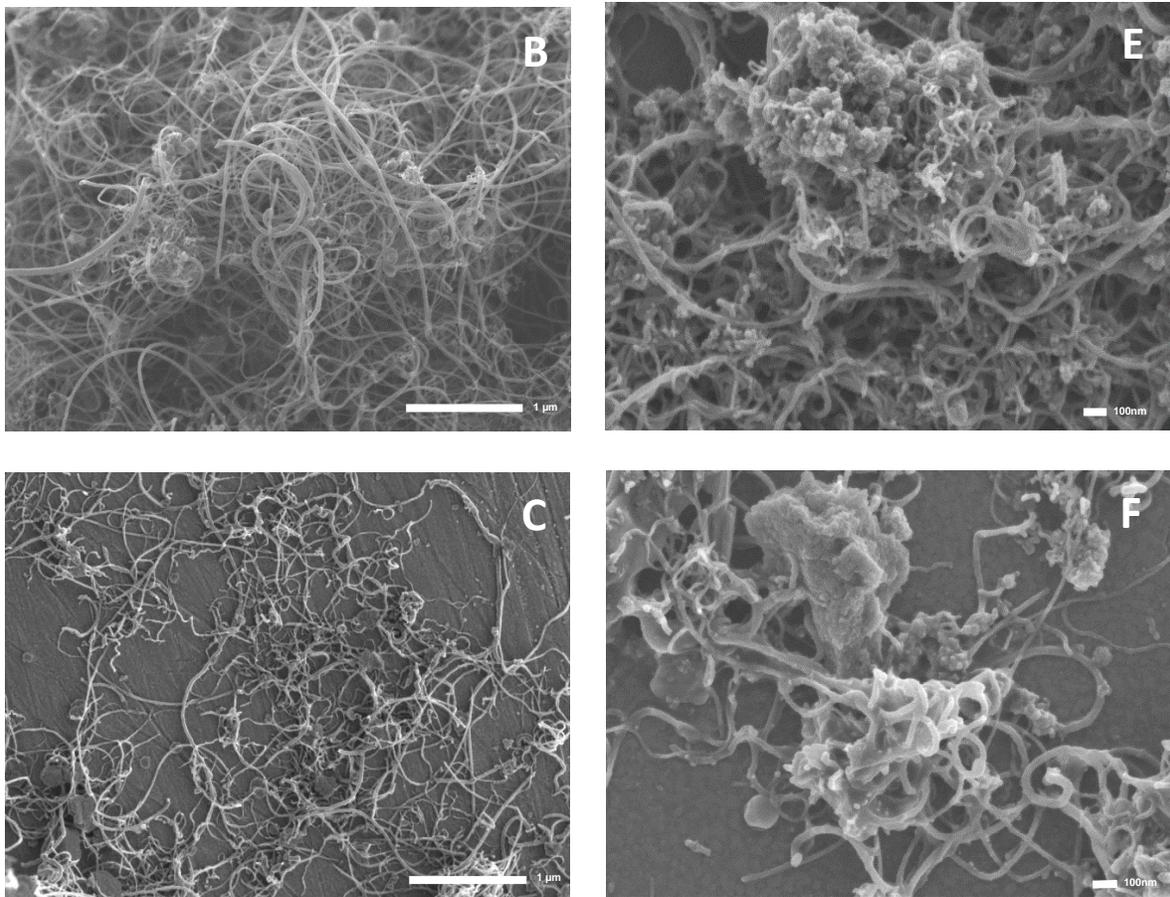


Figura 44. Análisis SEM para NTC con tiempo de contacto de tratamiento ácido A) 24 horas, B) 48 horas y C) 80 horas. Enzima inmovilizada sobre nanotubos funcionalizados D) 24 horas, E) 48 horas y F) 80 horas.

13.7 Tratamiento de nopal con enzima LiP inmovilizada

La caracterización de la lignina es comúnmente efectuada en la región mid-IR, la cual corresponde a una radiación electromagnética con longitudes de onda entre 4000 a 400 cm^{-1} . La penetración de las ondas IR dentro de muestra es muy pequeña, por lo que la espectroscopia FTIR es un método poderoso para determinar los grupos funcionales presentes solo en la superficie de la muestra [108].

En la Figura 45 se presenta los espectros FTIR normalizados y línea base para la muestra de nopal con nanotubos sin enzima y con enzima inmovilizada sobre NTC con 48 h de tiempo de contacto de oxidación. Al igual que los datos reportados en los estudios de Carmen-Mihaela Popescu [109], el espectro de la lignina evidencia

dos regiones importantes tales como bandas entre 3700 a 2750 cm^{-1} asignadas a grupos OH de agua absorbida físicamente o de enlaces en grupos alifáticos o aromáticos, también como grupos metilo, y las bandas en la región $1800 - 900\text{ cm}^{-1}$ principalmente a unidades estructurales de guaicil y siringil, así como otros grupos funcionales, es de notar que la lignina es un sistema complejo, por lo que las bandas de absorción de algunos grupos funcionales se superponen.

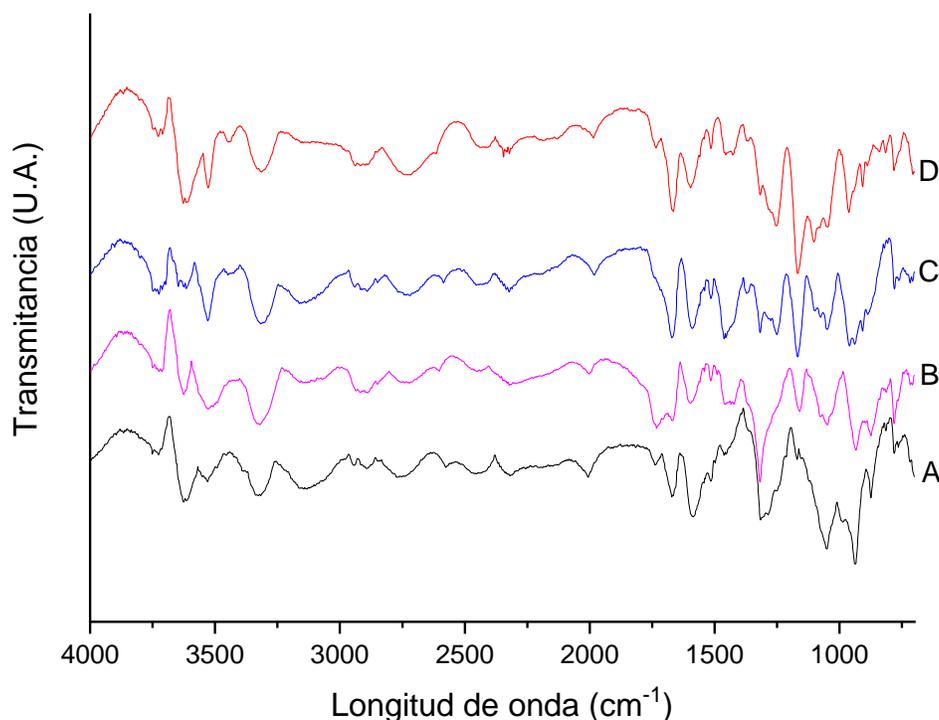


Figura 45. Espectros FTIR de solución de nopal posterior tratamiento para A) 0 h, B) 24 h y D) 72 h con enzima LiP inmovilizada sobre MWCNT de 48 h de tratamiento ácido.

Los cambios observados en los espectros FTIR por la degradación del nopal en la disminución de las bandas alrededor de 876 , 935 , 1736 cm^{-1} las cuales están relacionadas con unidades guaicil y siringil y cetonas sin combinación, estas señales se muestran en la Tabla 9. Con base a Cornwell et.al. [60] la disminución de las señales es debido a el rompimiento de enlaces en las unidades formadoras de siringil, guaicil y p-cumaril, las reacciones catalizadas por la enzima LiP incluyen la división de las cadenas laterales de propileno $\alpha\text{-C}\beta$ en la lignina; la hidroxilación

de los grupos metileno bencílicos; la oxidación de los alcoholes bencílicos correspondientes a aldehídos y cetonas; la oxidación de fenoles y cadenas aromáticas de compuestos no fenólicos.

Tabla 9. *Bandas de FTIR para el tratamiento con enzima LiP de solución de nopal.*

Banda (cm⁻¹)				Descripción	Referencia
0 h	24 h	48 h	72 h		
876	875	884	884	Deformación C-H fuera de plano posición 2,5 y 6 de G	[109]–[111]
935	935	939	941	Deformación C-H fuera del plano del anillo aromático G-S	[109], [110]
1169	1163	1167	1167	Alargamiento C-H en anillo aromático G	[108], [110]
1248	-	1250	1250	Anillo de sirigil y alargamiento C-O en lignina	[109], [110]
1315	1315	1318	1317	Vibración C1-O en derivados S	[109]
1463	1459	1461	1455	Esqueleto aromático combinado con deformación C-H en plano y alargamiento -OCH ₃	[109]–[111]
1590	1600	1592	1594	Alargamiento C=C del anillo aromático en S y deformación C-H	[110]
1667	1667	1670	1666	Alargamiento C=C del anillo conjugado de alcohol coniferil /Sinapil	[108]
1736	1738	1740	1734	C=O sin conjugar en cetonas sin conjugación	[109]
2893	2890	2890	2893	Alargamiento C-H en O-CH ₃ metoxil	[108]–[110]
3327	3323	3315	3313	Alargamiento O-H	[108], [110], [112]
3550	3527	3527	3526	Alargamiento O-H	[108], [110], [112]
3662	3626	3622	3622	Alargamiento O-H	[108], [110], [112]

G- Guaiacil, S- Siringil.

Como se muestra en la Figura 46 la espectroscopía UV-Vis de las muestras de nopal fueron tomadas a 205 nm para determinar el efecto de la enzima LiP sobre el sustrato, en variación tiempo de degradación de 0, 24, 48 y 72 horas. Todos los espectros tienen una alta absorbancia en 230 nm atribuida a cambios ocurridos en la estructura de la lignina tales como rompimiento de enlaces carbono-carbono y la señal centrada a 277 nm esta asignada a estructuras fenólicas no conjugadas de la lignina, se observa que los tratamientos enzimáticos tienen un efecto sobre esta señal, para presentar el nivel más bajo a las 24 h, y posteriormente aumentar para 48 y 72 horas, superando el valor de la absorbancia de control a tiempo cero para el último tratamiento, los incrementos son atribuidas a nuevas estructuras fenólicas generadas durante la despolimerización de la lignina, esto indica que la enzima LiP puede romper los enlaces β -O-4 para generar fenoles sin conjugar en la lignina

soluble en estructuras principalmente de siringil y guaicil por rompimiento de anillos aromáticos y grupos metoxi como se observa en la Figura 47 [113], [114]. Para todos los tratamientos se observa un aumento en la señal de 339 nm que está relacionada con estructuras fenólicas conjugadas que resultan de la degradación y liberación de nuevas capas de la lignina para estructuras de siringil, guaicil y cumaril [108].

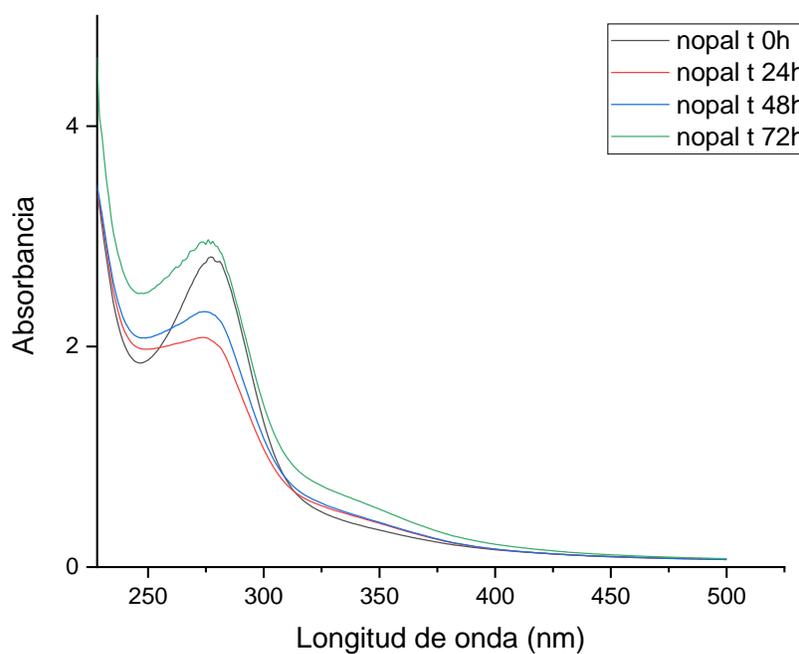


Figura 46. Espectro UV-Vis a 205 nm, para lignina soluble con enzima inmovilizada sobre nanotubos de carbono de 48 horas de oxidación, para tiempos de degradación de 0, 24, 48 y 72 horas, a pH de 5, temperatura de 35.5 °C y agitación constante.

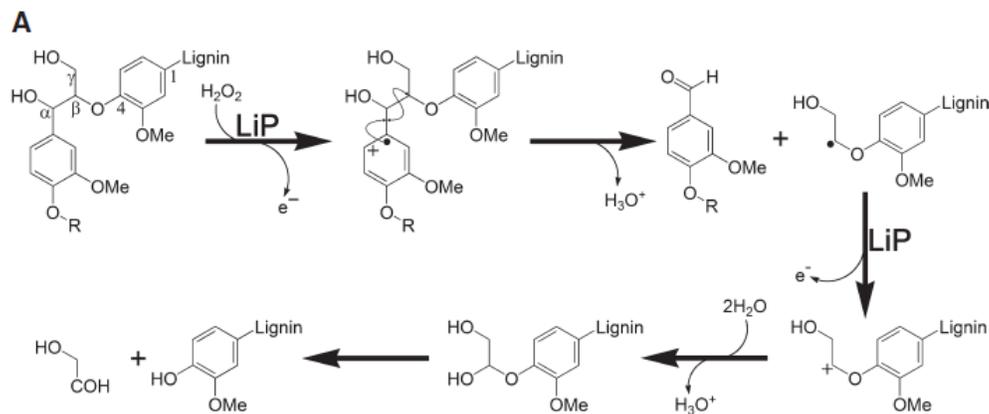


Figura 47. Ruta metabólica de la enzima LiP sobre estructura G-S.

14 Conclusiones

La producción de los nanotubos depende de varios factores tales como el tipo de catalizador, su estado de oxidación, la temperatura y el gas reductor. En este proyecto la mezcla metálica de Fe:Ni en una relación 3:1 comprobó se efectiva para la producción de MWCNTs, las pruebas de TGA confirman que durante su calcinación hasta los 650°C se obtienen los estados de oxidación de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄, que a través de su reducción utilizando gas H₂/N₂ se resultan los estados metálicos necesarios para el crecimiento de NTC por método de CVD.

Los nanotubos producidos muestran un diámetro promedio de 20 a 30 nm con algunas fibras mayores de 100 nm, a través de análisis de espectroscopia Raman muestran una buena señal gráfica (G'), que posterior al tratamiento ácido se reduce ligeramente mostrando el daño en la estructura de los enlaces sp² característica de los NTC.

La técnica de funcionalización de los MWCNTs mediante ácidos concentrados H₂SO₄:HNO₃ en una relación 3:1 en baño ultrasónico durante 3 horas y 60°C, con periodos de contacto variable de 24, 48 y 80 permite la obtención de grupos oxigenados sobre su superficie, lo cual se corrobora en las pruebas de espectroscopia Raman, FTIR y XPS. Demostrando que esta técnica ha demostrado ser eficiente, pero al mismo tiempo produce el rompimiento de los nanotubos, con

potenciales zeta mayores a 15 mV en todos los tratamientos lo que se asegura su dispersión por repulsión eléctrica en solución.

Mediante la técnica de XPS se pudo identificar y cuantificar la composición de los MWCNTs antes y después de su funcionalización, donde resulta características las curvas de los enlaces C=C de la red de los nanotubos, y esta se reduce para el último nivel de tratamiento de 80 horas y un aumento en la señal C-C lo que indica que la estructura ha sufrido un daño superior produciendo hibridaciones sp³ y una gran cantidad de vacancias. Observándose las mejores señales de enlaces C-OH y C-O y O-C=O para los tratamientos de 24 y 48 horas.

Por la técnica de XPS resulta difícil la identificación de los enlaces de los metales Fe y Ni, que son identificadas en formas de óxidos para las curvas O 1s, donde llegan a niveles muy bajos posterior a las 80 horas de tratamiento ácido, debido a que una de las funciones de los ácidos es la disolución de los metales y sílice de las estructuras de los nanotubos. Los residuales metálicos resultan importantes debido a que su presencia permite la recuperación del complejo enzimático-NTC posterior a las pruebas por la aplicación de un magneto.

Durante las pruebas de inmovilización resultó que la enzima presentaba mayor grado de inmovilización en nanotubos sin funcionalizar, esto debido a fenómeno de adsorción sobre la superficie de estos y la gran área superficial que posee el soporte, pero al desarrollar las pruebas de actividad la enzima demuestra incluso ser menos eficiente en la degradación del alcohol veratrílico en comparación a la enzima libre. Por lo que no resulta viable, además de ser un proceso en el que rápidamente se perderá de la superficie del soporte.

La LiP en condiciones de inmovilización covalente demuestra mayor termoestabilidad al presentar mejor desempeño en su actividad en condiciones de ligera acidez (pH 5.5.) y temperatura de 35 °C para los MWCNTs funcionalizados con 48 h en comparación con la enzima libre lo anterior debido a la modificación física que ocurre en la estructura enzima durante la inmovilización. Durante las pruebas sobre la muestra de nopal se demuestra que en un lapso de 24 horas se logra la degradación de las primeras capas de la lignina, para horas posteriores de

48 y 72 se logra mayor ruptura de las estructuras sobre enlaces de unión entre las unidades de siringil y guaicil de la misma, lo anterior con base en los resultados obtenidos de las pruebas UV-Vis y espectroscopía Raman. Las pruebas demuestran que la inmovilización de la enzima LiP en MWCNTs que no superan un tratamiento mayor a las 48 h de exposición con ácidos concentrados logra resultados favorables como pretratamiento del material lignocelulósico (nopal) en la reducción de la lignina para mejorar la eficiencia de tratamientos de degradación biológica para la producción de biocombustibles permitiendo mayor accesibilidad a las estructuras de celulosa.

15 Perspectivas

La enzima LiP es dependiente de H_2O_2 para poder realizar la catálisis, por lo que resulta importante la evaluación de la cinética de la enzima a diversas concentraciones de H_2O_2 , con la finalidad de evitar la formación del compuesto III y obtener una enzima catalíticamente inactiva, lo anterior complementado con estudios cromatográficos para conocer los compuestos que se promueven en cada concentración.

Para conocer el impacto que tiene el pretratamiento enzimático en el material lignocelulósico (nopal) en la producción de biocombustibles, se recomienda aplicar una evaluación de la concentración de celulosa disponible en las etapas de fermentación, así como la calidad y volumen de gases formados.

Actualmente la determinación de fenoles en aguas naturales, residuales domésticas, industriales y tratadas, está basada en una técnica colorimétrica. Las enzimas LiP inmovilizadas sobre nanotubos de carbono, pueden ser también utilizados en la preparación de un sensor en la determinación que grupos fenólicos, lo cual reducirá el tiempo de determinación y el uso de compuestos tóxicos.

16 Referencias

- [1] L. Pollegioni, F. Tonin, and E. Rosini, "Lignin-degrading enzymes," *FEBS J.*, vol. 282, no. 7, pp. 1190–1213, Apr. 2015, doi: 10.1111/febs.13224.
- [2] O. O. Kuloyo, J. C. du Preez, M. del P. García-Aparicio, S. G. Kilian, L. Steyn, and J. Görgens, "Opuntia ficus-indica cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, no. 12, pp. 3173–3183, Dec. 2014, doi: 10.1007/s11274-014-1745-6.
- [3] S. Carmen *et al.*, *Agro-industrial utilization of cactus pear*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.
- [4] A. Zoghiami and G. Paës, "Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis," *Front. Chem.*, vol. 7, no. 874, Dec. 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00874.
- [5] C. Wan and Y. Li, "Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass," *Biotechnology Advances*. 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.003.
- [6] A. O. Falade, U. U. Nwodo, B. C. Iweriebor, E. Green, L. V. Mabinya, and A. I. Okoh, "Lignin peroxidase functionalities and prospective applications," *Microbiology Open*. 2017, doi: 10.1002/mbo3.394.
- [7] A. T. Martinez *et al.*, "Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin," *Int. Microbiol.*, vol. 8, pp. 195–204, Oct. 2005.
- [8] S. F. Oliveira, J. M. R. da Luz, M. C. M. Kasuya, L. O. Ladeira, and A. Correa Junior, "Enzymatic extract containing lignin peroxidase immobilized on carbon nanotubes: Potential biocatalyst in dye decolourization," *Saudi J. Biol. Sci.*, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.018.
- [9] N. M. Mubarak *et al.*, "Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 107, pp. 124–131, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.molcatb.2014.06.002.
- [10] W. Feng and P. Ji, "Enzymes immobilized on carbon nanotubes.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 889–95, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.007.
- [11] S. A. Ansari and Q. Husain, "Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 512–23, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.005.
- [12] A. Reyhani, S. Z. Mortazavi, A. Nozad Golikand, A. Z. Moshfegh, and S. Mirershadi, "The effect of various acids treatment on the purification and electrochemical hydrogen storage of multi-walled carbon nanotubes," *J. Power Sources*, vol. 183, no. 2, pp. 539–543, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.jpowsour.2008.05.039.

- [13] G. A. Rivas *et al.*, “Carbon nanotubes for electrochemical biosensing,” *Talanta*, vol. 74, no. 3, pp. 291–307, 2007, doi: 10.1016/j.talanta.2007.10.013.
- [14] Q. Mu *et al.*, “Protein Binding by Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes Is Governed by the Surface Chemistry of Both Parties and the Nanotube Diameter,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 9, pp. 3300–3307, 2008, doi: 10.1021/jp710541j.
- [15] D. Tasis, N. Tagmatarchis, A. Bianco, and M. Prato, “Chemistry of Carbon Nanotubes,” *Chem. Rev.*, vol. 106, no. 3, pp. 1105–1136, Mar. 2006, doi: 10.1021/cr050569o.
- [16] Y. Yan *et al.*, “Carbon nanotube catalysts: recent advances in synthesis, characterization and applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 10, pp. 3295–346, 2015, doi: 10.1039/c4cs00492b.
- [17] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhuas, and P. Avouris, *Carbon nanotubes: Synthesis, structure, properties and applications*, 1st ed. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.
- [18] K. Koziol, B. O. Boskovic, and N. Yahya, “Synthesis of Carbon Nanostructures by CVD Method,” *Carbon and Oxide Nanostructures*, pp. 23–49, 2010, doi: 10.1007/8611_2010_12.
- [19] N. Saifuddin, A. Z. Raziah, and A. R. Junizah, “Carbon nanotubes: A review on structure and their interaction with proteins,” *J. Chem.*, 2013, doi: 10.1155/2013/676815.
- [20] A. G. Mamalis, L. O. G. Vogtländer, and A. Markopoulos, “Nanotechnology and nanostructured materials: Trends in carbon nanotubes,” *Precis. Eng.*, vol. 28, no. 1, pp. 16–30, 2004, doi: 10.1016/j.precisioneng.2002.11.002.
- [21] C.-H. Liu, Y.-Y. Liu, Y.-H. Zhang, R.-R. Wei, and H.-L. Zhang, “Tandem extraction strategy for separation of metallic and semiconducting SWCNTs using condensed benzenoid molecules: effects of molecular morphology and solvent,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 11, no. 33, pp. 7257–7267, 2009, doi: 10.1039/B901517E.
- [22] A. Aqel, K. M. M. A. El-Nour, R. A. A. Ammar, and A. Al-Warthan, “Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation,” *Arab. J. Chem.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–23, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.ARABJC.2010.08.022.
- [23] R. Purohit, K. Purohit, S. Rana, R. S. Rana, and V. Patel, “Carbon Nanotubes and Their Growth Methods,” *Procedia Mater. Sci.*, vol. 6, pp. 716–728, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.MSPRO.2014.07.088.
- [24] R. Vidu, M. Rahman, M. Mahmoudi, M. Enachescu, T. D. Poteca, and I. Opris, “Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation,” *Front. Syst. Neurosci.*, vol. 8, p. 91, 2014, doi: 10.3389/fnsys.2014.00091.
- [25] N. Saifuddin, A. Z. Raziah, and A. R. Junizah, “Carbon nanotubes: a review

- on structure and their interaction with proteins,” *J. Chem.*, vol. 2013, pp. 1–18, 2012, doi: 10.1155/2013/676815.
- [26] K. A. Shah and B. A. Tali, “Synthesis of carbon nanotubes by catalytic chemical vapour deposition: A review on carbon sources, catalysts and substrates,” *Mater. Sci. Semicond. Process.*, vol. 41, pp. 67–82, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.mssp.2015.08.013.
- [27] P. Serp and J. L. Figueiredo, *Carbon Materials for Catalysis*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.
- [28] M. Chernysheva *et al.*, “Carbon nanotubes for ultrafast fibre lasers,” *Nanophotonics*, vol. 6, no. 1, pp. 1–30, 2017, doi: 10.1515/nanoph-2015-0156.
- [29] M. Wilson, K. Kannangara, G. Smith, M. Simmons, and B. Raguse, *NANOTECHNOLOGY: Basic Science and Emerging Technologies*. CRC Press Company, 2002.
- [30] V. N. Popov, “Carbon nanotubes: properties and application,” *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 43, no. 3, pp. 61–102, Jan. 2004, doi: 10.1016/J.MSER.2003.10.001.
- [31] G. D. Nessim, “Properties, synthesis, and growth mechanisms of carbon nanotubes with special focus on thermal chemical vapor deposition.,” *Nanoscale*, vol. 2, no. 8, pp. 1306–1323, 2010, doi: 10.1039/b9nr00427k.
- [32] N. M. Mubarak, F. Yusof, and M. F. Alkhatib, “The production of carbon nanotubes using two-stage chemical vapor deposition and their potential use in protein purification,” *Chem. Eng. J.*, vol. 168, no. 1, pp. 461–469, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cej.2011.01.045.
- [33] S. M. Toussi, A. Fakhru’l-Razi, C. A. Luqman, and A. R. Suraya, “Optimization of Synthesis Condition for Carbon Nanotubes by Catalytic Chemical Vapor Deposition (CCVD),” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 17, p. 012003, Feb. 2011, doi: 10.1088/1757-899X/17/1/012003.
- [34] V. Jourdain and C. Bichara, “Current understanding of the growth of carbon nanotubes in catalytic chemical vapour deposition,” *Carbon*, vol. 58. Elsevier, pp. 2–39, 2013, doi: 10.1016/j.carbon.2013.02.046.
- [35] L. M. Hoyos-Palacio, A. G. García, J. F. Pérez-Robles, J. González, and H. V. Martínez-Tejada, “Catalytic effect of Fe, Ni, Co and Mo on the CNTs production,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 59, p. 012005, Jun. 2014, doi: 10.1088/1757-899X/59/1/012005.
- [36] M. Kumar and Y. Ando, “Chemical Vapor Deposition of Carbon Nanotubes: A Review on Growth Mechanism and Mass Production,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 6, pp. 3739–3758, 2010, doi: 10.1166/jnn.2010.2939.
- [37] K. B. . Teo, C. Singh, M. Chhowlla, and W. I. Milne, “Catalytic Synthesis of Carbon Nanotubes and Nanofibers,” *Encyclopedia of Nanoscience and*

Nanotechnology. American Scientific Publishers, pp. 1–22, 2003.

- [38] D. Méhn, A. Fonseca, G. Bister, and J. . Nagy, “A comparison of different preparation methods of Fe/Mo/Al₂O₃ sol–gel catalyst for synthesis of single wall carbon nanotubes,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 393, no. 4–6, pp. 378–384, Aug. 2004, doi: 10.1016/J.CPLETT.2004.06.071.
- [39] G. Allaedini, S. M. Tasirin, P. Aminayi, Z. Yaakob, and M. Z. Meor Talib, “Carbon nanotubes via different catalysts and the important factors that affect their production: A review on catalyst preferences,” *Int. J. Nano Dimens.*, vol. 7, no. 3, pp. 186–200, 2016, doi: 10.7508/ijnd.2016.03.002.
- [40] Y. Shirazi, M. A. Tofighy, T. Mohammadi, and A. Pak, “Effects of different carbon precursors on synthesis of multiwall carbon nanotubes: Purification and Functionalization,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 16, pp. 7359–7367, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.apsusc.2011.03.146.
- [41] V. B. Agbor, N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin, and D. B. Levin, “Biomass pretreatment: Fundamentals toward application,” *Biotechnology Advances*, vol. 29, no. 6. pp. 675–685, 2011, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005.
- [42] Y. Zheng, J. Zhao, F. Xu, and Y. Li, “Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production,” *Progress in Energy and Combustion Science*, vol. 42, no. 1. pp. 35–53, 2014, doi: 10.1016/j.peccs.2014.01.001.
- [43] D. L. Gall, J. Ralph, T. J. Donohue, and D. R. Noguera, “Biochemical transformation of lignin for deriving valued commodities from lignocellulose,” *Current Opinion in Biotechnology*. 2017, doi: 10.1016/j.copbio.2017.02.015.
- [44] H. V. Lee, S. B. A. Hamid, and S. K. Zain, “Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process,” *Sci. World J.*, 2014, doi: 10.1155/2014/631013.
- [45] H. Lange, S. Decina, and C. Crestini, “Oxidative upgrade of lignin - Recent routes reviewed,” 2013, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2013.03.002.
- [46] S. P. S. Chundawat, G. T. Beckham, M. E. Himmel, and B. E. Dale, “Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals,” *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, 2011, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205.
- [47] E. Shirkavand, S. Baroutian, D. J. Gapes, and B. R. Young, “Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment - A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016, doi: 10.1016/j.rser.2015.10.003.
- [48] V. K. Ponnusamy *et al.*, “A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential,” *Bioresource Technology*. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.070.
- [49] A. Kumar and R. Chandra, “Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment,” *Heliyon*. 2020, doi:

10.1016/j.heliyon.2020.e03170.

- [50] R. M. Peralta, B. P. da Silva, R. C. Gomes Côrrea, C. G. Kato, F. A. Vicente Seixas, and A. Bracht, "Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology," in *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, 2017.
- [51] T. Furukawa, F. O. Bello, and L. Horsfall, "Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation," *Front. Biol. (Beijing)*, vol. 9, no. 6, pp. 448–471, 2014, doi: 10.1007/s11515-014-1336-9.
- [52] M. R. G. S. Chandra and M. Madakka, "Comparative biochemistry and kinetics of microbial lignocellulolytic enzymes," in *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 2018.
- [53] P. Chowdhary, G. Shukla, G. Raj, L. F. R. Ferreira, and R. N. Bharagava, "Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research," *SN Appl. Sci.*, 2019, doi: 10.1007/s42452-018-0046-3.
- [54] A. M. Carmona-Ribeiro, T. Prieto, and I. L. Nantes, "Nanostructures for peroxidases," *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2015, doi: 10.3389/fmolb.2015.00050.
- [55] A. Ravichandran and M. Sridhar, "Insights into the mechanism of lignocellulose degradation by versatile peroxidases," *Curr. Sci.*, 2017, doi: 10.18520/cs/v113/i01/35-42.
- [56] D. Salvachúa *et al.*, "Versatile peroxidase as a valuable tool for generating new biomolecules by homogeneous and heterogeneous cross-linking," *Enzyme Microb. Technol.*, 2013, doi: 10.1016/j.enzmictec.2013.03.010.
- [57] R. Chandra, V. Kumar, and S. Yadav, "Extremophilic ligninolytic enzymes," in *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*, R. K. Sani and R. Navanietha Krishnaraj, Eds. Springer International Publishing, 2017.
- [58] R. Datta *et al.*, "Enzymatic degradation of lignin in soil: A review," *Sustain.*, 2017, doi: 10.3390/su9071163.
- [59] D. W. S. Wong, "Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes," *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, doi: 10.1007/s12010-008-8279-z.
- [60] K. L. Cornwell, M.-F. Tinland-Butez, P. J. Tardone, I. Cabasso, and K. E. Hammel, "Lignin degradation and lignin peroxidase production in cultures of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous ceramic supports," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 12, no. 12, pp. 916–920, 1990, doi: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90109-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90109-4).
- [61] C. Wan and Y. Li, "Solid-state biological pretreatment of lignocellulosic biomass," in *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*,

SpringerBr., Springer, Dordrecht, 2013, pp. 67–86.

- [62] A. Conesa, P. J. Punt, and C. A. M. J. J. Van Den Hondel, “Fungal peroxidases: Molecular aspects and applications,” *J. Biotechnol.*, 2002, doi: 10.1016/S0168-1656(01)00394-7.
- [63] F. J. Ruiz-Dueñas and Á. T. Martínez, “Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this,” *Microbial Biotechnology*. 2009, doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x.
- [64] L. Stobinski *et al.*, “Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods,” *J. Alloys Compd.*, vol. 501, no. 1, pp. 77–84, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.jallcom.2010.04.032.
- [65] N. G. Graebin, J. da N. Schöffler, D. de Andrades, P. F. Hertz, M. A. Z. Ayub, and R. C. Rodrigues, “Immobilization of Glycoside Hydrolase Families GH1, GH13, and GH70: State of the Art and Perspectives,” *Molecules*, vol. 21, no. 8, 2016.
- [66] J. M. Walker and R. Rapley, *Molecular Biology and Biotechnology*, 5th ed. UK: RCS Publishing, 2009.
- [67] A. Othman, A. Karimi, and S. Andreescu, “Functional nanostructures for enzyme based biosensors: properties{,} fabrication and applications,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 45, pp. 7178–7203, 2016, doi: 10.1039/C6TB02009G.
- [68] W. Huang *et al.*, “Attaching Proteins to Carbon Nanotubes via Diimide-Activated Amidation,” *Nano Lett.*, vol. 2, no. 4, pp. 311–314, Apr. 2002, doi: 10.1021/nl010095i.
- [69] M. Bilal *et al.*, “Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review,” *Sci. Total Environ.*, vol. 576, pp. 646–659, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2016.10.137.
- [70] Y. Gao and I. Kyratzis, “Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide--a critical assessment.,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 10, pp. 1945–1950, 2008, doi: 10.1021/bc800051c.
- [71] D. Niznansky, N. Viart, and J. L. Rehspringer, “Nanocomposites Fe₂O₃/SiO₂-preparation by sol-gel method and physical properties,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 8, no. 1, pp. 615–618, Feb. 1997, doi: 10.1007/BF02436910.
- [72] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1, pp. 248–254, 1976, doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

- [73] O. Derkacheva and D. Sukhov, "Investigation of lignins by FTIR spectroscopy," in *Macromolecular Symposia*, 2008, vol. 265, no. 1, pp. 61–68, doi: 10.1002/masy.200850507.
- [74] O. A. Cortez, F. J. Moura, E. de Albuquerque Brocchi, R. N. C. de Siqueira, and R. F. M. de Souza, "Fe-Ni Alloy Synthesis Based on Nitrates Thermal Decomposition Followed by H₂ Reduction," *Metall. Mater. Trans. B*, vol. 45, no. 6, pp. 2033–2039, 2014, doi: 10.1007/s11663-014-0221-x.
- [75] Z. H. Zhou, J. M. Xue, J. Wang, H. S. O. Chan, T. Yu, and Z. X. Shen, "NiFe₂O₄ nanoparticles formed in situ in silica matrix by mechanical activation," *J. Appl. Phys.*, vol. 91, no. 9, pp. 6015–6020, Apr. 2002, doi: 10.1063/1.1462853.
- [76] K. Wieczorek-Ciurowa and A. J. Kozak, "The thermal decomposition of Fe(NO₃)₃·9H₂O," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 58, pp. 647–651, 1999, doi: 10.1063/1.3253104.
- [77] M. A. A. Elmasry, A. Gaber, and E. M. H. Khater, "Thermal decomposition of Ni(II) and Fe(III) nitrates and their mixture," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 52, no. 2, pp. 489–495, 1998, doi: Doi 10.1023/A:1010155203247.
- [78] P. A. Sheena, P. K P, A. Nedumkallel, B. Sabu, T. Varghese, and M. E S Asmabi, "EFFECT OF CALCINATION TEMPERATURE ON THE STRUCTURAL AND OPTICAL PROPERTIES OF NICKEL OXIDE NANOPARTICLES," vol. 5, 2014.
- [79] P. R. Palacios, L. De Los Santos Valladares, A. Bustamante, and J. C. GonzÁlez, "Estudio de la deshidroxilaciÃ³n en el Ã³xido hidratado denominado limonita," *Rev. la Soc. QuÃmica del PerÃ*, vol. 78, pp. 198–207, 2012, [Online]. Available: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000300006&nrm=iso.
- [80] S. Ponce-Castañeda, J. R. Martínez, S. Palomares-Sánchez, F. Ruiz, O. Ayala-Valenzuela, and J. A. Matutes-Aquino, "Infrared spectroscopy analysis of oxyhydroxides as intermediate species in the formation of iron oxides-silica xerogels," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 27, no. 3, pp. 247–254, 2003, doi: 10.1023/A:1024009916120.
- [81] T. Belin and F. Epron, "Characterization methods of carbon nanotubes: A review," *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, vol. 119, no. 2, pp. 105–118, 2005, doi: 10.1016/j.mseb.2005.02.046.
- [82] J. H. Lehman, M. Terrones, E. Mansfield, K. E. Hurst, and V. Meunier, "Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes," *Carbon N. Y.*, vol. 49, no. 8, pp. 2581–2602, 2011, doi: 10.1016/j.carbon.2011.03.028.
- [83] R. A. DiLeo, B. J. Landi, and R. P. Raffaele, "Purity assessment of multiwalled

- carbon nanotubes by Raman spectroscopy," *J. Appl. Phys.*, vol. 101, no. 6, 2007, doi: 10.1063/1.2712152.
- [84] L. Bokobza and J. Zhang, "Raman spectroscopic characterization of multiwall carbon nanotubes and of composites," *Express Polym. Lett.*, vol. 6, no. 7, pp. 601–608, 2012, doi: 10.3144/expresspolymlett.2012.63.
- [85] S. Costa, "Characterization of carbon nanotubes by Raman spectroscopy," *Mater Sci ...*, vol. 26, no. 2, pp. 1–9, 2008, doi: 10.1155/2010/603978.
- [86] E. R. Edwards, E. F. Antunes, E. C. Botelho, M. R. Baldan, and E. J. Corat, "Evaluation of residual iron in carbon nanotubes purified by acid treatments," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 2, pp. 641–648, 2011, doi: 10.1016/j.apsusc.2011.07.032.
- [87] X.-M. Sui, S. Giordani, M. Prato, and H. D. Wagner, "Effect of carbon nanotube surface modification on dispersion and structural properties of electrospun fibers," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 95, no. 23, p. 233113, Dec. 2009, doi: 10.1063/1.3272012.
- [88] T. L. do A. Montanheiro, F. H. Cristóvan, J. P. B. Machado, D. B. Tada, N. Durán, and A. P. Lemes, "Effect of MWCNT functionalization on thermal and electrical properties of PHBV/MWCNT nanocomposites," *J. Mater. Res.*, vol. 30, no. 1, pp. 55–65, 2015, doi: DOI: 10.1557/jmr.2014.303.
- [89] J. Wei, W. Sun, W. Pan, X. Yu, G. Sun, and H. Jiang, "Comparing the effects of different oxygen-containing functional groups on sulfonamides adsorption by carbon nanotubes: Experiments and theoretical calculation," *Chem. Eng. J.*, vol. 312, pp. 167–179, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.133>.
- [90] K. Jiang, L. S. Schadler, R. W. Siegel, X. Zhang, H. Zhang, and M. Terrones, "Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation," *J. Mater. Chem.*, vol. 14, no. 1, p. 37, 2004, doi: 10.1039/b310359e.
- [91] N. Nosbi and H. M. Akil, "Controlling the number of walls in multi walled carbon nanotubes/alumina hybrid compound via ball milling of precipitate catalyst," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 340, pp. 78–88, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.APSUSC.2015.02.095.
- [92] T. A. Saleh, "The influence of treatment temperature on the acidity of MWCNT oxidized by HNO₃ or a mixture of HNO₃/H₂SO₄," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 17, pp. 7746–7751, 2011, doi: 10.1016/j.apsusc.2011.04.020.
- [93] H. Sadegh *et al.*, "Synthesis of MWCNT-COOH-Cysteamine composite and its application for dye removal," *J. Mol. Liq.*, 2016, doi: 10.1016/j.molliq.2015.12.042.
- [94] S. Mallakpour and A. Nezamzadeh Ezhieh, "Preparation of polystyrene/MWCNT-Valine composites: Investigation of optical, morphological, thermal, and electrical conductivity properties," *Polym. Adv.*

Technol., 2018, doi: 10.1002/pat.4229.

- [95] M. Aslam, G. P. Torrence, E. G. Zey, and Hoechst Celanese Corporation, "Esterification," in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, vol. 10, no. 10, 2010, pp. 471–496.
- [96] J. Otera and J. Nishikido, *Esterification*. John Wiley & Sons, 2009.
- [97] S. Liang, G. Li, and R. Tian, "Multi-walled carbon nanotubes functionalized with a ultrahigh fraction of carboxyl and hydroxyl groups by ultrasound-assisted oxidation," *J. Mater. Sci.*, vol. 51, Apr. 2016, doi: 10.1007/s10853-015-9671-z.
- [98] C. Liu *et al.*, "Binary nickel iron phosphide composites with oxidized surface groups as efficient electrocatalysts for the oxygen evolution reaction †," Nov. 2019.
- [99] T. I. T. Okpalugo, P. Papakonstantinou, H. Murphy, J. McLaughlin, and N. M. D. Brown, "High resolution XPS characterization of chemical functionalised MWCNTs and SWCNTs," *Carbon N. Y.*, vol. 43, no. 1, pp. 153–161, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.08.033>.
- [100] X. Cao, Y. Huang, C. Tang, J. Wang, D. Johnson, and Y. Fang, "Preliminary study on the electrocatalytic performance of an iron biochar catalyst prepared from iron-enriched plants," *J. Environ. Sci.*, vol. 88, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.jes.2019.08.004.
- [101] D. Guofa *et al.*, "In-Situ Formation of Highly Active Ni-Fe based Oxygen-Evolving Electrocatalysts via Simple Reactive Dip-Coating," *J. Mater. Chem. A*, vol. 5, Apr. 2017, doi: 10.1039/C7TA01134B.
- [102] S. Parveen, M. Asgher, and M. Bilal, "Lignin peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates (LiP-CLEAs) as robust biocatalytic materials for mitigation of textile dyes-contaminated aqueous solution," *Environ. Technol. Innov.*, vol. 21, p. 101226, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101226>.
- [103] P.-C. Ma, N. A. Siddiqui, E. Mäder, and J.-K. Kim, "Correlation between electrokinetic potential, dispersibility, surface chemistry and energy of carbon nanotubes," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 71, no. 14, pp. 1644–1651, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2011.07.014>.
- [104] L. Y. Jun, N. M. Mubarak, L. S. Yon, C. H. Bing, M. Khalid, and E. C. Abdullah, "Comparative study of acid functionalization of carbon nanotube via ultrasonic and reflux mechanism," *J. Environ. Chem. Eng.*, 2018, doi: 10.1016/j.jece.2018.09.008.
- [105] M. Youssry, M. Al-Ruwaidhi, M. Zakeri, and M. Zakeri, "Physical functionalization of multi-walled carbon nanotubes for enhanced dispersibility in aqueous medium," *Emergent Mater.*, vol. 3, pp. 25–32, 2020.
- [106] A. Salis *et al.*, "Measurements and Theoretical Interpretation of Points of Zero Charge/Potential of BSA Protein," *Langmuir*, vol. 27, no. 18, pp. 11597–11604,

Sep. 2011, doi: 10.1021/la2024605.

- [107] M. Romero-Arcos, J. F. Pérez-Robles, M. Guadalupe Garnica-Romo, M. S. Luna-Martinez, and M. A. Gonzalez-Reyna, "Synthesis and functionalization of carbon nanotubes and nanospheres as a support for the immobilization of an enzyme extract from the mushroom *Trametes versicolor*," *J. Mater. Sci.*, vol. 54, no. 17, pp. 11671–11681, 2019, doi: 10.1007/s10853-019-03722-2.
- [108] N. Stark, D. Yelle, and U. Agarwal, "Techniques for Characterizing Lignin," in *Lignin in Polymer Composites*, Elsevier, 2015, pp. 49–66.
- [109] C.-M. Popescu, C. Vasile, M.-C. Popescu, G. Singurel, V. Popa, and B. Munteanu, "Analytical methods for lignin characterization. II. Spectroscopic studies," *Cellul. Chem. Technol.*, vol. 40, pp. 597–621, 2006.
- [110] J. Reyes-Rivera and T. Terrazas, "Lignin analysis by HPLC and FTIR," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1544, New York: Humana Press, 2017, pp. 193–211.
- [111] C. Pozo, J. Díaz-Visurraga, D. Contreras, J. Freer, and J. Rodríguez, "Characterization of temporal biodegradation of radiata pine by *Gloeophyllum trabeum* through principal component analysis-based two-dimensional correlation FTIR spectroscopy," *J. Chil. Chem. Soc.*, vol. 61, no. 2, pp. 2878–2883, 2016, doi: 10.4067/S0717-97072016000200006.
- [112] T. Rashid, C. F. Kait, and T. Murugesan, "A 'fourier Transformed Infrared' Compound Study of Lignin Recovered from a Formic Acid Process," in *Procedia Engineering*, 2016, vol. 148, pp. 1312–1319, doi: 10.1016/j.proeng.2016.06.547.
- [113] A. Barapatre and H. Jha, "Degradation of alkali lignin by two ascomycetes and free radical scavenging activity of the products," *Biocatal. Biotransformation*, vol. 35, no. 4, pp. 269–286, Jul. 2017, doi: 10.1080/10242422.2017.1327953.
- [114] F. Wang, F. Huang, and M. Ai, "Synergetic depolymerization of aspen CEL by pyranose 2-oxidase and lignin-degrading peroxidases," *BioResources*, vol. 14, no. 2, pp. 3481–3494, 2019, doi: 10.15376/biores.14.2.3481-3494.

17 Anexos

Lista de artículos publicados.

Gonzalez-Reyna, M., Luna-Martínez, M. S., & Perez-Robles, J. F. (2020). Nickel supported on carbon nanotubes and carbon nanospheres for ammonia oxidation reaction. *Nanotechnology*, 31(23), 235706. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab73b6>

Romero-Arcos, M., Pérez-Robles, J. F., Guadalupe Garnica-Romo, M., Luna-Martínez, M. S., & Gonzalez-Reyna, M. A. (2019). Synthesis and functionalization of carbon nanotubes and nanospheres as a support for the immobilization of an enzyme extract from the mushroom *Trametes versicolor*. *Journal of Materials Science*, 54(17), 11671–11681. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03722-2>