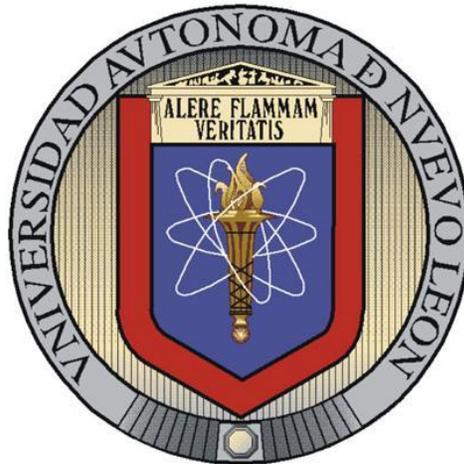


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**Inmovilización de enzimas en nanofibras poliméricas
mediante la técnica de electrohilado para su aplicación en
biosensores y sistemas de liberación de proteínas**

P R E S E N T A:

IVAN ELEAZAR MORENO CORTEZ

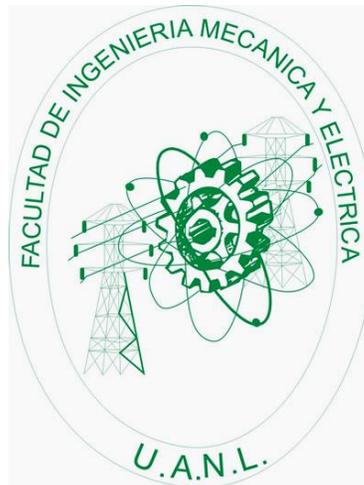
T E S I S

**EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN INGENIERIA DE LOS
MATERIALES**

CD. UNIVERSITARIA

OCTUBRE 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**Inmovilización de enzimas en nanofibras poliméricas
mediante la técnica de electrohilado para su aplicación en
biosensores y sistemas de liberación de proteínas**

P R E S E N T A:

IVAN ELEAZAR MORENO CORTEZ

T E S I S

**EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN INGENIERIA DE LOS
MATERIALES**

CD. UNIVERSITARIA

OCTUBRE 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que la tesis Inmovilización de enzimas en nanofibras poliméricas mediante la técnica de electrohilado para su aplicación en biosensores y sistemas de liberación de proteínas realizada por el alumno Iván Eleazar Moreno Cortez con número de matrícula 978838 sea aceptada para su defensa como opción al grado de Doctor en Ingeniería de los Materiales.

El comité de tesis

Dr. Virgilio A. González González
Asesor

Dr. Jorge Romero García
Asesor Externo

Dr. Moisés Hinojosa Rivera
Revisor

Dr. Carlos A. Guerrero Salazar
Revisor

Dr. Antonio S. Ledezma Perez
Revisor

Vo. Bo.

Dr. Moisés Hinojosa Rivera
Subdirector de Estudios de
Posgrado

Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L. a Octubre del 2010

DEDICATORIAS

A mis padres que lograron inculcarnos a mis hermanos y a mí la disciplina y valores esenciales para lograr el éxito en la vida, así como para evitar ceder ante los fantasmas del desánimo y la inconsistencia. Los amo y siempre estarán en mi mente y en mi corazón en todos los proyectos que emprenda en mi vida ya sean en el ámbito personal o profesional.

A mis hermanas Bertha Alicia y Martha Leticia quien siempre me han brindado su apoyo y confianza en los momentos difíciles de mi vida. Los quiero a todos y quiero que sepan que siempre serán una parte esencial de mi vida.

A mis sobrinos Henry Oziel y Miryam Abigail que son unos ángeles en mi vida y de quienes estoy seguro van a llegar lejos en la vida.

AGRADECIMIENTOS

Mis más profundos agradecimientos a mis asesores el Dr. Virgilio González González y el Dr. Jorge Romero García sin cuya valiosa y paciente asesoría no hubiera sido posible la culminación de esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica por todo el apoyo y facilidades otorgadas.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada por su valioso apoyo técnico y académico en la realización de esta tesis. Así como a todo su personal que nunca tuvieron inconveniente en brindarme su apoyo y paciencia para la realización de esta tesis. En particular a la LCQ. Gabriela Padrón Gamboa y a la LCQ. Diana Iris Medellín Banda por su invaluable apoyo con las técnicas de caracterización de materiales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

A todos mis amigos tanto del DIMAT como del CIQA por su amistad y sugerencias en la realización de esta tesis.

A todas aquellas personas que colaboraron de manera directa e indirecta en durante el desarrollo de este trabajo.

INDICE

Resumen.....	1
 CAPITULO 1. Introducción.....	 3
1.1 Justificación.....	3
1.2 Hipótesis General.....	8
1.3 Objetivos Generales.....	8
 CAPITULO 2. Antecedentes y Fundamentos.....	 9
2.1 Proteínas.....	9
2.1.1 Orden jerárquico estructural de las proteínas.....	10
2.1.1.1 Niveles de organización.....	10
2.1.2 Enzimas.....	12
2.1.2.1 Función y especificidad de las enzimas.....	12
2.1.3 Enzimas utilizadas.....	15
2.1.3.1 Lactato Deshidrogenasa.....	15
2.1.3.1.1 Mecanismo de catálisis.....	17
2.1.3.2 Papaína.....	19
2.1.3.2.1 Mecanismo de catálisis.....	22
2.2 Electrohilado.....	24
2.2.1 Teoría.....	24
2.2.2 Montaje de la técnica de electrohilado.....	25
2.2.3 Electrohilado de nanofibras.....	27
2.2.3.1 Definición y características de las nanofibras.....	27
2.2.3.2 Nanotecnología y nanofibras.....	27
2.2.4 Inmovilización por electrohilado.....	28
2.2.4.1 Inmovilización de enzimas.....	28
2.3 Biosensores.....	30
2.3.1 Definición.....	30
2.3.2 Componentes de un biosensor.....	30
2.3.3 Biosensores enzimáticos.....	31
2.3.3.1 Características y aplicaciones.....	32
2.3.3.2 Enzimas utilizadas en biosensores.....	33

2.4 Sistemas de liberación.....	34
2.4.1 Definición.....	34
2.4.2 Liberación controlada de péptidos y proteínas.....	35
2.4.3 Nanofibras como alternativa en la liberación de proteínas.....	36
2.4.3.1 Nanofibras en la liberación controlada de enzimas.....	39
Referencias.....	41
Lista de Figuras.....	46
Listado de Tablas.....	47
CAPITULO 3. Sistema Lactato Deshidrogenasa-8-Anilino-1-naftaleno acido sulfónico (LDH-ANS) en el sensado de lactato	48
3.1 Origen del lactato.....	48
3.2 Importancia de la detección de lactato.....	50
3.2.1 Métodos de detección de lactato.....	53
3.3 Sistema LDH-ANS.....	56
3.4 Hipótesis.....	57
3.5 Objetivos particulares.....	57
3.6 Experimentación.....	58
3.6.1 Materiales y Reactivos.....	58
3.6.2 Soluciones.....	58
3.6.3 Inmovilización en fibras de PVA.....	59
3.6.3.1 Inmovilización de ANS.....	59
3.6.3.2 Inmovilización de Ovoalbúmina (OVA)	60
3.6.3.3 Inmovilización de OVA/ANS.....	60
3.6.3.4 Inmovilización de LDH/ANS.....	61
3.6.3.5 Entrecruzamiento.....	61
3.6.4 Equipos utilizados.....	62
3.7 Resultados y discusión.....	63
3.7.1 Morfología.....	63
3.7.1.1 Optimización de morfologías.....	63
3.7.1.2 Efecto de la inmovilización en la morfología de las nanofibras.....	67
3.7.1.3 Efecto del entrecruzamiento en la morfología de las nanofibras.....	71
3.7.2 Presencia de la enzima LDH en las nanofibras electrohiladas.....	72
3.7.3 Detección de lactato.....	74

3.7.3.1 LDH-ANS en solución.....	74
3.7.3.2 Sistema LDH-ANS inmovilizado.....	77
3.8 Conclusiones.....	78
3.9 Trabajo a futuro.....	80
Referencias.....	80
Lista de figuras.....	84
CAPITULO 4. Liberación sostenida de lactato deshidrogenasa.....	85
4.1 Importancia de la liberación controlada de proteínas.....	85
4.2 Uso terapéutico de las enzimas.....	86
4.3 Deficiencia de enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....	94
4.4 Hipótesis.....	95
4.5 Objetivos particulares.....	95
4.6 Experimentación.....	96
4.6.1 Materiales y reactivos.....	96
4.6.2 Soluciones.....	96
4.6.3 Equipos utilizados.....	97
4.6.4 Proceso de encapsulación a través de electrohilado coaxial.....	98
4.6.4.1 Proceso de entrecruzamiento.....	99
4.6.5 Proceso de liberación enzimática <i>in vitro</i>	100
4.7 Resultados y discusión.....	101
4.7.1 Conductividad de las soluciones.....	101
4.7.2 Morfología.....	102
4.7.3 Presencia de la enzima en las nanofibras electrohiladas.....	106
4.7.4 Liberación sostenida de la enzima LDH <i>in vitro</i>	109
4.8 Conclusiones.....	112
4.9 Trabajo a futuro.....	113
Referencias.....	113
Listado de figuras.....	115
Listado de tablas.....	116
CAPITULO 5. Papaína inmovilizada en nanofibras de PVA como biosensor de iones metálicos.....	117
5.1 Importancia de las proteasas.....	117
5.1.1 Papaína y sus aplicaciones.....	118

5.1.2 Inmovilización y estabilización de la papaína.....	120
5.2 Contaminación de vías fluviales por metales.....	121
5.2.1 Biotécnicas para la detección de metales pesados en vías fluviales.....	123
5.3 Uso de la papaína en la detección de metales pesados.....	124
5.4 Hipótesis.....	125
5.5 Objetivos particulares.....	125
5.6 Experimentación.....	125
5.6.1 Materiales y Reactivos.....	125
5.6.2 Encapsulación de papaína.....	126
5.6.2.1 Inmovilización de la papaína.....	126
5.6.3 Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada.....	127
5.6.4 Medición de la actividad de la enzima libre e inmovilizada.....	127
5.6.5 Sensibilidad de la actividad enzimática de la papaína a la presencia de iones de metales pesados.....	129
5.6.6 Equipos utilizados.....	129
5.7 Resultados y discusión.....	130
5.7.1 Morfología.....	130
5.7.2 Presencia de la papaína en las nanofibras de PVA.....	133
5.7.3 Efecto del tiempo de entrecruzamiento en la actividad enzimática.....	134
5.7.4 Actividad enzimática de la papaína inmovilizada.....	136
5.7.5 Reusabilidad de la papaína inmovilizada.....	137
5.7.6 Efecto del tiempo de almacenamiento en la actividad enzimática.....	139
5.7.7 Inhibición de la actividad enzimática de la papaína como biosensor para iones metálicos.....	140
5.7.7.1 Efecto del tipo de solución de activación en la inhibición de la papaína en solución.....	140
5.7.7.2 Sensibilidad de la papaína al cambio en concentración de los iones metálicos.....	141
5.7.7.3 Sensibilidad de la papaína en solución a la presencia de iones de mercurio (Hg^{2+}).....	142
5.7.7.4 Sensibilidad de la papaína inmovilizada a la presencia de iones de mercurio (Hg^{2+}).....	144
5.8 Conclusiones.....	145
5.9 Trabajo a futuro.....	146

Referencias.....	147
Listado de figuras.....	150
CAPITULO 6. Conclusiones generales.....	152
Anexo 1.....	153

RESUMEN

En este trabajo de investigación se reporta el uso de la técnica de electrohilado para la preparación de nanofibras de poli(vinil alcohol) (PVA) con el propósito de encapsular e inmovilizar enzimas para su posterior aplicación en el desarrollo de biosensores y sistemas de liberación de proteínas. En una primera instancia se optimizó el proceso de electrohilado de PVA hasta obtener fibras en el rango nanométrico y con una morfología libre de defectos en forma de cuenta y cambios de diámetro. Posteriormente se comprobó en la primera parte de este trabajo de tesis la efectividad del sistema Lactato Deshidrogenasa-8-Anilino-1-naftaleno ácido sulfónico (LDH-ANS) en solución para la detección de lactato en un rango de concentraciones de 2-12 $\mu\text{g/ml}$. Se inmovilizó la enzima LDH tanto etiquetada con ANS como sin etiquetar en nanofibras de poli (vinil alcohol) (PVA). Las nanofibras obtenidas con este sistema mostraron morfologías interesantes así como diámetros de fibras en el rango nanométrico sin defectos superficiales aparentes. Se realizaron pruebas con el sistema LDH-ANS inmovilizado en nanofibras de PVA para la detección de lactato. Este sistema fue capaz de detectar la presencia de lactato en concentraciones por encima de 22 $\mu\text{g/ml}$.

En la segunda parte de este trabajo se encapsuló la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en nanofibras de PVA utilizando la técnica de electrohilado coaxial. Con esta técnica fue posible encapsular la enzima tanto en el interior de las nanofibras como en su superficie. Se obtuvieron morfologías sin cambios súbitos de diámetro ni defectos en forma de cuenta. Además se obtuvieron morfologías interesantes en forma de fibras entrelazadas y aglomerados de proteínas en la superficie de las nanofibras. De esta manera se logró la liberación sostenida de la enzima LDH a partir de

su encapsulación en las nanofibras electrohiladas de PVA. Este sistema pretende presentarse como un modelo de liberación de proteínas de alto peso molecular, dado que la LDH cuenta con un peso molecular de 140 kDa.

La tercera parte de este trabajo de tesis trata sobre la inmovilización de papaína en nanofibras de poli(vinil alcohol) (PVA) mediante la técnica de electrohilado. La inmovilización se logró en dos pasos: la encapsulación de la papaína mediante la técnica de electrohilado y su posterior inmovilización mediante un tratamiento de entrecruzamiento con glutaraldehído. La papaína inmovilizada en nanofibras de PVA mostró una actividad retenida de alrededor del 88%, lo que iguala otras técnicas de inmovilización reportadas para esta enzima. Además este sistema fue utilizado para la detección de iones de metales pesados, concretamente de mercurio (Hg^{2+}). En su aplicación como biosensor la papaína inmovilizada obtuvo un rango de sensibilidad de 0.2 a 3 ppm de concentración de iones de mercurio. El cual es comparable con resultados reportados en la literatura para biosensores de iones de mercurio (Hg^{2+})(Shukor, Baharom et al. 2006).

Por último, es importante mencionar que este trabajo de tesis se presentó en el congreso internacional Nanotech celebrado en la ciudad de Boston, Massachusetts en el año 2008 con la publicación de un artículo en extenso. Además este trabajo se presentó en el Workshop on Nanostructured Materials celebrado en la ciudad de México en ese mismo año.

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1 Justificación

La detección de sustancias de interés científico e industrial es un área de gran interés para la sociedad actual. Para este propósito se han ido renovando las tradicionales técnicas de detección y análisis. Existe una gran variedad de sensores usados en la industria y en laboratorios, los cuales forman parte ya de la vida cotidiana de millones de personas que a diario hacen uso de la tecnología actual en transporte, meteorología, salud y comunicaciones, la que en gran medida depende cada vez más de sensores confiables para su correcta operación. En la búsqueda por sensores cada vez más precisos y confiables la comunidad científica ha buscado en la naturaleza elementos de ayuda para cumplir con esta meta.

En este camino se ha hecho uso de elementos biológicos como unidades de reconocimiento molecular en sensores de alta sensibilidad conocidos como biosensores. Entre las unidades biológicas utilizadas para este fin se encuentran bacterias, tejidos celulares, anticuerpos, enzimas, etc. Los biosensores han comprobado poseer características únicas tales como excelente sensibilidad, precisión, exactitud y especificidad. Estas características únicas han hecho que el valor de mercado para los biosensores represente un nicho económico tan importante, que un estudio reciente tiene proyectado su valor para el 2012 en 6.1 millardos de dólares. Estas cifras dan cuenta del enorme potencial de desarrollo de los biosensores en áreas tan estratégicas y delicadas como la medicina, alimenticia, agricultura, medio ambiente, etc.

El primer biosensor de amplio impacto en la sociedad fue el biosensor de glucosa en primera instancia desarrollado por Lelan C. Clark en 1962, mediante el cual los pacientes diabéticos podían monitorear sus niveles de glucosa desde la comodidad de su hogar con una sola gota de sangre. Este biosensor utilizaba la enzima glucosa oxidasa como unidad de

reconocimiento biológico. Los biosensores basados en enzimas cuentan con una gran confiabilidad, especificidad y precisión. Una gran ventaja que presentan las enzimas como unidad de reconocimiento molecular en un biosensor es su facilidad para ser inmovilizadas, lo que aumenta en gran medida el tiempo de vida del biosensor. Existen diversas técnicas de inmovilización de enzimas, entre ellas la adsorción, inmovilización, atrapado o unión covalente con algún tipo de matriz tal como materiales mesoporosos, membranas o materiales nanoestructurados.

De entre todas las opciones para inmovilización de las enzimas los materiales nanoestructurados ofrecen una serie de ventajas insoslayables, tales como su elevada área superficial la cual les permite albergar una mayor cantidad de enzimas, así como también su estructura porosa la cual permite disminuir en gran medida la resistencia difusional que tiene que vencer el analito para alcanzar la enzima inmovilizada dentro de la nanoestructura. Las nanopartículas cuentan con las ventajas antes mencionadas de elevada área superficial y alta porosidad lo cual les permite ser una excelente opción para la inmovilización de enzimas u otras sustancias de interés, sin embargo su tendencia a la dispersión dificulta su recuperación del medio de reacción para su reutilización lo cual ha sido un inconveniente para su uso en biosensores. Por otro lado, las nanofibras pueden ser recuperadas fácilmente del medio de reacción para su posterior reutilización como biosensor. En este trabajo de investigación se propone la creación de biosensores enzimáticos mediante la inmovilización de enzimas en nanofibras de material polimérico, el cual tiene la ventaja de precio, disponibilidad y maleabilidad.

En este trabajo de tesis doctoral se trabajó con sistemas de enzimas encapsuladas, inmovilizadas y en solución. En el apartado particular de biosensores se trabajará en primera instancia con un sistema enzimático

para la detección de lactato, una sustancia de interés en distintas áreas de la industria y la investigación. En el área médica, por ejemplo, los niveles de lactato son indicativos de supervivencia en niños expuestos a cirugía abierta y de mortalidad en bebés hiperventilados. En los deportes la medición de lactato es útil en el monitoreo de los resultados del ejercicio y el rendimiento atlético. También es útil para medir la calidad de ciertos productos como leche, jugos, yogurt y algunos vinos.

Para la medición de lactato se utilizó la enzima lactato deshidrogenasa (LDH por sus siglas en inglés) etiquetada con un colorante llamado 8-Anilino-1-naftaleno ácido sulfónico (ANS por sus siglas en inglés), el cual al momento de entrar en contacto con el lactato disminuye la intensidad de su fluorescencia. Esta disminución o “quenching” de la fluorescencia del colorante puede ser relacionada con los niveles de lactato presentes en el medio. Se espera que con la inmovilización mejore la estabilidad de la enzima y con esto mejoren sus propiedades de reconocimiento molecular hacia el lactato, a la vez que se prolongue su tiempo de vida al retrasar su desnaturalización.

De igual manera, se utilizó sistemas enzimáticos basados en nanofibras para la detección de iones metálicos en solución. Para este fin se escogió la enzima papaína debido a la alta sensibilidad de su centro activo hacia la presencia de iones metálicos en el medio. La contaminación de fuentes de agua es cada vez más común, sobre todo en los países en vías de desarrollo, principalmente debido a los procesos de industrialización. Los complejos industriales canalizan sus desechos hacia los ríos y corrientes de agua subterráneas. Estos desechos son de naturaleza tanto orgánica como inorgánica, por ejemplo colorantes industriales, metales pesados, etc. A diferencia de los colorantes orgánicos los metales pesados no se pueden eliminar mediante técnicas de degradación orgánica como la fotocatalisis. Además, la contaminación debido a metales pesados se vuelve difícil de

detectar debido a lo sofisticado, caro y poco versátil de las técnicas actuales de detección de los mismos. Debido a lo anterior se espera que la papaína inmovilizada en nanofibras pueda servir como un biosensor eficaz, versátil y asequible para la detección de metales pesados en muestras de agua contaminadas.

De igual manera en este trabajo se propuso la utilización de las nanofibras como medio de encapsulación de enzimas, para su posterior utilización en sistemas de liberación. Los sistemas de liberación de drogas se han convertido en una necesidad debido a la creciente especialización en los medicamentos para ciertas enfermedades; lo que implica la necesidad de un medio de transporte, protección y liberación adecuados para que este tipo de drogas pueda llegar intactas a su sitio de acción predeterminado. Muchos de estas sustancias especializadas son de origen proteínico, ya sea que fuesen fabricadas de manera sintética o extraídas de fuentes naturales. Debido a la naturaleza inestable de las proteínas, estas sustancias tienden a degradarse muy fácilmente, principalmente en vías de liberación protegidas por el sistema inmunológico, enzimas o pH extremos. De entre todas las técnicas y vías de liberación utilizadas en la liberación de sustancias basadas en péptidos ó proteínas, las nanofibras surgen como una opción interesante y versátil debido a su elevada área superficial y porosidad.

En este trabajo se propuso la utilización de nanofibras como sistemas de liberación sostenida de enzimas. Se espera que las nanofibras sean capaces de albergar una gran cantidad de enzimas debido a su elevada área superficial. De igual manera su porosidad debería permitir un rápido proceso de liberación de las moléculas de proteína hacia el medio de reacción. Otra característica interesante de las nanofibras es la posibilidad de modular su porosidad. De tal manera que las enzimas inmovilizadas en nanofibras puedan servir como un nanoreactor enzimático en el caso de una porosidad pequeña o bien como un efectivo sistema de liberación en el caso de una

porosidad elevada. Por otra parte la superficie de las nanofibras es susceptible de ser modificada mediante algún tipo de entrecruzamiento, incrementando de esta manera el tiempo de liberación de las sustancias encapsuladas. De igual manera las nanofibras cuentan con la capacidad ya mencionada de ser recuperadas del medio de reacción una vez cumplida su labor de liberación sostenida. En este trabajo se utilizó la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como la sustancia proteínica a liberar. Como se explicará en el capítulo correspondiente de esta tesis, su encapsulación y posterior liberación se dificulta en gran medida debido a su elevado peso molecular.

Para la elaboración de las nanofibras así como para la inmovilización o encapsulación de enzimas se utilizó la técnica de electrohilado. El electrohilado es una técnica sencilla y efectiva que utiliza un campo eléctrico de alto voltaje para producir chorros poliméricos altamente cargados a partir de soluciones poliméricas o polímero fundido, que con la posterior evaporación del solvente se solidifican y disminuyen en diámetro hasta convertirse en nanofibras. Estas nanofibras son dirigidas por el campo eléctrico hacia un colector con carga opuesta, el cual puede tener diversas formas dependiendo de las necesidades de cada experimento. Los fundamentos de esta técnica fueron establecidos desde la década de los 30's gracias a los trabajos de Formhals, quien produjo fibras sintéticas usando un campo eléctrico (Subbiah, Bhat et al. 2005). Pero no fue sino en la reciente década cuando esta técnica adquirió popularidad entre la comunidad científica debido al descubrimiento de nuevas e interesantes aplicaciones para las nanofibras, las cuales incluyen nanocatálisis, tejidos artificiales, nanofiltros, ropa protectora, liberación controlada de medicamento, etc.

1.2 Hipótesis general

La técnica de electrohilado es un medio efectivo para la encapsulación y/o inmovilización de enzimas en nanofibras electrohiladas de poli (vinil alcohol). Los sistemas de enzimas inmovilizadas y encapsuladas mediante esta técnica pueden servir como biosensores y sistemas de liberación sostenida de proteínas.

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTOS

2.1 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas presentes en todos los organismos vivos, desde las bacterias y virus hasta organismos sumamente complejos multicelulares como los grandes mamíferos entre los que se incluyen los seres humanos. Existen una gran variedad de proteínas las cuales cumplen distintas e importantes funciones en los seres vivos, siendo las biomoléculas con mayor presencia dentro de las células, con más del 50% de su peso en seco. Su compleja estructura tridimensional les permite desempeñar distintas funciones en la naturaleza, como por ejemplo transporte, biocatálisis, protección, movimiento y estructurales. En la tabla 1 se muestra una clasificación de proteínas de acuerdo a la función que desempeñan en el cuerpo humano.

Tabla 1.- Clasificación de las proteínas de acuerdo a su función¹.

Función	Ejemplos
Transporte	Hemoglobina, la cual se encarga de transportar oxígeno de los pulmones a todas las células dentro de los organismos de distintas especies. Seroalbúmina, la cual se encarga de transportar ácidos grasos del torrente sanguíneo a órganos tan importantes como el hígado, el riñón, el intestino y el cerebro.
Estructura	Colágeno, el cual forma parte importante de huesos y tendones. Elastina, la cual forma parte de arterias y pulmones
Movimiento	Miosina, es la proteína más importante en el músculo esquelético y está íntimamente implicada en la contracción muscular en combinación con la actina.
Protección	Los anticuerpos, son producidos como parte de la respuesta humoral, la cual es una reacción de los plasmocitos al reconocer alguna bacteria o virus. El fibrinógeno por otro lado es una proteína asociada con la coagulación sanguínea.
Biocatálisis	Las enzimas son un tipo especial de proteínas las cuales se encargan de catalizar la mayoría de las reacciones que se llevan a cabo en los organismos vivos.
Regulación y control	Somatotropina, hormona que estimula el crecimiento humano y la reproducción de células. La insulina juega un papel vital en el metabolismo de la glucosa.

2.1.1 Orden jerárquico estructural de las proteínas

Las proteínas son macromoléculas biológicas compuestas de una o más subunidades llamadas polipéptidos, los cuales son grandes cadenas de aminoácidos unidos entre sí por medio de enlaces péptidicos ($O=C-NH$). Existen 20 aminoácidos esenciales, cuya combinación da origen a la mayoría de las proteínas. Una serie de interacciones entre aminoácidos, grupos de aminoácidos y cadenas de polipéptido; en conjunto con puentes disulfuros y de hidrógeno, da como resultado una estructura tridimensional sumamente compleja y funcional². En la siguiente sección se explorará los distintos niveles de organización de las proteínas, desde la estructura primaria lineal hasta las grandes estructuras globulares. El entendimiento de estos niveles de organización es de importancia vital si se quiere dar con la explicación del porque de la naturaleza tan diversa y sensible de las proteínas. La estructura tridimensional de las proteínas es interdependiente en todos sus niveles de organización. De tal manera que la estructura primaria prácticamente define el comportamiento de la macromolécula en todas las estructuras superiores.

2.1.1.1 Niveles de organización

La estructura primaria se define como la asociación elemental de aminoácidos a través de una serie de condensaciones hasta formar cadenas polipéptidicas. Estas estructuras lineales son la base sobre la que se sustentan las demás estructuras superiores (figura 1a). Una vez que un aminoácido pasa a formar parte de una cadena polipéptidica, recibe el nombre de "residuo". No importa de cuantos residuos esté conformada una cadena polipéptida, ésta siempre tendrá una terminación amino cargada positivamente y una terminación carboxílica cargada negativamente, llamadas terminal-N y terminal-C respectivamente.¹⁻³. Por otra parte, la estructura secundaria se define como una serie de arreglos estructurales a

nivel local que se dan a lo largo de la cadena polipéptida. Las estructuras secundarias más comunes en las proteínas son las hélices alfa y las hojas plegadas beta (figura 1b). Estas estructuras tienen su origen en una serie de puentes de hidrógeno entre aminoácidos. La parte de la cadena polipéptida que no cuenta con una estructura secundaria estructural se define como “secuencias aleatorias”.

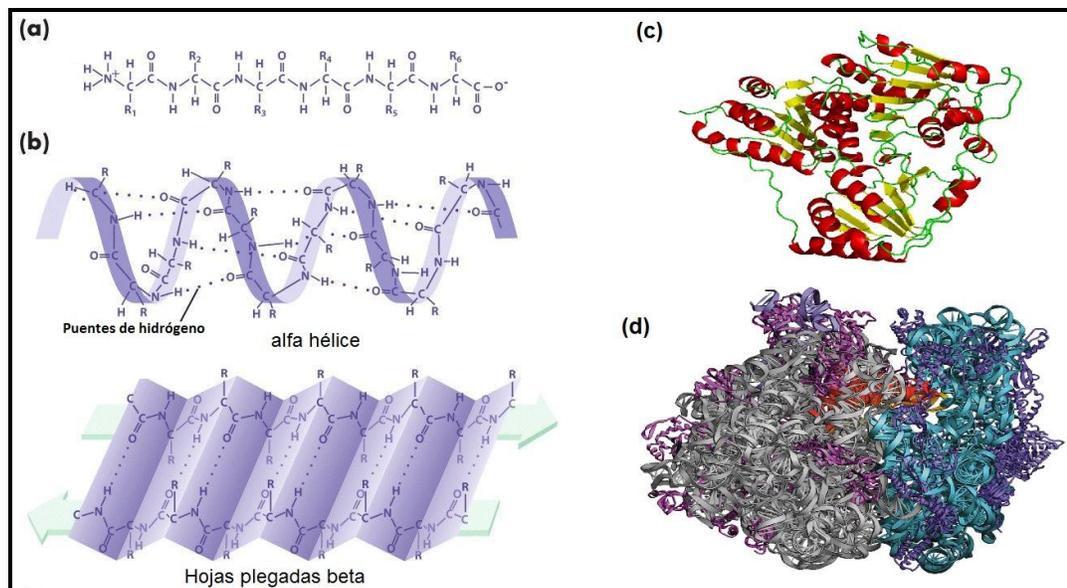


Figura 1.- Orden jerárquico estructural de las proteínas a) Secuencia de aminoácidos que conforman la estructura primaria, b) Estructura secundaria, c) Cadenas dobladas y plegadas que conforman la estructura terciaria, d) Unión de dos o más polipéptidos para formar la estructura cuaternaria.

La estructura terciaria hace referencia a la manera en que las estructuras secundarias se acomodan tridimensionalmente por medio de una serie de vueltas, giros y torceduras de la cadena polipéptida hasta formar una estructura globular compacta (figura 1c). La estructura tridimensional es de suma importancia para las diversas actividades que llevan a cabo las proteínas. Esta estructura terciaria es estabilizada principalmente por enlaces no covalentes como son puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y puentes del tipo S-S entre residuos⁴. Dado que esta estructura tridimensional es estabilizada principalmente por enlaces débiles no covalentes, tiende a perderse cuando la proteína es extraída de su medio ambiente natural. Lo anterior se le conoce con el nombre de

“desnaturalización”; una proteína que sufre desnaturalización ya no puede llevar a cabo ninguna de sus funciones biológicas. Es por eso que cada proteína cuenta con su rango de temperatura y pH óptimos para desarrollar su actividad biológica particular¹⁻².

Hay ciertas proteínas que se componen de más de una cadena polipéptida unidas en ocasiones por enlaces disulfuro (S-S) y estabilizadas por el mismo tipo de interacciones débiles no covalentes que estabilizan la estructura terciaria. Cuando una cadena posee este tipo de macroestructuras globulares se dice que posee una estructura cuaternaria (figura 1d). A cada cadena polipéptida en la estructura cuaternaria de una proteína se le llama “mero”, así por ejemplo cuando una proteína contiene dos unidades de cadenas polipéptidas se dice que es un “dímero”, si tiene tres se dice que es un “trímero” y así sucesivamente. Un tipo de proteínas que son particularmente sensibles a la desnaturalización porque pierden completamente su actividad son las enzimas. Debido a que en este trabajo se utilizaron las enzimas papaína y la lactato deshidrogenasa, en las siguientes secciones se hace una descripción con mayor detalle de las enzimas en general y los aspectos más relevantes de estas dos enzimas.

2.1.2 Enzimas

2.1.2.1 Función y especificidad de las enzimas

La función de un catalizador es acelerar la velocidad de las reacciones químicas sin tomar parte en ellas. De hecho, en las células se llevan a cabo miles de reacciones químicas, las cuales hacen posible el correcto funcionamiento de cada organismo biológico. Sin embargo ninguna de estas reacciones sería posible sin la ayuda de un biocatalizador. Las enzimas son biocatalizadores capaces de acelerar una reacción hasta en millones de veces⁵. En esta clase de reacciones la teoría plenamente aceptada para explicar su cinética es que la enzima forma un complejo con el substrato en

una reacción reversible, posteriormente ese complejo se descompone de nuevo en una molécula de producto y la enzima. Este mecanismo fue propuesto en una primera instancia por Brown y tiempo después Michaelis y Menten lo expresaron matemáticamente⁶ (figura 2).

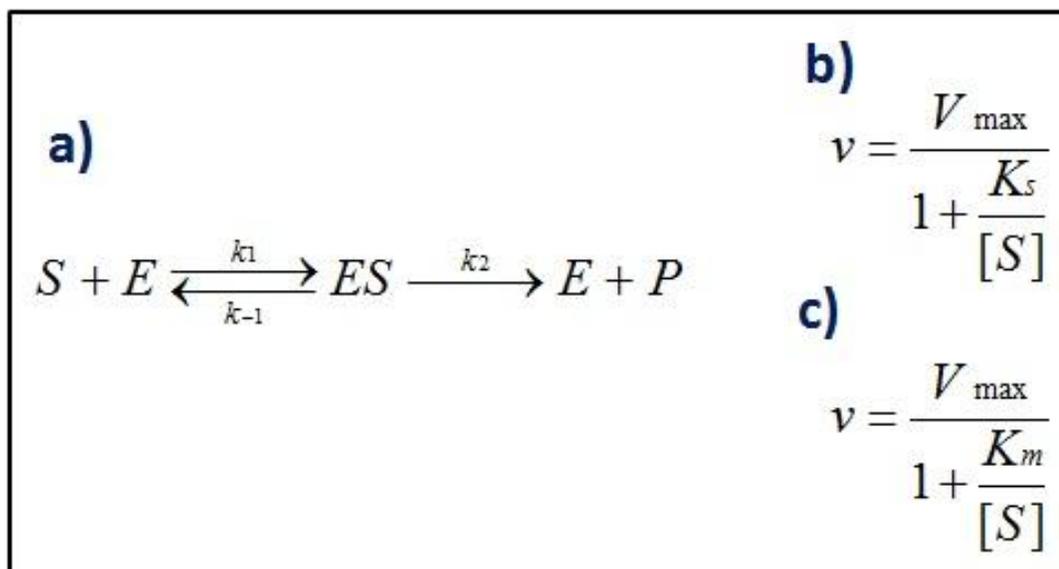


Figura 2.- Mecanismo de acción catalítico de las enzimas a) Mecanismo propuesto por Brown. Expresiones matemáticas derivadas en forma independiente por Michaelis y Menten para b) condiciones de rápido equilibrio y c) bajo condiciones que cumplen con el modelo estacionario

La manera en que la enzima logra cumplir con su tarea de biocatalizador es a través de diversos mecanismos de catálisis. Uno de los principales y plenamente aceptados es que la estructura tridimensional de la enzima orienta de tal modo al sustrato que el enlace susceptible a reaccionar queda orientado y muy próximo al centro catalítico de la enzima. Otro mecanismo interesante de catálisis enzimática es la formación de un intermediario covalente inestable con el sustrato que reacciona con más facilidad para formar productos (catálisis nucleofílica). Así mismo al contar con grupos funcionales donadores y aceptores de protones, la enzima es capaz de efectuar una catálisis general ácida o básica. También existen teorías según las cuales la enzima induce una tensión o torsión sobre el enlace susceptible haciendo que la ruptura de éste sea más sencilla⁵⁻⁷. Como en toda reacción catalizada, todos estos mecanismos enzimáticos van

orientados a estabilizar el estado de transición de la reacción para disminuir de esta forma la energía de activación, solo que en una reacción enzimática esto se complica dado que generalmente se producen dos o más estados de transición en el curso de la reacción.

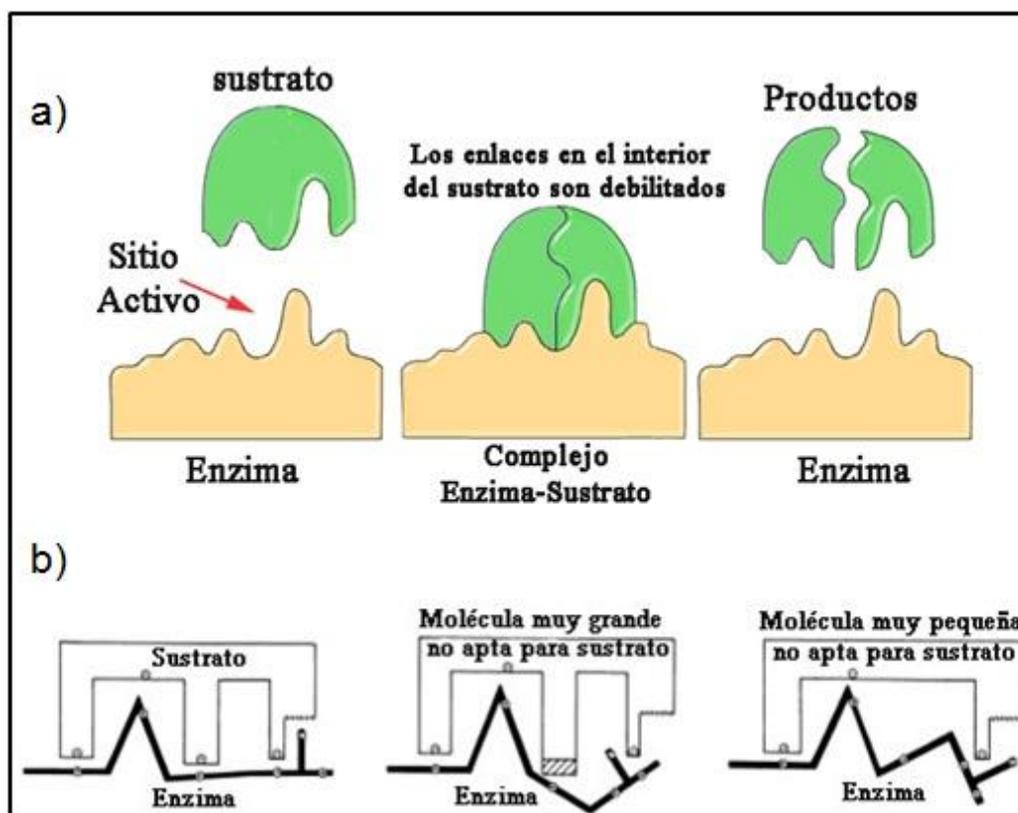


Figura 3.- Modelos para explicar la especificidad de las enzimas a) Modelo llave-candado de Emil Fisher , b) Modelo de ajuste inducido propuesto por Koshland

A diferencia de los catalizadores químicos comerciales, los cuales sintetizan una gran cantidad de reacciones químicas, las enzimas pueden presumir de una gran especificidad solamente hacia cierto tipo de moléculas características llamadas sustratos. Así mismo las enzimas solamente catalizan un tipo de reacción sin que se produzcan reacciones laterales ni subproductos. Así, se puede sentenciar que si no fuera por las enzimas las células pronto quedarían atrapadas en un sinfín de reacciones secundarias y productos no deseados^{3, 5}. El primero en proponer una explicación para esta especificidad fue Emil Fischer quien propuso el modelo de llave-candado

para explicar la manera en que la molécula de sustrato se adapta al centro activo de la enzima (figura 3a)^{6, 8}. Posteriormente Koshland propuso el modelo de ajuste inducido, según el cual la interacción entre el sustrato y la enzima daba lugar a un cambio de forma del sitio activo. Lo anterior le permitía a la enzima no solo adaptarse al sustrato, sino inducir en él una conformación más favorable de tal manera que la reacción se pudiese llevar a cabo en una forma más rápida y eficiente (figura 3b)^{6, 9}. Se sabe también que la alta especificidad de las enzimas incluso las lleva a distinguir y discriminar entre distintas formas estereoisómeras de la misma molécula de sustrato, algo que están muy lejos de lograr los catalizadores sintéticos convencionales^{1, 5}.

2.1.3 Enzimas utilizadas

2.1.3.1 Lactato Deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) está formada por cuatro subunidades que forman un tetrámero de un peso molecular de 144 kDa (figura 4a). Cada monómero está formado por una cadena péptida de 334 residuos de aminoácidos (36 kDa). En la estructura globular del tetrámero cada subunidad ocupa posiciones equivalentes: cada monómero cuenta con su correspondiente centro activo. Dependiendo de las condiciones de trabajo la LDH cataliza la reacción de reducción de piruvato a lactato ó la oxidación del lactato a piruvato, utilizando como cofactor la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y su forma reducida dihidronicotinamida adenina dinucleótido (NADH) respectivamente (figura 4b). El centro activo de una subunidad de la enzima LDH se muestra esquemáticamente en la figura 4c. En la figura también se muestran el sustrato lactato (rojo), el cofactor NAD^+ (amarillo), y tres cadenas laterales de aminoácidos (Arg-109, Arg-171, y His-195 en verde) las cuales están directamente involucradas en el proceso de catálisis.

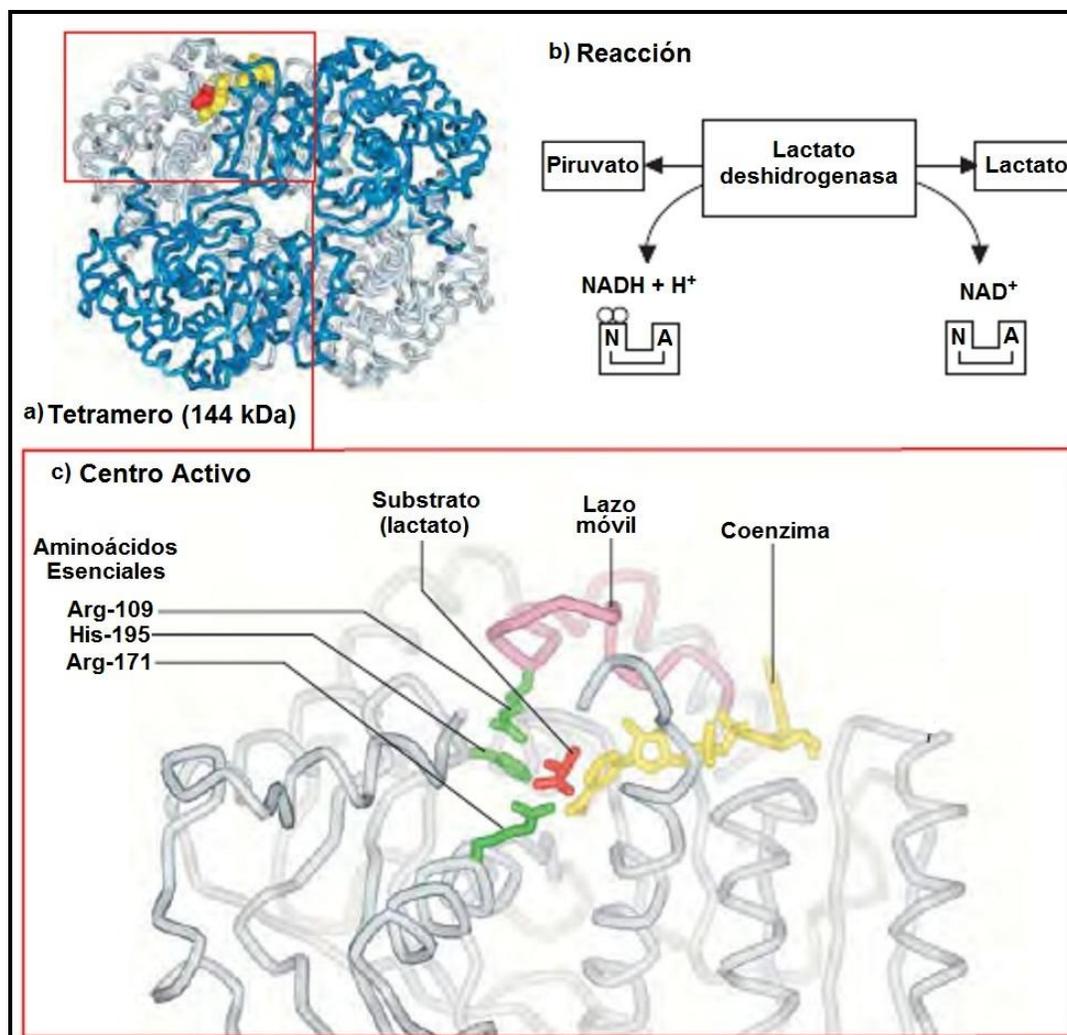


Figura 4.- Lactato deshidrogenasa (LDH): a) Estructura globular del tetrámero, b) reacción catalizada por la enzima y c) centro activo.

Un lazo móvil de péptido formado por los residuos de aminoácidos 98-111 se muestra también en la figura (rosa). En ausencia de sustrato y del cofactor este lazo móvil se encuentra abierto permitiendo el acceso al sitio de enlace para el sustrato (no mostrado). Una vez que se forma el complejo enzima-lactato-NAD⁺, el lazo móvil se cierra dejando aislado el centro activo. Hay dos tipos diferentes de subunidades en la LDH, la subunidad M y la subunidad H, las cuales contienen diferencias ligeras en su secuencia de aminoácidos, por lo que sus propiedades catalíticas son diferentes. De la

combinación de estos dos tipos de aminoácidos se forman las cinco diferentes isoenzimas presentes en el cuerpo humano.

2.1.3.1.1 Mecanismo de catálisis

Los residuos de aminoácidos que juegan un papel clave en el proceso de catálisis del sitio activo y sus roles en la reacción han sido plenamente identificados mediante una serie de investigaciones experimentales previas¹⁰⁻¹⁶. En la reacción catalizada por la LDH (figura 4b), se cataliza la transferencia de iones hidruro del lactato al cofactor NAD^+ o del cofactor NADH al piruvato. El equilibrio de la reacción favorece fuertemente la formación de lactato. Sin embargo a altas concentraciones de lactato y NAD^+ la oxidación de lactato a piruvato es posible. Como la reacción es reversible, el proceso catalítico puede ser representado por un ciclo cerrado. En el análisis siguiente del ciclo catalítico de la enzima es mostrado en seis fases en la figura 5. Los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la enzima pueden intervenir en el acoplamiento del sustrato y la coenzima, ó pueden tomar parte en algunos de los pasos del proceso catalítico directamente.

Solamente las cadenas laterales de los tres residuos más importantes se muestran en este análisis. El grupo guanidinio cargado positivamente de la arginina-171 enlaza y orienta al grupo carboxilato del sustrato por interacción electrostática. El grupo imidazol de la histidina-195 actúa como un donador de protón y la cadena lateral de la arginina-109 juega un papel importante en la estabilización del estado de transición. En adición a estos residuos el lazo móvil de péptido formado por los residuos 98-111 mencionado anteriormente cierra el sitio activo una vez completado el acoplamiento del sustrato y el cofactor, excluyendo de esta manera a las moléculas de agua durante el proceso de catálisis. En la figura 5 se muestran las seis principales fases del proceso de catálisis de la enzima

LDH.

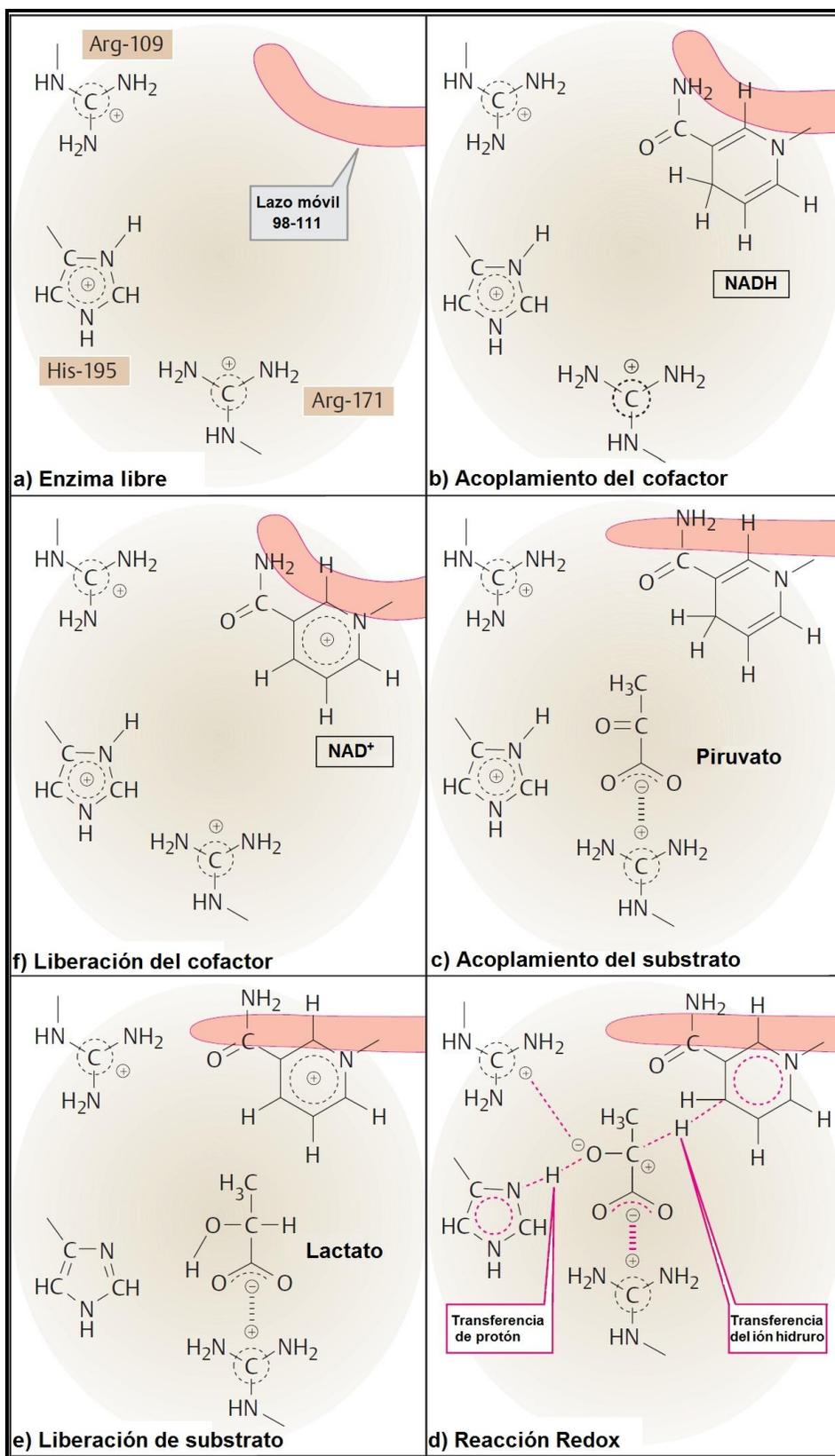


Figura 5.- Mecanismo de catálisis de la enzima LDH. (Explicado en texto)

En la enzima libre, el residuo His-195 se encuentra protonado (figura 5a). El cofactor NADH se enlaza primero (figura 5b), seguido por el piruvato (figura 5c). Es importante que el grupo carbonilo del piruvato y el sitio activo en el anillo nicotinamida del cofactor tengan una óptima posición uno con respecto al otro. En seguida el lazo de péptido 98-111 se cierra sobre el sitio activo, lo que produce un marcado descenso en la polaridad como consecuencia de la exclusión de las moléculas de agua. Esta reducción en la polaridad en el sitio activo, vuelve más fácil alcanzar el estado de transición (figura 5d). En el estado de transición un ión hidruro H^- es transferido del cofactor al átomo de carbono del grupo carbonilo. La carga negativa transitoria del oxígeno es estabilizada por medio de interacción electrostática con el residuo arginina-109. Al mismo tiempo un protón del residuo histidina-195 es transferido a este átomo de oxígeno, dando lugar a los productos lactato y NAD^+ todavía ligados a la enzima (figura 5e). Después de que el lazo de péptido 98-111 se abre, el lactato se disocia de la enzima y el grupo imidazol de la histidina-195 se vuelve a cargar positivamente al enlazar un protón de las moléculas de agua circundante (figura 5f). Finalmente el cofactor oxidado NAD^+ es liberado, y el estado inicial se vuelve a alcanzar (figura 5a).

2.1.3.2 Papaína

La papaína es una cisteína proteasa formada a partir de una sola cadena polipeptídica de 212 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 23 kDa. Esta cadena de residuos se pliega sobre si misma hasta formar una estructura globular con dos dominios bien definidos, entre los cuales se forma una hendidura en la que se encuentra el sitio activo de la enzima (figura 6). Este sitio activo está formado principalmente por los residuos cisteína 25 (Cys-25), asparagina 158 (Asn-158) y la histidina 159 (His-159), los cuales forman un par iónico tiolato-imidazolio¹⁷⁻¹⁹. Esta enzima es estable

bajo un amplio rango de condiciones: pH de 4 a 10 y a temperaturas superiores a 60°C²⁰.

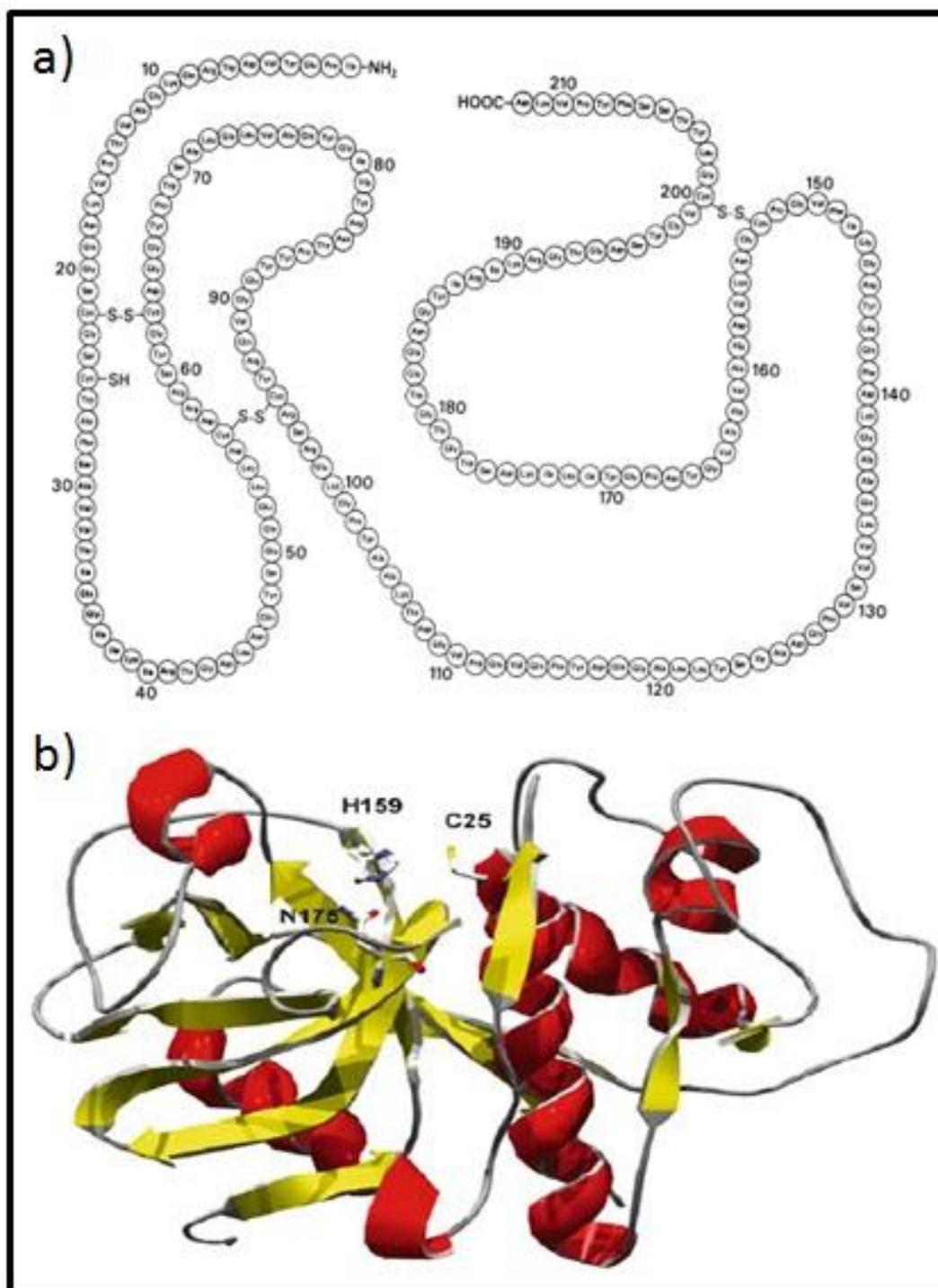


Figura 6.- Enzima papaína: a) Secuencia de aminoácidos, b) Estructura tridimensional.

La papaína es estable por varios meses cuando se almacena a 4°C en una forma inactiva reversible, por ejemplo la mercuripapaína (preparada por la adición de un equivalente de cloruro mercúrico) o el disulfuro de 2-piridil papaína (obtenida usando el reactivo disulfuro de 2,2'-dipiridilo), ambas formas inactivas pueden ser reactivados con tioles tales como 2-mercaptoetanol o DTT. La enzima es activada con cianuro de hidrógeno²¹, sulfuro de hidrógeno²², cisteína²³ y glutatión²⁴. Por otro lado, dentro de los inhibidores se encuentran los reactivos que presentan alta afinidad por los grupos carbonilo, la fenilhidrazina (oxida a la papaína), y otros²⁵. La papaína exhibe actividad endopeptidasa, amidasa y esterasa²⁶. El primer dominio (residuos 1-110) contiene principalmente hélices alfa, mientras que el segundo dominio (residuos 111-212) presenta un gran contenido de hojas antiparalelas tipo beta y un menor monto de hélices alfa. Tres de los cinco residuos de triptófano están localizados en el primer dominio y los otros dos en la región enrollada del segundo dominio.

La enzima posee siete residuos de cisteína, pero solamente uno de ellos, el residuo cisteína-25 (Cis25) lo que provee un grupo tiol libre al sitio activo. Los residuos restantes de cisteína forman puentes disulfuro (S-S) de la siguiente manera: Cis22-Cis63, Cis56-Cis95 y Cis153-Cis200. La estabilidad estructural de cada lóbulo se debe al menos en parte al núcleo hidrofóbico, formado con la contribución de muchas cadenas laterales de aminoácidos. Las moléculas de agua presentes en forma de redes juegan un papel importante en la estabilidad de la enzima, especialmente en la interface entre los dos dominios²⁷. Las moléculas de agua están localizadas en las áreas de contacto entre moléculas adyacentes de papaína. Es como si la enzima estuviera atrapada en una red de moléculas de agua con un número limitado de interacciones entre las moléculas de proteína²⁸.

2.1.3.2.1 Mecanismo de catálisis

El paso crucial en el proceso de catálisis de la papaína involucra la formación de un par iónico reactivo tiolato/imidazolio ($\text{Cys-S}^-/\text{His-Im}^-$), lo que resulta en una transferencia de un protón entre la cisteína 25 (Cis25) y la histidina-159 (His159). En el comienzo del proceso de catálisis el anión tiolato ataca al átomo de carbono del grupo carbonilo en el enlace péptidico próximo a ser dividido. De esta manera el doble enlace entre el carbono y el oxígeno se convierte en uno sencillo (figura 7a). El oxígeno asume una carga negativa permitiendo la formación de un primer estado de transición tetraédrico. El oxianión (O^-) es estabilizado por un puente de hidrógeno con los grupos NH de la cadena lateral del residuo glutamina-19 (Gln19) y de la estructura principal de la cisteína-25 (Cis25), lo que resulta en la formación de agujero oxianión (figura 7b)²⁹⁻³².

La rotura del enlace péptidico del sustrato ocurre cuando la rotación del residuo de histidina permite la transferencia de un protón del catión imidazolio al átomo de nitrógeno del enlace péptidico. La nueva amina formada a partir del sustrato es unida mediante un puente de hidrógeno al residuo His159, mientras que la parte carboxílica del sustrato es enlazada al residuo Cis25 por medio de un enlace tioéster, formando la acil enzima (figura 7c). El siguiente paso en la reacción envuelve la disociación de la amina recién formada del sustrato y su remplazo con una molécula de agua. El nitrógeno del grupo imidazolio contribuye a la polarización de la molécula de agua, la cual en consecuencia ataca al carbono del grupo carbonilo de la acil enzima (figura 7d).

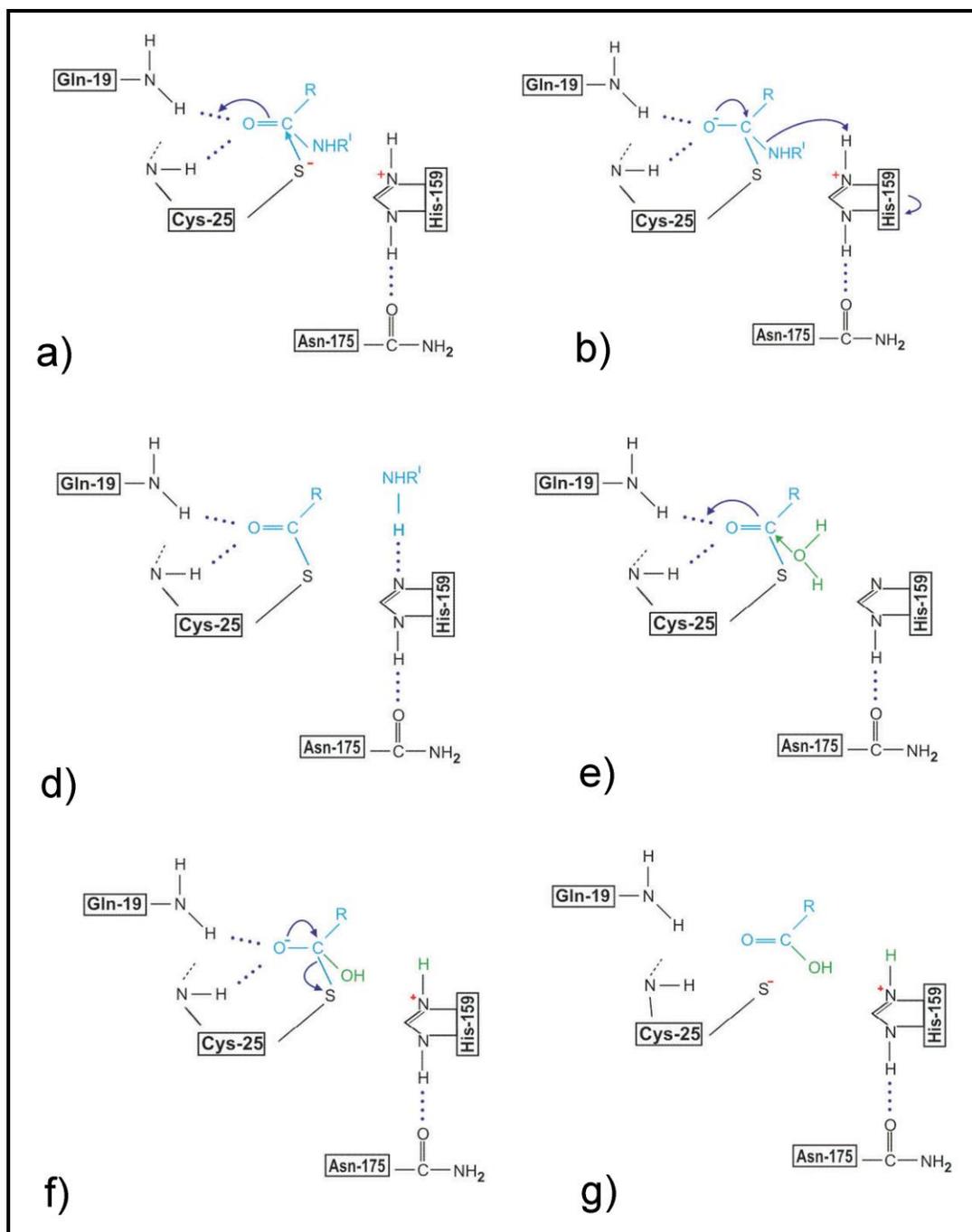


Figura 7.- Mecanismo de catálisis de la enzima papaína. (Explicado en texto)

Esto es seguido por la formación de un segundo intermediario tetraédrico (figura 7e). En el paso final la desacilación del tioéster lleva a una reconstrucción del grupo carboxilo en el sustrato hidrolizado, lo que es complementado con la liberación de la enzima activa (figura 7f)^{29, 32}.

2.2. Electrohilado

2.2.1. Teoría

El electrohilado se define de manera general como el proceso de producir fibras haciendo uso de un campo eléctrico, el cual actúa sobre las cargas inducidas en una solución polimérica. Este proceso consta de distintas etapas, desde el bombeo de la solución polimérica al electrodo (aguja) hasta la etapa final de recolección de fibras. La primera etapa es la formación de la gota de polímero en la punta de la aguja como consecuencia del bombeo antes mencionado. Posteriormente, como resultado de la aplicación del campo eléctrico, la tensión superficial en la superficie de la gota comienza a ceder, dando como resultado la deformación de la gota hasta adquirir una forma cónica.

A esta forma cónica como ya se mencionó anteriormente se denomina comúnmente como el “cono de Taylor”, el cual es muy importante dado que de su correcta formación depende en gran parte la morfología final de las fibras³³⁻³⁴. Una vez alcanzado un cierto valor límite característico de cada solución, la tensión superficial es vencida por la fuerza ejercida por el campo eléctrico sobre las cargas en el polímero provocando una deformación en la superficie del cono de Taylor. Esta deformación evoluciona hasta generar un chorro de polímero, el cual no sigue una trayectoria en línea recta hacia el colector, sino que sufre una serie de inestabilidades electrodinámicas que lo hacen seguir una trayectoria en forma de círculos concéntricos hasta alcanzar el colector³⁵. Como resultado de la evaporación del solvente y de las inestabilidades antes mencionadas, el chorro de polímero sufre una disminución en su diámetro pudiendo llegar a alcanzar escalas nanométricas una vez depositado en el colector.

Inicialmente se creía que conforme avanzaba en su camino hacia el colector, el chorro principal de polímero se dividía en múltiples chorros más pequeños³⁶. Conforme se avanzó en las técnicas de análisis de imágenes, se pudo comprobar mediante cámaras de alta velocidad que lo que pasaba en

realidad era que un solo chorro de polímero se movía tan rápidamente en su trayectoria hacia el colector que las cámaras normales no alcanzaban a distinguir ese efecto y simplemente describían una división del chorro principal en múltiples chorros más pequeños³⁷. Distintos investigadores han enfocado sus esfuerzos en investigar los diferentes fenómenos electrodinámicos que se presentan durante esta etapa del proceso de electrohilado^{35, 37}. Generalmente se reconocen tres tipos de inestabilidades en este proceso: la clásica (axisimétrica) también llamada inestabilidad Rayleigh, la inestabilidad axisimétrica inducida por el campo eléctrico y la inestabilidad *whipping*³⁷⁻³⁸.

2.2.2. Montaje de la técnica del electrohilado

El electrohilado requiere de ciertos elementos básicos para su funcionamiento (figura 8). Una fuente de alto voltaje para generar la diferencia de potencial necesaria para deformar la gota de polímero hasta producir el chorro polimérico que posteriormente dará origen a las nanofibras. Esta fuente de voltaje debe tener la capacidad para generar decenas de miles de voltios, que es el rango de voltaje necesario para el electrohilado de la mayoría de los polímeros convencionales³⁹.

Otro de los elementos clave es una bomba de infusión que es el elemento encargado de bombear la solución polimérica hacia el electrodo, que en la mayoría de los casos es una aguja convencional a la cual se le ha quitado la punta. Esta bomba debe ser capaz de generar y mantener flujos en el rango de 0 a 5 ml/hr, lo suficientemente pequeños solo para mantener el flujo de material entre el electrodo y el colector. De otra forma, si se presentasen interrupciones en el flujo de polímero, aumentaría la posibilidad de que aparecieran defectos estructurales en las fibras finales debido a las caídas de voltaje. Por otra parte, si el bombeo de material polimérico hacia el electrodo fuese demasiado alto se produciría un goteo que impediría totalmente el proceso de electrohilado⁴⁰.

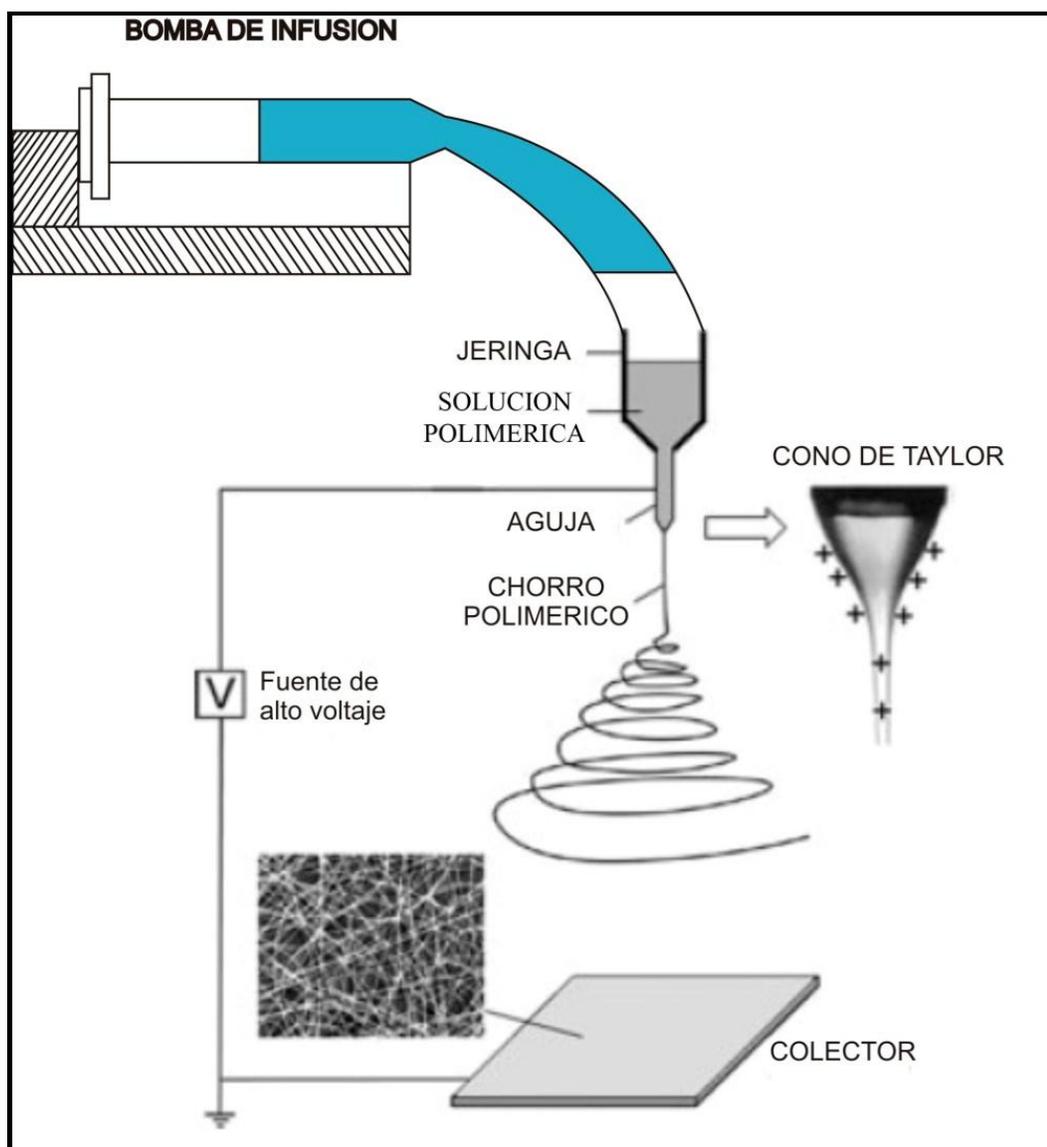


Figura 8.- Montaje clásico del aparato de electrohilado.

El electrodo, como ya se mencionó anteriormente debe ser de un material conductor y preferentemente terminado en una superficie plana, para evitar el “efecto corona” una vez que se aplique el voltaje. Al final el colector es la parte del montaje del electrohilado donde se depositan las fibras, éste debe estar conectado a tierra para completar el circuito. También debe ser de un material conductor (casi siempre aluminio), y su forma y orientación influyen de gran manera en el entramado final de las fibras³⁹⁻⁴⁰.

2.2.3 Electrohilado de nanofibras

2.2.3.1 Definición y características de las nanofibras

En la literatura científica se define como nanofibra aquellas fibras con diámetros menores a los 100 nanómetros. Sin embargo el sector comercial es más flexible en este aspecto aceptando como nanofibras aquellas con diámetros hasta de 300 a 500 nm⁴¹. A partir de la década pasada las nanofibras han recibido un renovado interés por su elevada área superficial y alta porosidad. Estas características las hacen excelentes candidatas para algunas aplicaciones tales como la catálisis, la inmovilización de sustancias orgánicas, filtración, tejidos artificiales, etc. En el caso particular de esta tesis la gran área superficial de las nanofibras permite una elevada carga enzimática, además su porosidad facilita que la molécula de sustrato alcance el centro catalítico de la enzima. Las nanofibras usadas como matriz en la encapsulación de enzimas tienen la ventaja de poder ser recuperadas del medio de reacción para reacciones posteriores.

2.2.3.2 Nanotecnología y nanofibras

Las nanofibras han encontrado su nicho en el nuevo mundo de la nanotecnología. Un punto en contra de esta nueva tecnología es su dificultad de síntesis, dado que se requieren generalmente de procedimientos químicos complicados para su generación. Algunos ejemplos de estos procedimientos son el auto-ensamblaje⁴², síntesis por medio de un templete⁴³, separación de fases⁴⁴ y el estiramiento⁴⁵. Es por eso de la importancia del electrohilado como una técnica sencilla de producción de nanofibras, por lo que en caso de consolidarse como una técnica comercial alentaría de gran manera la producción a gran escala de nanofibras. De esta manera se facilitaría el acceso a todas las aplicaciones actuales de las nanofibras, algunas de las más importantes son la filtración⁴⁶, la ingeniería de

tejidos⁴⁷, la liberación de sustancias terapéuticas⁴⁸, ropa para protección química y biológica⁴⁹, sensores⁵⁰ y para vendaje de heridas⁵¹.

2.2.4 Inmovilización por electrohilado

Una de las aplicaciones más versátiles y dinámicas que se le han encontrado a la técnica de electrohilado es la inmovilización de sustancias biológicas. Desde virus hasta enzimas pasando por bacterias y ácido desoxirribonucleico (DNA) han sido inmovilizados usando la técnica de electrohilado⁵²⁻⁵⁵. Un aspecto interesante es que las entidades biológicas conservan sus actividades metabólicas una vez inmovilizadas mediante esta técnica. Lo anterior nos indica que estas sustancias biológicas no sufren alteraciones significativas como resultado de la interacción con el campo eléctrico inducido por el alto voltaje utilizado en esta técnica.

2.2.4.1 Inmovilización de enzimas

De las entidades biológicas que se han inmovilizado utilizando la técnica del electrohilado las que son de nuestro interés para nuestro trabajo de investigación son las enzimas. El uso de enzimas para la catálisis de procesos industriales es preferido debido a las condiciones amigables de temperatura, presión y pH, bajo las cuales se llevan a cabo la mayoría de las reacciones enzimáticas⁵⁶. Así mismo se da preferencia a la utilización de enzimas inmovilizadas en algún soporte físico para evitar de esta manera la rápida desnaturalización de la enzima. Los materiales porosos se prefieren sobre los no porosos debido a la elevada área superficial y la alta carga de material biológico susceptible de ser inmovilizado usando este tipo de materiales. Entre los materiales porosos que se han utilizado en la inmovilización de enzimas se encuentran geles, partículas porosas y membranas⁵⁵.

Entre todas las opciones para inmovilizar enzimas, las nanopartículas son los materiales que combinan de una mejor manera características tales como el área superficial, resistencia a la difusión y eficiencia en la cantidad de enzima inmovilizada. Sin embargo su recuperación una vez terminada la reacción es siempre un aspecto desafiante debido a su dispersión en el medio. En este aspecto las nanofibras surgen como una opción interesante debido a la facilidad con que se pueden recuperar del medio de reacción y usarse de nuevo en futuras reacciones. Las nanofibras cumplen con lo anterior al mismo tiempo que conservan las principales cualidades de los materiales nanoestructurados⁵⁵.

Como ya se ha mencionado, el electrohilado es una técnica versátil para la producción de nanofibras. El electrohilado ha sido utilizado para inmovilizar enzimas tan diversas como celulasa, lipasa, glucosa, α -quimotripsina, lisozima, etc^{55, 57-61}. En todos los casos las enzimas inmovilizadas han conservado su actividad catalítica. Así mismo, en la mayoría de los casos la enzima inmovilizada ha mostrado una actividad catalítica inferior cuando se compara con la actividad de la enzima en solución. Sin embargo cuando esta comparación se lleva a cabo bajo la variación de distintos factores tales como el tiempo, la temperatura y el pH, se puede apreciar una notable mejoría en el desempeño de la enzima sometida a un proceso de inmovilización con respecto a la enzima en solución. Lo anterior significa que la enzima inmovilizada conserva durante más tiempo su actividad catalítica en un amplio rango de valores de temperatura y pH.

Los dos mecanismos más comunes mediante los cuales se logra la inmovilización y fijación de la enzima en las nanofibras poliméricas son el atrapamiento de la enzima seguido de un proceso de entrecruzamiento o bien la funcionalización de las nanofibras seguido de un proceso de activación y la posterior unión de la enzima mediante un enlace covalente^{55, 57}. El primer método es el más usado debido a su simpleza y facilidad, en el segundo método el aumento del número de fases tanto para la síntesis del

polímero como para la activación y adhesión de la enzima supone un aumento en el tiempo y costos de este tipo de procedimiento. El método de atrapamiento representa la ventaja de su sencillez y por tanto su relativamente bajo costo, sin embargo se necesita de un posterior proceso de entrecruzamiento de la enzima para evitar su desprendimiento de las fibras. Lo anterior se da como consecuencia del rompimiento de los enlaces débiles que unen a la enzima con el polímero (Van der Waals, dipolo-dipolo, etc.) una vez que éstas son introducidas al medio de reacción.

2.3. Biosensores

2.3.1. Definición

Un biosensor es definido básicamente como el aparato que utiliza una respuesta bioquímica de ciertas entidades biológicas (enzimas, anticuerpos, organelos y tejidos celulares, etc.) a determinadas sustancias llamadas analitos, para convertirla en una señal eléctrica cuantificable mediante diversos tipos de transductores (electroquímicos, ópticos, másicos, térmicos, magnéticos, etc.). Se usan en una amplia gama de disciplinas tales como la medicina, la agricultura, la ingeniería de alimentos, la ecología, etc. La principal ventaja de los biosensores es la especificidad y rapidez de su respuesta al entrar en contacto con sus respectivos analitos⁶².

2.3.2. Componentes de un biosensor

Generalmente los elementos típicos de un biosensor son la unidad de reconocimiento biológico que puede ser desde una bacteria hasta cierto tipo de tejido. Esta unidad biológica es la única parte de un biosensor que entra en contacto directo con el analito (sustancia a medir), al hacerlo se producen una serie de reacciones químicas que conllevan a cambios ópticos, eléctricos, térmicos, de masa, etc. El transductor es la parte de un biosensor que se encarga de transformar estos cambios en una señal cuantificable

susceptible de ser captada, amplificada y mostrada como resultado final en la pantalla del aparato. Un procesador de datos es el encargado de amplificar y procesar la señal producida por el transductor, dependiendo del equipo utilizado para tal efecto (figura 9). El objetivo final es que el usuario vea en la pantalla una cifra que represente fielmente la cantidad de la sustancia que se busca identificar mediante el biosensor⁶³.

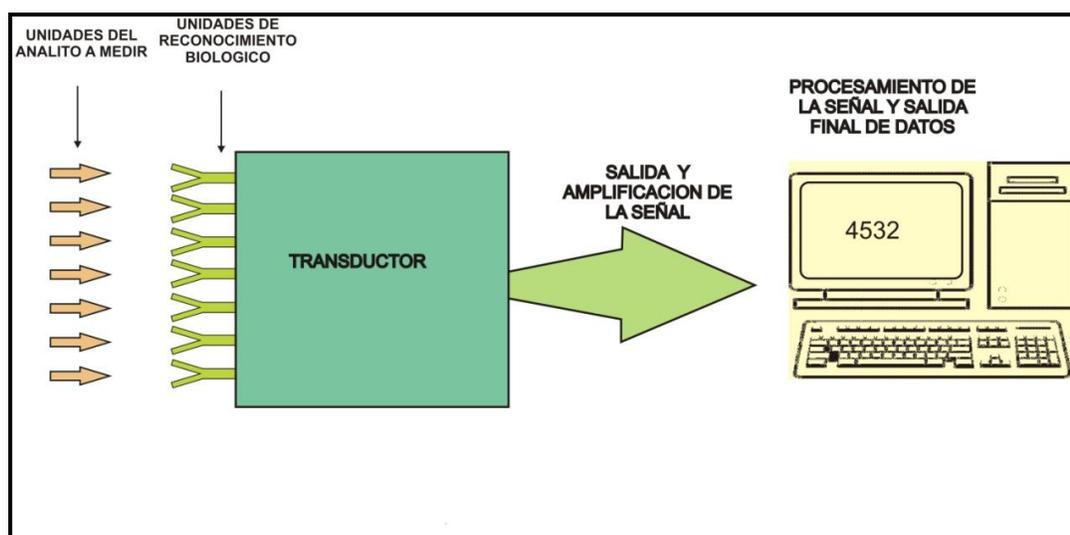


Figura 9.- Componentes básicos de un biosensor

2.3.3. Biosensores Enzimáticos

En un biosensor enzimático el elemento que entra en contacto con el analito es una enzima. Esto le confiere unas excelentes propiedades de rapidez de detección pero sobre todo de especificidad hacia un determinado analito. La interacción entre la enzima y el analito produce alguno de los siguientes efectos: cambio en la concentración de protones, liberación o absorción de gases (como amoníaco u oxígeno); emisión, absorción o reflectancia de luz así como emisión de calor, etc. Estos cambios son convertidos por el transductor en una señal de respuesta susceptible de ser interpretada y procesada, esta señal puede ser una corriente o potencial eléctrico, cambios de temperatura, o absorción de luz a través de medios

electroquímicos, térmicos u ópticos. El primer biosensor basado en enzimas fue desarrollado por Clark and Lyons, quienes inmovilizaron la enzima glucosa oxidasa en un electrodo sensible al oxígeno para medir glucosa⁶⁴. Desde entonces a la fecha ha ocurrido una impresionante proliferación de aplicaciones que incluyen una amplia variedad de sustratos. Un amplio rango de enzimas han sido integradas en distintos transductores para construir biosensores con aplicaciones en el cuidado de la salud, medicina veterinaria, industria alimenticia, monitoreo medioambiental y defensa^{63, 65}.

2.3.3.1 Características y aplicaciones

Sus principales características son la alta afinidad, especificidad, reversibilidad, facilidad de detección, señales altas en tiempos muy cortos, disponibilidad comercial de enzimas, rapidez de respuesta y la sensibilidad hacia sus respectivos analitos⁶⁵. Las principales áreas de aplicación de los biosensores enzimáticos son el cuidado de la salud tanto en animales como en humanos, las industrias de los alimentos y la fermentación, monitoreo medioambiental, agricultura y defensa. Todavía se espera un incremento en el uso de los biosensores enzimáticos en aplicaciones clínicas y médicas. Una prueba rápida para sustancias tales como amilasa, glucosa, lactato, paracetamol, salicilato, creatina, quinasa así como urea serían de una invariable ayuda en emergencias médicas. Aunque muchas de estas prueba son actualmente llevadas a cabo en laboratorios clínicos centrales, hay ahora una demanda por métodos baratos para el monitoreo de estos compuestos en consultorios médicos, departamentos de pacientes no hospitalizados, para el diagnóstico y monitoreo de las condiciones de los pacientes así como para terapia. Esto requerirá de métodos fáciles de usar y que requieran de una mínima preparación de la muestra. Esta es el área de oportunidad en donde se espera que los biosensores jueguen un rol importante^{63, 65-66}. El principal ejemplo de biosensores enzimáticos es el ya mencionado biosensor para la detección de glucosa, el cual ha tenido un gran impacto comercial

marcando el camino para la incursión en el mercado de los biosensores enzimáticos

2.3.3.2. Enzimas inmovilizadas utilizadas en biosensores

Cuando se utilizan enzimas como elementos biológicos en un biosensor, dos factores se vuelven de crucial importancia: la estabilidad operacional y el uso a largo plazo. Dado que la principal manera de lograr esto es mediante la inmovilización de la enzima, el tipo y el grado de inmovilización se convierten en un factor determinante en el desempeño de un biosensor. Las distintas maneras de inmovilizar una enzima ya se han discutido en secciones anteriores, se dividen en su mayor parte en técnicas físicas y químicas. Dentro de los métodos físicos de inmovilización la técnica de sol-gel es ampliamente utilizada debido a diversos factores tales como su baja temperatura de síntesis y su grado de transparencia final. Este último factor facilita la aplicación de las enzimas como elementos biológicos sensibles en biosensores ópticos. Entre las enzimas inmovilizadas mediante esta técnica se encuentran la glucosa oxidasa⁶⁷, catalasa⁶⁷, ureasa⁶⁸, colesterol esterasa⁶⁹, lactato oxidasa⁷⁰, lactato deshidrogenasa⁷¹, peroxidasa de rábano picante⁷², etc. No obstante sus evidentes ventajas, el método de sol-gel como técnica de inmovilización cuenta con la desventaja de un procedimiento que conlleva una serie de etapas hasta llegar al objetivo final. Lo anterior implica un incremento en el costo de los biosensores comerciales desarrollados mediante esta técnica y potencial riesgo de degradación de la enzima.

La técnica de electrohilado cuenta con la gran ventaja de que todo el procedimiento de inmovilización se lleva a cabo en un solo paso. Lo anterior significa que el proceso se simplifica y se vuelve más eficiente, lo que a su vez reduce de gran manera los costos totales del biosensor. La alta porosidad y elevada área superficial de las nanofibras electrohiladas hacen

del proceso de electrohilado una muy buena opción para aplicaciones en el área biomédica tal como los biosensores. Como ya se mencionó anteriormente la inmovilización en un solo paso por electrohilado reduce los riesgos de desnaturalización de la enzima, al no tener que someterla a una serie de procesos químicos que pudiesen alterar su frágil estructura tridimensional y afectar su función catalítica. Debido a las razones anteriores el electrohilado se ha presentado en los últimos años como una gran alternativa en la inmovilización de enzimas tanto para biosensores como para otros sistemas que involucren estas entidades biológicas. Entre las enzimas que se han inmovilizado mediante electrohilado para su aplicación específica en biosensores se encuentran la ureasa⁷³, glucosa oxidasa⁷⁴, α -quimotripsina⁵⁵, tirosinasa⁷⁵, peroxidasa de rábano picante⁷⁶, etc. En todos los casos la gran porosidad de las nanofibras electrohiladas facilita la difusión del analito hasta alcanzar el centro activo de las enzimas inmovilizadas. De igual manera la inmovilización de enzimas en nanofibras permite la fácil recuperación del catalizador inmovilizado del medio de reacción, algo sumamente difícil de lograr con otros métodos de inmovilización como por ejemplo las nanopartículas⁵⁵.

2.4. Sistemas de liberación

2.4.1. Definición

Un sistema de liberación es una formulación o un aparato que permite la introducción de una sustancia (casi siempre terapéutica) al interior del cuerpo, mejorando su eficacia, tiempo de acción y seguridad al controlar la rapidez, el tiempo y la precisión del lugar donde se va a liberar la sustancia. Estos sistemas de liberación son una interfase entre la sustancia que se desea liberar y el cuerpo⁷⁷. En esta sección se hará hincapié en el recuento de las diferentes rutas de liberación de sustancias terapéuticas, en especial aquellas que involucren péptidos y proteínas. De igual manera se le dará

énfasis al papel asumido por la nanotecnología, en concreto por las nanofibras, en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación. Las principales razones para el desarrollo e investigación de nuevos sistemas de liberación de sustancias terapéuticas son la de extender el tiempo de duración del efecto de la droga, a la vez que se protege a ésta de las condiciones adversas que se pudiesen presentar en su camino hacia el sitio de liberación predeterminado. Una vez cumplidos estos objetivos se tiene como consecuencia una disminución en la frecuencia de aplicación y se minimizan los efectos adversos, lo que conlleva a un aumento considerable en la confortabilidad y la aceptación del paciente a tratamientos médicos de largo plazo.

2.4.2. Liberación controlada de proteínas y péptidos

La liberación controlada de proteínas y péptidos ha cobrado importancia debido a la investigación sobre su importante papel en diversos e importantes procesos fisiológicos. Algunos de estos procesos incluyen la fertilidad, crecimiento, inflamación, regulación de la presión sanguínea, percepción del dolor, etc. Lo anterior, aunado a su producción sintética mediante el uso de técnicas biotecnológicas, ha incrementado el interés en el desarrollo de sistemas de liberación que permitan y potencialicen su uso terapéutico en cuadros clínicos particulares. Sin embargo su desarrollo como sustancia terapéutica ha estado limitado por su marcada inestabilidad metabólica, lo que se vuelve un obstáculo considerando la barrera enzimática presente en la mayoría de las rutas de liberación más comunes de fármacos⁷⁸. Algunas alternativas interesantes para el uso terapéutico de proteínas y péptidos son la liberación pulmonar y la modificación química de las proteínas⁷⁹⁻⁸⁰. Sin embargo la tendencia que se sigue es tratar de encontrar técnicas que hagan posible la liberación a través de las vías de administración más aceptadas por los pacientes. Entre estas se encuentran la vía oral y transdermal, las cuales son por mucho las más aceptadas por los pacientes al eliminar el uso de agujas asociadas a las inyecciones⁸⁰.

2.4.3 Nanofibras como alternativa en la liberación de proteínas

Tal y como se ha mencionado en capítulos anteriores el uso de proteínas como agentes terapéuticos se complica debido principalmente a la vulnerabilidad de su frágil estructura tridimensional frente a los sistemas de defensa del cuerpo humano (enzimas y macrofágos). Como consecuencia de lo anterior las proteínas necesitan de un sistema de transportación y liberación eficaz más que cualquier otra molécula terapéutica. Las nanofibras son alternativas interesantes para el transporte y liberación de péptidos y proteínas, dado que proporcionan ventajas tales como una gran área superficial y un trayecto de difusión corto para las proteínas encapsuladas.

Por otra parte la alta porosidad de las nanofibras facilitaría el intercambio de moléculas entre el interior de éstas y el medio de reacción. El electrohilado es el método de fabricación de nanofibras mas ampliamente utilizado en diversas aplicaciones de las nanofibras incluyendo la liberación controlada de sustancias. Este método se lleva a cabo a temperatura ambiente y los campos eléctricos y esfuerzos mecánicos que involucra no parecen conllevar a graves daños en las funciones biológicas de las sustancias inmovilizadas. Lo anterior queda confirmado por la gran cantidad de trabajos publicados en los que se reporta la inmovilización de sustancias biológicas mediante esta técnica^{40, 47, 59, 73}. Por otra parte el electrohilado cuenta con la gran ventaja de poder generar nanofibras poliméricas en un solo paso a partir de una solución polimérica. Lo anterior cobra gran importancia en el caso de la encapsulación y posterior liberación de proteínas, dado que reduce sustancialmente el riesgo de inestabilidad y posterior degradación de las proteínas.

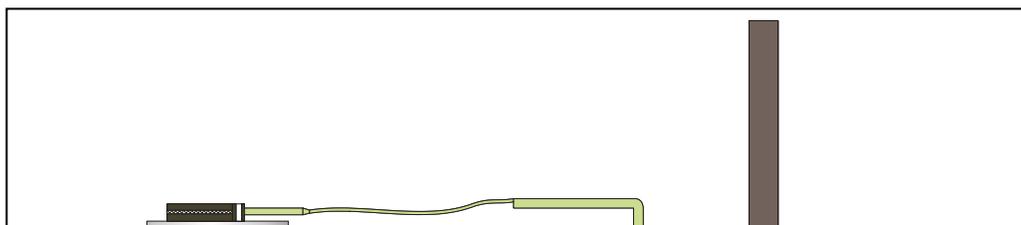


Figura 10.- Montaje del electrohilado coaxial

Por lo general se disuelve la sustancia a encapsular en la solución polimérica y posteriormente se procede al electrohilado bajo parámetros de solución y de operación característicos de cada sistema proteína-polímero. Una característica de este método es la solubilidad que debe de poseer la proteína en la solución polimérica para que el electrohilado se lleve a cabo de manera exitosa. Para los casos en que la proteína no es miscible en la solución polimérica, existen alternativas como el electrohilado coaxial, en el cual se utilizan diferentes canales para bombear el polímero y la solución de proteína respectivamente. Esto se logra mediante el uso de electrodos concéntricos donde la solución polimérica casi siempre es bombeada como solución exterior, pero en algunos casos también se bombea en el conducto interior. Un ejemplo de esta variante del electrohilado se muestra en la figura

10, estos sistemas han sido utilizados en casos donde hay poca miscibilidad entre el solvente utilizado para disolver el polímero y la proteína utilizada. Por lo general hay pocas publicaciones donde se hayan utilizado electrohilado coaxial para generar nanofibras, esto debido al alto grado de dificultad que representa el manejar diferentes velocidades de flujo para las dos soluciones (interna y externa), además de otras dificultades asociadas a este método⁸¹⁻⁸³.

El electrohilado ofrece la posibilidad de fabricar nanofibras de mezclas de polímeros, con la ventaja de combinar propiedades tales como la biodegradabilidad y la biocompatibilidad de distintos tipos de polímeros en un solo electrohilado. De la misma manera se han realizado electrohilados de suspensiones de gotas de agua dispersadas en una solución polimérica, logrando de esta manera electrohilar fibras con depósitos de agua encapsulados en su interior. Esto cuenta con la gran ventaja de poder incluir moléculas solubles en agua (proteínas por ejemplo) en esos depósitos, para posteriormente poder ser encapsuladas y liberadas de forma gradual⁶⁰.

Sin embargo a pesar de lo anterior han sido muy pocos los trabajos publicados donde se haya utilizado el electrohilado para la encapsulación y posterior liberación de proteínas, principalmente debido al temor que el proceso afecte de alguna manera al desempeño biológico de la macromolécula. Entre las proteínas encapsuladas y liberadas a través de la técnica de electrohilado se encuentran la lisozima⁶¹, β -galactosidasa, albúmina de suero bovino⁸⁴, ADN plasmídico⁸⁵, factores de crecimiento⁸⁶, etc. De entre estos, la liberación de ADN plasmídico y factores de crecimiento celular se encuentran entre los trabajos más vanguardistas e interesantes que se han publicado utilizando nanofibras como sistemas de liberación de proteínas.

2.4.3.1 Nanofibras en la liberación controlada de enzimas

Las enzimas inmovilizadas en un medio sólido cuentan con una gran estabilidad inclusive en disolventes orgánicos y en condiciones de pH y temperaturas adversas. Además de estabilizar la enzima, el uso de la inmovilización puede influir en un mejor control de la reacción enzimática. Las nanofibras son ideales para la encapsulación de enzimas dado que cuentan con una gran área superficial, lo cual nos da la posibilidad de inmovilizar una gran cantidad de enzima a la vez que se eleva su eficiencia como catalizador. Su superficie puede ser modificada mediante la manipulación de determinados parámetros tanto de solución como de operación, lo cual nos permite modular la porosidad de la nanofibra y en consecuencia el intercambio de sustancias entre el interior de las nanofibras y el medio de reacción⁸⁷. Además la técnica de electrohilado cuenta con la ventaja de poder utilizar diversas enzimas con distintos grados de solubilidad y extraídas de distintas fuentes. Otra gran ventaja es que al utilizar un medio sólido fibroso, las enzimas encapsuladas pueden ser fácilmente recuperables del medio de reacción para su uso en posteriores reacciones.

Básicamente existen tres tendencias principales en el uso de nanofibras para el transporte y posterior liberación de enzimas. La primera de ellas nos habla de la inmovilización de las enzimas en el exterior de las nanofibras. Lo anterior se logra básicamente al sumergir las nanofibras electrohiladas en una solución enzimática. Las enzimas quedan adheridas al exterior de las nanofibras ya sea mediante grupos funcionales activos en la superficie de las fibras o por simple adsorción física⁸⁸⁻⁸⁹. Su principal desventaja es que únicamente es aprovechado el exterior de las nanofibras, mientras que el resto de la nanoestructura es desaprovechado. Otro método es mezclar la enzima con la solución polimérica y efectuar el electrohilado inmediatamente después. Este método aprovecha la totalidad de la nanofibra para la encapsulación de la enzima, sin embargo existe el riesgo de una liberación inmediata de la enzima sobre todo en los casos donde se utilizan polímeros solubles en el medio de reacción. En estos casos las nanofibras

tienen que someterse a un proceso de entrecruzamiento para evitar su inmediata disolución en medios acuosos⁵⁷.

Una tercera alternativa más sofisticada es la técnica de electrohilado coaxial. Este método soluciona el conflicto de falta de solubilidad enzimática en el solvente utilizado para el electrohilado, a la vez que proporciona un medio de transporte y protección eficaz de la enzima mediante la capa exterior polimérica. Además, como ya se mencionó, esta capa exterior puede ser modificada para modular su porosidad, de tal manera que las nanofibras pueden actuar bien como un sistema efectivo para la liberación de enzimas o en su defecto como un nanoreactor donde la reacción enzimática es llevada a cabo por completo en el interior de las fibras. Un ejemplo de lo anterior es la encapsulación de la β -galactosidasa y la fosfatasa alcalina en nanoestructuras tubulares mediante el uso de electrohilado coaxial⁸⁷. Esto permitió la creación de nanofibras huecas conteniendo en su interior las enzimas solubilizadas en un medio acuoso, protegidas por una capa de polímero hidrofóbico. A su vez la capa exterior de estas nanofibras fue modificada con polietilenglicol, lo cual aumentó considerablemente su porosidad facilitando de esta manera el intercambio de sustancias entre el medio exterior y las sustancias encapsuladas. Se comprobó por lo tanto su efectividad tanto como sistema de liberación de enzima en el caso de la fosfatasa alcalina y como nanoreactor enzimático en el caso de la β -galactosidasa⁸⁷.

En distintos trabajos se ha publicado con éxito el uso de las nanofibras como sistema de liberación de enzimas. Por ejemplo se ha reportado la inmovilización y posterior liberación de lisozima hasta por doce días, utilizando un sistema de nanofibras electrohiladas a partir de una solución de policaprolactona y polietilenglicol⁹⁰. La luciferasa es otra de las enzimas que han sido liberadas a partir de nanofibras poliméricas, en este caso se utilizó alcohol polivinílico para el electrohilado de este sistema y se retardó la

liberación de la enzima mediante un recubrimiento de poli (p-xilileno)⁸⁴. En cualquiera de los dos casos se comprobó la eficacia y versatilidad de las nanofibras como sistema de liberación de enzimas, dado que ambas enzimas conservaron su actividad incluso después del proceso de electrohilado y posterior liberación.

Referencias

1. Whitford D: *Proteins: Structure and Function*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2005.
2. Carl B, Jhon T: *Introduction to Protein Structure*. New York: Garland Publishing, 1999.
3. Tanford C, Reynolds J: *Nature's Robots: A History of Proteins*: Oxford University Press, 2004.
4. Drauz K, Waldmann H (eds): *Enzyme catalysis in organic synthesis*. Wiley, 2002.
5. Bugg T: *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*: Wiley-blackwell 2009.
6. Copeland R: *Enzymes A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*: Wiley, 2000.
7. Aehle W (ed): *Enzymes in industry Production and Applications*. Wiley, 2004.
8. Fisher E, Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme, *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*. (1894), 27, 2985-2993.
9. Koshland DE, Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1958), 44 (2), 98-104.
10. Adams MJ, Buehner M, Chandrasekhar K, et al., Structure-Function Relationships in Lactate Dehydrogenase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1973), 70 (7), 1968-1972.
11. Holbrook JJ, Direct Measurement of Proton Binding to the Active Ternary Complex of Pig Heart Lactate Dehydrogenase, *Biochemical Journal* (1973), 133, 847-849.
12. Clarke AR, Wigley DB, Chia WN, et al., Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis, *Nature* (1986), 324 (6098), 699-702.
13. Anderson VE, LaReau RD, Hydride transfer catalyzed by lactate dehydrogenase displays absolute stereospecificity at C4 of the nicotinamide ring, *Journal of the American Chemical Society* (1988), 110 (11), 3695-3697.
14. Clarke AR, Wilks HM, Barstow DA, et al., An investigation of the contribution made by the carboxylate group of an active site histidine-aspartate couple to binding and catalysis in lactate dehydrogenase, *Biochemistry* (1988), 27 (5), 1617-1622.
15. Clarke AR, Atkinson T, Holbrook JJ, From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part II, *Trends in Biochemical Sciences* (1989), 14 (4), 145-148.
16. Deng H, Zheng J, Burgner J, Callender R, Molecular properties of pyruvate bound to lactate dehydrogenase: a Raman spectroscopic study, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1989), 86 (12), 4484-4488.
17. Husain SS, Lowe G, Completion of the amino acid sequence of papain, *Biochemical Journal* (1969), 114 (2), 279-288.
18. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, Neil RD (eds): *Handbook of Proteolytic Enzymes* (2 Ed.). London: Academic Press, 2004.

19. Rzychon M, Chmiel D, Stec-Niemczyk J, Modes of inhibition of cysteine proteases, *Acta Biochimica Polonica* (2004), 51 (4), 861-873.
20. Beynon R, Bond JS (eds): *Proteolytic enzymes: a practical approach*. The practical approach series. (2 Ed.). Oxford: Oxford University Press, 2001.
21. Vines SH, Tryptophane in Proteolysis, *Annals of Botany* (1902), os-16 (1), 1-c-22.
22. Mendel LB, Blood AF, Some peculiarities of the proteolytic activity of papain, *Journal of Biological Chemistry* (1910), 8 (3), 177-213.
23. Grassmann W, Dyckerhoff H, v. Schoenebeck O, Über natürliche Aktivatoren und Hemmungskörper proteolytischer Enzyme, *Zeitschrift für physiologische Chemie* (1930), 186 (4-6), 183-194.
24. Grassmann W, v. Schoenebeck O, Eibeler H, Über die Aktivierung tierischer und pflanzlicher Proteasen durch Glutathion. , *Zeitschrift für physiologische Chemie* (1931), 194 (3-4), 124-136.
25. Klein IB, Kirsch JF, The Activation of Papain and the Inhibition of the Active Enzyme by Carbonyl Reagents, *Journal of Biological Chemistry* (1969), 244 (21), 5928-5935.
26. Glazer AN, Smith EL: 14 Papain and Other Plant Sulfhydryl Proteolytic Enzymes. In D. B. Paul (ed), *The Enzymes* (Vol. Volume 3): Academic Press, 1971, 501-546.
27. Szabo A, Kotorman M, Laczko I, Simon LM, Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2006), 41, 43-48.
28. Kamphuis IG, Kalk KH, Swarte MBA, Drenth J, Structure of papain refined at 1.65 Å resolution, *Journal of Molecular Biology* (1984), 179 (2), 233-256.
29. Menard R, Carriere J, Laflamme P, et al., Contribution of the glutamine 19 side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain, *Biochemistry* (1991), 30 (37), 8924-8928.
30. Menard R, Plouffe C, Laflamme P, et al., Modification of the Electrostatic Environment is Tolerated in the Oxyanion Hole of the Cysteine Protease Papain, *Biochemistry* (1995), 34 (2), 464-471.
31. Harrison MJ, Burton NA, Hillier IH, Catalytic Mechanism of the Enzyme Papain: Predictions with a Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Potential, *Journal of the American Chemical Society* (1997), 119 (50), 12285-12291.
32. Otto H-H, Schirmeister T, Cysteine Proteases and Their Inhibitors, *Chemical Reviews* (1997), 97 (1), 133-172.
33. Buchko CJ, Chen LC, Shen Y, Martin DC, Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films *Polymer* (1999), 40 (26), 7397-7407.
34. Cloupeau M, Prunet-Foch B, Electrostatic spraying of liquids: Main functioning modes, *Journal of Electrostatics* (1990), 25 (2), 165-184.
35. Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH, Bending instability in electrospinning of nanofibers, *Journal of Applied Physics* (2001), 89 (5), 3018-3026.

36. Doshi J, Reneker DH, Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *Journal of Electrostatics* (1995), 35 (2-3), 151-160.
37. Shin YM, Hohman MM, Brenner MP, Rutledge GC, Electrospinning: a whipping fluid jet generates submicron polymer fibers, *Applied Physics Letters* (2001), 78 (8), 1149.
38. Hohman MM, Shin M, Rutledge G, Brenner MP, Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory, *Physics of Fluids* (2001), 13 (8), 2201.
39. Subbiah T, Bhat GS, Tock RW, Parameswaran S, Ramkumar SS, Electrospinning of Nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science* (2005), 96, 557-569.
40. Li D, Xia Y, Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?, *Advanced Materials* (2004), 16 (14), 1151-1170.
41. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Lim T-C, Ma Z: *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. Singapore: World Scientific Publishing, 2005.
42. Liu G, Qiao L, Guo A, Diblock Copolymer Nanofibers, *Macromolecules* (1996), 29 (16), 5508-5510.
43. Lin F, Shuhong L, Huanjun L, et al., Super-Hydrophobic Surface of Aligned Polyacrylonitrile Nanofibers, *Angewandte Chemie International Edition* (2002), 41 (7), 1221-1223.
44. Peter XM, Ruiyun Z, Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix, *Journal of Biomedical Materials Research* (1999), 46 (1), 60-72.
45. Ondarcuhu T, Joachim C, Drawing a single nanofibre over hundreds of microns, *EPL (Europhysics Letters)* (1998), 42 (2), 215-220.
46. Grafe TH, Graham KM: Nanofiber Web from Electrospinning. *Nonwovens in Filtration - Fifth International Conference*. Stuttgart, Germany: 2003.
47. Shina M, Ishii O, Sueda T, Vacanti JP, Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh, *Biomaterials* (2004), 25, 3717-3723.
48. Yang D, Li Y, Nie J, Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs, *Carbohydrate Polymers* (2007), 69, 538-543.
49. Graham K, Gogins M, Schreuder-Gibson H: Incorporation of Electrospun Nanofibers Into Functional Structures. *International Nonwovens Technical Conference*. Baltimore, Maryland: Int. Nonwovens J. Summer, 2004, 21-27.
50. Ding B, Kim J, Miyazaki Y, Shiratori S, Electrospun nanofibrous membranes coated quartz crystal microbalance as gas sensor for NH₃ detection, *Sensors and Actuators B* (2004), 101, 373-380.
51. Venugopal J, Ramakrishna S, Biocompatible Nanofiber Matrices for the Engineering of a Dermal Substitute for Skin Regeneration, *Tissue Engineering* (2005), 11 (5-6), 847-854.
52. Lee S-W, Belcher AM, Virus-Based Fabrication of Micro- and Nanofibers Using Electrospinning, *Nano Lett.* (2004), 4 (3), 387-390.
53. Salalha W, Kuhn J, Dror Y, Zussman E, Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres, *Nanotechnology* (2006), 17 (18), 4675-4681.

54. Luu YK, Kim K, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M, Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers, *Journal of Controlled Release* (2003), 89, 341–353.
55. Jia H, Zhu G, Vugrinovich B, et al., Enzyme-Carrying Polymeric Nanofibers Prepared via Electrospinning for Use as Unique Biocatalysts, *Biotechnol. Prog.* (2002), 18, 1027-1032.
56. Cavaco-Paulo A, Gübitz GM (eds): *Textil processing with enzymes*. Cambridge: Woodhead, 2009.
57. Wu L, Yuan X, Sheng J, Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning, *Journal of Membrane Science* (2005), 250, 167-173.
58. Wang Y, Hsieh Y-L, Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes, *Journal of Membrane Science* (2008), 309, 73-81.
59. Ren G, Xu X, Liu Q, et al., Electrospun poly(vinyl alcohol)/glucose oxidase biocomposite membranes for biosensor applications, *Reactive & Functional Polymers* (2006), 66, 1559-1564.
60. Qi H, Hu P, Xu J, Wang A, Encapsulation of Drug Reservoirs in Fibers by Emulsion Electrospinning: Morphology Characterization and Preliminary Release Assessment, *Biomacromolecules* (2006), 7, 2327-2330.
61. Yang Y, Li X, Qi M, Zhou S, Weng J, Release pattern and structural integrity of lysozyme encapsulated in core-sheath structured poly(DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2008), 69, 106-116.
62. Sadana A: *Engineering Biosensors Kinetics and Design Applications* Amsterdam: Elsevier, 2002.
63. Newman J, Setford S, Enzymatic biosensors, *Molecular Biotechnology* (2006), 32 (3), 249-268.
64. Leland CC, Jr., Champ L, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences* (1962), 102 (*Automated and Semi-Automated Systems in Clinical Chemistry*), 29-45.
65. Mulchandani A, Rogers K (eds): *Enzyme and Microbial Biosensors. Techniques and Protocols*. New Jersey: Humana Press Inc, 1998.
66. Global Industry Analysts I: *Biosensors in Medical Diagnostics - Global Strategic Business Report 2009*.
67. Ramanathan K, Rees JB, Bengt D, Sol-gel based thermal biosensor for glucose, *Analytica Chimica Acta* (2001), 427 (1), 1-10.
68. Pandey PC, Upadhyay S, Singh G, et al., A New Solid-State pH Sensor and Its Application in the Construction of all Solid-State Urea Biosensor, *Electroanalysis* (2000), 12 (7), 517-521.
69. Kumar A, Malhotra R, Malhotra BD, Grover SK, Co-immobilization of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase in a sol-gel film, *Analytica Chimica Acta* (2000), 414 (1-2), 43-50.
70. Anzai J-i, Inomata N, Osa T, Morita M, Maehara K, A facile method of regulating the dynamic range of L-Lactate sensor based on polymer coating, *Chemical & pharmaceutical bulletin* (1992), 40 (10), 2897-2899.

71. Chaubey A, Gerard M, Singh V, Malhotra B, Immobilization of lactate dehydrogenase on tetraethylorthosilicate-derived sol-gel films for application to lactate biosensor, *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2001), 96 (1), 303-311.
72. Park T-M, Iwuoha EI, Smyth MR, Development of a sol-gel enzyme inhibition-based amperometric biosensor for cyanide, *Electroanalysis* (1997), 9 (14), 1120-1123.
73. Sawicka K, Gouma P, Simon S, Electrospun biocomposite nanofibers for urea biosensing, *Sensors and Actuators B* (2005), 108, 585-588.
74. Scampicchio M, Arecchi A, Lawrence NS, Mannino S, Nylon nanofibrous membrane for mediated glucose biosensing, *Sensors and Actuators B: Chemical (In Press, Corrected Proof)*,
75. Arecchi A, Scampicchio M, Drusch S, Mannino S, Nanofibrous membrane based tyrosinase-biosensor for the detection of phenolic compounds, *Analytica Chimica Acta* (2010), 659 (1-2), 133-136.
76. Wang D, Sun G, Xiang B, Chiou B-S, Controllable biotinylated poly(ethylene-co-glycidyl methacrylate) (PE-co-GMA) nanofibers to bind streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) for potential biosensor applications, *European Polymer Journal* (2008), 44 (7), 2032-2039.
77. Jain KK: Drug Delivery Systems – An Overview. (Vol. 437), 2008, 1-50.
78. Fricker G, Drewe J, Current Concepts in Intestinal Peptide Absorption, *Journal of Peptide Science* (1996), 2 (4), 195-211.
79. Wang B, Siahaan T, Soltero R: Drug Delivery Principle and Applications. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2005, 189-201.
80. M.Hillery A, W.Lloyd A, Swarbrick J: Drug Delivery and Targeting New York: Taylor & Francis, 2001, 244-273.
81. Yang Y, Wang H, Lu X, et al., Electrospinning of carbon/CdS coaxial nanofibers with photoluminescence and conductive properties, *Materials Science and Engineering B* (2007), 140, 48-52.
82. Xin Y, Huang Z, Li W, et al., Core-sheath functional polymer nanofibers prepared by co-electrospinning, *European Polymer Journal* (2008),
83. Zhan S, Chen D, Jiao X, Co-electrospun SiO₂ hollow nanostructured fibers with hierarchical walls, *Journal of Colloid and Interface Science* (2008), 318, 331-336.
84. Zeng J, Aigner A, Czubayko F, et al., Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings, *Biomacromolecules* (2005), 6 (3), 1484-1488.
85. Nie H, Wang C-H, Fabrication and characterization of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA, *Journal of Controlled Release* (2007), 120, 111-121.
86. Valmikinathan CM, Defroda S, Yu X, Polycaprolactone and Bovine Serum Albumin Based Nanofibers for Controlled Release of Nerve Growth Factor, *Biomacromolecules* (2009), 10 (5), 1084-1089.
87. Dror Y, Kuhn J, Avrahami R, Zussman E, Encapsulation of Enzymes in Biodegradable Tubular Structures, *Macromolecules* (2008), 41 (12), 4187-4192.

88. Ye P, Xu Z-K, Wu J, Innocent C, Seta P, Nanofibrous Membranes Containing Reactive Groups: Electrospinning from Poly(acrylonitrile-co-maleic acid) for Lipase Immobilization, *Macromolecules* (2005), 39 (3), 1041-1045.
89. Huang X-J, Xu Z-K, Wan L-S, Innocent C, Seta P, Electrospun Nanofibers Modified with Phospholipid Moieties for Enzyme Immobilization, *Macromolecular Rapid Communications* (2006), 27 (16), 1341-1345.
90. Jiang H, Hu Y, Li Y, et al., A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents, *Journal of Controlled Release* (2005), 108, 237–243.

LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 1.- Orden jerárquico estructural de las proteínas a) Secuencia de aminoácidos que conforman la estructura primaria, b) Estructura secundaria, c) Cadenas dobladas y plegadas que conforman la estructura terciaria, d) Unión de dos o más polipéptidos para formar la estructura cuaternaria.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 2.- Mecanismo de acción catalítico de las enzimas a) Mecanismo propuesto por Brown. Expresiones matemáticas derivadas en forma independiente por Michaelis y Menten para b) condiciones de rápido equilibrio y c) bajo condiciones que cumplen con el modelo estacionario.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 3.- Modelos para explicar la especificidad de las enzimas a) Modelo llave-candado de Emil Fisher , b) Modelo de ajuste inducido propuesto por Koshland.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4.- Lactato deshidrogenasa (LDH): a) Estructura globular del tetrámero, b) reacción catalizada por la enzima y c) centro activo.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 5.- Mecanismo de catálisis de la enzima LDH. (Explicado en texto).....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 6.- Enzima papaína: a) Secuencia de aminoácidos, b) Estructura tridimensional.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 7.- Mecanismo de catálisis de la enzima papaína. (Explicado en texto).....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 8.- Montaje clásico del aparato de electrohilado.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 9.- Componentes básicos de un biosensor.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 10.- Montaje del electrohilado coaxial.....</i>	<i>37</i>

LISTADO DE TABLAS

<i>Tabla 1.- Clasificación de las proteínas de acuerdo a su función.....</i>	<i>9</i>
--	----------

SISTEMA LACTATO DESHIDROGENASA-ANS EN EL SENSADO DE LACTATO

3.1. Origen del lactato

El ácido láctico es un intermediario en el metabolismo de los carbohidratos, se genera principalmente en los músculos blancos esqueléticos, cerebro, piel, médula renal y eritrocitos. Este ácido al ser formado inmediatamente se descompone en un ión hidrógeno (H^+) y en el ión lactato (CH_3COCOO^-). En la figura 1, se muestra la estructura del lactato, en un primer plano el L-(+)-lactato y en un segundo plano se muestra el D-(-)-lactato. El isómero L-(+) es el importante metabólicamente hablando además de ser el único que es producido en el metabolismo del cuerpo humano, la presencia de D-(-)-lactato en el organismo es indicativa de un desorden intestinal¹.

El hígado usa aproximadamente el 65% (75 gramos al día) del total de lactato basal producido para la formación de glucosa en el proceso denominado gluconeogénesis. Otra forma de eliminación de lactato es a través de oxidación en los músculos rojos esqueléticos y la corteza renal. Por lo tanto la concentración de lactato en la sangre depende de su rapidez de producción en los tejidos antes mencionados y de la rapidez de su metabolismo en el hígado y los riñones. La transformación de glucosa a lactato en las periferias del cuerpo y su posterior reconversión a glucosa en el hígado se conoce como el ciclo de Cori. Un ligero incremento en la producción de lactato puede ser manejado con eficacia por el hígado. Aun así el hígado tiene un punto de saturación cuando las concentraciones de lactato en la sangre exceden los 2 mmol/L¹.

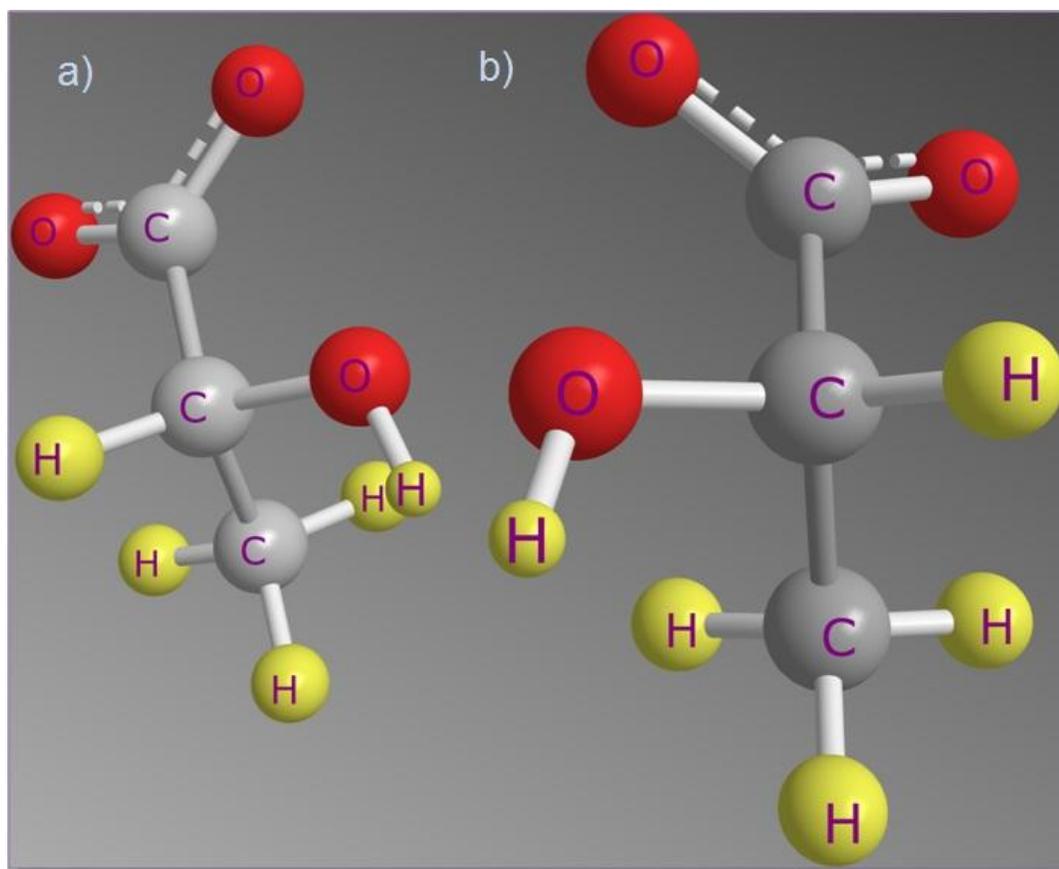


Figura 1.- Estructura de los dos isómeros del ión lactato. a) D-(-)-Lactato, b) L-(+)- Lactato

En algunas situaciones particulares la producción de lactato puede incrementarse de manera significativa, por ejemplo durante un ejercicio extremo la concentración de lactato puede incrementarse de alrededor de 0.9 mmol/L hasta más de 20 mmol/L en 10 segundos. Estas situaciones pueden generar una condición clínica conocida como acidosis láctica¹. Existen dos tipos de acidosis láctica: la acidosis tipo A relacionada con una baja en la oxigenación del tejido como en el caso de un traumatismo, hipovolemia ó una falla en el ventrículo izquierdo. La acidosis láctica tipo B la cual se relaciona más con desórdenes de salud tales como diabetes mellitus, neoplasia (tumores) y enfermedades hepáticas. Este tipo de acidosis láctica también puede ser causada por ciertas drogas o toxinas como el metanol, etanol y salicilatos, así como también por errores metabólicos de nacimiento.

La acidosis láctica ocurre en el 1% de aquellos pacientes hospitalizados y tiene una tasa de mortalidad mayor al 60% llegando a alcanzar el 100% en aquellos pacientes con hipotensión. Una causa poco común y pocas veces diagnosticada de acidosis láctica es la causada por el D-(-)-lactato, el cual no es producido de manera natural por el metabolismo humano. Una bacteria intestinal es la culpable de la presencia de esta forma isomérica del lactato en la sangre. Su acumulación y absorción en el flujo sanguíneo puede causar una acidosis sistémica. Esta condición se presenta en casos de lesiones o traumatismos intestinales, como por ejemplo después de una operación de bypass yeyunal y se manifiesta por un estado mental alterado que va desde una somnolencia hasta un coma conforme se incrementa el nivel de D-(-)-lactato en la sangre. Las pruebas de laboratorio para detectar lactato en la sangre por lo general están diseñadas para L-(+)-lactato, por lo que no pueden detectar la presencia de D-(-)-lactato en la sangre. El D-(-)-lactato puede ser detectado por cromatografía de gases o de manera enzimática utilizando la enzima D-lactato deshidrogenasa.

3.2. Importancia de la detección de lactato

La detección de lactato tiene una considerable importancia en distintos campos de la sociedad actual. Las concentraciones normales de lactato en la sangre van de 0.36 a 0.75 mM en reposo a valores de 0.36 a 1.7 mM en pacientes hospitalizados. Elevados niveles de lactato en la sangre son indicadores de un considerable número de condiciones médicas. Por ejemplo los niveles de lactato en el suero sanguíneo son indicativos de sobrevivencia en niños después de una cirugía abierta y de mortalidad en niños bajo respiración artificial. También se prefiere sobre el pH en la evaluación de la asfixia fetal intrapartum². En el fluido cerebroespinal el lactato normalmente iguala las concentraciones en el flujo sanguíneo. Pero cuando se presentan alteraciones en el sistema nervioso central, las concentraciones de lactato en el fluido cerebroespinal cambian independientemente del lactato sanguíneo. Se ha detectado un incremento en las concentraciones de lactato en el fluido

cerebroespinal en individuos con accidentes cerebrovasculares, hemorragia intracraneal, meningitis bacterial, epilepsia y otros desordenes del sistema nervioso central¹.

En el adulto un elevado nivel de lactato en la sangre puede ser predictivo de una falla múltiple de órganos y en el caso de pacientes con choque séptico de una posible muerte. El monitoreo de los niveles de lactato también sirve como un indicador de la función de hígados recién transplantados. Los niveles de lactato son indicativos del proceso de fermentación, la calidad, frescura y eficiencia de almacenamiento de ciertos productos alimenticios comerciales tales como salsas de tomate, frutas, jugos, leche, yogurt, quesos y vinos³. Es el causante del sabor agrio de los productos lácteos, al ser el principal producto de la fermentación causada por bacterias ácido lácticas⁴. En la industria de los lácteos el monitoreo de los niveles de lactato es importante para detectar una posible contaminación microbiana. En estudios previos se ha detectado una disminución de la alimentación de oxígeno a los tejidos en pacientes con enfermedades de oclusión periférica arterial. En experimentos con animales estos mismos investigadores concluyeron que el lactato en el sudor es un buen indicador en la evaluación de la severidad de enfermedades de oclusión arterial periférica así como de la efectividad de un determinado tratamiento con medicamentos vasoactivos⁵⁻⁶.

En el mundo deportivo la concentración de lactato en los fluidos fisiológicos es un indicativo de la producción de energía bajo condiciones anaeróbicas en el cuerpo entero. Es por eso que los niveles de lactato en el fluido sanguíneo se usan para monitorear el desempeño atlético y para evaluar cuales son los mejores equipos y regímenes de entrenamiento para los atletas. La determinación del umbral anaeróbico o el estado máximo estable de lactato es la máxima carga de ejercicio que el cuerpo puede soportar sin que se rompa el equilibrio entre la producción y la eliminación de

lactato. Si se incrementa el esfuerzo por encima de este límite la concentración de lactato en el sistema se incrementará⁷. El lactato también es importante en muchos productos farmacéuticos, cosméticos, detergentes domésticos y productos antisépticos⁸.

El análisis de los niveles de ácido láctico en la saliva puede usarse como un diagnóstico preliminar de la fibrosis cística⁹. Por incrementarse ante la falta de oxígeno en los tejidos, el lactato es un indicador muy importante para condiciones isquémicas. Bajo este concepto los niveles de lactato se pueden relacionar con una serie de condiciones clínicas, por ejemplo bajo la categoría de tejido hipóxico los niveles de lactato pueden incrementarse por algún tipo de choque (hipovolémico, cardiogénico o endotóxico), falla respiratoria (asfixia) o por una congestión cardíaca severa. Otras condiciones isquémicas bajo las cuales se pueden incrementar los niveles de lactato son un desorden sistémico (cirugías neoplásticas, falla renal o hepática, diabetes mellitus, etc.), drogas o toxinas (salicilatos, etanol, etc.) y desordenes hereditarios (deficiencia de glucosa 6 fosfatasa). La forma y la tendencia hacia un incremento en los niveles de lactato sanguíneos es un indicador muy sensible de supervivencia¹⁰. En general los niveles de lactato son un buen indicador del estado de oxigenación de los tejidos, alertando de una temprana condición isquémica. Es por eso que un potencial primer campo de aplicación para un sensor de lactato es en cuidados intensivos, durante operaciones quirúrgicas y terapia intensiva, especialmente en terapia de traumas incluyendo aplicaciones médicas en campo. En situaciones de emergencia el monitoreo de los niveles de lactato le permitiría al médico obtener una indicación de la efectividad de sus esfuerzos de resucitación para incrementar el volumen de circulación sanguínea¹⁰.

La presencia del isómero D-(-)-Lactato en la sangre se ha relacionado con heridas intestinales causadas por ciclos de isquemia-reperfusión (I/R). Estos ciclos por lo general causan necrosis en los tejidos internos intestinales, siendo la mucosa la primera en verse afectada. Lo anterior lleva a un aumento en la permeabilidad del tejido y también a un crecimiento excesivo de la población bacteriana en el área afectada. La mayoría de los efectos sistémicos de la isquemia intestinal pueden ser atribuidos a este crecimiento excesivo bacteriano, así como a la posterior liberación de sus productos metabólicos. Como ya se ha mencionado el D-(-)-Lactato es un producto de la fermentación bacteriana y es producido por ciertas bacterias nativas encontradas en el tracto gastrointestinal humano (*Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, y *Bacteriodes*). Debido a que los mamíferos no cuentan con un sistema enzimático capaz de degradar y eliminar este isómero, las moléculas de D-(-)-Lactato pasan intactas por el hígado y se incorporan al sistema sanguíneo. Como consecuencia los incrementos en el flujo sanguíneo de los niveles de este isómero en particular pueden usarse como un diagnóstico temprano de heridas intestinales causadas por ciclos I/R¹¹.

3.2.1. Métodos de detección de lactato

La mayoría de los métodos para la medición de lactato, sobre todo en laboratorios convencionales, se basan en métodos colorimétricos laboriosos y no específicos que involucran una serie de pasos de extracción, purificación y preparación de la muestra¹²⁻¹³. Estos métodos no son del todo específicos, además de necesitar en la mayoría de los casos de aditivos para la intensificación del color. Este tipo de métodos se han empleado en la industria láctea y vinícola para monitorear procesos, así como para determinar la calidad final del producto¹⁴⁻¹⁵. La detección colorimétrica también se ha empleado en la detección de ácido láctico en fluidos fisiológicos tan importantes como la sangre, saliva y orina^{13, 16}. Aun y cuando el método de detección colorimétrica es el más antiguo, continúa siendo el

más utilizado en laboratorios no especializados debido a su relativa sencillez y confiabilidad.

Un ejemplo de este tipo de métodos es el método Barker-Summerson el cual está basado en la reacción de Deniges, bajo la cual el ácido láctico es convertido a acetaldehído al ser calentado en presencia de ácido sulfúrico concentrado. Una vez convertido se hace reaccionar el acetaldehído con p-hidroxidifenilo lo que da como resultado un cambio de color de la solución a violeta. La intensidad de este cambio de color se mide a 560 nm, lo cual se usa como una indicación de la cantidad de lactato presente en la muestra original. Este método requiere de una serie de pasos para la preparación de las muestras, además de la necesidad de la adición de iones cúpricos como promotores de color. Aún así este método continúa siendo el más usado en laboratorios convencionales alrededor del mundo. Debido principalmente a que este método requiere del uso de reactivos relativamente accesibles y baratos, además de su simpleza y confiabilidad (Anexo1)¹³.

El método más exacto para la medición de ácido láctico es utilizando la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), sin embargo este método es largo y también requiere de un proceso de preparación de la muestra, además de ser un proceso costoso en la mayoría de los casos. También se debe tener cuidado a la hora de elegir la correcta fase estacionaria, así como de un adecuado método de detección (ultravioleta, infrarrojo, electroquímico, etc.)¹⁷. Otra alternativa en la detección de ácido láctico es el uso de enzimas como elemento de reconocimiento en biosensores especializados. Esta alternativa tiene la gran ventaja del alto grado de especificidad de las enzimas así como de su rapidez de detección. Las enzimas más utilizadas en la detección de lactato son la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y la enzima lactato oxidasa (LOX). También se ha utilizado la enzima L-Lactato-citocromo c oxidoreductasa aislada del hongo

termoresistente *Hansenula polymorpha*, así como también lactato oxidasa de origen bacterial y la lactato monooxigenasa¹⁸⁻²⁰.

A partir de la utilización de enzimas en la detección y sensado de lactato, se han ideado diversas maneras para mejorar su desempeño así como para prolongar su vida útil. Entre otras estrategias se han utilizado ciertas combinaciones de dos o más enzimas, así como diversas técnicas de inmovilización. Entre los sistemas bienzimáticos que se han utilizado para la detección de lactato se encuentran el sistema citocromo b_2 /LDH²¹, el sistema glutamato piruvato transaminasa/LDH²² y el sistema peroxidasa de rábano picante/LOX²³. Se han ideado sistemas de detección de lactato que utilizan hasta tres enzimas en un intento por depurar e intensificar la señal de salida de este tipo de biosensores²⁴. También se han probado una serie de diferentes tipos de inmovilización para estas enzimas, con el fin de mejorar su eficacia como biosensor y prolongar su vida útil. Se han inmovilizado las enzimas LDH y LOX en películas de polímeros conductores en un intento por mejorar la sensibilidad del biosensor al amplificar la señal de salida bajo el concepto de reciclamiento de sustrato. Por ejemplo se han inmovilizado las enzimas LDH y LOX en películas poliméricas utilizando polímeros conductores tales como la poli (anilina) y la poli (1,3-fenilendiamina)^{10, 25}. También se ha estudiado su inmovilización covalente utilizando polímeros tales como la poli (tiramina) para crear membranas enzimáticas que añadirían una gran versatilidad de aplicaciones a los biosensores enzimáticos²⁶.

Se ha experimentado con el uso de geles e hidrogeles en la inmovilización de estas enzimas en combinación con tetraortosilicatos (TEOS) y nanotubos de carbono en un intento por mejorar su desempeño²⁷⁻²⁸. También se ha experimentado con la nanotecnología, modificando en una primera instancia la superficie de electrodos enzimáticos, utilizando procesos tales como la depositación química en fase vapor asistida por plasma en

conjunto con litografía coloidal²⁹. Lo anterior resultó en un mejor desempeño del biosensor como resultado principalmente de un aumento en la relación señal contra ruidos de corriente. Las superficies nanoestructuradas en biosensores han demostrado ser particularmente interesantes sobre todo en los casos en donde se busque medir analitos con constantes altas de transferencia de carga y también en donde se presenten problemas de adsorción³⁰⁻³¹. Otras técnicas interesantes para mejorar el rendimiento de estos biosensores especializados en la detección de lactato han sido su inmovilización en la punta de fibras ópticas, así como también el uso de ingeniería genética para mejorar el rendimiento de la enzima LOX a altas temperaturas^{18, 32}.

3.3 Sistema LDH-ANS

En este trabajo se utilizó un sistema basado en el acomplejamiento del compuesto 8-Anilino-1-naftaleno ácido sulfónico (ANS) con la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). El compuesto ANS generalmente se ha usado como un colorante fluorescente para determinar el carácter hidrofóbico de las superficies proteínicas³³⁻³⁵. Aunque también es mencionada la posibilidad en la literatura de que su relación con las proteínas se deba más a interacciones dinámicas del tipo electroestático entre su grupo sulfonato ($R-SO_3^-$) cargado negativamente con grupos catiónicos en la estructura de las proteínas, que a una interacción estática con las partes hidrofóbica preexistentes de las proteínas³⁶. La fluorescencia del compuesto ANS es sofocada por el agua, es solamente al entrar en contacto con las proteínas cuando su grupo anilino-naftaleno es aislado de las moléculas de agua circundantes. La intensidad, rendimiento cuántico, y tiempo de vida de la fluorescencia del compuesto ANS dependen de la geometría del torcimiento del anillo fenil con respecto a su enlace con la mitad naftaleno del compuesto³⁶⁻³⁷.

3.4. Hipótesis

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) inmovilizada en conjunto con el compuesto 8-Anilino-1-naftaleno ácido sulfónico (ANS) puede formar un sistema capaz de funcionar como un biosensor para el lactato. La disminución de la fluorescencia de este sistema al entrar en contacto con el lactato se usará como una medida de la presencia de lactato en el medio de reacción.

3.5 Objetivos particulares

- Comprobar la eficacia del sistema LDH-ANS en solución para la detección y sensado de lactato.
- Utilizar la enzima ovoalbúmina o albúmina de clara de huevo (OVA) como enzima de prueba en la optimización del proceso de inmovilización utilizando electrohilado.
- Inmovilizar la enzima LDH en conjunto con ANS en nanofibras de poli(vinil alcohol) (PVA) utilizando la técnica de electrohilado.
- Comprobar la presencia y acomplejamiento del sistema LDH-ANS en las nanofibras de PVA.
- Realizar pruebas con el sistema LDH-ANS inmovilizado en nanofibras de poli(vinil alcohol) en la detección de lactato.

3.6 Experimentación

3.6.1 Materiales y Reactivos

En esta parte del trabajo de tesis se utilizaron los siguientes materiales: poli(vinil alcohol) (PVA) con 98% de hidrólisis y un peso molecular promedio en peso (M_w) de 126 kg/mol, poli(vinil alcohol) (PVA) con una hidrólisis de 87-89 % y un peso molecular promedio en peso (M_w) de 13-23 kg/mol y el solvente metanol grado reactivo fueron comprados en Aldrich. L-Lactato deshidrogenasa (LDH) tipo II de músculo de conejo (EC 1.1.1.27), ovoalbúmina (OVA) o albúmina de clara de huevo (EC 232-692-7) y el ácido láctico fueron proveídos por Sigma. El fosfato disódico (Na_2HPO_4) de un peso molecular (PM) de 141.96 g/mol fue comprado a Productos Químicos de Monterrey, S.A. El fosfato monopotásico (KH_2PO_4) de peso molecular (PM) de 136.09 g/mol y el compuesto 8-Anilino-1-naftaleno ácido sulfónico (ANS) fueron comprados en Fisher Scientific.

3.6.2 Soluciones

Todas las soluciones se prepararon utilizando un buffer de fosfatos a pH 7.3. Para preparar el buffer se agregó a una solución de fosfato disódico (Na_2HPO_4) de 9.47 g/L otra solución de 9.07 g/L de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) hasta alcanzar el pH deseado. En todas las muestras se utilizó una solución de LDH de concentración 4 μM y una solución de ANS de una concentración de 3 μM de acuerdo a lo reportado en la literatura. Lo anterior nos da una relación LDH/ANS de 332 que es la que se usó en la preparación de todas las muestras, tanto en los procesos de inmovilización como en las pruebas de fluorescencia para el sensado de lactato².

Para las soluciones de PVA, se disolvió la cantidad requerida de polímero de acuerdo a cada concentración en agua desionizada. Posteriormente se elevó la temperatura de la mezcla a 90°C hasta disolver completamente el polímero. Para este sistema se utilizaron dos

concentraciones de PVA (10% y 7% masa/masa), así como dos tipos de soluciones, una manejando una mezcla de polímeros de alto y bajo peso molecular y otra utilizando solamente el PVA de alto peso molecular pero utilizando una mezcla de solventes de 95:5 agua:etanol. Los tiempos de disolución dependían del peso molecular y el grado de hidrólisis del polímero, que iban de una a dos horas y media. Para conocer la relación óptima de OVA/ANS se realizaron una serie de pruebas de fluorescencia. Basados en estas pruebas y en la literatura, se encontró que la relación OVA/ANS que daba una mayor intensidad de fluorescencia fue de 80. Y esta fue la relación que se usó para todas las pruebas posteriores de inmovilización y fluorescencia³⁸.

3.6.3 Inmovilización en fibras de PVA

3.6.3.1. Inmovilización de ANS

Se preparó cada solución de PVA de acuerdo al procedimiento antes mencionado. Posteriormente se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente, se agregó el ANS hasta alcanzar una concentración de 2.5% m/m con respecto a la masa del polímero añadido y se agitó para disolver. Una vez disuelto el ANS en la solución de PVA se procedió al electrohilado de la solución bajo las siguientes condiciones:

- Voltaje aplicado: 20 kV
- Distancia entre el electrodo y el colector: 10 cm
- Velocidad de la bomba: 0.3 mL/h

Se realizó el electrohilado bajo estas condiciones durante 3 horas hasta obtener una membrana de un buen grosor.

3.6.3.2. Inmovilización de OVA

Una vez que la solución de PVA se hubo enfriado a temperatura ambiente se agregó la enzima OVA hasta alcanzar una concentración de 2.5% m/m con respecto a la masa del polímero añadido. Y se dejó en agitación por espacio de 5 minutos. Una vez disuelta la enzima en la solución polimérica se procedió al electrohilado bajo las siguientes condiciones:

- Voltaje aplicado: 20 kV
- Distancia entre el electrodo y el colector: 10 cm
- Velocidad de la bomba: 0.4 mL/h

Se dejó trabajando el electrohilado por tres horas hasta obtener una membrana de un grosor aceptable.

3.6.3.3. Inmovilización de OVA/ANS

Se preparó la solución de polímero de acuerdo a los requerimientos de cada muestra. Se agregó la enzima OVA hasta alcanzar una concentración de 2.5% m/m con respecto a la masa de polímero añadido. Posteriormente se agrega el ANS hasta alcanzar la relación óptima de OVA/ANS de 80 mencionada anteriormente. Se dejó en agitación por alrededor de 10 minutos para asegurar una completa interacción entre la enzima y el colorante. Posteriormente se procedió al electrohilado de la solución bajo las siguientes condiciones:

- Voltaje aplicado: 20 kV
- Distancia entre el electrodo y el colector: 10 cm
- Velocidad de la bomba: 0.4 mL/h

Se dejó trabajar el electrohilado durante 2 horas hasta agotar la solución.

3.6.3.4. Inmovilización de LDH/ANS

Se preparó la solución de 8% m/m de PVA utilizando una mezcla de PVA de alto y bajo peso molecular en una proporción 50/50. Para solubilizar el PVA en agua se siguió el procedimiento antes mencionado. Debido a la dificultad para solubilizar la LDH en la solución de PVA se siguió el siguiente procedimiento para preparar inmovilizar el sistema LDH/ANS en PVA. Se prepararon dos soluciones: en la primera se solubilizaron 178 μ L de una solución LDH/ANS en un mililitro del buffer de fosfatos y se agregaron a 4 mL de la solución polimérica. Se dejó en agitación durante 40 minutos hasta obtener una buena dispersión de la enzima en la solución polimérica. Se procedió de inmediato al electrohilado siguiendo las siguientes condiciones:

- Voltaje aplicado: 20 kV
- Distancia entre el electrodo y el colector: 10 cm
- Velocidad de la bomba: 0.33 mL/h

Se dejó el electrohilado durante una hora hasta obtener una membrana de un espesor suficiente para realizar las pruebas de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM).

3.6.3.5. Entrecruzamiento

Dado que las fibras de poli(vinil alcohol) tienden a hincharse y perder su estructura fibrosa al entrar en contacto con el agua, es necesario someterlas a un proceso de entrecruzamiento para que mantengan su estructura fibrosa aún después de estar un determinado tiempo sumergidas en agua. El proceso de entrecruzamiento al que se sometieron las nanofibras de PVA en este trabajo, fue mediante sumersión en una solución de metanol concentrado por espacio de 24 horas. Posteriormente se sacaron las fibras del baño de metanol y se les dejó secar por espacio de 30 minutos. Para comprobar la efectividad del proceso de entrecruzamiento, se sumergieron en un baño de agua las piezas tratadas con metanol y otras sin tratamiento alguno. Uno de los mecanismos propuestos para explicar el

entrecruzamiento mediante metanol, es que las moléculas de este alcohol orgánico actúan desplazando a las moléculas de agua de la estructura interna de las fibras. De esta manera se promueve la formación de enlaces no covalentes del tipo puentes de hidrógeno entre las moléculas de polímero, sustituyendo a los anteriores puentes de hidrógeno existentes entre las moléculas de polímero y las moléculas de agua en las nanofibras recién electrohiladas. Cabe mencionar que todo este proceso es físico y no involucra ningún tipo de agente de entrecruzamiento químico que pudiese afectar la estabilidad estructural de la enzima. Lo anterior resultan en un incremento en el grado de cristalinidad de las nanofibras, lo que lleva a una mejora en sus propiedades mecánicas³⁹⁻⁴⁰.

3.6.4. Equipos utilizados

Microscopía: Un microscopio electrónico de barrido (SEM) fue usado para estudiar la morfología de las fibras una vez secas. Para realizar estas pruebas se usó un equipo de emisión de campo JSM-7401F. Para las pruebas de microscopia laser confocal se utilizó un equipo LSM 5 Pascal, Axioplan 2 imaging Zeiss con una longitud de onda de excitación de 458 nm (laser de Ar) con potencia nominal en la muestra de 20 mW.

Electrohilado: El equipo de electrohilado usado para este trabajo consistió en una jeringa a cuya aguja de metal se le redondeo la punta. Una fuente de alto voltaje Spellman CZE1000R de corriente directa y una bomba de infusión Cole Parmer también fueron utilizadas en el proceso de electrohilado para este trabajo. Para recolectar las fibras se utilizó un electrodo de aluminio aterrizado.

Fluorescencia: Para obtener los espectros de emisión se utilizó un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B en el rango de 400 a 600 nm. Para las pruebas de fluorescencia se utilizaron las siguientes condiciones para cada una de las enzimas evaluadas: para la enzima LDH sola se utilizó una longitud de excitación de 286 nm y se emitió en 340 nm, para la LDH etiquetada con ANS se utilizó una longitud de excitación de 370 nm y se

recogió la señal en 460 nm. Para los sistemas en solución e inmovilizados se utilizaron las mismas longitudes de excitación. Para la enzima OVA etiquetada con ANS tanto en solución como inmovilizada se utilizó una longitud de excitación de 390 nm y se emitió en 470 nm.

Ultravioleta: Las pruebas de ultravioleta-visible utilizadas en el método Barker-Summerson fueron llevadas a cabo utilizando un equipo Shimadzu 2401.

3.7. Resultados y discusión

3.7.1. Morfología

3.7.1.1. Optimización de morfologías

Para este trabajo se realizó el electrohilado de distintas mezclas de polímero y de solventes, esto con el fin de dar con la combinación que nos diera la mejor morfología posible en las nanofibras. Entiéndase por mejor morfología a las nanofibras libres de defectos superficiales y con una distribución de diámetros lo más homogénea posible y cercana a la región nanométrica. Primero se realizó un electrohilado utilizando el PVA de alto peso molecular (M_w 126 kg/mol) a una concentración de 7% m/m dándonos la morfología mostrada en la figura 2 (a,b). Como se puede apreciar aunque presenta una morfología interesante, el análisis de la distribución de diámetros se acerca más al tamaño micro que al nano (figura 2 (c,d)). Esto aunado a defectos estructurales provoca una drástica disminución en el área superficial de las nanofibras. Posiblemente el aumento en el diámetro de estas fibras se deba a la elevada viscosidad provocada por el alto peso molecular del polímero. En los recuadros se realiza un acercamiento a las nanofibras en los que se puede apreciar imperfecciones en la superficie de las fibras, a consecuencia probablemente de un secado incompleto. Esto es típico en las soluciones poliméricas que no cumplen con la viscosidad adecuada para el proceso de electrohilado⁴¹⁻⁴³.

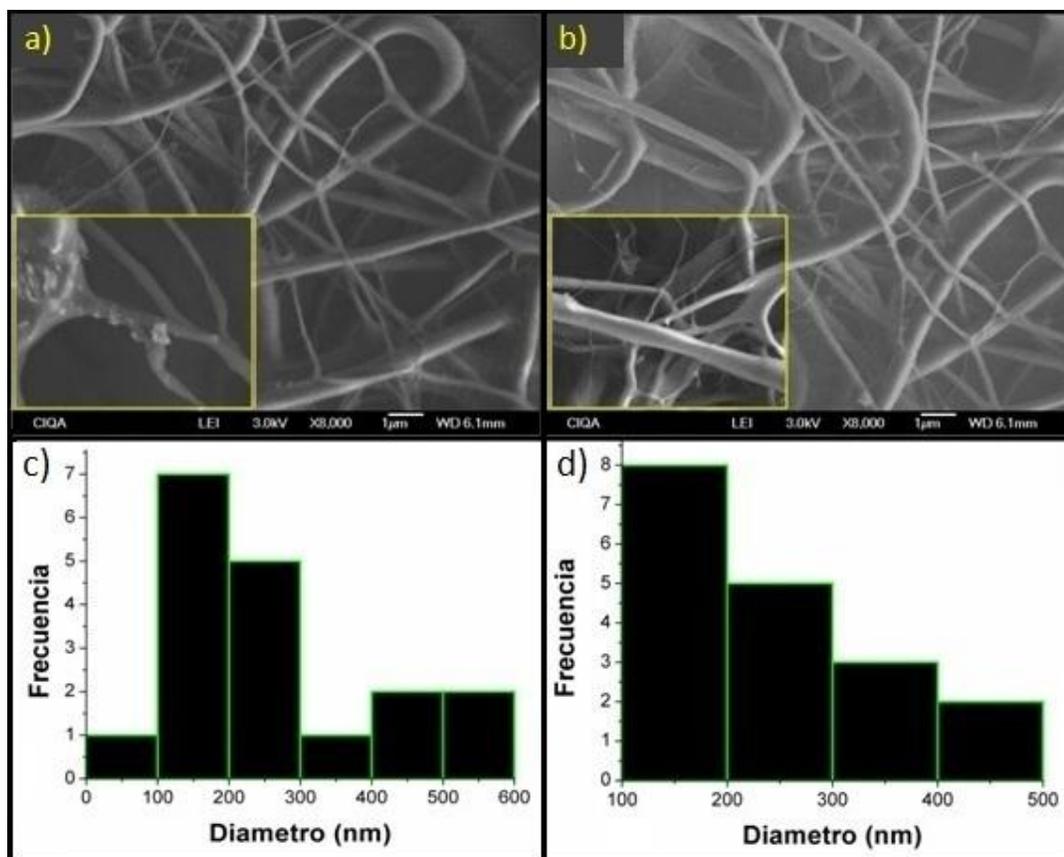


Figura 2.- Morfología de las nanofibras de PVA electrohiladas con una concentración de 7% m/m (a,b). Histogramas de diámetros de fibras (c,d)

Debido a lo anterior se buscaron alternativas en la búsqueda de una adecuada morfología en las nanofibras electrohiladas. Entre esas opciones se utilizó una mezcla de solventes agua-etanol en una proporción 95:5, esto con el propósito de que el etanol actuara como un plastificante que permitiera un mayor movimiento de las cadenas de polímero y con esto disminuyera un poco la viscosidad. En la figura 3 (a,b) se pueden apreciar las micrografías de las nanofibras de PVA con una concentración de 7% m/m utilizando la mezcla de solventes 95:5 agua:etanol. Como se puede apreciar en las micrografías las fibras continúan teniendo una morfología interesante, más sin embargo el diámetro continúa siendo muy irregular además de encontrarse en el rango micrométrico (figura 3 (c,d)). Además siguieron apareciendo defectos en la superficie de las fibras así como uniones entre

éstas, posiblemente debido a un secado incompleto en el proceso de electrohilado.

Por último se intentó el electrohilado con una mezcla de polímeros de alto y bajo peso molecular en una relación 50:50 a una concentración de 10% m/m. En la figura 4 (a,b) se muestran las micrografías de las nanofibras electrohiladas utilizando esta mezcla de polímeros. Como se puede apreciar la morfología de las fibras mejora considerablemente con respecto a los casos anteriores. No se observan defectos en forma de cuenta y el diámetro de las fibras se vio reducido considerablemente.

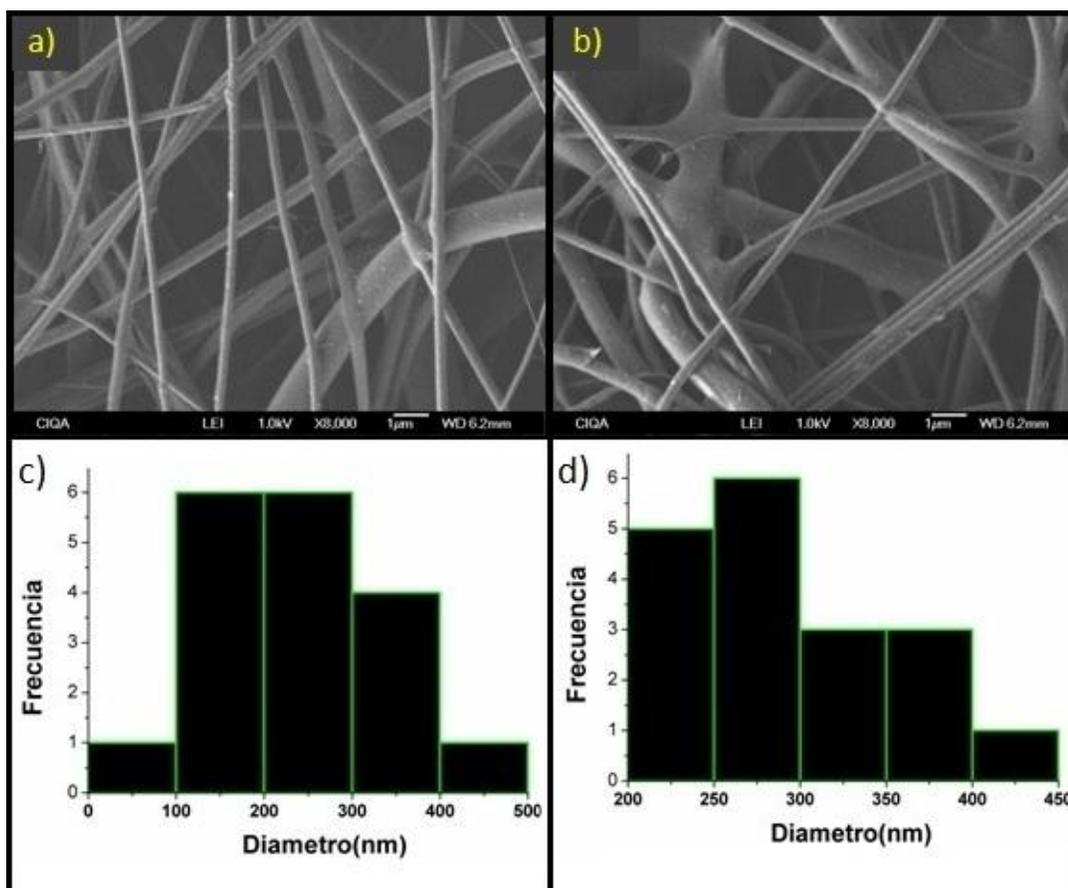


Figura 3.- Morfología de las nanofibras de PVA electrohiladas con una concentración de 7% m/m utilizando una mezcla de solventes 95:5 agua:etanol (a,b). Histogramas de diámetros de fibras (c,d).

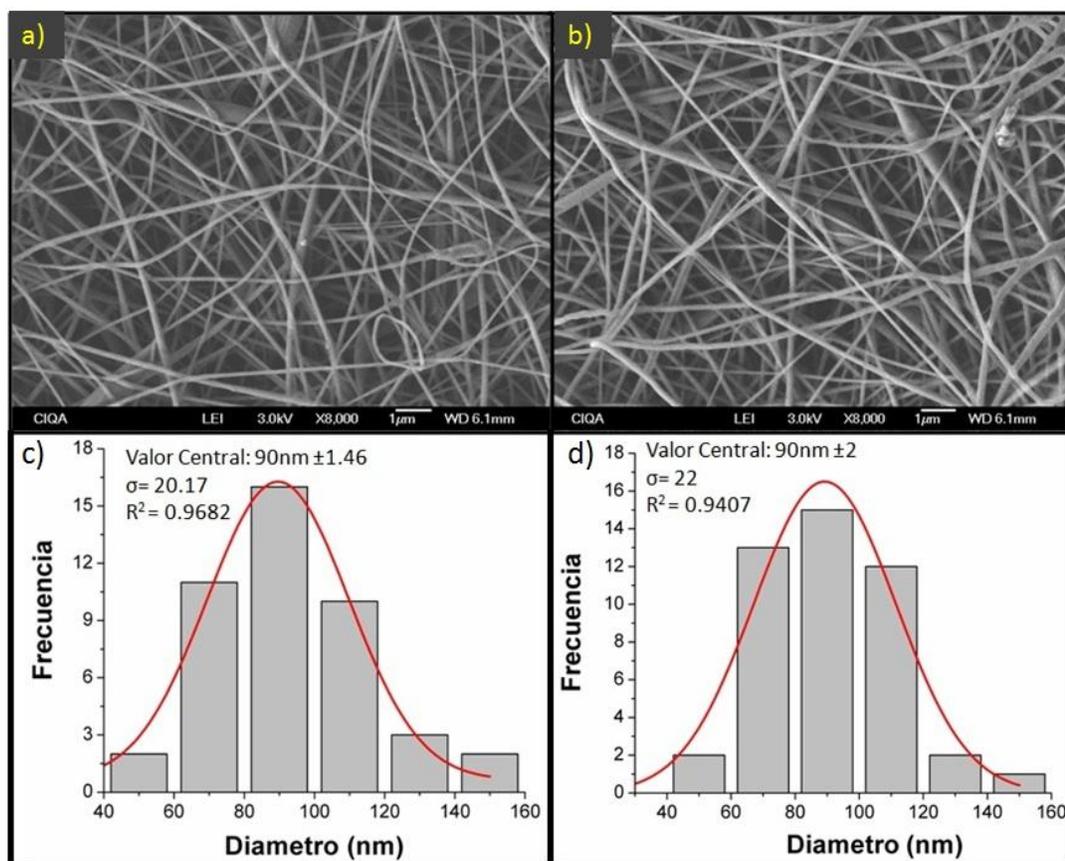


Figura 4.- Morfología de las nanofibras de PVA electrohiladas con una concentración de 10% m/m utilizando una mezcla de 50:50 PVA de alto y bajo peso molecular (a,b). Análisis de diámetros correspondiente (c,d).

En el análisis de diámetros mostrado debajo de cada micrografía se puede apreciar que en ambos casos tenemos una distribución gaussiana con un valor central de 90 nm y con una aceptable dispersión (figura 4 (c,d)). Lo anterior nos confirma que las nanofibras electrohiladas utilizando esta mezcla de polímeros de alto y bajo peso molecular fueron las únicas que mostraron una distribución de diámetros homogénea y lo que es más importante dentro de la escala nanométrica. Debido a esto en lo sucesivo se trabajó con esta mezcla para todos los procesos de electrohilado. También es importante recalcar el elevado grado de ajuste ($R^2=0.9682$) al modelo gaussiano mostrado por la distribución de diámetros.

3.7.1.2. Efecto de la inmovilización en la morfología de las nanofibras

En la figura 5, se muestra el efecto de la inmovilización de ANS en la morfología de las nanofibras electrohiladas de PVA. Aunque en general se conservó la homogeneidad y poca dispersión en el diámetro de las fibras de PVA, si se observó un aumento en el diámetro central de la distribución por encima de los 100 nanómetros (figura 5 (c,d)). Además se pudieron apreciar defectos en la morfología tales como cambios súbitos de diámetro y defectos informes a través de toda la morfología de las fibras (círculos amarillos). Esto es típico en los casos donde se presenta una inadecuada viscosidad en la solución electrohilada.

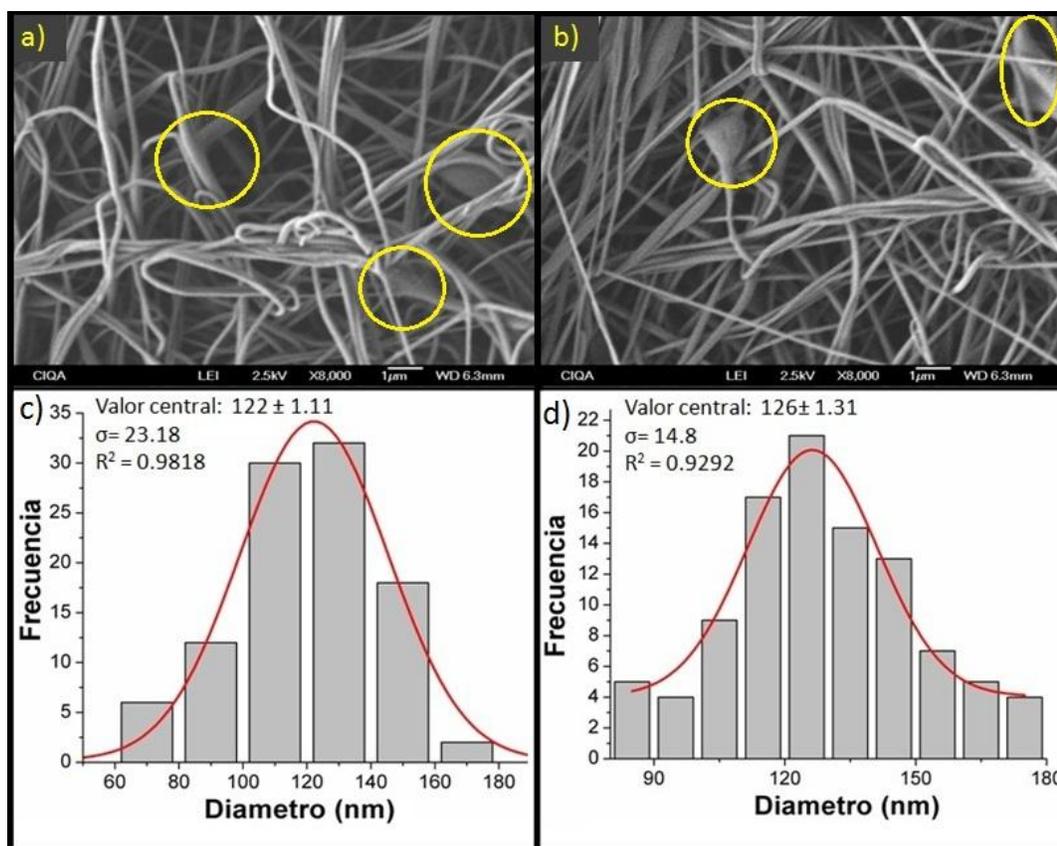


Figura 5.- Morfología de las nanofibras electrohiladas a partir de una solución de PVA-ANS inmovilizado en su estructura (a,b). Análisis de la distribución de diámetros (c,d).

En la figura 6 se observa el efecto que tuvo en la morfología de las nanofibras de PVA la inmovilización de la enzima ovoalbúmina (OVA). Para observar más claramente este efecto se usaron altas concentraciones de enzima. En una primera instancia se disolvieron 3 mg de enzima en 4 mL de solución de polímero (figura 6a), y después se disolvieron 11 mg en el mismo volumen de la mezcla de polímero (figura 6b). Como se puede observar en el análisis de la distribución de diámetros (figura 6c,6d), hubo un cambio drástico en el diámetro de las nanofibras con la enzima OVA inmovilizada. El cambio más dramático se dio en el segundo caso llegando a obtenerse diámetros de varias micras y con un valor central en la distribución de 220 nm. También se observaron defectos superficiales en ambos casos y en algunas partes uniones entre fibras, todo lo cual hace disminuir el área superficial de las fibras.

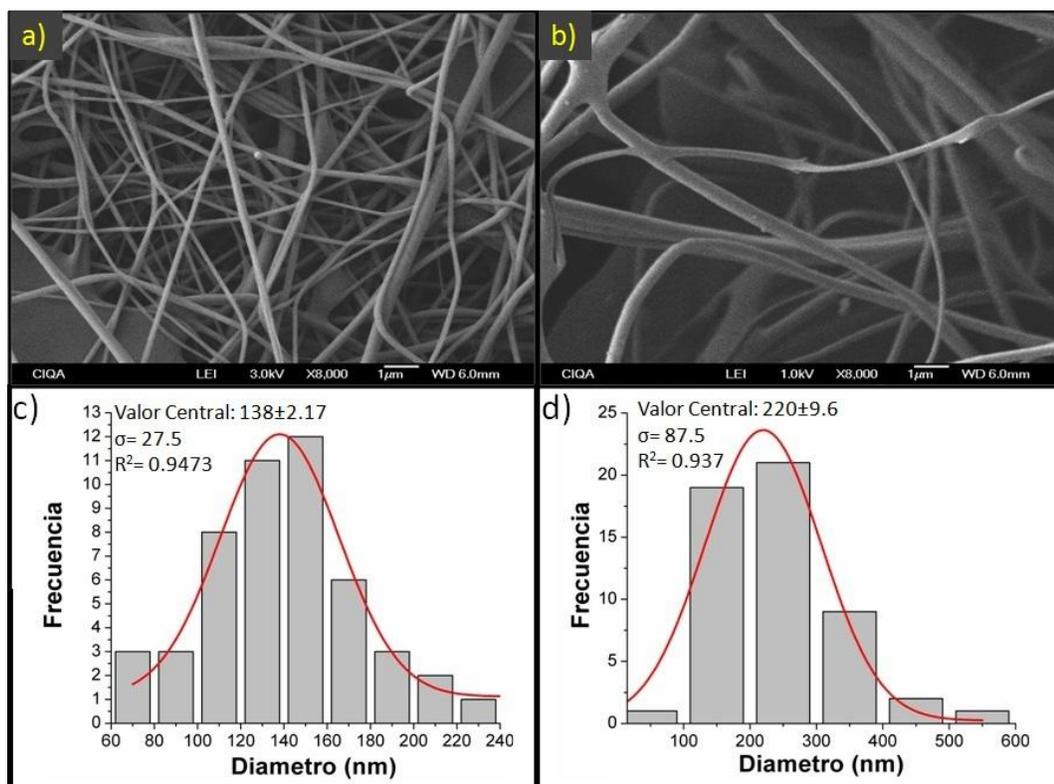


Figura 6.- Enzima OVA inmovilizada en nanofibras electrohiladas a) 3 mg de enzima, b) 11 mg de enzima, c) y d) Análisis de distribución de diámetros

En la figura 7 (a,b) se observa la morfología de las fibras de PVA una vez inmovilizada la enzima OVA etiquetada con ANS. Se presentó un incremento significativo en el diámetro de las fibras, sobre todo en la muestra con la mayor concentración de enzima (figura 7b). También se presentaron defectos superficiales y uniones entre fibras (recuadros amarillos). Lo anterior aunado al incremento significativo en el diámetro de las fibras, hace suponer un decremento también importante en el área superficial de las fibras. El incremento en el diámetro de las nanofibras es típico de las soluciones de PVA con una elevada viscosidad⁴⁴. De esta manera el incremento de diámetro observado en la figura 7 puede explicarse debido al efecto de la adición de un compuesto de alto peso molecular como lo es la enzima globular OVA (M_w 45 kDa) sobre la solubilidad de la solución electrohilada.

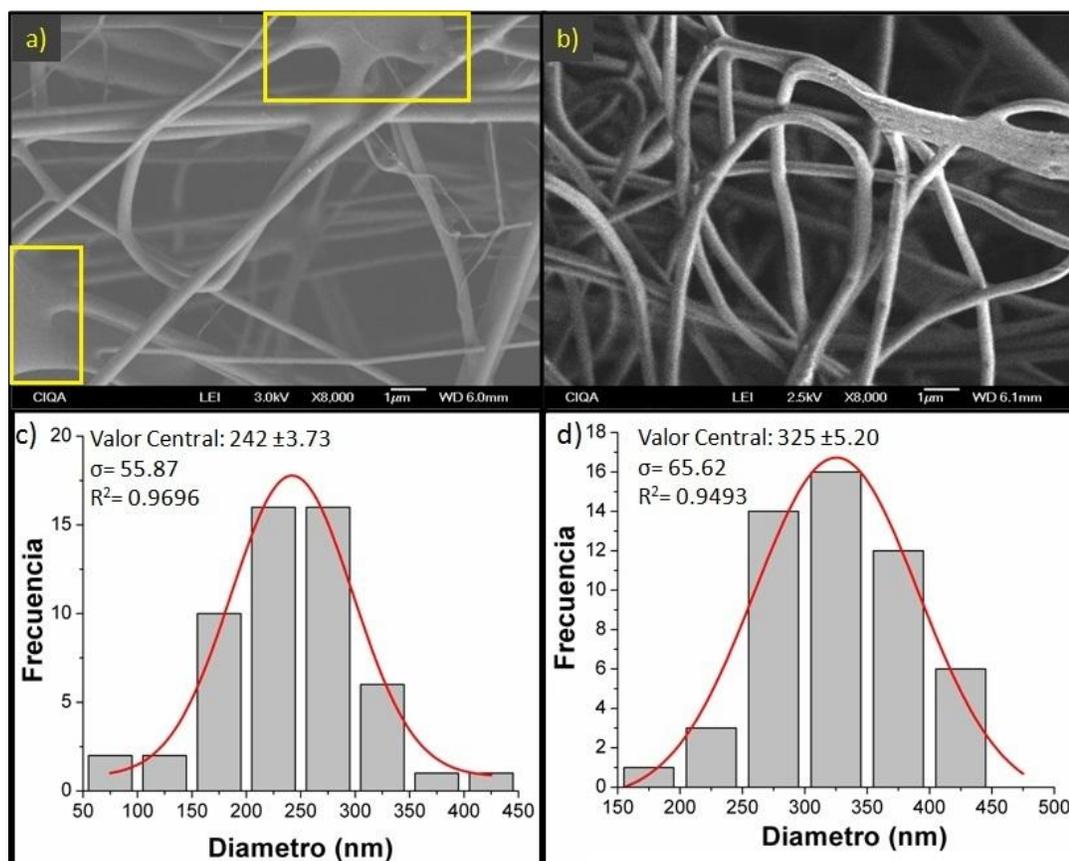


Figura 7.- Enzima OVA etiquetada con ANS inmovilizada en fibras de PVA a) 1.5 mg de enzima, b) 11 mg de enzima, c) y d) Análisis de distribución de diámetros

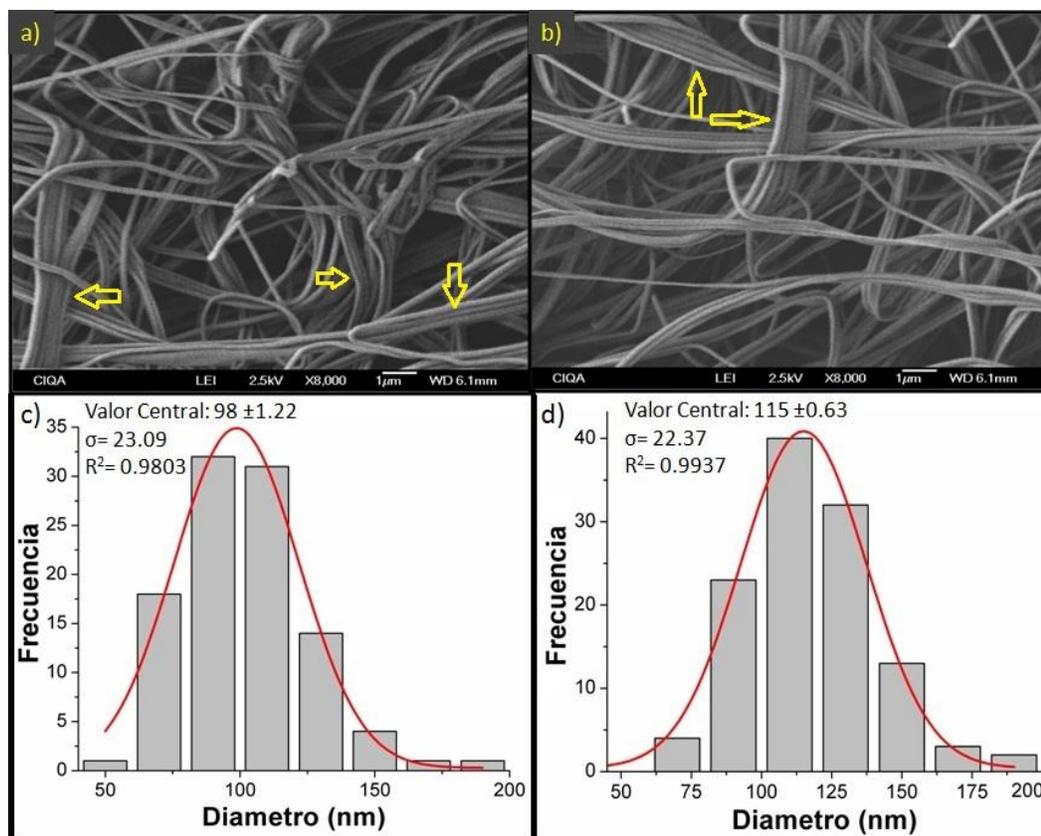


Figura 8.- Enzima LDH etiquetada con ANS inmovilizada en fibras de PVA a) y b), Análisis de distribución de diámetros c) y d).

En la figura 8 se presenta la morfología resultante al inmovilizar la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) etiquetada con ANS en nanofibras de PVA mediante la técnica de electrohilado. Como se puede apreciar en ambas micrografías se muestra una morfología muy particular, con grupos de varias fibras unidas entre sí y con una misma orientación (flechas amarillas). Una posible explicación para esto es que al tratarse de una enzima con un elevado peso molecular, ésta actúe como un aglutinante entre las fibras para dar lugar a esta morfología la cual se asemeja a la forma de un listón formado por varias fibras. Otro dato interesante es que en este caso a diferencia del anterior no se observó un incremento significativo en el diámetro de las fibras, quedando en el rango nanométrico la mayor parte de ellas (figura 8 (c,d)). Este comportamiento se ha reportado en el electrohilado

de enzimas de alto peso molecular⁴⁵, así como también en el electrohilado de soluciones concentradas de poli (electrolitos)⁴⁶⁻⁴⁷.

3.7.1.3. Efecto del entrecruzamiento en la morfología de las nanofibras

Como ya se ha mencionado al ser el poli(vinil alcohol) (PVA) un polímero hidrofílico, las fibras electrohiladas a partir de este polímero tienden a hincharse y perder su morfología fibrosa al entrar en contacto con el agua. Para evitar esto generalmente se somete a las fibras a un proceso de entrecruzamiento para poder conservar su estructura fibrosa en ambientes acuosos. El proceso de entrecruzamiento que se utilizó en este trabajo fue la sumersión de las fibras en un baño de metanol por un período de 24 horas, para después secarse y comprobar la efectividad del proceso mediante el sumergimiento de las fibras en agua durante tres días. La figura 9 muestra la morfología de las fibras después del proceso de entrecruzamiento, así como después de la sumersión en agua.

Como se puede apreciar en la figura 9a el proceso de entrecruzamiento no afecta en gran manera la estructura fibrosa de las fibras, y lo que es más importante la mayor parte de la morfología de las fibras se conservó aún después de un tiempo prolongado de sumersión en agua (figura 9b). En contraste la muestra sin entrecruzar perdió completamente su estructura fibrosa después de solamente una hora de sumersión en agua (figura 9 (c,d)). Lo anterior remarca la importancia de un adecuado proceso de entrecruzamiento antes de someter las nanofibras electrohiladas de PVA a cualquier proceso que involucre contacto con un medio acuoso.

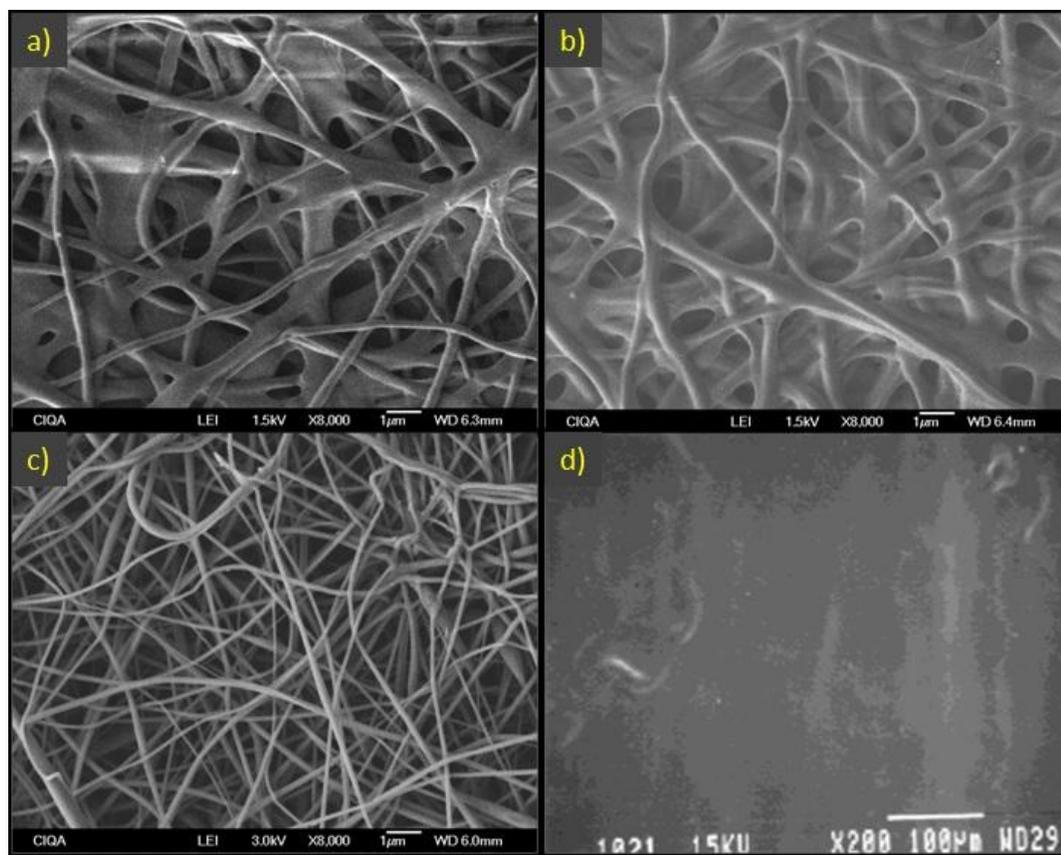


Figura 9.- Nanofibras de PVA entrecruzadas en metanol a) y nanofibras sin tratamiento de entrecruzado c), muestra entrecruzada después de tres días en agua b) y muestra sin entrecruzar después de una hora en agua⁴⁰ d).

3.7.2. Presencia de la enzima LDH en las nanofibras electrohiladas

La presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) etiquetada con el compuesto 8-Anilino-1-naftaleno ácido sulfónico (ANS) en las nanofibras electrohiladas de poli (vinil alcohol) (PVA) se comprobó utilizando la técnica de microscopía laser confocal. Aprovechando la fluorescencia del compuesto ANS una vez que entra en contacto con la enzima, se electrohilaron fibras de PVA conteniendo la enzima etiquetada en un portaobjetos de óxido de indio-estaño (ITO) para su posterior análisis en el microscopio confocal.

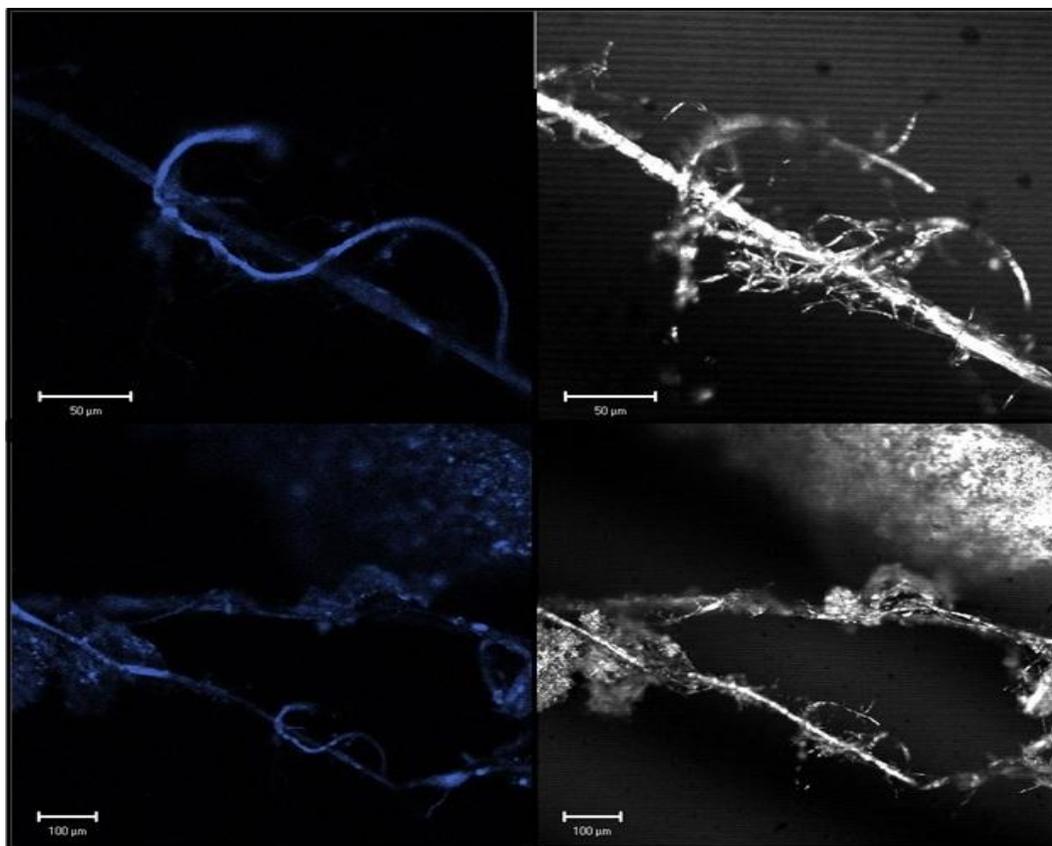


Figura 10.- Imágenes de microscopía confocal mostrando la fluorescencia de las fibras electrohiladas de PVA conteniendo a la enzima etiquetada inmovilizada.

En la figura 10 se muestran las imágenes de fluorescencia de las fibras obtenidas mediante esta técnica. Se puede observar como se presenta fluorescencia a lo largo de la fibra, con lo que se demuestra la presencia de la enzima LDH etiquetada con ANS en las fibras de PVA. Si la enzima no estuviera etiquetada con el compuesto ANS y a la vez plenamente distribuida en las fibras, no se presentaría fluorescencia en ninguna parte de la morfología de las fibras.

3.7.3. Detección de Lactato

3.7.3.1. LDH-ANS en solución

Para la detección de lactato en solución se utilizó el sistema LDH-ANS y el método colorimétrico Barker-Summerson. En la figura 11 se muestra la gráfica correspondiente a la detección de lactato utilizando el sistema LDH-ANS en solución. Como se esperaba, conforme se incrementó la cantidad de lactato añadida al medio de reacción, se presentó una disminución en la intensidad de la fluorescencia producida por la enzima etiquetada. Si analizamos esta disminución en el rango completo de 0-40 $\mu\text{g/mL}$, correspondiendo la máxima fluorescencia a la enzima etiquetada sin la presencia del lactato en el medio. Al agregar la primera dosis de lactato al medio se observa una drástica disminución en la fluorescencia de la enzima etiquetada (figura 11a). Conforme se avanza en el análisis de la gráfica se nota que la fluorescencia va disminuyendo primero de una manera proporcional a la cantidad de lactato en el medio, para después llegar a un estado estable donde por más cantidad de lactato que se agregue al medio la fluorescencia producida por el sistema LDH-ANS no presenta grandes cambios.

Como se puede notar si se analiza el rango completo, la gráfica es perfectamente ajustable a un modelo exponencial (figura 11a). Sin embargo si se pretende utilizar este sistema para la detección de lactato, es preferible solo usar el rango donde la disminución de la fluorescencia de la enzima etiquetada presente un comportamiento lineal con respecto al lactato presente en el medio. Esta parte del rango detectable se señala mediante un recuadro en la figura 11a y se presenta ampliada en la figura 11b. Como se puede observar en este rango la gráfica se puede ajustar a un modelo lineal con un coeficiente de determinación de 0.9318 (R^2). Lo anterior indica que en este rango el sistema LDH-ANS en solución se puede utilizar como un

sistema confiable para la detección de lactato sin que se de ningún consumo de sustrato en el proceso.

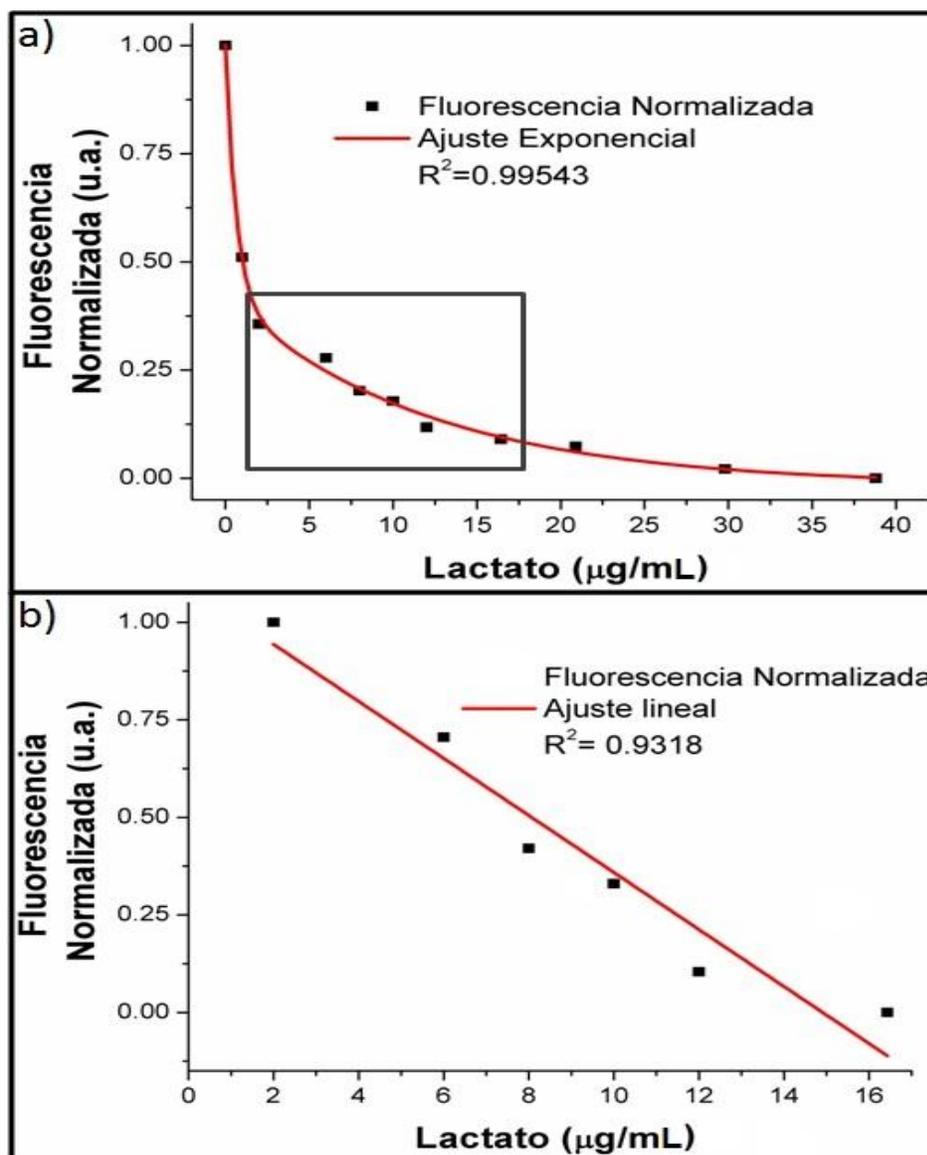


Figura 11.- Detección de lactato utilizando el sistema LDH-ANS en solución. En un rango de 0-40 µg/ml (a), y en el rango de 2-12 µg/ml (b)

Aunque ya pasaron muchos años desde la primera vez que se utilizó el método Barker-Summerson para la detección de lactato en muestras biológicas, éste sigue siendo muy utilizado en laboratorios convencionales alrededor del mundo. Lo anterior debido a que es un método robusto, confiable y práctico, además de que utiliza reactivos asequibles en cualquier laboratorio convencional. Para la preparación y análisis de muestras se

siguieron los pasos reportados para la ejecución de este método¹³. Se usaron las mismas concentraciones de lactato que en las pruebas con el sistema LDH-ANS.

En la figura 12 se muestra una comparación en los resultados obtenidos mediante estos dos métodos. Se utilizó el rango de 1- 12 $\mu\text{g/mL}$ de lactato, si se observan los dos métodos muestran un comportamiento lineal a lo largo de este rango. Si bien el método Barker-Summerson cuenta con un mejor ajuste lineal ($R^2=0.98$), el método del sistema LDH-ANS cuenta con una confiabilidad aceptable en ese rango de 1-12 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.9$). Cabe notar que si se utiliza el rango de 2-12 $\mu\text{g/mL}$ el factor de determinación se incrementa a 0.9318 como ya se ha mencionado anteriormente. Como se puede deducir del análisis de las figuras 11 y 12, el sistema utilizando la enzima LDH etiquetada con ANS se puede utilizar como un biosensor confiable para la detección de lactato en solución.

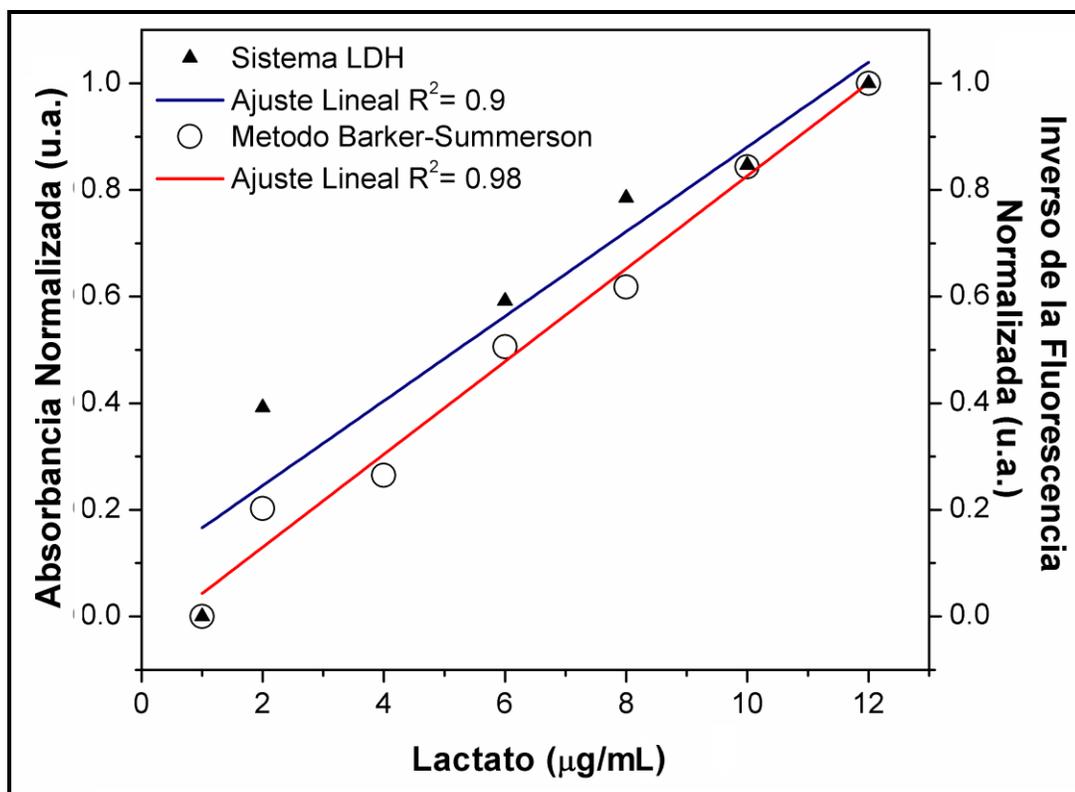


Figura 12.- Comparación de métodos entre el Sistema LDH en solución y el método Barker-Summerson.

3.7.3.2. Sistema LDH-ANS inmovilizado

Cabe señalar la dificultad que representa la inmovilización de esta enzima en nanofibras de PVA, debido a la poca solubilidad de la enzima en la solución polimérica. Lo anterior debido a que la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cuenta con un gran peso molecular (140 kg/mol), por lo que tiende a precipitarse al entrar en contacto con la solución de polímero. Aún así se logró hacer pruebas con este sistema para la detección de lactato. En la figura 13, se muestra la detección de lactato utilizando el sistema LDH-ANS inmovilizado en nanofibras de PVA. Analizando la gráfica se aprecia que durante los primeros cinco puntos de prueba no se observa un cambio significativo en la fluorescencia de las fibras (4-22 $\mu\text{g/mL}$)

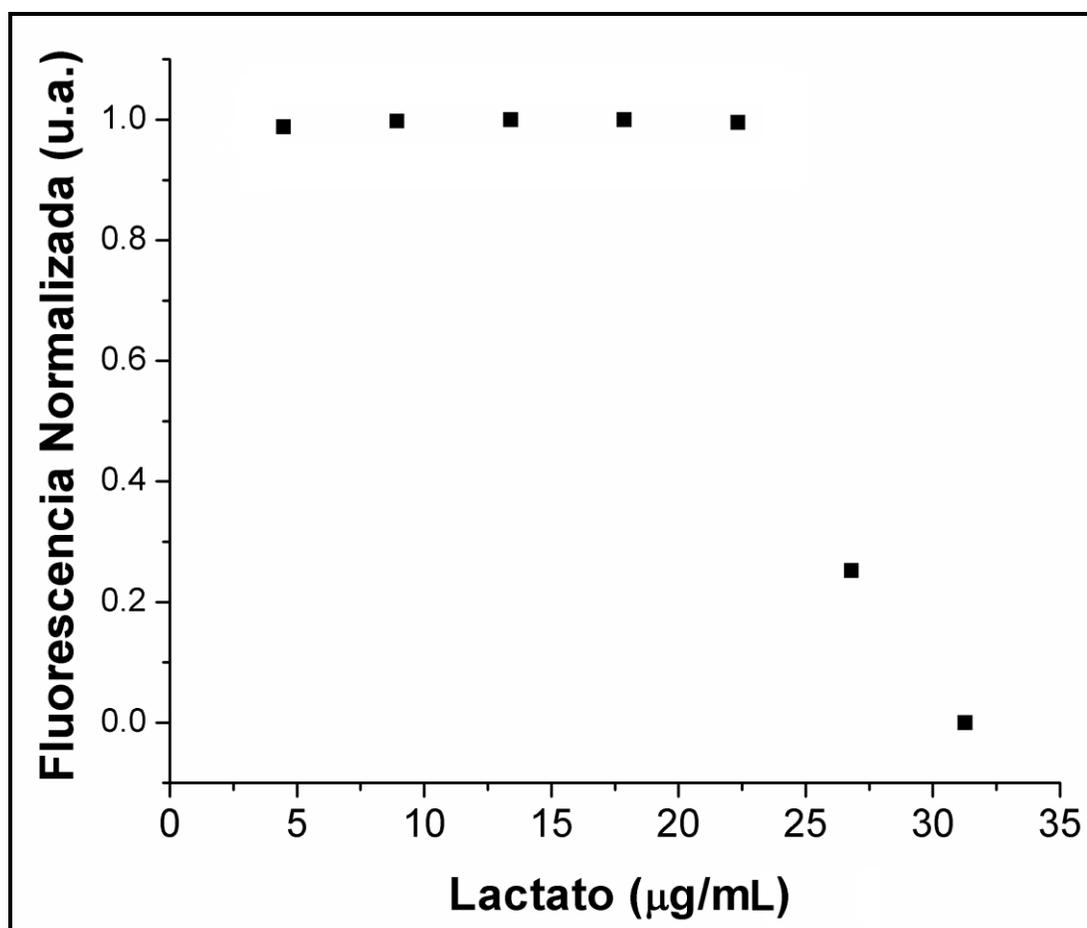


Figura 13.- Detección de lactato utilizando la enzima LDH etiquetada con ANS inmovilizada en nanofibras de PVA.

Es al llegar al punto de prueba número 6 (27 $\mu\text{g/mL}$) cuando se aprecia una disminución drástica en la fluorescencia de las fibras, para continuar descendiendo hasta llegar a un mínimo en el punto de prueba número 7 (31 $\mu\text{g/mL}$). Este comportamiento se puede atribuir al camino de difusión que tiene que recorrer la mayoría de las moléculas de analito (lactato) a través de la estructura porosa de las fibras hasta alcanzar las moléculas inmovilizadas de la enzima. Lo cual es esperado en el caso de enzimas en estado sólido y a su vez inmovilizadas en el interior de matrices porosas, las cuales tienen un acceso mucho más limitado a sus respectivos sustratos que sus contrapartes en solución⁴⁸. También es de tomarse en cuenta que no todas las moléculas de enzima se encuentran inmovilizadas en la superficie de las fibras, sino a través de toda la estructura porosa de éstas. Lo cual también es un factor que limita el acceso a las moléculas de sustrato por parte de la enzima inmovilizada.

3.8. Conclusiones

Se logró el etiquetado de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y ovoalbúmina (OVA) con el compuesto 8-Anilino-1-naftaleno ácido sulfónico (ANS) el cual se vuelve fluorescente al entrar en contacto con las partes hidrofóbicas de las enzimas. También se encontraron las relaciones LDH/ANS y OVA/ANS que producían la mayor intensidad de fluorescencia.

Se comprobó la efectividad del sistema LDH-ANS en solución para la detección de lactato en un rango de concentraciones de 2-12 $\mu\text{g/mL}$ con un factor de determinación en su ajuste lineal de 0.9318 (R^2). Lo cual nos habla de la confiabilidad de este sistema para la detección de la presencia de lactato en ese rango de concentraciones.

Se logró la optimización de la morfología de las fibras electrohiladas mediante diversas pruebas utilizando mezclas de solventes de diferente

polaridad, así como de polímeros de distinto peso molecular. Finalmente se obtuvo una morfología óptima libre de defectos y con una distribución de diámetros dentro del rango nanométrico. Lo anterior se logró utilizando una solución polimérica con una concentración de 10% m/m a base de una mezcla 50:50 de poli (vinil alcohol) (PVA) de alto y bajo peso molecular respectivamente.

Se optimizó el proceso de inmovilización de enzimas por medio de la técnica de electrohilado, mediante pruebas consecutivas de inmovilización de la enzima de prueba ovoalbúmina (OVA) etiquetada y sin etiquetar con ANS en nanofibras de PVA obteniendo morfologías interesantes pero con diámetros en el rango micrométrico.

Se logró la inmovilización de la enzima LDH tanto etiquetada con ANS como sin etiquetar en nanofibras de poli (vinil alcohol) (PVA). Aun con la inmovilización de la enzima etiquetada se obtuvieron morfologías interesantes con diámetros de fibras en el rango nanométrico sin defectos superficiales aparentes.

Se comprobó la presencia de la enzima LDH etiquetada con ANS en las fibras de PVA electrohiladas mediante pruebas de microscopia laser confocal. Siendo evidente la fluorescencia de las fibras una vez conteniendo la enzima etiquetada en su estructura.

Se realizaron pruebas con el sistema LDH-ANS inmovilizado en nanofibras de PVA para la detección de lactato. Se obtuvieron resultados satisfactorios aunque no óptimos, debido a la poca sensibilidad del sistema a concentraciones de lactato por debajo de la concentración de 22 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo por encima de esta concentración se obtuvo el propósito de este trabajo, lo cual era la disminución de la fluorescencia de la enzima inmovilizada al entrar en contacto con las moléculas de lactato. El resultado anterior nos hace pensar en el comienzo del desarrollo de biosensores de lactato mucho mas robustos y versátiles a base de nanofibras. Lo cual nos daría la ventaja de un uso continuo y reiterativo de este biosensor, sin perder la efectividad y sensibilidad de la enzima. El sistema LDH-ANS cuenta

además con la característica de que durante el proceso de detección no se presenta un consumo de moléculas de lactato por conversión a moléculas de piruvato. Para que se diera esta conversión tendría que estar presente el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) en el medio de reacción.

3.9. Trabajo a futuro

Realizar más pruebas con este sistema LDH-ANS inmovilizado en nanofibras de PVA para mejorar su rango de sensibilidad.

Realizar pruebas de repetibilidad y de tiempo a este sistema para comprobar su ventaja en estos aspectos con respecto al mismo sistema LDH-ANS en solución.

Referencias

1. Carl B, Edward A, David B: *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (Sexta Ed.). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2007. p. 976.
2. D'Auria S, Gryczynski Z, Gryczynski I, Rossi M, Lakowicz JR, A Protein Biosensor for Lactate, *Analytical Biochemistry* (2000), 283 (1), 83-88.
3. Katrik J, Pizzariello A, Mastihuba V, et al., Biosensors for -malate and -lactate based on solid binding matrix, *Analytica Chimica Acta* (1999), 379 (1-2), 193-200.
4. Parra A, Casero E, Vázquez L, Pariente F, Lorenzo E, Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces, *Analytica Chimica Acta* (2006), 555 (2), 308-315.
5. Abeysekara S, Naylor JM, Wassef AWA, Isak U, Zello GA, D-Lactic acid-induced neurotoxicity in a calf model, *AJP - Endocrinology and Metabolism* (2007), 293 (2), E558-565.
6. Weber J, Kumar A, Kumar A, Bhansali S, Novel lactate and pH biosensor for skin and sweat analysis based on single walled carbon nanotubes, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2006), 117 (1), 308-313.
7. Schabmueller CGJ, Loppow D, Piechotta G, et al., Micromachined sensor for lactate monitoring in saliva, *Biosensors and Bioelectronics* (2006), 21 (9), 1770-1776.

8. Smutok O, Gayda G, Gonchar M, Schuhmann W, A novel -lactate-selective biosensor based on flavocytochrome b2 from methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, *Biosensors and Bioelectronics* (2005), 20 (7), 1285-1290.
9. Tsai Y-C, Chen S-Y, Liaw H-W, Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2007), 125 (2), 474-481.
10. Yang Q, Atanasov P, Wilkins E, Needle-type lactate biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* (1999), 14 (2), 203-210.
11. Günel E, Çağlayan O, Çağlayan F, Serum D-lactate levels as a predictor of intestinal ischemia-reperfusion injury, *Pediatric Surgery International* (1998), 14 (1), 59-61.
12. Friedemann TE, Graeser JB, The determination of lactic acid, *Journal of Biological Chemistry* (1933), 100 (1), 291-308.
13. Barker SB, Summerson WH, The colorimetric determination of lactic acid in biological material, *The Journal of Biological Chemistry* (1941), 138, 535-554.
14. Pilone GJ, Kunkel RE, Colorimetric Determination of Total Lactic Acid in Wine, *American Journal of Enology and Viticulture* (1970), 21 (1), 12-18.
15. Heinemann B, A Rapid Colorimetric Method for the Determination of Lactic Acid in Milk, *Journal of Dairy Science* (1940), 23 (10), 969-972.
16. Tsao MU, Baumann ML, Wark S, Microdetermination of Lactic Acid in Urine, *Analytical Chemistry* (1952), 24 (4), 722-725.
17. Kotani A, Miyaguchi Y, Kusu F, Determination of organic acids by High-Performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Analytical Sciences* (2001), 17 (Supplement), a141-a143.
18. Minagawa H, Nakayama N, Matsumoto T, Ito N, Development of long life lactate sensor using thermostable mutant lactate oxidase, *Biosensors and Bioelectronics* (1998), 13 (3-4), 313-318.
19. Gibello A, Collins MD, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF, Richardson PT, Cloning and Analysis of the L-Lactate Utilization Genes from *Streptococcus iniae*, *Applied and Environmental Microbiology* (1999), 65 (10), 4346-4350.
20. Mascini M, Moscone D, Palleschi G, A lactate electrode with lactate oxidase immobilized on nylon net for blood serum samples in flow systems, *Analytica Chimica Acta* (1984), 157, 45-51.
21. Schubert F, Kirstein D, Schröder KL, Scheller FW, Enzyme electrodes with substrate and co-enzyme amplification, *Analytica Chimica Acta* (1985), 169, 391-396.
22. Lobo-Castañón MJ, Miranda-Ordieres AJ, Tuñón-Blanco P, A bienzyme-poly-(o-phenylenediamine)-modified carbon paste electrode for the amperometric detection of -lactate, *Analytica Chimica Acta* (1997), 346 (2), 165-174.
23. Herrero AM, Requena T, Reviejo AJ, Pingarrón JM, Determination of l-lactic acid in yoghurt by a bienzyme amperometric graphite-Teflon composite biosensor, *European Food Research and Technology* (2004), 219 (5), 557-560.

24. Kwan RCH, Hon PYT, Mak KKW, Renneberg R, Amperometric determination of lactate with novel trienzyme/poly(carbamoyl) sulfonate hydrogel-based sensor, *Biosensors and Bioelectronics* (2004), 19 (12), 1745-1752.
25. Chaubey A, Pande KK, Singh VS, Malhotra BD, Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films, *Analytica Chimica Acta* (2000), 407 (1-2), 97-103.
26. Situmorang M, Gooding JJ, Hibbert DB, Immobilisation of enzyme throughout a polytyramine matrix: a versatile procedure for fabricating biosensors, *Analytica Chimica Acta* (1999), 394 (2-3), 211-223.
27. Ma L, Wen J, Lu W, Caiyin Q, Liang Y, Efficient immobilization of lactate dehydrogenase in biocomposites of double-walled carbon nanotube-doped alginate gel, *Enzyme and Microbial Technology* (2008), 42 (3), 235-241.
28. Chaubey A, Gerard M, Singh V, Malhotra B, Immobilization of lactate dehydrogenase on tetraethylorthosilicate-derived sol-gel films for application to lactate biosensor, *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2001), 96 (1), 303-311.
29. Lupu A, Valsesia A, Bretagnol F, Colpo P, Rossi F, Development of a potentiometric biosensor based on nanostructured surface for lactate determination, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2007), 127 (2), 606-612.
30. Menon VP, Martin CR, Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles, *Analytical Chemistry* (1995), 67 (13), 1920-1928.
31. Delvaux M, Demoustier-Champagne S, Walcarius A, Flow Injection Amperometric Detection at Enzyme-Modified Gold Nanoelectrodes, *Electroanalysis* (2004), 16 (3), 190-198.
32. Li C-I, Lin Y-H, Shih C-L, Tsaur J-P, Chau L-K, Sol-gel encapsulation of lactate dehydrogenase for optical sensing of -lactate, *Biosensors and Bioelectronics* (2002), 17 (4), 323-330.
33. Rauceo JM, Gaur NK, Lee K-G, et al., Global Cell Surface Conformational Shift Mediated by a *Candida albicans* Adhesin, *Infection and Immunity* (2004), 72 (9), 4948-4955.
34. Kundu B, Guptasarma P, Use of a hydrophobic dye to indirectly probe the structural organization and conformational plasticity of molecules in amorphous aggregates of carbonic anhydrase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2002), 293 (1), 572-577.
35. Bailey RW, Dunker AK, Brown CJ, Garner EC, Griswold MD, Clusterin, a Binding Protein with a Molten Globule-like Region†, *Biochemistry* (2001), 40 (39), 11828-11840.
36. Matulis D, Baumann CG, Bloomfield VA, Lovrien RE, 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate as a Protein Conformational Tightening Agent, *Biopolymers* (1999), 49, 451-458.
37. Kirk WR, Kurian E, Prendergast FG, Characterization of the sources of protein-ligand affinity: 1-sulfonato-8-(1')anilidonaphthalene binding to intestinal fatty acid binding protein, *Biophysical Journal* (1996), 70 (1), 69-83.
38. Haskard CA, Li-Chan ECY, Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS⁻) Fluorescent Probes, *J. Agric. Food Chem.* (1998), 46, 2671-2677.

39. Kenawy E-R, Abdel-Hay FI, El-Newehy MH, Wnek GE, Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers, *Materials Science and Engineering A* (2007), *459*, 390-396.
40. Yao L, Haas TW, Guiseppi-Elie A, et al., Electrospinning and Stabilization of Fully Hydrolyzed Poly(Vinyl Alcohol) Fibers, *Chemistry of Materials* (2003), *15*, 1860-1864.
41. Subbiah T, Bhat GS, Tock RW, Parameswaran S, Ramkumar SS, Electrospinning of Nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science* (2005), *96*, 557-569.
42. Zhang C, Yuan X, Wu L, Han Y, Sheng J, Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats, *European Polymer Journal* (2005), *41*, 423-432.
43. Tao J, Shivkumar S, Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA, *Materials Letters* (2007), *61*, 2325-2328.
44. Jun Z, Hou H, Wendorff JH, Greiner A, Poly(vinyl alcohol) nanofibres by electrospinning: influence of molecular weight on fibre shape, *e-Polymers* (2005), *038*,
45. Wang Y, Hsieh Y-L, Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes, *Journal of Membrane Science* (2008), *309*, 73-81.
46. McKee MG, Hunley MT, Layman JM, Long TE, Solution Rheological Behavior and Electrospinning of Cationic Polyelectrolytes, *Macromolecules* (2005), *39* (2), 575-583.
47. Müller K, Quinn JF, Johnston APR, et al., Polyelectrolyte Functionalization of Electrospun Fibers, *Chemistry of Materials* (2006), *18* (9), 2397-2403.
48. Wu L, Yuan X, Sheng J, Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning, *Journal of Membrane Science* (2005), *250*, 167-173.

LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 1.- Estructura de los dos isómeros del ión lactato. a) D-(-)-Lactato, b) L-(+)- Lactato.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 2.- Morfología de las nanofibras de PVA electrohiladas con una concentración de 7% m/m (a,b). Histogramas de diámetros de fibras (c,d).....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 3.- Morfología de las nanofibras de PVA electrohiladas con una concentración de 7% m/m utilizando una mezcla de solventes 95:5 agua:etanol (a,b). Histogramas de diámetros de fibras (c,d).....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 4.- Morfología de las nanofibras de PVA electrohiladas con una concentración de 10% m/m utilizando una mezcla de 50:50 PVA de alto y bajo peso molecular (a,b). Análisis de diámetros correspondiente (c,d).....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 5.- Morfología de las nanofibras electrohiladas a partir de una solución de PVA-ANS(a,b). Análisis de la distribución de diámetros (c,d).....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 6.- Enzima OVA inmovilizada en nanofibras electrohiladas a) 3 mg de enzima, b) 11 mg de enzima, c) y d) Análisis de distribución de diámetros.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 7.- Enzima OVA etiquetada con ANS inmovilizada en fibras de PVA a) 1.5 mg de enzima, b) 11 mg de enzima, c) y d) Análisis de distribución de diámetros.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 8.- Enzima LDH etiquetada con ANS inmovilizada en fibras de PVA a) y b), Análisis de distribución de diámetros c) y d).....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 9.- Nanofibras de PVA entrecruzadas en metanol a) y nanofibras sin tratamiento de entrecruzado c), muestra entrecruzada después de tres días en agua b) y muestra sin entrecruzar después de una hora en agua40 d).....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 10.- Imágenes de microscopia confocal mostrando la fluorescencia de las fibras electrohiladas de PVA conteniendo a la enzima etiquetada inmovilizada.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 11.- Detección de lactato utilizando el sistema LDH-ANS en solución. En un rango de 0-40 µg/ml (a), y en el rango de 2-12 µg-ml (b).....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 12.- Comparación de métodos entre el Sistema LDH en solución y el método Barker-Summerson.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 13.- Detección de lactato utilizando la enzima LDH etiquetada con ANS inmovilizada en nanofibras de PVA.....</i>	<i>77</i>

LIBERACION SOSTENIDA DE LACTATO DESHIDROGENASA

4.1 Importancia de la liberación controlada de proteínas

Las proteínas juegan un papel importante en el cuerpo humano en cuestiones tan importantes como estructura, defensa, genética y reproducción, hormonas. etc. De ahí su importancia terapéutica en el tratamiento de un número creciente de padecimientos de salud. Por ejemplo debido a deficiencias metabólicas el cuerpo deja de producir la proteína insulina, la cual juega un papel clave en la regulación de la cantidad de glucosa en el cuerpo humano. Debido a esta deficiencia de insulina en el cuerpo, muchas personas tienen la necesidad de inyectarse constantemente insulina sintética para controlar sus niveles de glucosa. Otra proteína importante es la hemoglobina, la cual se encarga de transportar el oxígeno desde los pulmones a los órganos más importantes del cuerpo humano. Estructuralmente la miosina juega un importante papel en el movimiento muscular. El origen de la enfermedad de Alzheimer se ha vinculado a la acumulación (en forma de fibras) en el cerebro de la proteína β -amiloide, la cual dificulta la comunicación entre las neuronas, lo que desencadena la cascada de síntomas que caracterizan esta enfermedad¹.

Los anteriores son sólo algunos ejemplos de cuán importante son las proteínas para el ser humano. Como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, las funciones biológicas de las proteínas cualesquiera que estas sean (catálisis, defensa, estructura, etc.) dependen totalmente de la estabilidad de su estructura tridimensional. Lamentablemente esta estructura es sumamente inestable una vez que la proteína es extraída de su medio ambiente natural. Esto, en conjunto con su importancia nutricional y terapéutica ha creado la necesidad de idear sistemas de administración y liberación eficaces para su uso en el tratamiento de distintos cuadros clínicos

y situaciones médicas particulares. Anteriormente también se han mencionado los distintos métodos que se han empleado para estabilizar la estructura tridimensional de las proteínas. Algunos ejemplos son las matrices porosas, geles, películas de polímero, alteraciones genéticas y en el caso particular de este trabajo de tesis, nanofibras poliméricas.

4.2 Uso terapéutico de las enzimas

Las enzimas son proteínas sumamente importantes para el correcto funcionamiento del cuerpo humano. Sin las enzimas las reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos, simplemente no serían lo suficientemente rápidas para el sostenimiento de la vida. La característica más apreciada en las enzimas es su elevada especificidad hacia un determinado tipo de moléculas llamadas sustratos. Estas proteínas catalizadoras tienen la capacidad incluso de distinguir entre distintas formas llamadas estereoisómeras de la misma molécula de sustrato². En ocasiones, por razones genéticas o patológicas el cuerpo deja de producir determinado tipo de enzimas ó las sintetiza de manera incorrecta por lo que no pueden realizar adecuadamente su función catalizadora.

En la tabla 1 se enumeran algunos padecimientos clínicos asociados con enzimas. En la figura 1 se muestra el intervalo de aplicación de las enzimas cuando se usan como drogas terapéuticas. Como puede observarse las aplicaciones de las enzimas van desde el tratamiento del cáncer hasta aliviar los síntomas de enfermedades hereditarias.

Tabla 1.- Enfermedades relacionadas con enzimas.

Enfermedad	Enzima Involucrada	Síntomas Clínicos
Anemia Hemolítica	<i>Glucosa-6- fosfato deshidrogenasa piruvato quinasa</i>	Inestabilidad de los glóbulos rojos, hemólisis
Gota	<i>fosforribosilpirofosfato (PRPP) sintetasa</i>	Hiperuricemia, problemas renales y de articulaciones.
Inmunodeficiencia	<i>Adenosina Deaminasa</i>	Inmunodeficiencia combinada de células T y B
Litiasis Renal	<i>Adenina fosforribosiltransferasa (APRT)</i>	Problemas Renales
Deficiencia de piruvato deshidrogenasa	<i>Piruvato deshidrogenasa, dihidrolipoil transacetilasa, dihidrolipoil deshidrogenasa</i>	Probable causa del síndrome de Reye, acidosis láctica, defectos neurológicos y ataxia.
Tirosinemia (Tipo II)	<i>Tirosina Aminotransferasa</i>	Retraso Mental, queratitis, dermatitis, síndrome Franconi.
Albinismo	<i>Tirosinasa</i>	Ausencia de pigmento en la piel, pelo y ojos
Prolinemia	<i>Prolina Oxidasa</i>	Nefritis hereditaria, sordera neurosensorial y retardo mental
Intolerancia a la lisina	<i>L-lisina: NAD oxidoreductasa</i>	Vómito, coma, hiperamonemia, cabello delgado, destrucción de músculos y osteoporosis.

Fuente: Southern Illinois University School of Medicine (SIU)

El concepto del uso de las enzimas como agentes terapéuticos ha estado en la mente de los científicos desde hace 40 años. Por ejemplo una enzima terapéutica fue descrita como una parte de terapia de reemplazo enzimático en la década de los 60's por de Duve³. En el año de 1987 el producto Activasa (alteplasa) fue la primera enzima recombinante en ser aprobada por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos⁴. La segunda enzima en ser aprobada para su uso comercial fue el producto Adagen, el cual contenía un forma de la enzima adenosina deaminasa bovina (ADA) tratada con poli (etilenglicol) (PEG) para incrementar su tiempo de circulación sanguínea⁴.

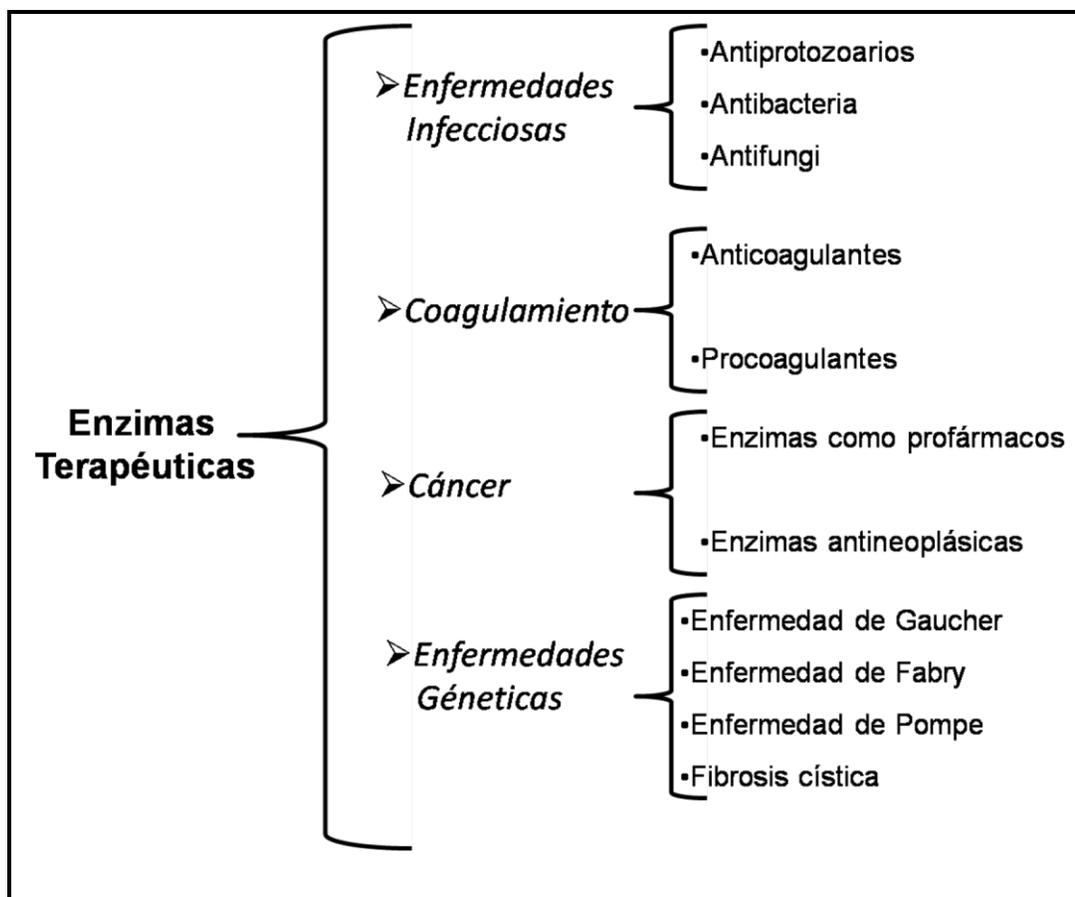


Figura 1.- Esquema que muestra los diferentes campos de acción de las enzimas como drogas terapéuticas⁴⁻⁵.

Dos factores han influido grandemente en el incremento de la investigación científica sobre las enzimas como agentes terapéuticos, al mismo tiempo que han impulsado su comercialización como productos farmacéuticos. El primero es de naturaleza jurídica y financiera, fue en el año 1983 cuando se aprobó la llamada Acta de medicamentos huérfanos (*Orphan Drug Act*), la cual promovía la investigación, desarrollo y comercialización de medicamentos huérfanos. Un medicamento huérfano se define como aquel destinado al tratamiento de enfermedades con menos de 200, 000 casos al año en Estados Unidos. Debido a lo anterior era muy poco probable que las empresas farmacéuticas invirtieran recursos en el desarrollo de ese tipo de medicamentos. Es por eso que el gobierno se vio en la necesidad de intervenir de distintas maneras para impulsar la investigación y desarrollo de estos medicamentos.

Esta intervención se ha venido dando mediante diversos mecanismos, por ejemplo exenciones de impuestos, extensión de la patente por 7 años, derechos de mercado y subsidios económicos para la investigación clínica. Lo anterior ha impulsado grandemente la investigación de nuevos productos terapéuticos basados en enzimas. El producto Adagen (pegadema bovina) fue la primera enzima terapéutica en verse beneficiada por esta ley⁶. Este último producto en conjunto con la Activasa marcaron el inicio de una nueva era para las enzimas, llevándolas de un producto meramente suplementario a una droga terapéutica aprobada por la FDA*. En la tabla 2 se da una relación de algunas de las enzimas terapéuticas, así como de su aplicación correspondiente.

Otro factor que ha impulsado el desarrollo de las enzimas como drogas terapéuticas ha sido los avances en biotecnología que se han dado en los últimos años. Estos adelantos han permitido eliminar algunos inconvenientes en el desarrollo y comercialización de enzimas, al permitir la existencia de enzimas más seguras, baratas y con un aumento en su potencia y especificidad como catalizadores. Los modernos avances en ingeniería genética también han permitido la utilización de enzimas mutantes en condiciones extremas de temperatura y pH. Tradicionalmente las enzimas eran extraídas de su fuente natural, por ejemplo algún tejido animal o humano. Sin embargo en la mayoría de los casos industriales y de diagnóstico, las enzimas son producidas por microorganismos. Estos microorganismos utilizados en la producción de enzimas son no patógenos, no tóxicos y por lo general no producen anticuerpos. Además éstos se pueden cultivar en gran escala en un corto espacio de tiempo bajo métodos de fermentación bien establecidos. De acuerdo a lo anterior, estos microorganismos pueden producir una cantidad abundante y regular de la enzima requerida de acuerdo a cada aplicación^{5, 7}.

* Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos por sus siglas en inglés

Tabla 2.- Algunos ejemplos de enzimas terapéuticas⁴⁻⁵

Nombre Comercial	Enzima utilizada	A.D.	A.P.	Aplicación
Adagen	Pegademasa bovina	1984	1990	Para tratamiento de reemplazo de la enzima ADA
Fabrazyme	Agalsidasa Beta	1988	2003	Tratamiento de la enfermedad de Fabry
Aldurazyme	Laronidasa	1997	2003	Tratamiento de pacientes con mucopolisacaridosis tipo I
Replagal	α -Galactosidasa	1998	2003	Terapia de reemplazo enzimático a largo plazo para el tratamiento de la enfermedad de Fabry
Ceredasa	Inyección de alglucerasa	1985	1991	Para terapia de reemplazo enzimático en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher tipo I
Elitek	Rasburicasa	2000	2002	Tratamiento de la hiperuricemia maligna inducida (asociada con tratamientos de quimioterapia).
Zurase	Uricasa modificada con PEG	1999		Profilaxis de hiperuricemia en pacientes con cáncer proclives a desarrollar el síndrome de lisis tumoral.
TheraCLEC-Total	Lipasa, amilasa y proteasa.	2002		Tratamiento de la insuficiencia pancreática
Melanocid	Arginina deiminasa	1999		Tratamiento del melanoma maligno invasivo

A.D. Año de diseño

A.P. Año de aprobación como medicamento huérfano.

En conjunto con lo anterior, las ventajas de la ingeniería genética ha permitido la producción de virtualmente cualquier proteína por medio de sistemas de producción recombinantes. Estos sistemas conllevan a un aumento de los beneficios potenciales en términos de niveles de producción y pureza de las enzimas producidas. Las enzimas recombinadas y no recombinadas usadas para aplicaciones industriales y de diagnóstico son generalmente producidas por sistemas de ingeniería microbiana, mientras que muchas enzimas terapéuticas son producidas en líneas de células de origen animal. La mayoría de las enzimas (recombinadas y no recombinadas) son producidas por fermentación en el medio de cultivo y secretadas directamente al medio extracelular. La principal ventaja de este método extracelular de producción es que se evita la necesidad de romper la membrana celular para liberar las enzimas, conllevando a una disminución en los proceso de purificación final del producto. Después del proceso de

producción las células enteras intactas se pueden remover del medio de cultivo por simple filtración o por centrifugación^{5, 7-8}.

En determinadas ocasiones la enzima deseada se produce por métodos intracelulares, esto es la enzima es producida dentro de la célula. Este método necesariamente implica la posterior ruptura de la membrana celular, para poder liberar la enzima al medio extracelular. El problema es que junto con la enzima de interés, se libera todo el contenido de la célula. Por lo tanto una serie de subsecuentes pasos de purificación son necesarios para obtener la enzima final requerida, añadiendo grados de complicación a todo el proceso de fabricación de enzimas. Entre las enzimas intracelulares a las que se les ha encontrado una aplicación industrial se encuentran la asparaginasa, la penicilina acilasa y la glucosa isomerasa. La complejidad del proceso de fabricación de enzimas depende del grado de pureza que requiera su aplicación final. Por ejemplo, para aplicaciones industriales la enzima producida generalmente requiere de un mínimo si no es que de ningún paso de purificación final, y el producto final es obtenido por medio de concentración de extracto crudo, la adición de un excipiente, y si se requiere, de un secado final. Las enzimas terapéuticas, por otra parte, requieren de una serie de procesos de purificación antes de su formulación final, lo que implica múltiples pasos de cromatografía de alta resolución^{5, 7-8}.

Las enzimas, como otras proteínas con aplicaciones terapéuticas, se han beneficiado de una disciplina interesante y relativamente nueva llamada ingeniería de proteínas, la cual se encarga de diseñar y/o manipular las propiedades y características de diversas proteínas para adecuar y optimizar su funcionamiento a determinado proceso industrial o de laboratorio (figura 2). Esta disciplina consiste principalmente de dos métodos para llegar a este objetivo, el diseño racional y la evolución dirigida. El diseño racional consiste en utilizar la mutagénesis dirigida, la cual consiste de la sustitución, eliminación o enjertación de uno o más nucleótidos en el ADN que codifica para esa enzima en particular, esto con el fin de mutar un aminoácido o

secuencia de aminoácidos predeterminada en la estructura primaria de la proteína. Lo anterior lleva a la consecuente modificación y/o potencialización de la propiedad deseada en la enzima en particular. Por ejemplo, se ha utilizado este método para modificar y/o potencializar propiedades tales como la especificidad y la estabilidad de determinadas enzimas, así como también para facilitar su proceso de purificación. Este método conlleva a una disminución en el tiempo y dinero invertidos en el proceso de ingeniería de las proteínas. Sin embargo, el principal factor limitante para su uso es el conocimiento previo requerido de la estructura proteínica de la enzima a todos sus niveles, así como de la relación entre esa estructura y la propiedad enzimática en particular que se desee modificar. Se espera que conforme se avance en el conocimiento de la estructura proteínica de cada vez más enzimas, se pueda utilizar con más frecuencia esta rama de la ingeniería de proteínas⁷.

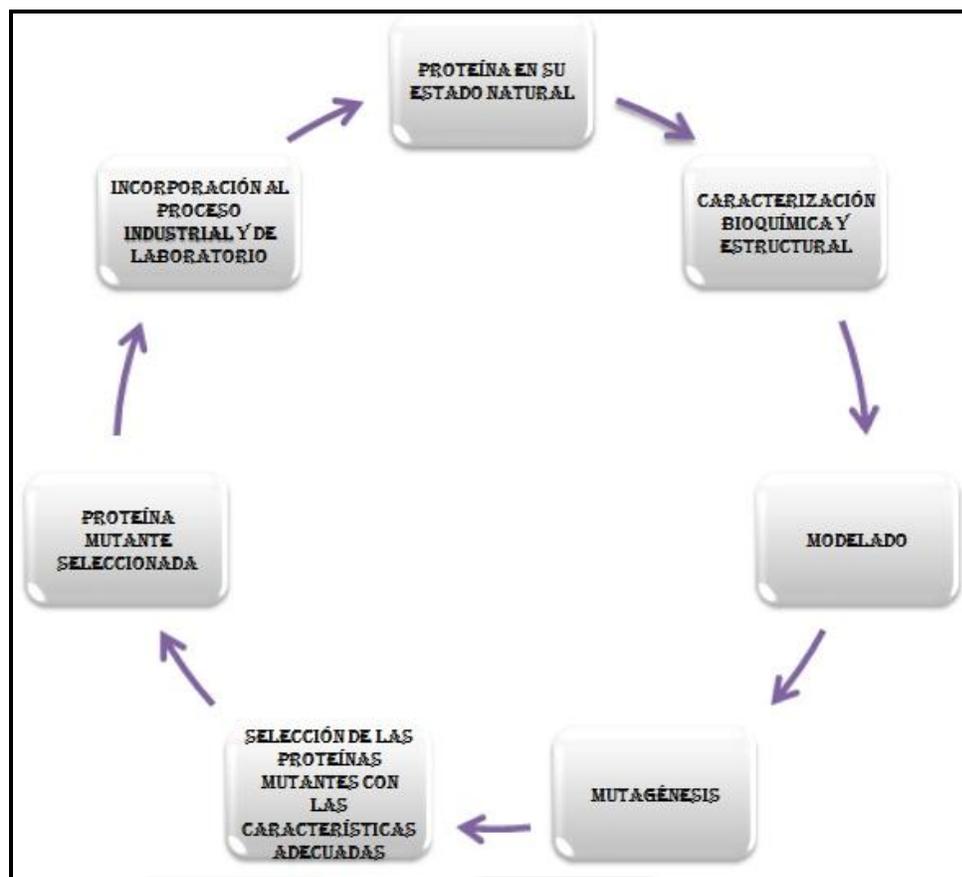


Figura 2.- Esquema que muestra el ciclo de la ingeniería de proteínas⁷.

Otra herramienta poderosa que se ha usado en la ingeniería de proteínas son las técnicas de evolución molecular o mutagénesis al azar. Ambas técnicas se basan en la bien establecida tecnología conocida como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), la cual permite la introducción de un número pequeño de mutaciones preseleccionadas de secuencias de ADN. Éstas consisten principalmente de generar mutaciones al azar en las enzimas de interés, para posteriormente usar mecanismos de selección de los organismos mutantes que posean las características deseadas. Hay dos tipos principales de técnicas de evolución molecular: mezclado de ADN (*DNA shuffling*) y la evolución dirigida. La primera consiste en la unión de fragmentos de la molécula de ADN proveniente de varios organismos modificados genéticamente en un solo código genético para obtención de mejores resultados. Esta técnica mimetiza la recombinación genética que ocurre durante la reproducción sexual, por lo que también es llamada PCR sexual. Ha sido aplicada con éxito para la modificación y potencialización de propiedades de enzimas tales como la β -lactamasa y bifenil-dioxigenasas (BPDox)⁹⁻¹⁰.

La evolución dirigida consiste en una serie de ciclos de mutaciones al azar con la posterior selección de los especímenes con las características deseadas en cada paso. Esta técnica cuenta con la ventaja de que se puede realizar aún sin un conocimiento profundo previo de la estructura de la proteína. Para que la evolución dirigida sea efectiva, se debe contar con métodos efectivos y versátiles de selección de especímenes a fin de agilizar el proceso. Este método mimetiza el proceso de evolución que se da en la naturaleza, pero en mucho menor tiempo. Una clara ventaja de este procedimiento es que limita el número de especímenes mutantes a seleccionar, con un espécimen mutante seleccionado en cada paso. Mediante esta estrategia se ha logrado mejorar las funciones naturales de distintas enzimas, además de mejorar su habilidad para sobrevivir en ambientes distintos de los de su fuente natural.

Algunas enzimas cuyas funciones y características fueron modificadas mediante evolución dirigida son una especie de esterasa extraída del *Bacillus subtilis*. Fue modificada para ser capaz de hidrolizar enlaces de esteres de p-nitrobencilo en presencia de solventes orgánicos, una reacción de interés para la industria farmacéutica puesto que la utiliza en la remoción de grupos funcionales introducidos durante la síntesis de antibióticos pertenecientes a la clase de las cefalosporinas. Su actividad específica fue incrementada hasta 30 veces a través de cuatro generaciones de mutagénesis al azar y una posterior recombinación de ADN¹¹. También fue optimizada la actividad específica de la subtilisina (serina endopeptidasa) en solventes polares a través de esta técnica¹². Un caso interesante es la enantioselectividad inducida en la lipasa extraída de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* a través de esta técnica¹³.

En base a lo comentado en párrafos anteriores se puede apreciar como los últimos avances en biotecnología han influido en el desarrollo de las enzimas como drogas terapéuticas. La ingeniería genética nos ha proporcionado una manera eficaz de obtener enzimas más puras y en mayor cantidad a través de cultivos de microorganismos recombinados genéticamente. Así mismo la ingeniería de proteína ha permitido obtener enzimas con funciones renovadas y mejoradas, o incluso con funciones nuevas. Lo anterior aunado a los beneficios e incentivos económicos de la Acta de medicamentos huérfanos (*Orphan Drug Act*) ha facilitado y promovido en gran medida el desarrollo de las enzimas como drogas terapéuticas.

4.3 Deficiencia de enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La deficiencia de enzima LDH es una enfermedad hereditaria que generalmente se presenta en el lapso entre la infancia y la adolescencia, y que afecta a todo el proceso de conversión de los carbohidratos de la comida a energía, lo cual impide el correcto funcionamiento de los músculos.

Algunos síntomas clínicos de esta enfermedad incluyen la intolerancia al ejercicio, acompañada de daño muscular y decoloración de la orina después de realizar ejercicios extenuantes. Otros síntomas incluyen erupciones de color rojo, y en las mujeres embarazadas provoca dificultades en el parto debido a rigidez del útero. Debido a esto, a los individuos que presentan esta enfermedad se les recomienda evitar ejercicios intensos. Generalmente se detecta durante exámenes físicos, durante los cuales hay un aumento en los niveles de piruvato pero no de lactato. Lo que indica una ausencia de la enzima lactato deshidrogenasa, dado que como ya se ha mencionado esta enzima es la encargada de la conversión de piruvato a lactato. Esta enfermedad metabólica es una característica autosomal recesiva, lo que indica que ambos padres tienen que tener al menos una copia del gen alterado localizado en uno de los 22 autosomas (cromosomas asexuales)¹⁴⁻¹⁵.

4.4 Hipótesis

Las nanofibras electrohiladas de poli (vinil alcohol) (PVA) pueden funcionar como un sistema efectivo de liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH), encapsulada ya sea en el interior o en la superficie de las nanofibras preparadas por electrohilado.

4.5 Objetivos Particulares

- Optimizado de la técnica de electrohilado coaxial para la producción de nanofibras de poli (vinil alcohol) (PVA)
- Lograr la encapsulación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en las nanofibras de PVA tanto en su exterior como en su interior.
- El análisis de la morfología de las nanofibras electrohiladas antes y después del proceso de encapsulación.

- Verificar la presencia de la enzima tanto en el interior como en el exterior de las fibras de PVA producidas por electrohilado coaxial.
- Comprobar la liberación de la enzima al medio de reacción mediante el monitoreo de la absorbancia a 340 nm característica del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH).
- Monitorear el efecto de las distintas condiciones de electrohilado en la liberación de la enzima al medio.

4.6 Experimentación

4.6.1 Materiales y reactivos

En esta parte del trabajo de tesis se utilizaron los siguientes materiales: el poli (vinil alcohol) (PVA) con 98% de hidrólisis y un peso molecular promedio en peso (M_w) de 126 kg/mol, así como el poli (vinil alcohol) (PVA) con una hidrólisis de 87-89 % y un peso molecular promedio en peso (M_w) de 13-23 Kg/mol y el solvente metanol, todos los materiales anteriores fueron comprados en Aldrich. La enzima L-Lactato deshidrogenasa (LDH) tipo II de músculo de conejo (EC 1.1.1.27), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), el ácido láctico y el Tris buffer fueron obtenidos de Sigma.

4.6.2 Soluciones

Todas las soluciones se prepararon utilizando buffer Tris-HCl, pH 7.3. Una solución de poli (vinil alcohol) (PVA) de 8% m/m fue utilizada en todos los procesos de encapsulación mediante electrohilado coaxial, utilizando ambos tipos de polímero de alto y bajo peso molecular en una proporción 1:1. Las soluciones enzimáticas de LDH se prepararon disolviendo diferentes cantidades de la enzima en el buffer de fosfatos a pH 7.3 (0.5, 1.5, 3 y 4 mg/mL). Las soluciones se marcaron con el consecutivo 1, 2, 3 y 4

cuando se utilizó la solución enzimática como elemento interno en el proceso de electrohilado coaxial, y como 5, 6, 7 y 8 cuando la solución enzimática se utilizó como elemento externo.

4.6.3 Equipos utilizados

Microscopía: Un microscopio electrónico de barrido (SEM) fue usado para estudiar la morfología de las fibras una vez secas. Para realizar estas pruebas se usó un equipo de emisión de campo JSM-7401F.

Electrohilado: El equipo de electrohilado usado para este trabajo consistió en una jeringa a cuya aguja de metal se le redondeo la punta. Una fuente de alto voltaje Spellman CZE1000R de corriente directa y un colector de aluminio aterrizado. Dos bombas de infusión Cole Parmer (Bomba 1) y KD Scientific (Bomba 2) fueron utilizadas para controlar las velocidades de alimentación de la solución enzimática y la solución polimérica respectivamente.

Espectroscopía: Las pruebas de ultravioleta-visible fueron llevadas a cabo utilizando un equipo Shimadzu 2401. Para los espectros de infrarrojo se utilizó un espectrofotómetro Nexus 470. Los análisis de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) fueron llevados a cabo en un sistema modificado de ablación laser Riber LDM-32 usando un programa de análisis Cameca Mac3. La presión base en la cámara de análisis fue de 1×10^{-10} torr y la fuente de rayos X AlK_{α} a 1486.6 eV fue usada para la excitación. Las muestras fueron montadas sobre una lámina delgada de aluminio y entonces transferidas a una cámara analizadora. El ángulo de despegue del electrón fue puesto a 45° . Todas las posiciones de los picos del XPS fueron referenciadas usando el pico el C 1s de las muestras a 284.6 eV. Los picos de interés fueron deconvolucionados en componentes gaussianas con el programa PeakFit 4. La información que se obtuvo mediante esta técnica es sobre la superficie de nuestro material.

Conductividad: Las mediciones de conductividad fueron llevadas a cabo utilizando un equipo de medición de conductividad eléctrica en solución Corning 442.

4.6.4 Proceso de encapsulación a través de electrohilado coaxial

La técnica de electrohilado coaxial fue utilizada en este proceso de encapsulación de la enzima LDH en nanofibras de PVA (figura 7 primer capítulo). Esta técnica permite el electrohilado de nanofibras utilizando soluciones de diferentes características de densidad y solubilidad entre sí. En este trabajo se utilizaron las soluciones enzimáticas como soluciones interiores y exteriores en el electrohilado coaxial. En el primer caso el poli (vinil alcohol) fue utilizado como recubrimiento para encapsular la solución enzimática en el interior de las nanofibras electrohiladas. En el segundo caso la solución enzimática fue usada como solución exterior con el propósito de comparar el perfil de la cinética de liberación de la enzima tanto encapsulada en el interior de las nanofibras como encapsulada en su superficie. Las diferentes velocidades de alimentación que fueron utilizadas para cada muestra, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.- Velocidades de alimentación y la respectiva conductividad eléctrica de cada una de las soluciones enzimáticas utilizadas para la preparación coaxial de nanofibras.

Muestra	Velocidades de alimentación (mL/h)		Conductividad eléctrica (mS)
	<i>Bomba 1</i>	<i>Bomba 2</i>	
	<i>Solución Enzimática</i>	<i>Solución Polimérica</i>	
1	0.08	0.006	10.75
5	0.06	0.005	
2	0.1	0.007	30.4
6	0.04	0.004	
3	0.07	0.006	80.5
7	0.04	0.004	
4	0.08	0.004	104.3
8	0.05	0.003	

El aumento de la conductividad eléctrica con los cambios en las proporciones de las soluciones es consecuencia de la naturaleza proteínica polar de las enzimas. La conductividad de la solución de polímero fue de 850 μS . En cada caso las soluciones (proteína y polímero) fueron bombeadas hacia una aguja de metal sin punta la cual fungió como electrodo positivo. Este electrodo consiste de dos agujas metálicas en un arreglo concéntrico, los diámetros exterior e interior fueron de 1.25 mm y 0.85 mm respectivamente. Se utilizó un colector aterrizado de aluminio para recolectar las nanofibras electrohiladas, así mismo la distancia que se estableció entre el colector y el electrodo fue de 10 cm. Una vez que se formó una gota en la punta del electrodo se procedió a la aplicación de un voltaje, con la intención de crear un campo eléctrico y arrastrar el chorro de polímero hacia el colector. En todas las muestras se utilizó un voltaje de 20 kV. En su camino hacia el colector este chorro polimérico sufre una serie de inestabilidades hidrodinámicas así como de evaporación del solvente. Ambos fenómenos tienen como consecuencia un dramático decremento en el diámetro de las fibras hasta alcanzar la escala nanométrica.

4.6.4.1 Proceso de entrecruzamiento

Como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, las nanofibras electrohiladas de poli(vinil alcohol) tienden a hincharse y perder por completo su estructura fibrosa al entrar en contacto con medios acuosos. Es por eso que se requiere de un adecuado proceso de entrecruzamiento para conservar esa estructura fibrosa una vez que las fibras entren en contacto con el agua. Para esta parte del trabajo de tesis se escogió de nueva cuenta el proceso de entrecruzamiento de las fibras de PVA por sumersión en un baño de alcohol. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el capítulo anterior para entrecruzar las nanofibras electrohiladas de PVA con la LDH en su interior.

4.6.5 Proceso de liberación enzimática *in vitro*

El medio de reacción utilizado para cuantificar el proceso de liberación de la enzima a partir de la membrana fibrosa contiene 2.8 mL de 0.02 M de buffer Tris-HCl, pH de 7.3; 0.1 mL de una solución de NAD^+ con una concentración de 6.6 mM y 0.1 mL de una solución de ácido láctico a una concentración de 30 mM. En la reacción catalizada por la enzima LDH el piruvato es convertido a lactato con la consiguiente oxidación de NADH como cofactor a su forma oxidada NAD^+ (figura 3). Dado que el cofactor NADH absorbe a una longitud de onda de 340 nm, la conversión de piruvato a lactato usando la enzima LDH como catalizador provoca una disminución en la absorbancia a 340 nm conforme el cofactor NADH se oxida. Sin embargo en este trabajo se utilizó la reacción en la dirección opuesta, catalizando la conversión de lactato a piruvato, con la consiguiente reducción del cofactor NAD^+ produciéndose un incremento en la absorbancia a 340 nm. El cambio de absorbancia con el tiempo se utilizó para dar seguimiento al perfil de liberación de la DLH de las nanofibras y también para dar seguimiento a la actividad catalítica residual (figura 4).

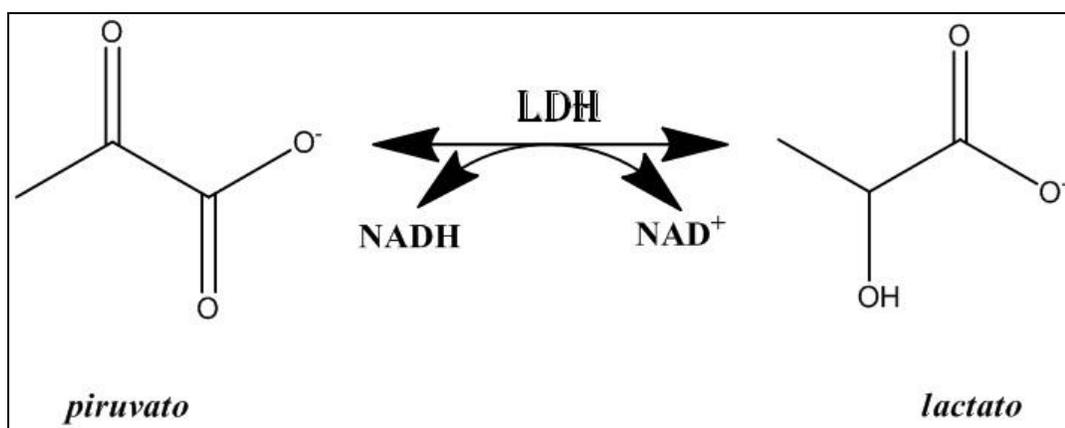


Figura 3.- Reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

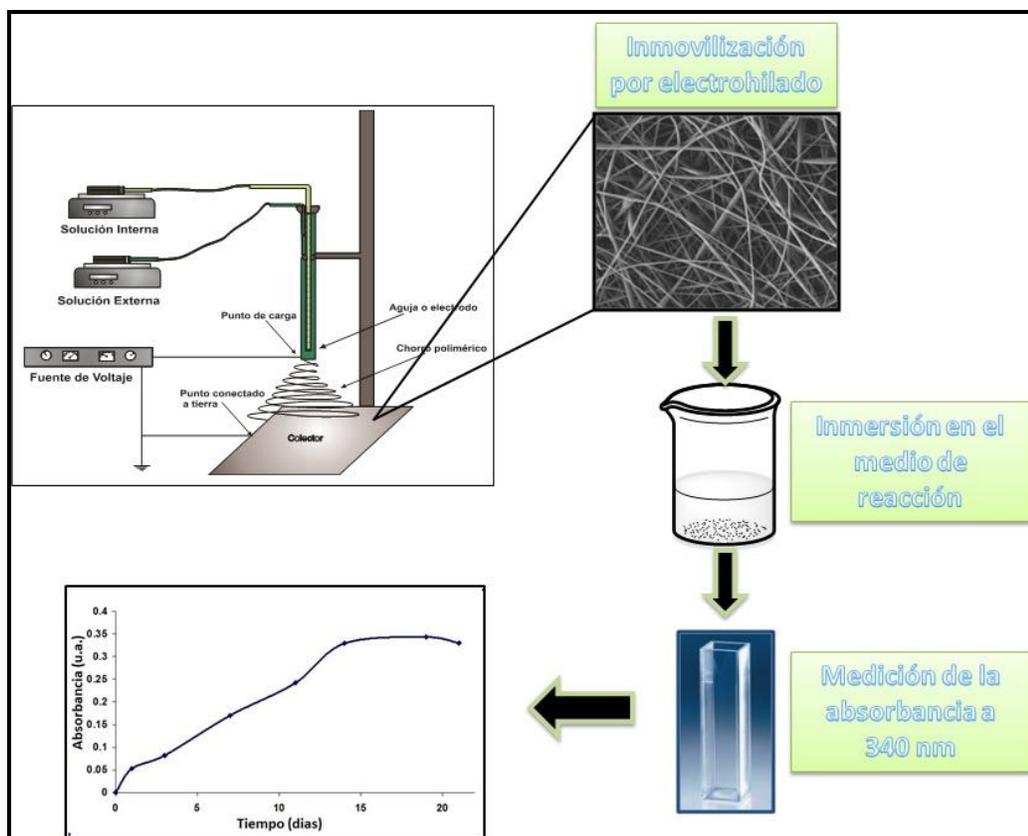


Figura 4.- Esquema que muestra los diferentes pasos en el proceso de liberación de la enzima LDH.

4.7 Resultados y discusión

4.7.1 Conductividad de las soluciones

La conductividad de la solución a partir de la cual fue electrohilada cada solución se muestra en la tabla 3. Como se puede notar, hubo un incremento en la conductividad de las soluciones conforme la concentración de enzima se incrementó. De hecho, la conductividad de la solución polimérica sin carga enzimática fue de 850 μS . Este incremento en las conductividades de la solución puede interpretarse como un incremento en la ionización de las moléculas de proteína. La conductividad de la solución es un parámetro determinante en la técnica de electrohilado¹⁶. Estos datos acerca de las conductividades de las soluciones electrohiladas fueron de gran ayuda en la optimización del proceso de encapsulación enzimática a través de la técnica de electrohilado coaxial (datos no mostrados).

4.7.2 Morfología

La morfología y diámetro de las fibras electrohiladas de poli(vinil alcohol) se analizaron antes y después del proceso de encapsulación de la enzima lactato deshidrogenasa. En la figura 5 podemos observar el cambio que se produjo en la morfología de las nanofibras durante el proceso de encapsulación utilizando la enzima como elemento interno en el electrohilado coaxial (muestras 1-4). Básicamente, las nanofibras presentan una morfología libre de defectos y su análisis de distribución de diámetros arroja un valor central de $90 \text{ nm} \pm 1.46$, el cual cae dentro del intervalo nanométrico (figura 5a, 6a). Una vez que la enzima se encapsuló en el interior de las nanofibras, el diámetro se incrementó hasta alcanzar un diámetro de $145 \text{ nm} \pm 2.07$ (figura 6 b-e).

Sin embargo, este incremento no fue muy apreciable conservándose la característica gran área superficial de las nanofibras. En las morfologías presentadas en la figura 5 podemos observar también fibras entrelazadas (flechas verdes) al igual que defectos en forma de cuentas (círculos verdes). El incremento en el diámetro de las fibras así como su entrelazamiento forman parte de la morfología esperada en fibras electrohiladas a partir de soluciones concentradas de polielectrolitos¹⁷. Dado que las proteínas son polielectrolitos naturales este tipo de morfología ha sido observada en nanofibras usadas en la inmovilización de enzimas¹⁸. Por lo tanto la morfología observada en la figura 5 puede explicarse por el hecho de que las soluciones de lactato deshidrogenasa actuaron como soluciones concentradas de polielectrolitos. El incremento en la conductividad de la solución conforme se incrementaba el contenido enzimático también soporta esta hipótesis.

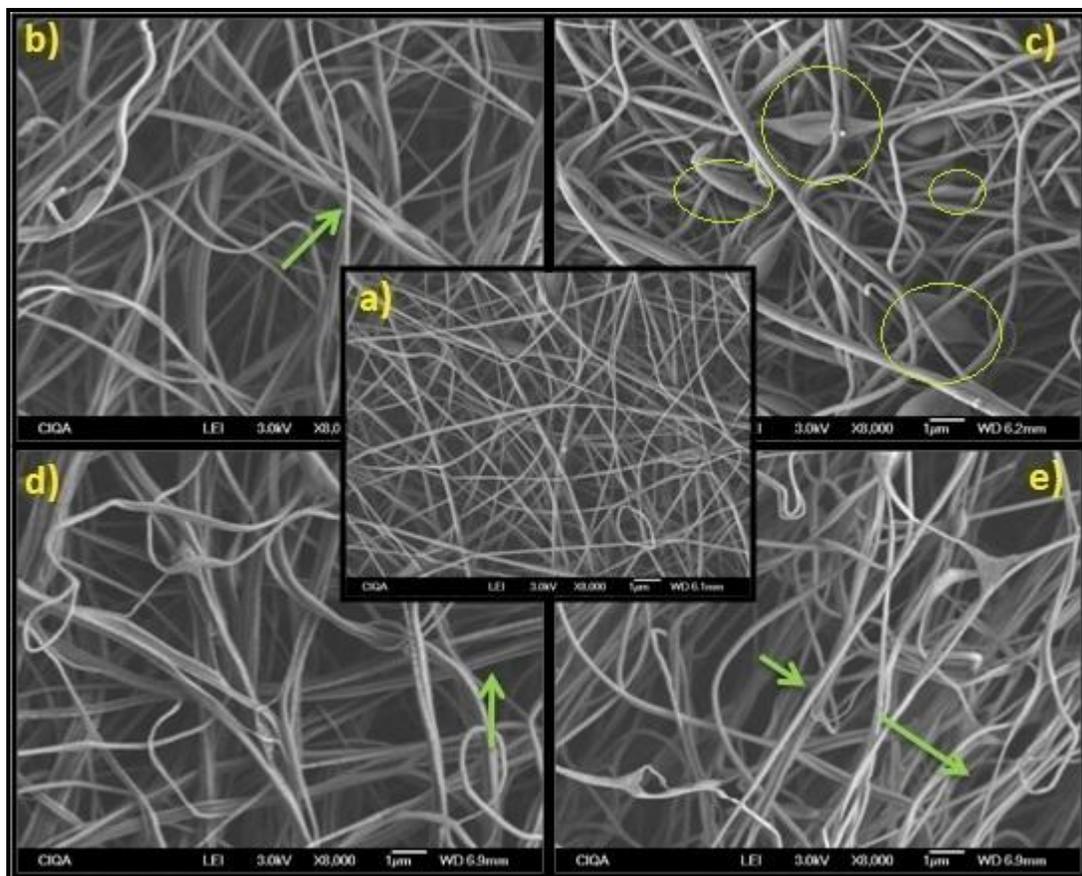


Figura 5.- Morfología de las nanofibras de PVA en las muestras donde se utilizó la solución enzimática como elemento interno en el electrohilado coaxial: a) PVA sin enzima, b) 0.5 mg/mL, c) 1.5 mg/mL, d) 3 mg/mL y e) 4 mg/mL.

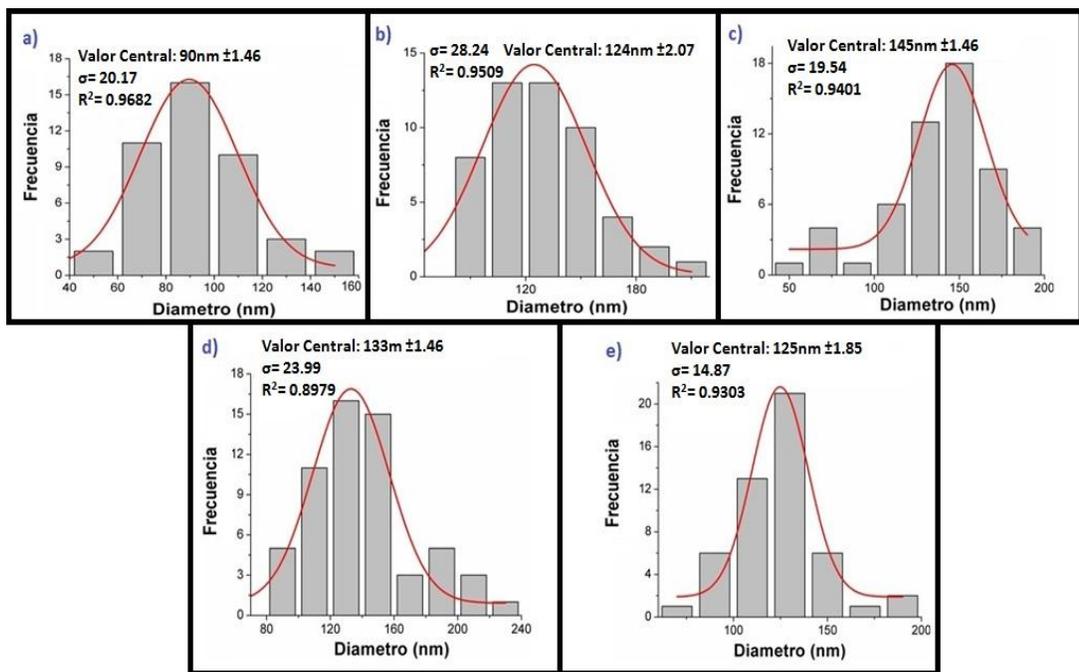


Figura 6.- Análisis de distribución de diámetros de las morfologías mostradas en la figura 5.

En la figura 7 se muestra la morfología de las nanofibras en las que se utilizó la solución enzimática como elemento exterior en el electrohilado coaxial (muestras 5-8). De nuevo se observa que en las nanofibras de PVA que no contienen enzima alguna se obtiene una morfología libre de defectos y con un diámetro de $90\text{nm} \pm 2$ (figura 7a, 8a). Una vez que se lleva a cabo el proceso de encapsulación de la enzima, se observó un cambio drástico en la morfología que se manifestó con la aparición de aglomerados en la superficie de las nanofibras (flechas verdes en figura 7 b-e). Se presume que estos aglomerados se formaron por la presencia de la LDH a partir de la solución enzimática utilizada, los datos mediante análisis superficial con espectroscopia XPS apoyan esta hipótesis. La presencia de estos aglomerados se acompañó por un incremento en el diámetro de las fibras hasta $136\text{nm} \pm 0.65$ (figura 8 b-e). Sin embargo este incremento no fue relevante, de tal manera que el área superficial de las nanofibras fue conservada.

En la figura 9 se muestra el efecto del proceso del entrecruzamiento en la morfología de las nanofibras electrohiladas de PVA antes y después de su inmersión en agua. Podemos observar la efectividad del proceso de entrecruzamiento conservando la morfología fibrosa de las nanofibras hasta tres días después de su inmersión en agua. El mecanismo que se ha propuesto para este proceso de entrecruzamiento es que las moléculas de alcohol desplazan a las moléculas remanentes de agua, permitiendo que las nanofibras de PVA formen enlaces tipo puente de hidrógeno entre ellas en lugar de formar enlaces con las moléculas de agua remanentes. Todo este proceso es físico sin involucrar ningún tipo de agente químico de entrecruzamiento que pueda afectar la estabilidad enzimática. El tratamiento con alcohol incrementa el grado de cristalinidad de las nanofibras de PVA permitiendo que ocurran entrecruzamientos físicos entre las fibras¹⁹.

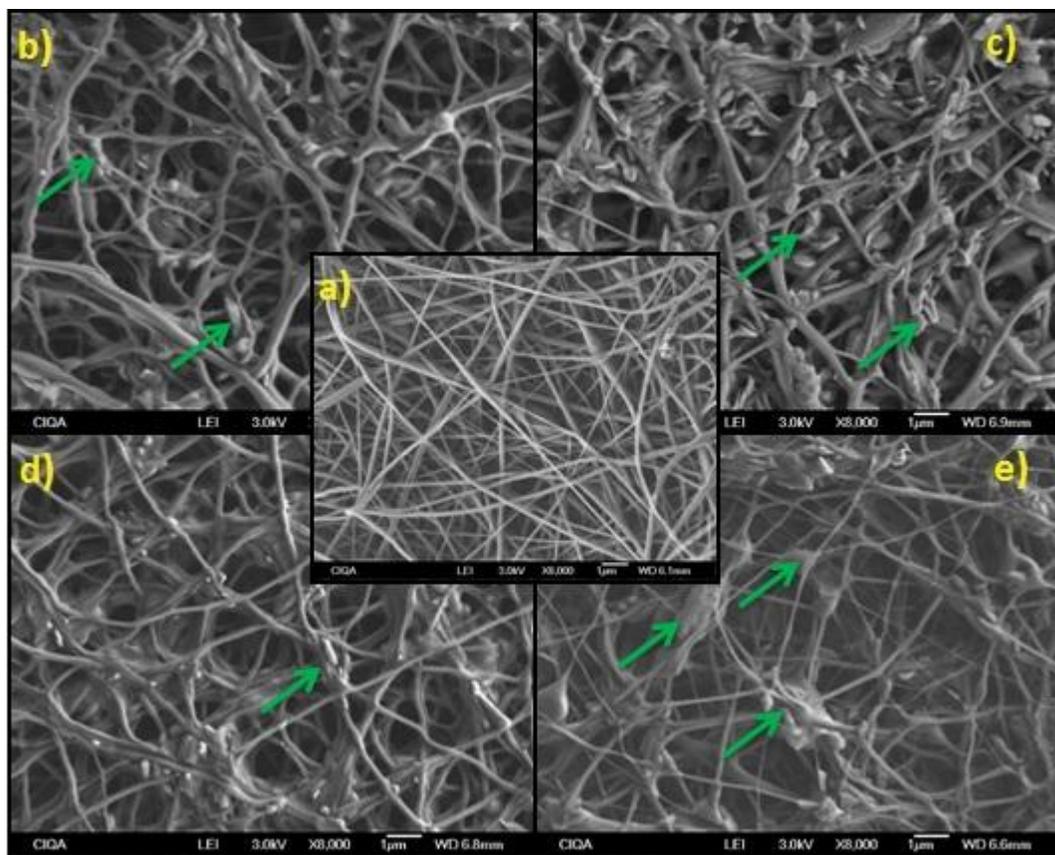


Figura 7.- Morfología de las nanofibras de PVA en las muestras donde se utilizó la solución enzimática como elemento externo en el electrohilado coaxial: a) PVA sin enzima, b) 0.5 mg/mL, c) 1.5 mg/mL, d) 3 mg/mL y e) 4 mg/mL.

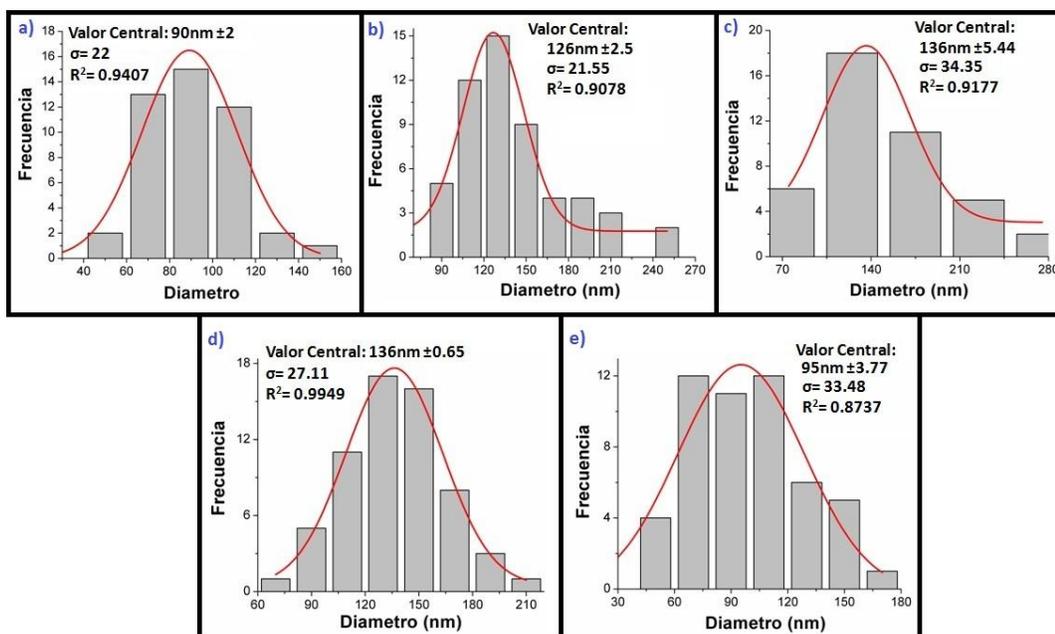


Figura 8.- Análisis de distribución de diámetros de las morfologías mostradas en la figura 7.

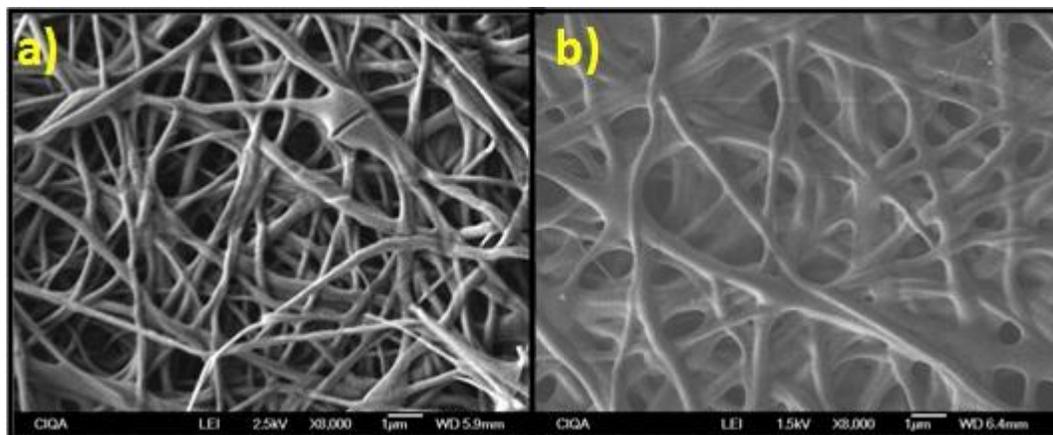


Figura 9.- a) Morfología de las nanofibras de PVA después del proceso de entrecruzamiento mediante 24 horas de sumersión en metanol, b) Nanofibras entrecruzadas de PVA después de 3 días de sumersión en agua.

4.7.3 Presencia de la enzima en las nanofibras electrohiladas

En las muestras donde la solución enzimática fue utilizada como elemento interno en el electrohilado coaxial (muestras 1-4), la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa en las nanofibras electrohiladas de PVA fue confirmada utilizando un análisis mediante espectroscopía de infrarrojo (FTIR). El espectro de infrarrojo de las nanofibras de PVA con y sin enzima se muestra en la figura 10. Hay un estiramiento del enlace C-O en 1090 cm^{-1} en las nanofibras de PVA sin enzima, de igual manera las fibras de PVA exhiben una banda de estiramiento correspondiente al enlace alcohol (O-H) alrededor de 3315 cm^{-1} . En los espectros de infrarrojo de las muestras conteniendo la enzima en el interior de las fibras de PVA (muestras 1-4), la banda de absorción en 3315 cm^{-1} fue más ancha en comparación con la muestras sin enzima. Lo anterior se ha asignado a una superposición de las bandas de estiramiento correspondientes a los enlaces O-H y N-H. De igual manera se presentó una banda de absorción en 1650 cm^{-1} inducida por el enlace O=C-NH (Amida primaria). Estas bandas de absorción son características de las proteínas, lo cual es un indicativo de la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en las nanofibras de PVA²⁰⁻²¹.

En las nanofibras de PVA donde se utilizó la solución enzimática como elemento exterior en el electrohilado coaxial (muestras 5-8), la presencia de la enzima LDH en la superficie de las fibras fue confirmada mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Esta técnica permite analizar la superficie de diversos tipos de muestras hasta una profundidad de 10nm, determinando de esta manera la energía de enlace de los electrones asociados a cada tipo de átomo en la superficie del material. En la figura 11 podemos apreciar en los espectros de XPS la energía de enlace del carbono (C 1s) antes y después del proceso de encapsulación de la enzima (figura 11 a-b). La deconvolución del pico de C 1s dio como resultado tres componentes gaussianas asociadas a las energías de enlace en 284.8, 286.2 y 288.2 electrovolts (eV), las cuales fueron asignadas a energías de enlace del carbono en los grupos funcionales CH_2 , CH-OH y $-\text{COO}$ respectivamente²¹⁻²².

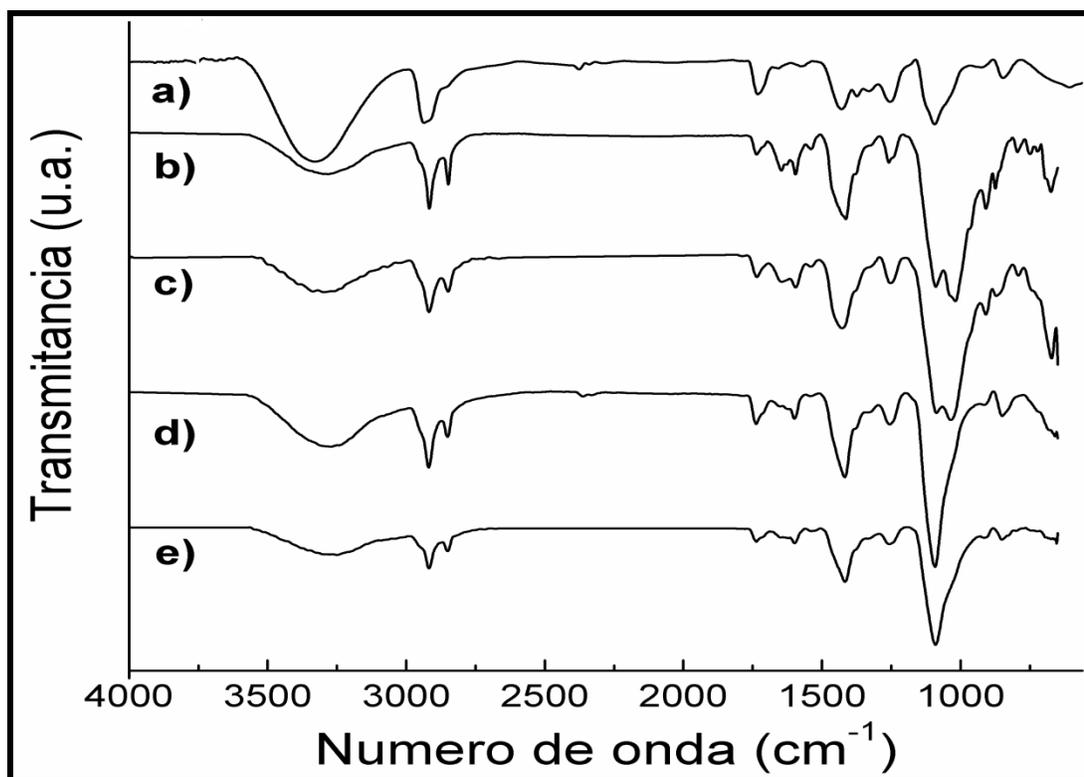


Figura 10.- Espectros de infrarrojo de las nanofibras de PVA solo (a) y con diferentes concentraciones de solución enzimática como elemento interno en el electrohilado coaxial: b) 0.5 mg/mL, c) 1.5 mg/mL, d) 3 mg/mL y d) 4 mg/mL.

Como podemos observar el pico en 288.2 eV tiene un área mayor en las nanofibras de PVA con enzima que en las nanofibras compuestas de PVA solamente, lo anterior puede ser explicado por el hecho de que las enzimas cuentan con un gran número de grupos carboxilos en su estructura proteínica. La energía de enlace en 399 eV asociada al nitrógeno (N 1s) en proteínas se observa también en las fibras con la enzima encapsulada en su superficie (figura 11c)²³⁻²⁴. Estos resultados sugieren que existe una buena cantidad de proteína cubriendo la superficie de las fibras como resultado de la proceso de encapsulación utilizando la técnica de electrohilado coaxial.

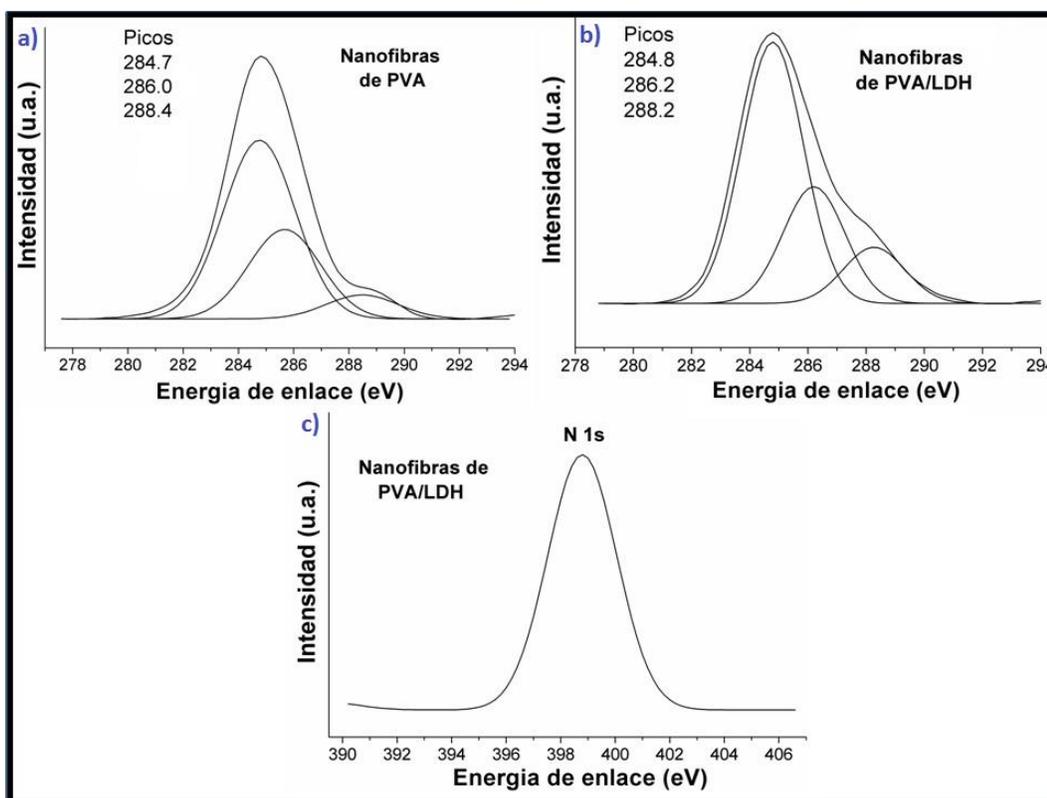


Figura 11.- Espectros de XPS del carbono (C 1s) para las nanofibras de PVA solo (a), el espectro de XPS del carbono (C 1s) (b) y del nitrógeno (N 1s) (c) para las nanofibras de PVA con la enzima LDH encapsulada en su exterior.

4.7.4 Liberación sostenida de la enzima LDH *in vitro*

La actividad enzimática fue monitoreada periódicamente mediante la absorbancia del cofactor NADH en el medio de reacción. Una vez que la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) encapsulada en las nanofibras de poli (vinil alcohol) (PVA) fue introducida al medio de reacción, se produjo un incremento en la absorbancia a 340 nm. Este incremento en la absorbancia fue usado como una señal tanto de la presencia de la enzima liberada en el medio de reacción como de la conservación de la función catalítica de la enzima liberada de las nanofibras de PVA. En las muestras 1-4 hubo una respuesta inmediata en la señal de ultravioleta (UV), cuando se introdujo la enzima encapsulada en el medio de reacción. De igual manera se puede observar una continuidad en la absorbancia por un considerable periodo de tiempo.

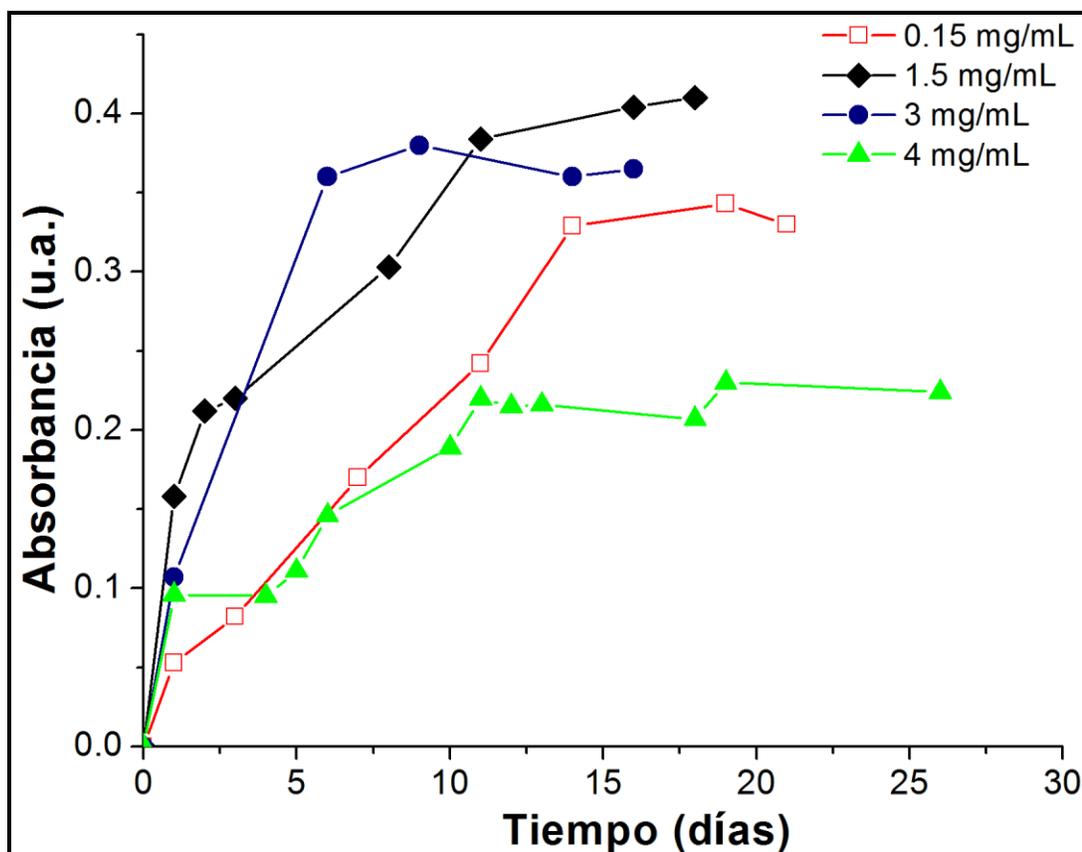


Figura 12.- Absorbancia a 340 nm en el caso de las muestras donde se utilizó la solución enzimática como solución interna en el proceso de electrohilado.

De tal manera que no se observa un decremento en la absorbancia a 340 nm hasta el vigésimo día, lo cual es un indicativo tanto de la presencia de la enzima liberada en el medio de reacción como de la efectividad de las nanofibras al conservar intacta la función catalítica de la enzima (figura 12). Para las muestras 5-8 donde se utilizó la solución enzimática como elemento externo en el electrohilado coaxial, se observó un rápido incremento en la absorbancia seguida por una disminución para la mayoría de las muestras en el décimo día, excepto para la muestra 8 cuya absorbancia disminuyó desde el cuarto día (figura 13). Lo anterior podría asociarse a que en este caso las enzimas encapsuladas en la superficie de las fibras están más expuestas al medio de reacción, lo cual facilita el proceso de desorción de la superficie de las nanofibras, dando como resultado un perfil de liberación más rápido en comparación con las muestras donde la enzima fue encapsulada en el interior de las nanofibras.

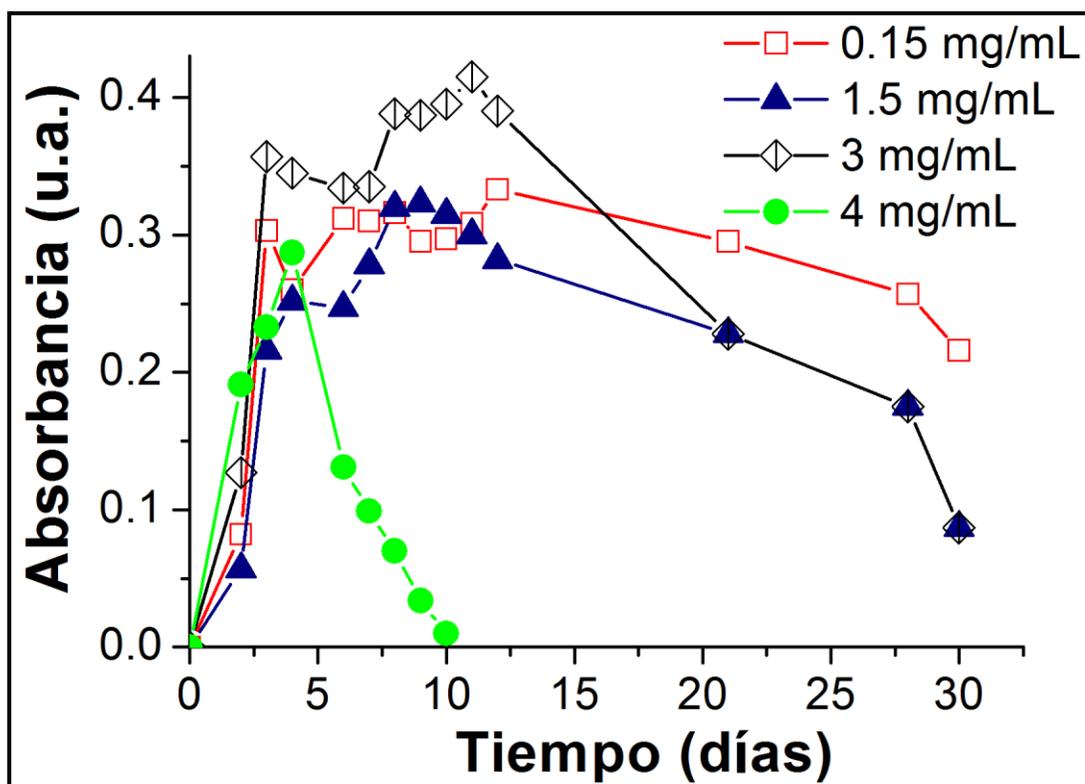


Figura 13.- Absorbancia a 340 nm en el caso de las muestras donde se utilizó la solución enzimática como solución externa en el proceso de electrohilado.

En el caso de las muestras entrecruzadas hubo un incremento sostenido en la absorbancia en UV hasta la tercera semana, demostrando la efectividad del proceso de entrecruzamiento para incrementar la resistencia al agua de las nanofibras de PVA. Sin embargo en las curvas que representan la liberación de la enzima LDH encapsulada en este tipo de nanofibras se puede notar una pendiente menos pronunciada, lo que podría asociarse a una mayor dificultad de la enzima para superar la barrera difusiva que representa la membrana de polímero entrecruzado de las nanofibras (figura 14).

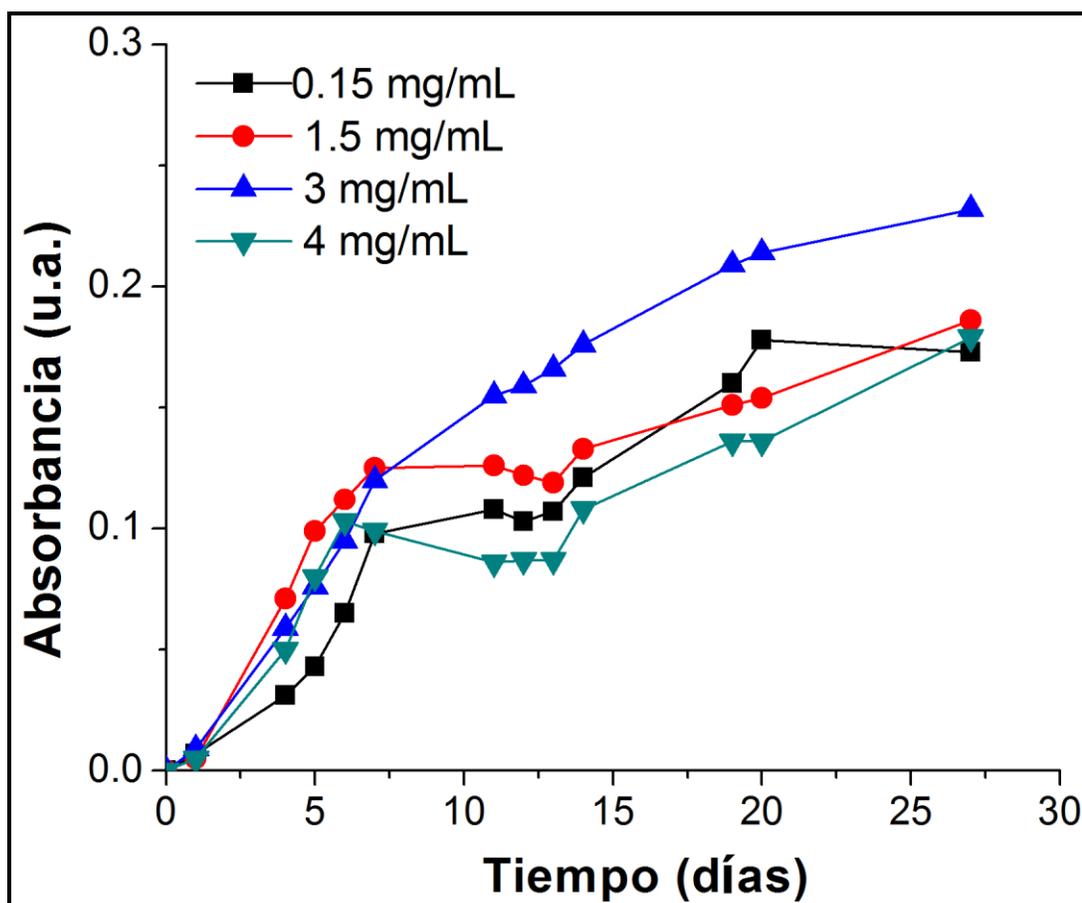


Figura 14.- Absorbancia a 340 nm en el caso de las muestras entrecruzadas mediante metanol.

4.8 Conclusiones

Se logró la encapsulación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en nanofibras de poli(vinil alcohol) mediante la técnica de electrohilado coaxial.

Se estudió la morfología de las nanofibras así como la distribución de diámetros mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), obteniéndose una morfología sin cambios súbitos de diámetros ni defectos en forma de cuenta. Además la morfología de las muestras 1 a 4 mostraron fibras entrelazadas en su morfología y en las muestras 5 a 8 se observaron aglomerados en las superficies de las nanofibras.

La presencia de la enzima en las nanofibras electrohiladas fue confirmada por medio de espectroscopia de infrarrojo (FTIR) en las muestras 1 a 4 y mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) en el caso de las muestras 5 a 8.

Finalmente se monitoreo la absorbancia a 340 nm, la cual se interpretó como una señal tanto de la presencia de la enzima en el medio como de la conservación de su función catalítica una vez liberada de las nanofibras de PVA

Se logró la liberación sostenida de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) mediante su encapsulación en nanofibras de poli (vinil alcohol) (PVA) utilizando la técnica de electrohilado coaxial.

Este sistema establece las bases para una posterior aplicación en la liberación controlada de la enzima LDH en el tratamiento clínico de la en un futuro en el tratamiento del síndrome de la deficiencia de la enzima lactato deshidrogenasa. Además este sistema puede ser visto como un modelo en la liberación de proteínas de alto peso molecular, dado que el peso de la LDH es de 140 kDa.

4.9 Trabajo a futuro

Realizar pruebas *in vivo* de biodegradación y biocompatibilidad de este sistema de liberación.

Realizar pruebas *in vivo* para comprobar la eficacia de este sistema en la liberación de la enzima LDH en individuos afectados por el síndrome de deficiencia de la enzima lactato deshidrogenasa.

Optimizar el proceso de electrohilado coaxial para poder alterar a voluntad la morfología de las nanofibras una vez encapsulada la enzima en su interior y en su superficie. Para esto sería necesario realizar un buen número de pruebas para obtener información acerca de cómo afecta cada parámetro de operación y de solución en la morfología final de las fibras. Así mismo este proceso de optimización del proceso de electrohilado coaxial tendría que llevar a una disminución del diámetro final de las nanofibras por debajo de los 100 nanómetros.

Referencias

1. Whitford D: *Proteins: Structure and Function*: Wiley, 2005.
2. Copeland R: *Enzymes A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*: Wiley, 2000.
3. C. de Duve, The significance of lysosomes in pathology and medicine, *Proceedings of the Institute of Medicine of Chicago* (1966), 26, 73-76.
4. Vellard M, The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals, *Current Opinion in Biotechnology* (2003), 14 (4), 444-450.
5. McGrath BM, Walsh G (eds): *Directory of Therapeutic Enzymes*. Enzymes-Therapeutic use Catalogs. New York: CRC 2006.
6. Aiuti A, Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID, *Current Opinion in Molecular Therapeutics* (2002), 4, 515-522.
7. Arberghina L (ed): *Protein Engineering in industrial biotechnology*. Amsterdam: CRC Press, 2005.

8. Walsh G (ed): *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2001.
9. Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WPC, Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling, *Nat Biotech* (1996), *14* (3), 315-319.
10. Kumamaru T, Suenaga H, Mitsuoka M, Watanabe T, Furukawa K, Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase, *Nat Biotech* (1998), *16* (7), 663-666.
11. Moore JC, Arnold FH, Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents, *Nat Biotech* (1996), *14* (4), 458-467.
12. Chen K, Arnold FH, Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1993), *90* (12), 5618-5622.
13. Reetz MT, Zonta A, Schimossek K, Jaeger K-E, Liebeton K, Creation of Enantioselective Biocatalysts for Organic Chemistry by In Vitro Evolution, *Angewandte Chemie International Edition in English* (1997), *36* (24), 2830-2832.
14. Maekawa M, Sudo K, Nagura K, Li SSL, Kanno T, Population screening of lactate dehydrogenase deficiencies in Fukuoka Prefecture in Japan and molecular characterization of three independent mutations in the lactate dehydrogenase-B(H) gene, *Human Genetics* (1994), *93* (1), 74-76.
15. Tsujino S, Shanske S, Brownell AKW, Haller RG, DiMauro S, Molecular genetic studies of muscle lactate dehydrogenase deficiency in white patients, *Annals of Neurology* (1994), *36* (4), 661-665.
16. Subbiah T, Bhat GS, Tock RW, Parameswaran S, Ramkumar SS, Electrospinning of Nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science* (2005), *96*, 557-569.
17. McKee MG, Hunley MT, Layman JM, Long TE, Solution Rheological Behavior and Electrospinning of Cationic Polyelectrolytes, *Macromolecules* (2005), *39* (2), 575-583.
18. Wang Y, Hsieh Y-L, Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes, *Journal of Membrane Science* (2008), *309*, 73-81.
19. Kenawy E-R, Abdel-Hay FI, El-Newehy MH, Wnek GE, Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers, *Materials Science and Engineering A* (2007), *459*, 390-396.
20. Ren G, Xu X, Liu Q, et al., Electrospun poly(vinyl alcohol)/glucose oxidase biocomposite membranes for biosensor applications, *Reactive and Functional Polymers* (2006), *66*, 1559-1564.
21. Wu L, Yuan X, Sheng J, Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning, *Journal of Membrane Science* (2005), *250*, 167-173.
22. Zhang C, Yuan X, Wu L, Sheng J, Drug-loaded ultrafine poly(vinyl alcohol) fibre mats prepared by electrospinning, *e-Polymers* (2005), *72*.
23. Zhang YZ, Wang X, Feng Y, et al., Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)-encapsulated poly(epsilon-caprolactone) nanofibers for sustained release, *Biomacromolecules* (2006), *7* (4), 1049-1057.

24. Ma Z, Masaya K, Ramakrishna S, Immobilization of Cibacron blue F3GA on electrospun polysulphone ultra-fine fiber surfaces towards developing an affinity membrane for albumin adsorption, *Journal of Membrane Science* (2006), 282, 237-244.

LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 1.- Esquema que muestra los diferentes campos de acción de las enzimas como drogas terapéuticas.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 2.- Esquema que muestra el ciclo de la ingeniería de proteínas.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 3.- Reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 4.- Esquema que muestra los diferentes pasos en el proceso de liberación de la enzima LDH.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 5.- Morfología de las nanofibras de PVA en las muestras donde se utilizó la solución enzimática como elemento interno en el electrohilado coaxial: a) PVA sin enzima, b) 0.5 mg/mL, c) 1.5 mg/mL, d) 3 mg/mL y e) 4 mg/mL.....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 6.- Análisis de diámetros de las morfologías mostradas en la figura 5.....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 7.- Morfología de las nanofibras de PVA en las muestras donde se utilizó la solución enzimática como elemento externo en el electrohilado coaxial: a) PVA sin enzima, b) 0.5 mg/mL, c) 1.5 mg/mL, d) 3 mg/mL y e) 4 mg/mL.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 8.- Análisis de diámetros de las morfologías mostradas en la figura 7.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 9.- a) Morfología de las nanofibras de PVA después del proceso de entrecruzamiento mediante 2 horas de sumersión en metanol, b) Nanofibras entrecruzadas de PVA después de 3 días de sumersión en agua.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 10.- Espectros de infrarrojo de las nanofibras de PVA solo (a) y con diferentes concentraciones de solución enzimática como elemento interno en el electrohilado coaxial: b) 0.5 mg/mL, c) 1.5 mg/mL, d) 3 mg/mL y d) 4 mg/mL.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 11.- Espectros de XPS del carbono (C 1s) para las nanofibras de PVA solo (a), el espectro de XPS del carbono (C 1s) (b) y del nitrógeno (N 1s) (c) para las nanofibras de PVA con la enzima LDH encapsulada en su exterior.....</i>	<i>108</i>
<i>Figura 12.- Absorbancia a 340 nm en el caso de las muestras donde se utilizó la solución enzimática como solución interna en el proceso de electrohilado.....</i>	<i>109</i>

Figura 13.- Absorbancia a 340 nm en el caso de las muestras donde se utilizó la solución enzimática como solución externa en el proceso de electrohilado.....110

Figura 14.- Absorbancia a 340 nm en el caso de las muestras entrecruzadas mediante metanol.....111

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.- Enfermedades relacionadas con enzimas.....87

Tabla 2.- Algunos ejemplos de enzimas terapéuticas.....90

Tabla 3.- Velocidades de alimentación y la respectiva conductividad eléctrica de cada una de las soluciones enzimáticas utilizadas para la preparación coaxial de nanofibras.....98

Papaína inmovilizada en nanofibras de PVA como biosensor de iones metálicos

5.1 Importancia de las proteasas

Las proteasas son enzimas especializadas en romper los enlaces péptidos de otras proteínas. Las proteasas más comunes de origen animal son la α -quimotripsina, tripsina, renina y la pepsina. La omnipresencia e importancia de las proteasas en la naturaleza es tal que representan aproximadamente el 2% del contenido genético en la mayoría de los organismos, además de estar envueltas en prácticamente todo proceso fisiológico. Lo anterior convierte a estas proteínas en verdaderos paradigmas de la catálisis enzimática. Las proteasas también son las enzimas más usadas en la industria y la biotecnología, abarcando aproximadamente el 60% del mercado de enzimas a nivel mundial¹⁻².

En el campo de la biotecnología se han producido numerosos esfuerzos para aprovechar la potencia catalítica de las proteasas en diversas aplicaciones tales como la producción de polímeros especiales, edulcorantes y hormonas peptídicas³⁻⁴. Una de las principales aplicaciones industriales de las proteasas es su incorporación en los detergentes para ropa, con el fin de remover las manchas consistentes de fragmentos de proteína de sangre, yema de huevo, chocolate, etc⁵. El uso de enzimas proteasas en el lavado de ropa es para hidrolizar los fragmentos de proteína en las fibras hasta convertirlos en péptidos de bajo peso molecular. Cabe aclarar que las enzimas proteasas utilizadas en detergentes requieren de una estabilidad en ambientes de trabajo con valores de pH alcalinos y bajas temperaturas. La proteasa más utilizada en detergentes es la serina proteasa subtilisina extraída del *Bacillus licheniformis* genéticamente modificado, debido a su estabilidad en condiciones alcalinas⁵.

5.1.1 Papaína y sus aplicaciones

Las llamadas tiol proteasas las podemos encontrar ampliamente en la naturaleza, y la más conocida de ellas es la papaína. La papaína es una cisteína endopeptidasa (EC 3.4.22.2) extraída de la planta *Carica papaya* y es considerada como una enzima modelo de la familia de las cisteínas proteasas. Esta enzima ha sido bien estudiada desde el punto de vista estructural y cinético. Se encuentra además entre las enzimas industriales más utilizadas. La papaína es más barata que las enzimas microbianas y muestra un amplio intervalo de especificidad y buena estabilidad térmica entre las diferentes proteasas. Su temperatura óptima para almacenamiento es 4 °C pero su actividad disminuye aproximadamente en un 20% a los 6 meses. El pH sugerido para su uso varía entre 6.0 y 7.0. La papaína cuenta con un peso molecular de 23,000 Da y un punto isoeléctrico de 9.5. Esta enzima muestra actividad proteolítica hacia proteínas, péptidos de cadena corta, enlaces amida y ésteres de aminoácidos⁵⁻⁷.

En cuanto a sus aplicaciones la papaína cuenta con un gran potencial industrial, se utiliza en las industrias peletera, cosmética, textil, detergentes, cervecera, farmacéutica y de alimentos^{2, 5, 8-9}. En el proceso de fabricación de cerveza se utiliza como agente estabilizante por frío^{7, 10}. Una de las aplicaciones más conocida de la papaína es para el ablandamiento de carnes en la industria cárnica^{7, 10-11}. En este caso la papaína es utilizada para el ablandamiento de la carne de animales de mayor edad, lo cual logra principalmente hidrolizando los enlaces péptidicos de los tejidos proteínicos conectivos del colágeno, elastina y actomiosina, los principales responsables del endurecimiento de la carne¹². Otra aplicación popular de la papaína es su uso en procedimientos estéticos o clínicos, para evitar el crecimiento de cabello en algunas partes del cuerpo como las piernas o como un medio para suavizar la piel¹³. La enzima degrada el cabello en crecimiento (α -queratina), a la vez que afloja el folículo capilar. Así mismo esta enzima es la proteasa más explotada en la industria panificadora².



Figura 1.- Algunas casos de aplicaciones de la papaína.

La papaína se ha utilizado en procesos de hidrolización de proteínas para elaborar suplementos dietéticos ricos en oligopéptidos con diversas aplicaciones clínicas^{7, 14-15}. Estos hidrolisados, preparados mediante hidrólisis enzimática han demostrado ser un valioso suplemento dietético para ancianos, atletas o para personas con intolerancia o alergia hacia algún tipo de proteínas, fibrosis cística, enfermedad de Crohn, etc¹⁶. También ha sido ampliamente utilizada en la síntesis de muchos compuestos como péptidos⁸, surfactantes basados en lipoaminoácidos¹⁷, ésteres de aminoácidos¹⁸ y derivados de carbohidratos¹⁹. La papaína ha formado parte en ciertos procesos de importancia biofarmacéutica, tales como la digestión de moléculas pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (CMH I) utilizadas en pruebas de alorreactividad con cúmulos de diferenciación alorreactivos y linfocitos T citotóxicos, todo esto con aplicación en el área de inmunología de trasplantes de órganos²⁰. Otro proceso farmacéutico en el que ha estado involucrada la papaína ha sido su

utilización en el tratamiento de glóbulos rojos utilizados en pruebas de citotoxicidad mediada por células anticuerpo-dependiente (ADCC por sus siglas en inglés) con linfocitos como células ejecutoras²¹. Como enzima terapéutica la papaína se ha usado en el tratamiento de la mastitis puerperal destructiva aguda¹⁰. De igual manera películas fabricadas a partir de mezclas pectina-papaína utilizando poli(vinil alcohol) como plastificante han sido utilizadas en el proceso de curación de heridas cutáneas en pacientes humanos²². Algunas aplicaciones de la papaína en proceso y productos de índole común se muestran en la figura 1.

5.1.2 Inmovilización y estabilización de la papaína

Como ya se ha mencionado la principal desventaja de las proteínas es la inestabilidad estructural de su estructura tridimensional una vez que son extraídas de su medio ambiente natural. La enzima papaína no es la excepción, ya que en determinadas áreas de aplicación ha sido necesaria su inmovilización para obtener un rendimiento satisfactorio. Dentro de los diversos métodos que han sido llevados a cabo para la inmovilización de papaína se encuentra su inmovilización mediante enlace covalente con algún tipo de matriz o soporte. Por ejemplo la papaína se ha inmovilizado mediante enlaces covalentes a órgano-sílices²³, sefariosa quelante¹⁰, membranas del copolímero poli-(vinil alcohol/butiral)²⁴, polímeros epóxicos²⁵, tri(4-formilo fenoxi) cianurato¹², fibras de nitrilo⁸, y superficies de poli (etileno) y vidrio funcionalizadas mediante plasma en frío²⁶.

La papaína también ha sido inmovilizada en quitosán por adsorción y posterior entrecruzamiento con glutaraldehído. Esto sirvió para mantener su integridad estructural a mayores temperaturas de trabajo y tiempos de almacenamiento prolongados¹³. De igual manera la papaína ha sido inmovilizada en carbón activado y alúmina para uso en la preparación de hidrolizados proteínicos usando suero como fuente de proteínas¹⁶. La papaína fue inmovilizada en membranas funcionalizadas de poli-(óxido de

fenileno) y polisulfona para su aplicación como membranas autolimpiables²⁷⁻²⁸. También ha sido inmovilizada en telas de algodón utilizando la técnica de sol-gel con tetraorthosilicato (TEOS) como sol⁹. La inmovilización de papaína en esferas de sílice fue inducida por nanopartículas de plata²⁹. La inmovilización de papaína en espumas mesocelulares de silicio fue lograda con la asistencia de irradiación con microondas. Por este medio se logró una mayor carga enzimática en comparación con el mismo método pero sin la asistencia de la radiación de microondas³⁰. La papaína ha sido inmovilizada también en matrices cúbicas tridimensionales mesoporosas de sílice³¹. La encapsulación de papaína fue lograda también utilizando cápsulas de alginato para su liberación controlada condiciones de pH que simulaban las condiciones adversas del estómago e intestino humano³².

Otras formas de lograr la estabilización de la papaína en condiciones adversas han sido el uso de distintos co-solventes para lograr su estabilización térmica por medio de hidratación preferencial. Otro medio para lograr un correcto funcionamiento de la papaína es su modificación química. Por ejemplo la papaína ha sido modificada químicamente con anhídridos carboxílicos derivados de distintos ácidos carboxílicos tales ácido citraconico, maleico, ftálico y succínico. Esto dio como resultado el cambio de pH óptimo de la enzima de 7 a 9 y su temperatura óptima también se incremento de 60 a 80 °C, las cuales son condiciones idóneas para su aplicación en detergentes domésticos⁵.

5.2 Contaminación de vías fluviales por metales

Las vías fluviales están siendo contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos tales como pesticidas y metales pesados provenientes de distintas ramas industriales como la industria minera. Los metales pesados a diferencia de los contaminantes orgánicos, no pueden ser eliminados vía degradación y de esta manera persisten en el ecosistema. Cuando los metales pesados entran en el medio ambiente acuático, se

acumulan y concentran hasta entrar en la cadena alimenticia. Dado que los seres humanos son los consumidores finales en esta cadena, los efectos mortales de este tipo de contaminantes se manifiestan a nivel humano. Un caso dramático fue el envenenamiento por mercurio en Minamata, Japón. Entre 1956 y 1960 la corporación Chisso descargó alrededor de 200 a 600 toneladas de desechos líquidos contaminados con mercurio en la bahía de Minamata. El sedimento en el fondo del mar registró un nivel de varios cientos de partes por millón de mercurio. El mercurio acabó eventualmente en la cadena alimenticia lo que desencadenó una masiva epidemia por envenenamiento por mercurio³³.

En Malasia la contaminación debida a metales pesados ha crecido a niveles peligrosos. Una inspección llevada a cabo por el Departamento de Medio Ambiente del gobierno de Malasia reveló que el 10.4% de las 420, 000 toneladas de los desechos en el año 2001 contenían metales pesados principalmente en forma de lodos³⁴. Un ejemplo de lo anterior es la contaminación de los ríos Pinang, Juru y Derhaka por desechos industriales del complejo industrial Prai. Los desechos de este complejo se desechan en los ríos mencionados mediante tuberías subterráneas, causando un incremento en la concentración de metales pesados en estas vías fluviales³⁵. De esta manera surge la necesidad de procedimientos rápidos y simples para detectar la presencia de metales pesados tóxicos en suelos, fluidos industriales y otros cuerpos de agua. Los métodos clásicos tales como la espectroscopia de emisión atómica, espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo, electrodo sensitivo a iones, polarografía y voltametría son ampliamente utilizados. Sin embargo los métodos mencionados anteriormente son costosos, necesitan de una sofisticada instrumentación, mano de obra especializada, un complicado tratamiento previo de las muestras y algunas veces también requieren de un prolongado tiempo de medición.

5.2.1 Biotécnicas para la detección de metales pesados en vías fluviales

Biosensores así como bioindicadores y bioensayos proveen una alternativa rápida y eficaz para el análisis de compuestos de metales pesados sin las desventajas de los métodos tradicionales. Distintas configuraciones han sido descritas incluyendo biosensores enzimáticos, biosensores celulares y biosensores genéticamente modificados para la determinación de metales pesados³⁶. Los bioindicadores microbiales son una alternativa más simple y menos cara para la detección de metales pesados en comparación con los métodos clásicos, ya que no requieren de equipo especializado. Otras alternativas son los bioensayos utilizando bacterias como elemento sensible, los cuales han sido comercializados bajo marcas tales como Lux-Fluoro³⁷, Politox³⁸ y Microtox³⁹. Sin embargo estos bioensayos no cuentan con la capacidad para diferenciar entre pesticidas y metales pesados, de tal manera que la sustancia tóxica culpable de la contaminación debe ser determinada con una combinación de técnicas tales como cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta eficacia y espectroscopía de absorción atómica.

Es por eso que ha habido una inclinación por trabajar con enzimas como una forma de desarrollar sistemas de detección más especializados. La actividad de algunas enzimas es inhibida cuando entran en contacto con metales pesados, esta característica ha sido utilizada para emplearlas en la detección de estos metales en muestras de aguas contaminadas. Algunas enzimas que han sido utilizadas para este fin son las peroxidasas, xantina oxidasa, invertasa, glucosa oxidasa y la proteasa tripsina. Sin embargo la enzima más frecuentemente utilizada para estos fines es la ureasa, la cual es relativamente barata y fácil de conseguir aunque sufre de gran interferencia. La mayoría de estas enzimas son baratas y no requieren de un equipo costoso ni de grandes requerimientos para funcionar como en el caso de los bioensayos microbiales mencionados anteriormente. De esta manera el uso

de un simple ensayo enzimático colorimétrico para detectar distintos tipos de contaminantes tiene el potencial de ser empleado ampliamente para monitorear cuerpos de agua *in situ*.

5.3 Uso de la papaína en la detección de metales pesados

La enzima papaína ha sido utilizada en diversos ensayos para la detección de metales pesados dado su conocida habilidad para formar enlaces con metales pesados especialmente mercurio (Hg^{2+}). Esta enzima cuenta además con un rango óptimo de pH más amplio que las enzimas comúnmente usadas para ensayos de detección de metales pesados tales como la ureasa⁴⁰ y la peroxidasa de rábano picante⁴¹. En un primer caso la papaína se usó como un cofactor en la detección de distintos iones metálicos utilizando ensayos de aglutinación. Estas pruebas consisten en la disminución o pérdida total de la emisión de fluorescencia del polímero poli (fenileno etileno) (PPE) por aglutinación y posterior precipitación del polímero debido a la presencia en la solución de iones metálicos (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+}). Esta sensibilidad del polímero a ciertos iones metálicos aumentó cuando el polímero fue acomplejado con la enzima papaína, particularmente la sensibilidad hacia los iones Hg^{2+} se incrementó considerablemente. El PPE acomplejado con papaína fue usado como un método colorimétrico para la detección de iones metálicos⁴². En otro caso soluciones de papaína fueron usadas para la detección de una variedad de metales pesados incluyendo plata (Ag^{2+}) y mercurio (Hg^{2+}). Cabe aclarar que estas soluciones de papaína usadas en este ensayo estuvieron libres de agentes quelatantes de metales y protectores del grupo tiol. Estas soluciones de papaína probaron ser un simple, reproducible, rápido y sensible ensayo para la detección de metales pesados en aguas contaminadas³⁴.

5.4 Hipótesis

La enzima papaína inmovilizada en nanofibras de poli(vinil alcohol) (PVA) puede funcionar como un biosensor para la detección y medición de la presencia de iones de mercurio en solución.

5.5 Objetivos Particulares

- Evaluar la efectividad de la papaína en solución en la detección de iones de metales pesados
- Optimizar el proceso de electrohilado para la encapsulación de la papaína en nanofibras de poli-(vinil alcohol) (PVA)
- Inmovilizar la papaína en las nanofibras de PVA mediante su entrecruzamiento por medio de sumersión en glutaraldehído.
- Evaluar el efecto del tiempo de entrecruzamiento y almacenamiento en la actividad enzimática de la papaína.
- Evaluar la repetibilidad para determinar la efectividad del proceso de entrecruzamiento en la conservación de la actividad enzimática de la papaína inmovilizada.
- Evaluar la efectividad de la papaína inmovilizada en la detección de iones de metales pesados en solución.

5.6 Experimentación

5.6.1 Materiales y Reactivos

Papaína (E.C. 3.4.22.2, 1.6 U/mg) de látex de papaya, cisteína $\geq 97\%$ (M_w 121.16 g/mol), N-alfa-Benzoil-L-Arginina-4-Nitroanilida $\geq 98\%$ (BAPA) (M_w 434.88 g/mol), glutaraldehído grado I 50% acuoso (M_w 100.12 g/mol), Tris buffer, ácido acético grado reactivo ACS $\geq 99.7\%$, cloruro de mercurio (I) (Hg_2Cl_2) reactivo ACS $\geq 99.5\%$, nitrato de plata ($AgNO_3$) grado reactivo ACS $\geq 99.0\%$, albúmina de suero bovino (BSA) polvo liofilizado $\geq 96\%$ (electroforesis en gel de agarosa) , todos ellos fueron adquiridos en Sigma-

Aldrich. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (M_w 372.25 g/mol), dimetil sulfóxido (M_w 78.13), cloruro cúprico ($CuCl_2$) grado reactivo ACS $\geq 99.0\%$, cloruro de zinc ($ZnCl_2$) grado reactivo ACS $\geq 97.0\%$ fueron proveídos por Productos Químicos Monterrey. Poli (vinil alcohol) (PVA) con 98% de hidrólisis y un peso molecular promedio en peso (M_w) de 126 kg/mol, poli (vinil alcohol) (PVA) con una hidrólisis de 87-89 % y un peso molecular promedio en peso (M_w) de 13-23 kg/mol fueron comprados en Aldrich.

5.6.2 Encapsulación de papaína

Las muestras de papaína inmovilizada se prepararon utilizando una solución de poli(vinil alcohol) (PVA) de 8% m/m empleando ambos tipos de polímero de alto y bajo peso molecular en una proporción 1:1. La enzima fue agregada a la solución polimérica hasta alcanzar concentraciones expresadas en porcentajes con respecto al peso del polímero presente en la solución. Una vez disuelta la enzima en la solución polimérica se procedió a realizar el electrohilado. Para todas las muestras se realizó el electrohilado utilizando un voltaje de 20 kV, una velocidad de alimentación de 0.6 mL/h y una distancia de la aguja al colector de 15 cm. Cada una de las corridas se dividió en cuatro partes de igual peso. Dos se utilizaron para las distintas pruebas de actividad enzimática y las otras dos se utilizaron para calcular la cantidad de proteína inmovilizada.

5.6.2.1 Inmovilización de la papaína

La inmovilización de papaína encapsulada en las fibras de PVA se logró mediante su entrecruzamiento mediante glutaraldehído. Este tipo de aldehído es por mucho el agente entrecruzante más utilizado para la inmovilización de enzimas⁴³⁻⁴⁶. En este caso se sumergió las fibras de PVA conteniendo la enzima en la solución de glutaraldehído por diferentes períodos de tiempo. Después se extrajeron las muestras y se retiró el exceso de glutaraldehído. Posteriormente las muestras se colocaron en una estufa a

50 °C por espacio de 20 minutos. Al sacarse de la estufa las muestras se almacenaban a temperatura ambiente por 24 horas antes de ser usadas en las pruebas de actividad enzimática.

5.6.3 Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada

Para llevar a cabo la determinación de proteínas se empleó el ensayo Bio-Rad. Se preparó una curva de calibración a partir de soluciones a diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) [2, 4, 6, 8, 10, 14 y 16 ug/mL]. También se preparó un blanco con agua destilada. Se tomaron las dos partes de cada corrida de electrohilado destinadas a este propósito y se sumergieron toda la noche en un Tris-HCl buffer a pH 7.5. Con el objetivo de que toda la cantidad presente de proteína en las nanofibras se difundiera hacia el buffer. Para realizar las mediciones se tomó un volumen de 0.8 mL del buffer y se añadieron 0.2 mL del reactivo Bio-Rad para completar un volumen total de 1mL. Se mezcló bien y se dejó reaccionar por 10 minutos para posteriormente leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm. Este mismo procedimiento se aplicó para cada una de las soluciones estándar y también para una solución de papaína de 0.1 mg/mL. Una vez determinadas las absorbancias de las muestras, se aplicaron los datos obtenidos en la curva de calibración para mostrar los resultados en unidades de masa. Finalmente se realizó una conversión de unidades para expresar los resultados en miligramos. Para calcular el porcentaje de eficiencia de carga enzimática se dividió la cantidad calculada de la proteína entre el peso total de las nanofibras y se multiplicó por 100.

5.6.4 Medición de la actividad de la enzima libre e inmovilizada.

Se evaluó la actividad amidasa de la papaína empleando como sustrato al N-alfa-Benzoil-L-Arginina-4-Nitroanilida (BAPA), el ensayo está basado en el método de Earlander *et al.* adaptado para papaína⁴⁷. En una medición típica se colocaron en un tubo de ensayo 1 mL de una solución de

papaína con una concentración de 1 mg/mL ó una muestra de la papaína inmovilizada en nanofibras de PVA. A estas muestras se les agregó 5 ml de la solución de sustrato activador de la enzima y se dejaron reaccionar por espacio de 25 minutos antes de parar la reacción con la adición de 1 ml de ácido acético al 30%. Posteriormente se leyó el cambio en la absorbancia a 410 nm correspondiente a la presencia de *p*-nitroanilina liberada como resultado de la acción amidasa de la papaína sobre el sustrato BAPA. Esta absorbancia se tomó por espacio de 15 segundos. Un mililitro de agua destilada fue usado como blanco.

La actividad enzimática obtenida de esta forma se expresó en unidades BAPA las cuales se calculan mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Unidades BAPA} = \Delta_{410\text{nm}}/\text{min} \times 1000 \times 3/8800$$

Donde 8,800 es el coeficiente de extinción molar del sustrato BAPA, 3 es el volumen en ml, $\Delta_{410\text{nm}}/\text{min}$ es la absorbancia a 410 nm por minutos de reacción y 1000 es un factor de conversión que resulta de convertir moles a micromoles y mililitros a litros. La actividad específica se obtuvo al dividir las unidades BAPA entre la cantidad de la enzima papaína presente en las nanofibras de PVA y es expresada en unidades BAPA por miligramo de proteína.

Para medir su efecto en el sensado de iones metálicos en este trabajo se utilizaron tres tipos diferentes de soluciones de sustrato: el primero solo conteniendo BAPA, el segundo consistía de BAPA y cisteína y el tercer tipo constaba de BAPA, EDTA y cisteína. Para la preparación de cada tipo diferente de solución de sustrato se disolvieron 43.5 mg de BAPA en 1 ml de DMSO, mientras que 60.58 mg de cisteína y/o 74.45 mg de EDTA se disolvían en 99 ml de Tris-HCl buffer pH 7.5. Una vez disuelto adecuadamente el sustrato, dicha solución se agregaba a la del Tris buffer

conteniendo cisteína y/o EDTA para obtener así 100 ml de la solución del sustrato activadora de la enzima. Esta solución de sustrato se preparó fresca diariamente.

5.6.5 Sensibilidad de la actividad enzimática de la papaína a la presencia de iones de metales pesados

Tanto la papaína en solución como inmovilizada en nanofibras de PVA fueron sometidas a pruebas para medir la sensibilidad de su actividad enzimática a la presencia de metales pesados. Se prepararon soluciones patrón con concentraciones de 10 ppm ó 40 ppm de mercurio, cobre, zinc y plata, las cuales se prepararon disolviendo las sales metálicas en agua desionizada ultrapura. Estas soluciones fueron posteriormente diluidas para preparar soluciones de metales pesados con diferentes concentraciones. Las sales metálicas usadas fueron Hg_2Cl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 y AgNO_3 . Para observar el efecto en la actividad enzimática de la papaína libre e inmovilizada, 0.5 ml de las soluciones de los distintos metales pesados fueron añadidos al tubo de ensayo antes de añadir el sustrato. Una vez añadido el sustrato la actividad enzimática fue medida normalmente utilizando un blanco conteniendo también la misma concentración de metales pesados como línea base. Para el caso del mercurio se utilizaron concentraciones de 40, 30, 20, 15, 10, 5 y 2.5 ppm y para los otros tres metales pesados se utilizaron concentraciones de 10, 5 y 2.5 ppm solamente.

5.6.6 Equipos Utilizados

Microscopía: Un microscopio electrónico de barrido (SEM) fue usado para estudiar la morfología de las fibras una vez secas. Para realizar estas pruebas se usó un equipo de emisión de campo JSM-7401F.

Electrohilado: El equipo de electrohilado usado para este trabajo consistió en una jeringa a cuya aguja de metal se le redondeo la punta. Una

fuentes de alto voltaje Spellman CZE1000R de corriente directa y un colector de aluminio aterrizado. Una bomba de infusión Cole Parmer.

Espectroscopía: Las pruebas de ultravioleta-visible fueron llevadas a cabo utilizando un equipo Shimadzu 2401. Para los espectros de infrarrojo se utilizó un espectrofotómetro Nexus 470.

5.7 Resultados y discusión

5.7.1 Morfología

El efecto de la concentración de la enzima papaína sobre la morfología final de las nanofibras electrohiladas se puede apreciar en la figura 2. En las nanofibras sin ninguna carga enzimática se presenta una morfología libre de defectos y con un diámetro promedio de $81.38\text{nm} \pm 1.88$ (figura 2a, 3a). Se presentó un incremento en el diámetro de las nanofibras conforme se aumentó la cantidad de enzima encapsulada en las nanofibras electrohiladas (figura 2(b-e), 3(b-e)). Así mismo conforme se incrementó la carga enzimática en las nanofibras, se presentó un aumento gradual en los entrelazamientos de las nanofibras (flechas verdes). Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores de este trabajo de tesis, estos entrelazamientos y el aumento en el diámetro de las nanofibras es la morfología esperada en el electrohilado de soluciones concentradas de poli (electrolitos)⁴⁸. Dado que las proteínas son poli-(electrolitos) naturales, es de esperarse que se presente este tipo de morfología en las nanofibras electrohiladas a partir de soluciones concentradas de proteína (enzima).

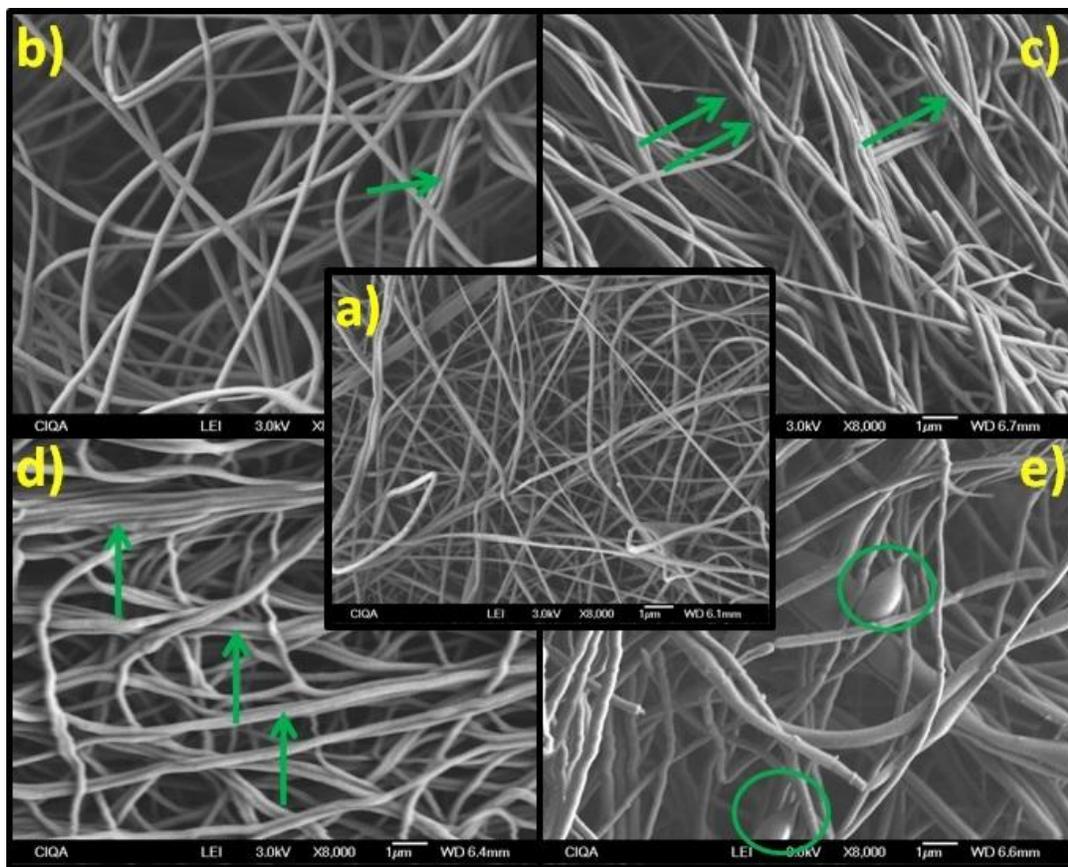


Figura 2.- Impacto de la concentración de la enzima en la morfología de las nanofibras a)0%, b) 5%, c) 10%, d) 16% y e) 33%.

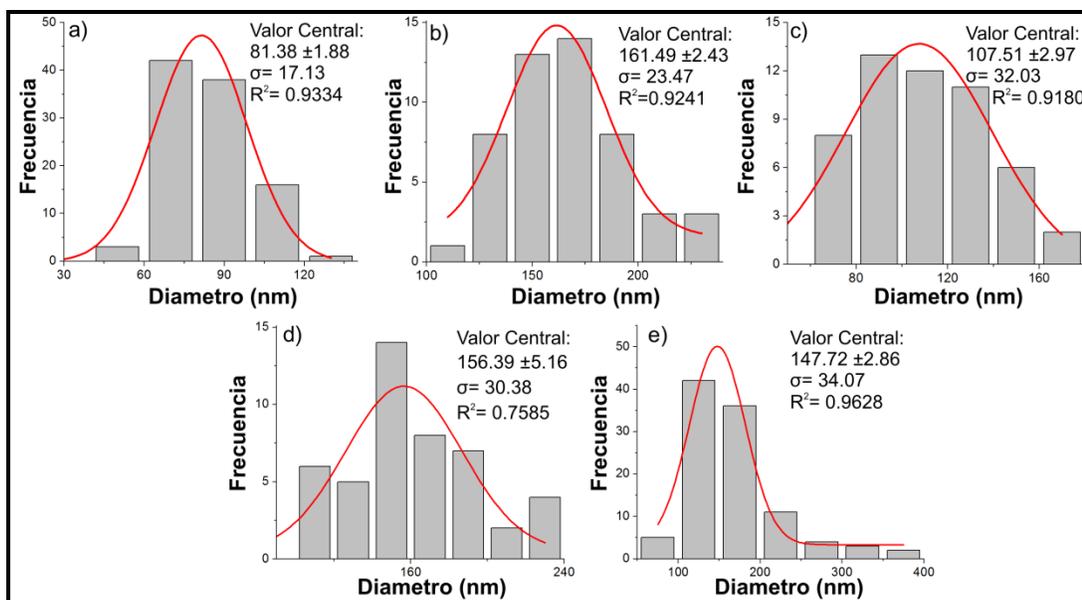


Figura 3.- Distribución de diámetros de las morfologías mostradas en la figura 2.

De igual manera en las nanofibras con la mayor concentración de enzima (figura 2e), se puede notar la aparición de defectos en la morfología de las nanofibras tales como defectos en forma de cuenta y cambios en el diámetro de las fibras (círculos verdes). En la figura 4 se observa el efecto del tiempo de entrecruzamiento en la morfología final de las nanofibras electrohiladas de PVA. Tal como se puede apreciar si bien el tratamiento de entrecruzamiento con glutaraldehído es una manera efectiva de inmovilizar a las moléculas de enzima en las nanofibras de PVA, por otro lado un exceso de tiempo de entrecruzamiento puede llevar a la pérdida total de la estructura fibrosa de las nanofibras.

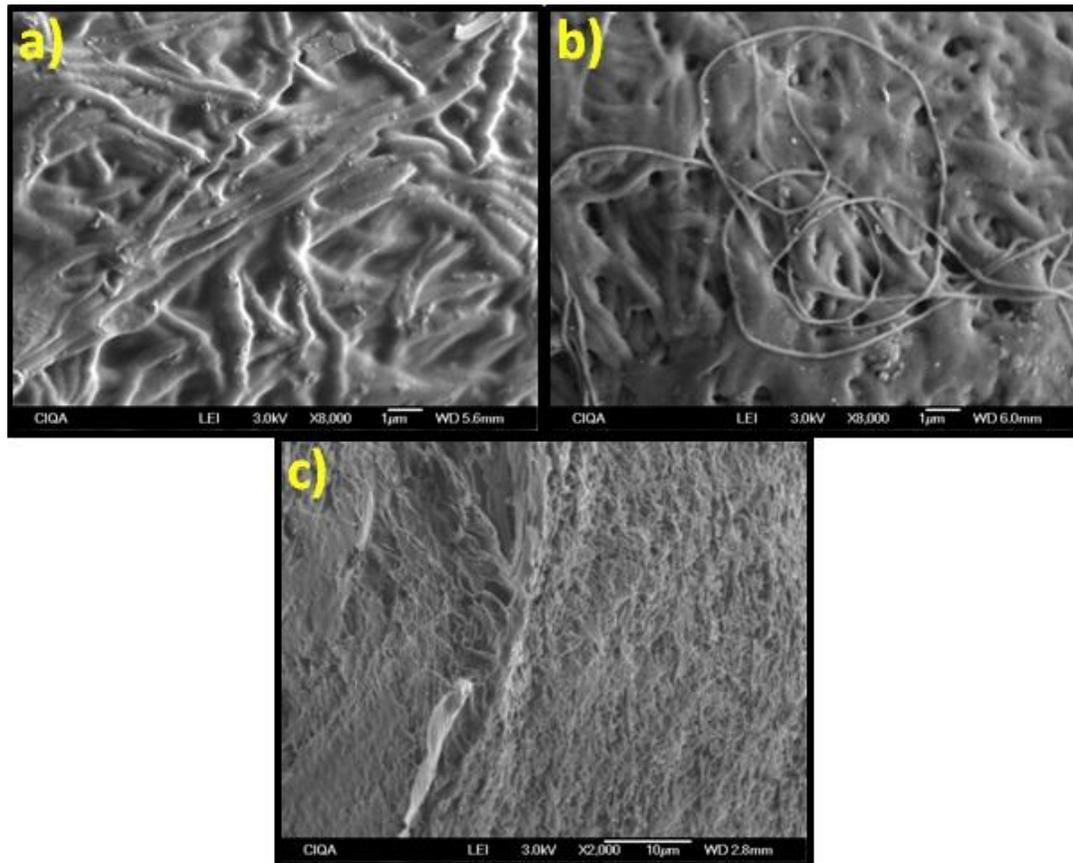


Figura 4.- Efecto del tiempo de entrecruzamiento en la morfología de las nanofibras de PVA: a) 15 minutos, b) 30 minutos, c) 60 minutos.

5.7.2 Presencia de la papaína en las nanofibras de PVA

La presencia de la enzima papaína en las nanofibras electrohiladas de poli (vinil alcohol) (PVA) fue comprobada mediante un análisis de espectroscopía de infrarrojo (FTIR). El espectro de infrarrojo de las nanofibras de PVA sin enzima y de las nanofibras conteniendo papaína encapsulada se muestran en la figura 5. Las fibras de PVA sin carga enzimática exhiben una banda de estiramiento alrededor de 3315 cm^{-1} que corresponde al grupo OH presente en este polímero (figura 5a). En los espectros de infrarrojo de las muestras conteniendo la papaína encapsulada en las fibras de PVA (figura 5b), la banda de absorción en 3315 cm^{-1} sufre un ensachamiento en comparación con los espectros de las muestras sin enzima.

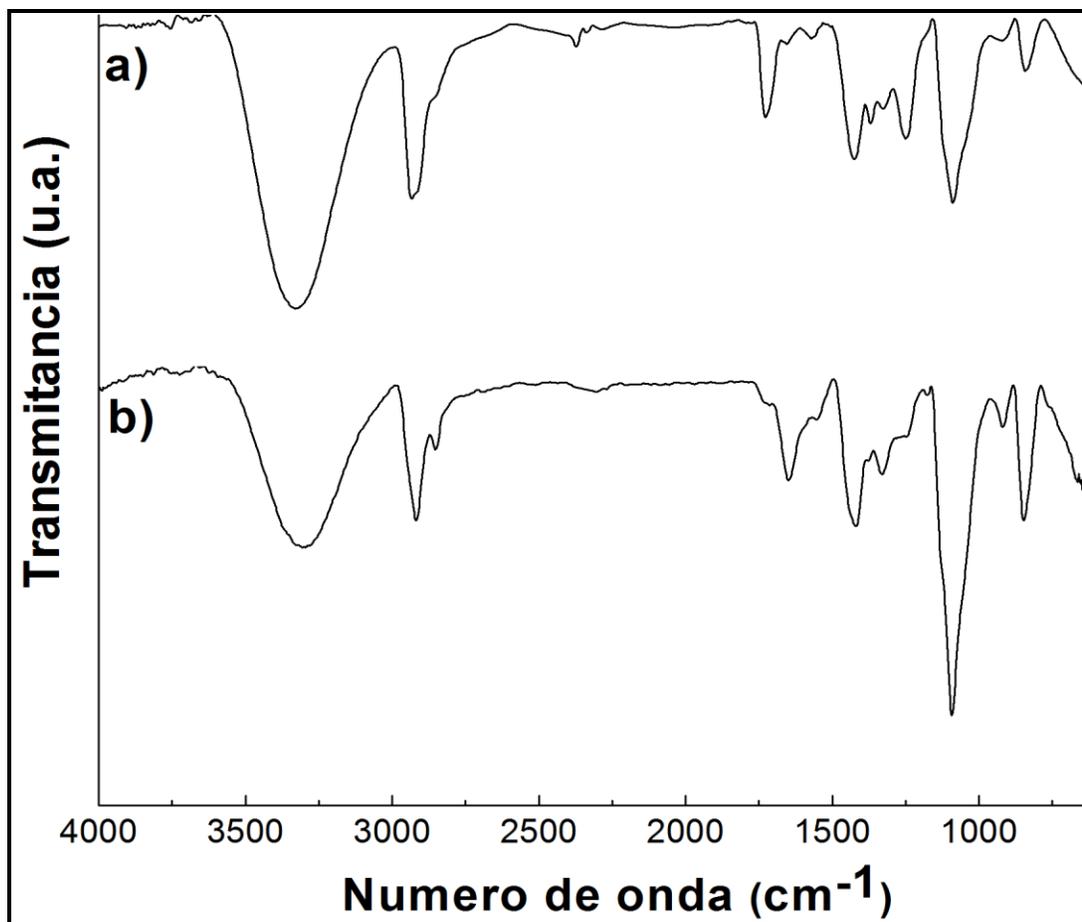


Figura 5.- Espectros de infrarrojo correspondientes a nanofibras de PVA sin carga enzimática (a), y a una muestra de papaína encapsulada en nanofibras de PVA (b).

Lo anterior se ha atribuye a una superposición de las bandas de estiramiento de los enlaces en los grupos O-H y N-H. De igual manera se presentó una banda de absorción en 1650 cm^{-1} inducida por el enlace O=C-NH (Amida I). Dado que estas bandas de absorción son características de las proteínas se puede llegar a la conclusión de que la papaína esta encapsulada en las nanofibras de PVA^{43, 45, 49}.

5.7.3 Efecto del tiempo de entrecruzamiento en la actividad enzimática

En la figura 6, se muestra el efecto que tuvo el proceso de entrecruzamiento en la actividad enzimática de las muestras de papaína inmovilizada. Se escogió como agente entrecruzante el glutaraldehído por su alta reactividad hacia grupos amina e hidroxilo, en un intento por volver insolubles en ambientes acuosos a las muestras de papaína inmovilizada. Al analizar la figura 6 se puede resaltar que el incremento en el tiempo de entrecruzamiento llevó a un aumento en la actividad enzimática de las muestras inmovilizadas hasta llegar a un máximo en los 30 minutos de entrecruzamiento. Sin embargo después de este máximo se presenta un decremento en la actividad enzimática cuando el tiempo de entrecruzamiento continúa incrementándose. Este decremento puede ser explicado porque la fijación de las moléculas de enzima a las nanofibras de PVA hace más difícil el acceso e interacción de las moléculas de substrato con el centro activo de la enzima. Cabe señalar que este decremento en la actividad enzimática se vuelve más lento conforme se sigue incrementando el tiempo de entrecruzamiento. Lo anterior se debe a que los grupos -OH de las moléculas de PVA reaccionan más fácilmente con el glutaraldehído⁴³⁻⁴⁴.

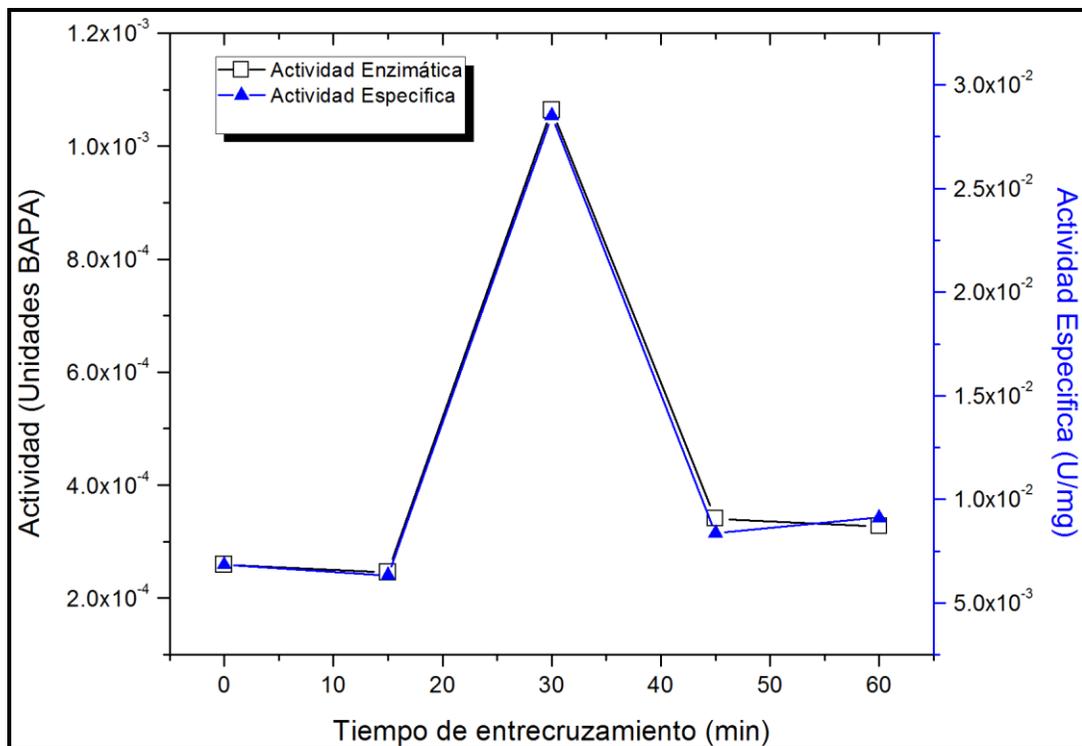


Figura 6.- Efecto del proceso de entrecruzamiento en la actividad enzimática de las muestras de papaína inmovilizada.

De tal manera que una vez alcanzado un cierto tiempo de entrecruzamiento, el proceso de entrecruzamiento ocurre solamente entre las moléculas de PVA y tiene un menor efecto en la enzima. El proceso de entrecruzamiento también puede influenciar negativamente la actividad enzimática de las muestras de papaína inmovilizada al afectar la morfología de las mismas. Como se puede apreciar en la figura 4 el incremento en el tiempo de entrecruzamiento afectó negativamente la morfología de las nanofibras, al grado de perder por completo la estructura fibrosa en tiempos elevados de entrecruzamiento. Lo anterior resultó en una disminución del área superficial de las nanofibras, lo cual pudo haber incrementado la dificultad de las moléculas de sustrato para alcanzar las moléculas de enzima inmovilizadas⁴³⁻⁴⁴.

5.7.4 Actividad enzimática de la papaína inmovilizada

En la figura 7 se muestra el efecto del aumento en el porcentaje de papaína presente en la solución electrohilada sobre la eficiencia en la carga enzimática y la actividad específica de la papaína inmovilizada. En esta figura se puede apreciar como conforme se fue aumentando el porcentaje de papaína la carga enzimática fue aumentando de una manera sostenida. No pasa lo mismo con la actividad específica la cual llega a un máximo en un porcentaje de 13% de papaína, para después descender conforme el porcentaje de papaína y la carga enzimática se siguen incrementando. Algunos factores también pueden haber influido en esta baja en la actividad de las enzimas inmovilizadas. Por ejemplo se ha reportado que las enzimas en estado sólido o ligadas a soportes sólidos tienen un acceso mucho más limitado a las moléculas de sustrato que las moléculas libres.

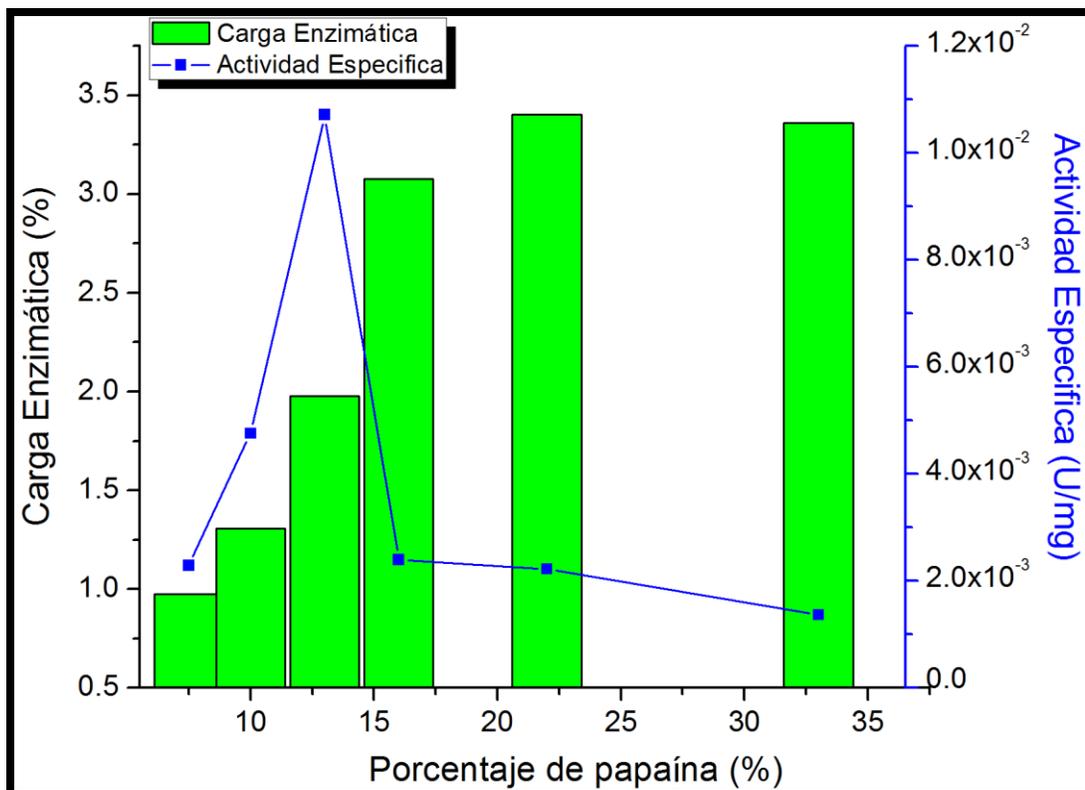


Figura 7.- Efecto del porcentaje de papaína presente en la solución electrohilada sobre la eficiencia en la carga enzimática y la actividad específica de la papaína inmovilizada.

Además se ha reportado que en los casos de encapsulación e inmovilización de enzimas no todas las moléculas de proteína van a dar a la superficie de las nanofibras, que es donde estarían más expuestas a reaccionar con las moléculas de sustrato⁴³. Por lo tanto es de esperarse que en nuestro caso el descenso en la actividad pudo deberse a que hubo un exceso en la cantidad de papaína encapsulada durante el proceso de electrohilado. Lo anterior aunado al proceso de entrecruzamiento por glutaraldehído pudo haber provocado una interferencia y bloqueo de los diferentes centros activos de las enzimas inmovilizadas en la competencia por alcanzar las moléculas de sustrato que lograron difundirse a través de la estructura porosa de las nanofibras^{43-44, 46}. De esta manera aunque el porcentaje de papaína se continuó incrementando se produjo un descenso en la relación actividad específica por miligramo de nanofibra electrohilada. Sin embargo la máxima actividad alcanzada es alrededor del 88% de la actividad de la papaína libre (1.22×10^{-2} U/mg), lo que supera por un buen margen otras formas de inmovilización y estabilización de la papaína^{13, 30-31, 50-51}. Esta alta actividad con respecto a la actividad de la enzima libre sugiere que la conformación tridimensional de la papaína no fue afectada por las altas interacciones de las fuerzas electroestáticas involucradas en el proceso de electrohilado, como tampoco por las interacciones polares intermoleculares con el poli (vinil alcohol) (PVA)⁴³⁻⁴⁴.

5.7.5 Reusabilidad de la papaína inmovilizada

La estabilidad durante el reciclado de la papaína inmovilizada fue examinada por medio de la medición de su actividad enzimática durante diversos ciclos de ensayos enzimáticos repetidos. Como se puede observar en la figura 8 la actividad relativa de la papaína inmovilizada comparada con su valor inicial en porcentaje va disminuyendo a lo largo de los repetidos ensayos enzimáticos. La enzima inmovilizada retuvo alrededor del 12% de su actividad inicial después de 6 ciclos de reutilización. Esta característica de

reusabilidad es ventajosa para el uso continuo de esta enzima inmovilizada para aplicaciones industriales. Por otra parte la pérdida de actividad probablemente tenga dos posibles razones. En primera instancia, quizás existían en un principio algunas moléculas de enzima que no fueron unidas químicamente a las nanofibras de PVA, sino que quedaron encapsuladas solamente a través de enlaces físicos, por lo cual resultaron en pérdidas durante los diversos ciclos de ensayos para medir su actividad enzimática⁴³. Una posible segunda razón es que la medición repetida de la actividad enzimática durante distintos ciclos de reutilización pudiera haber causado una pérdida gradual de la morfología en las nanofibras. Lo anterior provocaría una drástica disminución del área superficial de las nanofibras, disminuyendo de esta manera la efectividad de la función enzimática de la papaína inmovilizada⁴³.

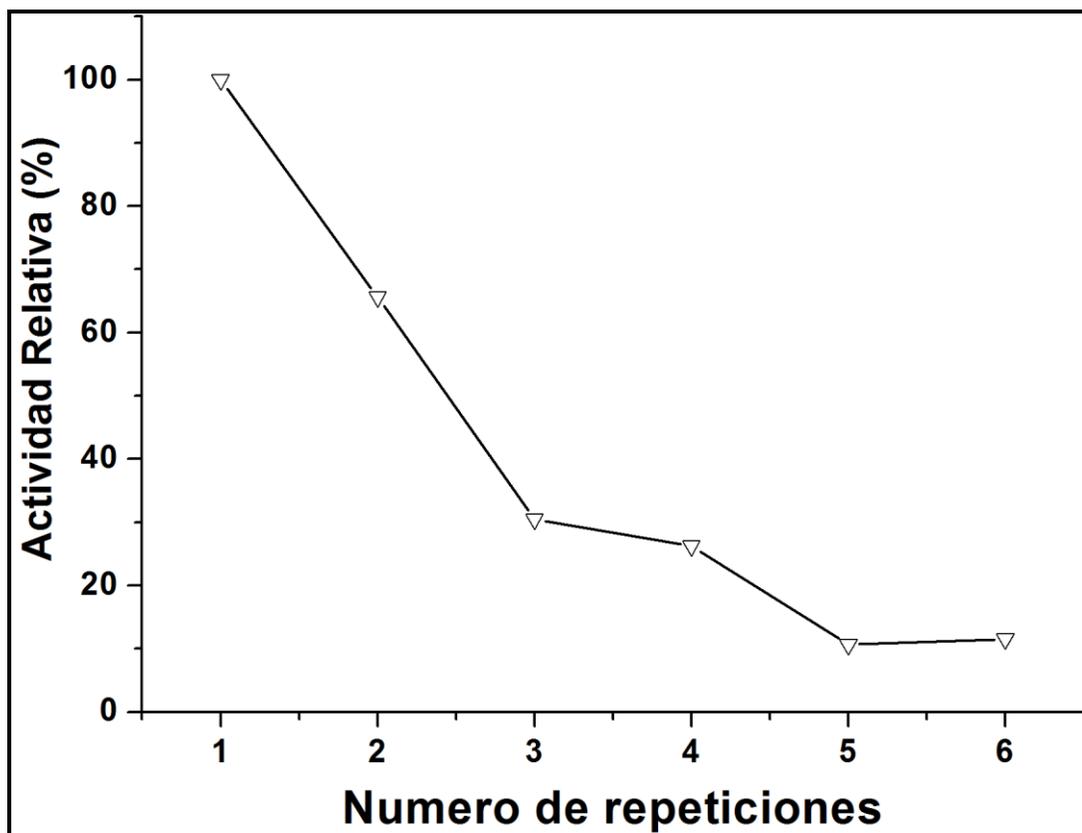


Figura 8.- Actividad Relativa después de varios ciclos de ensayos repetidos.

5.7.6 Efecto del tiempo de almacenamiento en la actividad enzimática

En la figura 9 se muestra el efecto que tuvo el tiempo de almacenamiento en la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en nanofibras de PVA. El desempeño de la papaína bajo diferentes tiempos de almacenamiento fue mejorado con el proceso de inmovilización. El desempeño de la papaína inmovilizada fue mejor en comparación con la enzima en solución y retuvo alrededor del 40% de su actividad inicial a los 14 días de almacenamiento. Al crear enlaces intermoleculares entre las proteínas y también con el PVA, el proceso de entrecruzamiento con glutaraldehído claramente influyó en el mejor desempeño de la papaína inmovilizada durante el tiempo de almacenamiento.

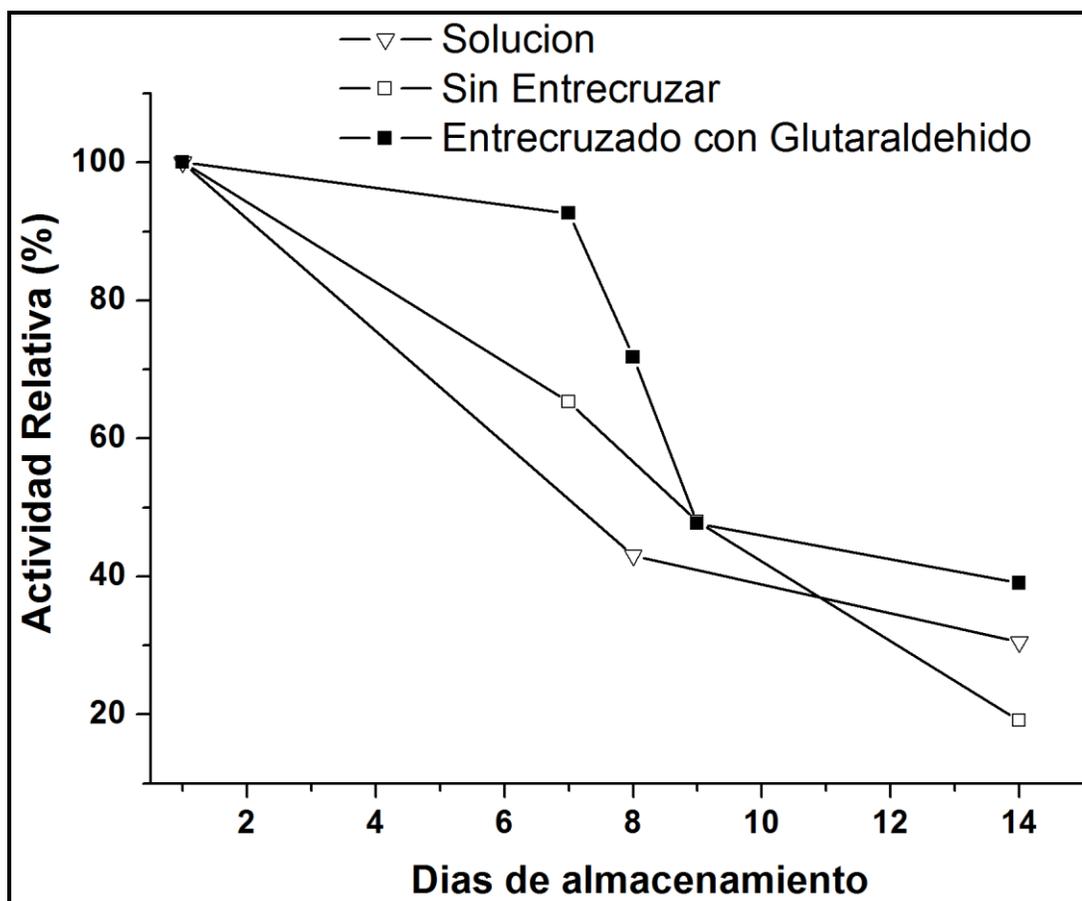


Figura 9.- Efecto del tiempo de almacenamiento en la actividad enzimática de la papaína inmovilizada.

5.7.7 Inhibición de la actividad enzimática de la papaína como biosensor para iones metálicos

5.7.7.1 Efecto del tipo de solución de activación en la inhibición de la papaína en solución.

En la figura 10 se muestra el efecto del tipo de solución de activación sobre la actividad de la papaína en solución. Para estas pruebas se utilizó una sola concentración de 10 ppm. Como se puede observar en presencia de únicamente BAPA, la papaína mostró actividad nula (solución 1). Lo anterior se explica por el hecho de que la papaína únicamente se vuelve activa en la presencia de un compuesto tiol como la cisteína⁵²⁻⁵³. Con la solución de activación 2 se observó un incremento en la actividad de la papaína, no obstante la presencia de los iones de metales pesados. Lo anterior debido a la activación de la papaína por la presencia de la cisteína.

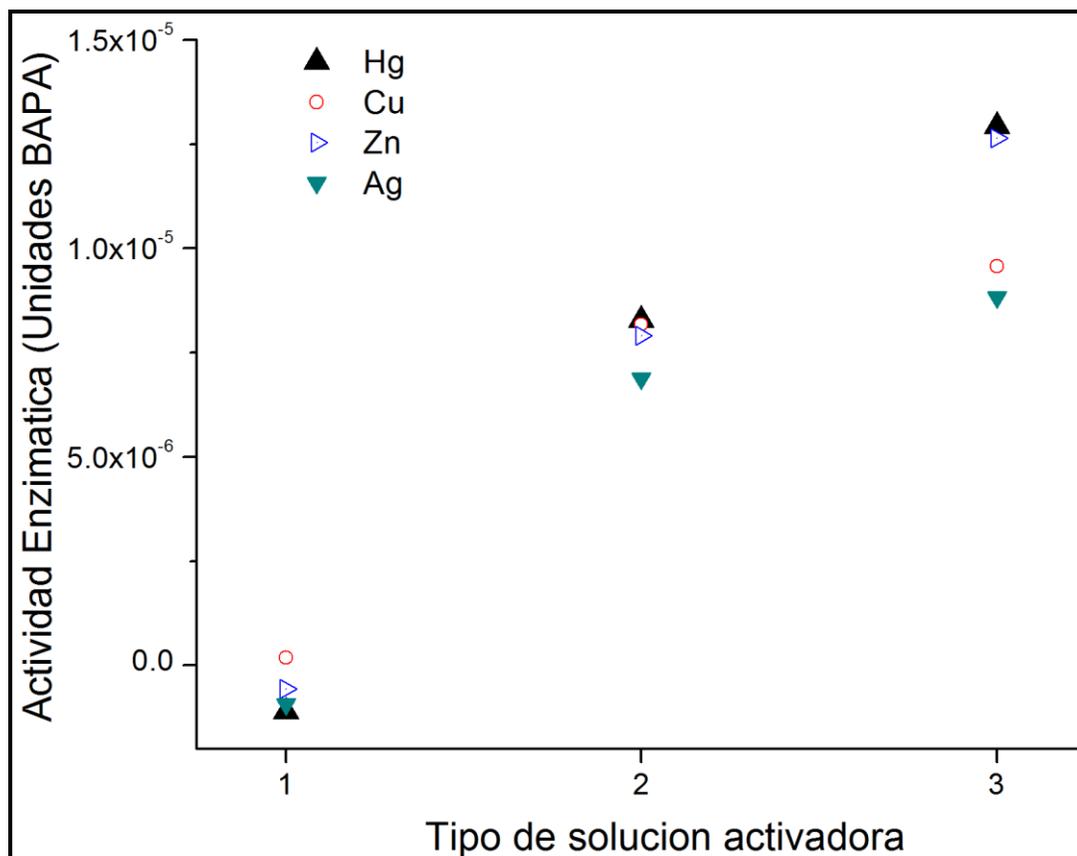


Figura 10.- Efecto del tipo de solución de activación en la actividad enzimática de la papaína en solución. 1) BAPA, 2) BAPA y cisteína, 3) BAPA, cisteína y EDTA.

Cuando se utilizó la solución de activación 3 se observó otro incremento en la actividad de la papaína como resultado de la adición de EDTA. Este compuesto actúa como quelatante de metales, por lo que la actividad enzimática de la papaína se ve libre de interferencias. Sin embargo también se puede notar que tanto el cobre como la plata siguieron teniendo una fuerte inhibición de la papaína a pesar de la presencia del EDTA. Debido a que el propósito de este estudio es utilizar la papaína en el sensado de iones metálicos, se optó por utilizar el sustrato conteniendo solamente BAPA y cisteína (Solución 2).

5.7.7.2 Sensibilidad de la papaína al cambio en concentración de los iones metálicos.

La sensibilidad de la papaína al cambio en la concentración de las soluciones de los distintos iones metálicos en el medio se muestra en la figura 11. Esta sensibilidad queda expresada en el porcentaje de actividad con relación a la actividad enzimática de la papaína libre sin la presencia de iones metálicos (1.22×10^{-2} U/mg). En la figura se puede apreciar que la papaína mostró un drástico descenso en su actividad debido a la presencia de los distintos iones metálicos en el medio. Los metales que provocaron una mayor inhibición en la actividad enzimática de la papaína fueron el cobre (Cu) y la plata (Ag). Pero solamente en el caso del mercurio (Hg) y el zinc (Zn) este descenso en la actividad enzimática fue estable y sostenido. El mercurio (Hg) fue el metal hacia que la papaína mostró una mayor sensibilidad, con un descenso de alrededor del 25% de la actividad cuando se pasó de una concentración de 2.5 ppm a una de 10 ppm. Lo anterior demuestra la extrema sensibilidad de la papaína hacia las distintas concentraciones de este metal pesado en el medio de reacción. Para el caso del cobre (Cu) y la plata (Ag) la sensibilidad de la papaína hacia la presencia de estos metales en el medio de reacción no fue congruente, es decir no hubo ni un descenso ni un aumento sostenido de la actividad enzimática ante

el aumento de concentración de estos metales en la solución. Por las razones anteriores se decidió utilizar el mercurio (Hg) en las pruebas posteriores de la papaína en solución e inmovilizada como biosensor de metales pesados.

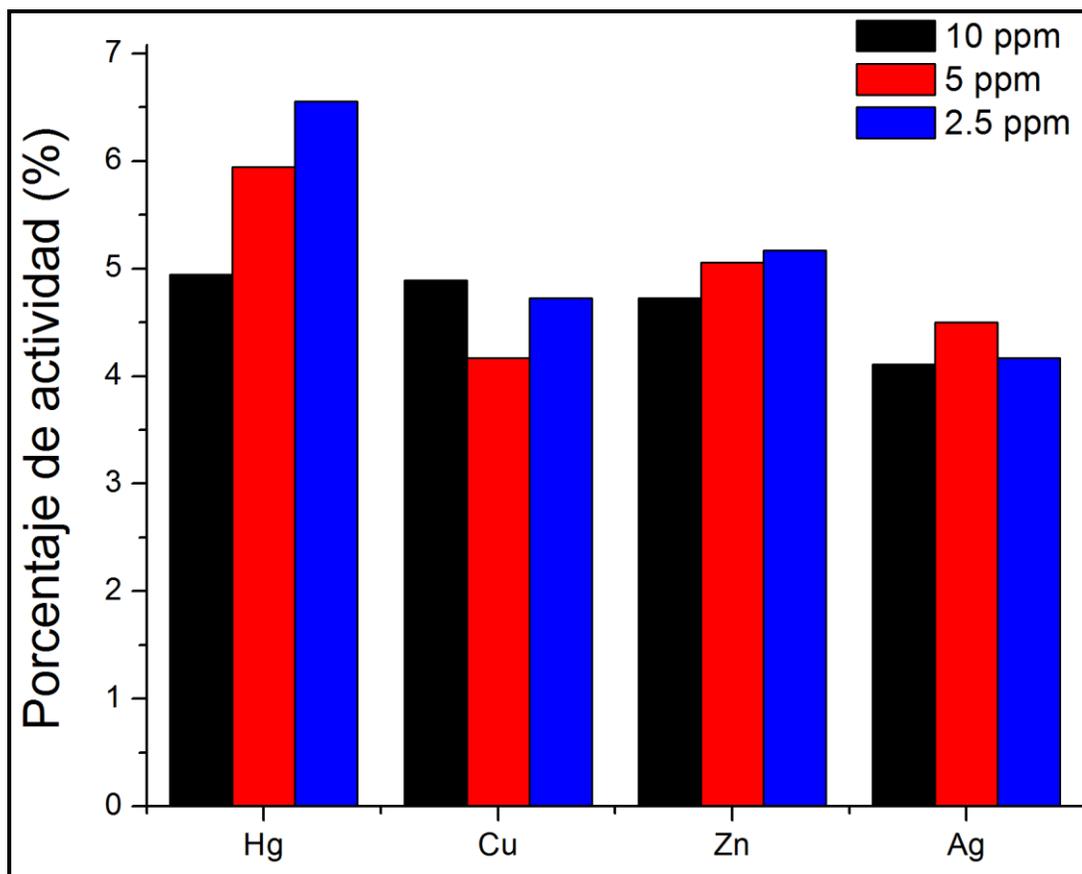


Figura 11.- Sensibilidad de la actividad enzimática de la papaína hacia el cambio de concentración de los diversos metales. Cobre (Cu), mercurio (Hg), zinc (Zn) y plata (Ag).

5.7.7.3 Sensibilidad de la papaína en solución a la presencia de iones de mercurio (Hg^{2+})

La sensibilidad de la papaína en solución hacia la presencia de iones de mercurio en el medio de reacción se muestra en la figura 12. Se puede notar como la actividad enzimática de la papaína en solución disminuye conforme se incrementa la concentración de iones de este metal en el medio

de reacción. De la figura también se observa que este decremento en la actividad enzimática no sigue un comportamiento lineal. Es por eso que se buscó un modelo al que se pudieran ajustar estos datos. En un principio se pensó que el modelo que mejor definía este comportamiento era un modelo exponencial. Aún así cuando se introdujeron los datos en un modelo exponencial (línea roja), el grado de ajuste no fue el esperado ($R^2=0.5209$). Lo anterior puede ser explicado debido a la dispersión que muestran los datos de actividad enzimática por encima de la concentración de 15 ppm. Por otra parte cuando se tomaron solamente los datos de actividad enzimática en el rango de 0 ppm a 15 ppm y se realizó un ajuste lineal (línea azul), su grado de ajuste fue mucho más aceptable ($R^2= 0.75$). La linealidad es fundamental para aplicaciones prácticas en campo.

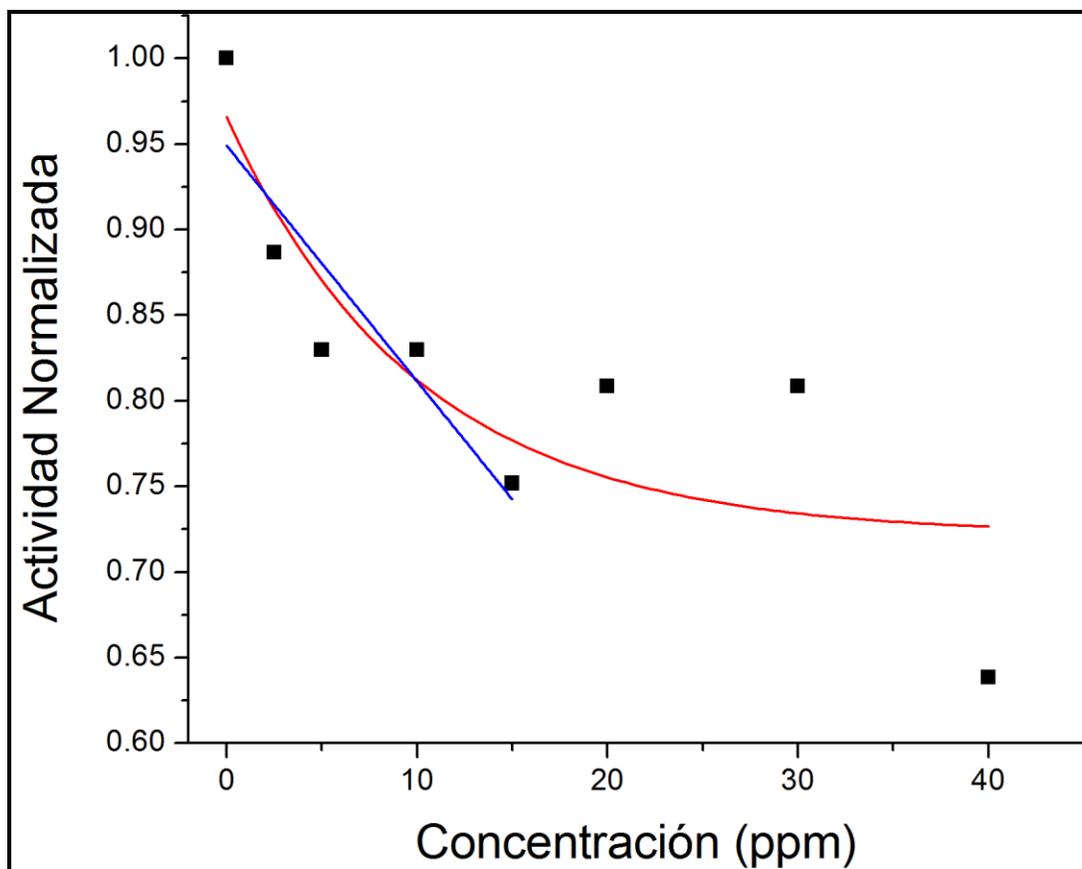


Figura 12.- Sensibilidad de la papaína en solución hacia la presencia de iones de mercurio en el medio de reacción.

Es por esta razón que por lo menos en el rango de 0 ppm a 15 ppm la enzima papaína muestra un gran potencial en el sensado de iones de mercurio (Hg^{2+}).

5.7.7.4 Sensibilidad de la papaína inmovilizada a la presencia de iones de mercurio (Hg^{2+})

En la figura 13 se presenta la sensibilidad que presentó la papaína inmovilizada hacia la presencia de iones de mercurio en el medio de reacción. Como se puede observar hubo un descenso en la actividad enzimática conforme se fue incrementando la concentración de iones de mercurio presentes en el medio de reacción. Este descenso en general se puede describir como una curva exponencial (línea azul). Sin embargo si se observan los datos de absorbancia correspondientes a las concentraciones más bajas de iones de mercurio, éstas no confirman plenamente esta tendencia exponencial. Ahora bien, cuando se tomaron solamente los datos de actividad en el rango de 0.2 ppm a 3 ppm y se realizó un ajuste lineal el grado de ajuste fue muy alto (0.9687). Esto quiere decir que en este rango de 0.2 ppm a 3 ppm la papaína inmovilizada muestra una sensibilidad lineal hacia la presencia de los iones de mercurio presentes en el medio. Este rango es mucho más bajo que el obtenido para la papaína en solución. Esto quiere decir que el proceso de inmovilización no afectó la sensibilidad de la enzima hacia los iones de este metal. Cabe destacar que este rango de sensibilidad de la papaína inmovilizada es comparable con lo reportado para sistemas de detección de iones de mercurio involucrando papaína inmovilizada^{34, 42}.

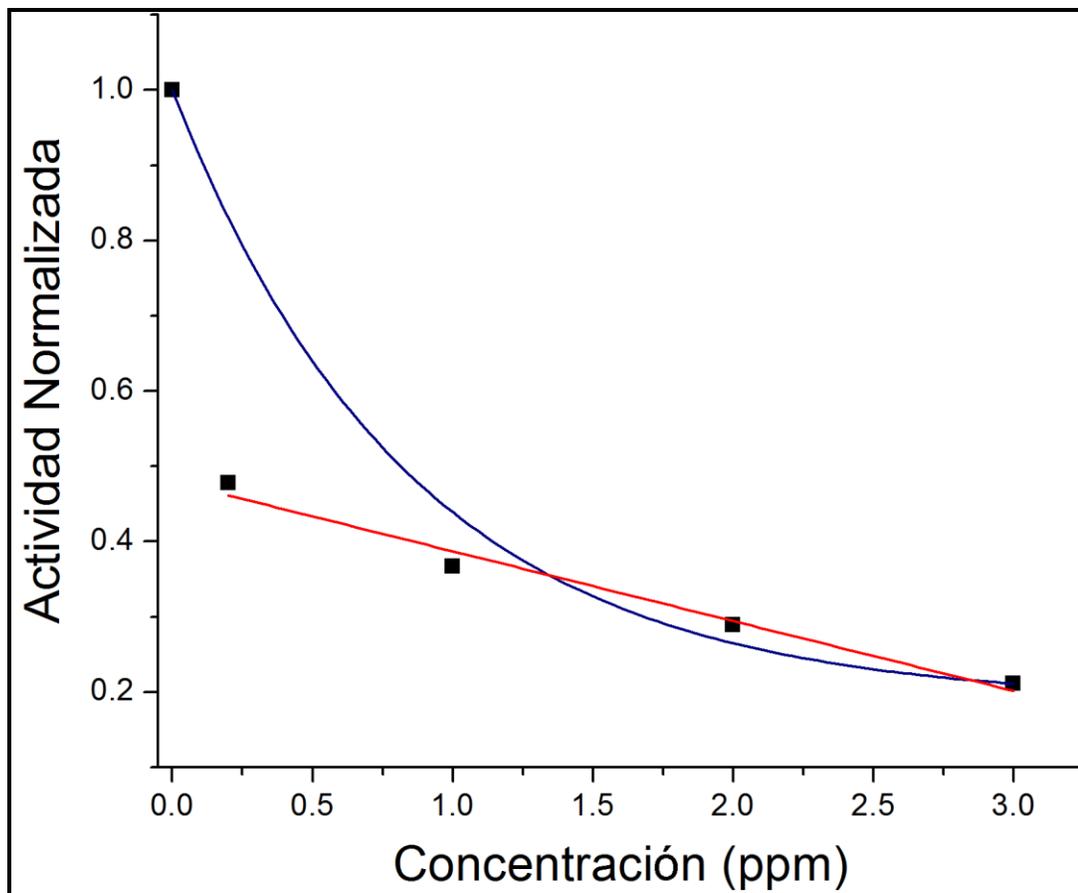


Figura 13.- Sensibilidad de la papaína inmovilizada en PVA hacia la presencia de iones de mercurio en el medio de reacción.

5.8 Conclusiones

De acuerdo a las pruebas realizadas se determinó usar como substrato una solución de BAPA y cisteína y como inhibidor se escogió los iones de mercurio (Hg^{2+}) dado que fueron hacia los que la papaína mostró mayor sensibilidad.

Se encapsuló con éxito la papaína en nanofibras de poli (vinil alcohol) (PVA) utilizando la técnica de electrohilado. De acuerdo a las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrida (SEM), se obtuvieron fibras en el rango nanométrico y con una morfología libre de defectos

estructurales, al menos en las nanofibras electrohiladas a partir de soluciones con bajas concentraciones de enzima (0 a 16% con respecto al peso del polímero).

La presencia de la enzima en las nanofibras de PVA fue confirmada mediante espectroscopia de infrarrojo (IR).

La papaína fue inmovilizada con éxito en las nanofibras de PVA mediante un procedimiento de entrecruzado utilizando glutaraldehído. Se evaluó asimismo el efecto del proceso de entrecruzamiento en la actividad enzimática de la papaína inmovilizada. Encontrándose que el tiempo de entrecruzamiento óptimo era de 30 minutos.

La efectividad del proceso de inmovilización fue confirmada mediante pruebas de repetibilidad en las que la papaína inmovilizada mostró actividad hasta después de 6 ciclos de reutilización.

Se realizaron además prueba de almacenamiento en las que la papaína inmovilizada logró mantener alrededor de 40% de su actividad después de 14 días de almacenamiento.

Se evaluó la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, obteniéndose una actividad retenida alrededor del 88%, lo que iguala e incluso supera a otras formas reportadas de inmovilización de papaína.

Se comprobó la hipótesis principal confirmándose que la papaína inmovilizada en nanofibras de PVA puede funcionar como un biosensor en el sensado de iones de mercurio (Hg^{2+}). Este biosensor obtuvo un rango sensibilidad de 0.2 a 3 ppm de concentración de iones de mercurio.

5.9 Trabajo a futuro

Confirmar la presencia de la papaína en las muestras con otra técnica de caracterización.

Realizar pruebas de sensado con la papaína inmovilizada a diferentes temperaturas y pH, para evaluar el efecto de estas variables en el sensado de iones metálicos.

Ampliar el rango de sensibilidad de este biosensor y realizar pruebas de sensado de iones metálicos *in situ*.

Referencias

1. Hedstrom L, Introduction: Proteases, *Chemical Reviews* (2002), 102 (12), 4429-4430.
2. Walsh G: *Proteins: Biochemistry and Biotechnology* (2 Ed.). Chichester: John Wiley, 2002. pp. 369,433.
3. Bordusa F, Proteases in Organic Synthesis†, *Chemical Reviews* (2002), 102 (12), 4817-4868.
4. Morcelle SR, Barberis S, Priolo N, Caffini NO, Clapes P, Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funarium clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2006), 41, 117-124.
5. Sangeetha K, Abraham TE, Chemical modification of papain for use in alkaline medium, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2006), 38, 171–177.
6. Beynon R, Bond JS (eds): *Proteolytic enzymes: a practical approach*. The practical approach series. (2 Ed.). Oxford: Oxford University Press, 2001.
7. Biasutti EAR, Marco LMD, Afonso WO, et al., Utilización de dos soportes para la inmovilización de la papaína, *ARS Pharmaceutica* (2006), 47 (4), 425-435.
8. Li YF, Jia FY, Li JR, Liu G, Li YZ, Papain immobilization on a nitrilon fibre carrier containing primary amine groups, *Biotechnology and applied Biochemistry* (2001), 33 (Pt 1), 29-34.
9. Ignatova M, Manolova N, Rashkov I, Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning, *European Polymer Journal* (2007), 43, 1112-1122.
10. Afaq S, Iqbal J, Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable carrier, *Electronic Journal of Biotechnology [online]* (2001), 4 (3), 120-124.
11. Swanson MC, Boiano JM, Galson SK, Grauvogel LW, Reed CE, Immunochemical quantification and particle size distribution of airborne papain in a meat portioning facility, *American Industrial Hygiene Association Journal* (1992), 53 (1), 1-5.
12. Rao RS, Borkar PS, Khobragade CN, Sagar AD, Enzymatic activities of proteases immobilized on tri(4-formyl phenoxy) cyanurate, *Enzyme and Microbial Technology* (2006), 39, 958–962.
13. Kilinc A, Onal S, Telefoncu A, Stabilization of Papain by Modification with Chitosan, *Turk J Chem* (2002), 26, 311-316.
14. Barbosa CM, Morais HA, Delvivo FM, et al., Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres, *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2004), 84 (14), 1891-1900.
15. Lin H, Wang H, Xue C, Ye M, Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain, *Enzyme and Microbial Technology* (2002), 31 (5), 588-592.

16. Silva VDM, Marco LMD, Afonso WdO, Lopes DCF, Silvestre MPC, Comparative Study of the Immobilization of Pancreatin and Papain on Activated Carbon and Alumina, Using Whey as Protein Substrate, *World Applied Sciences Journal* (2007), 2 (3), 175-183.
17. Clapés P, Morán C, Infante MR, Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants, *Biotechnology and Bioengineering* (1999), 63 (3), 333-343.
18. Cantacuzène D, Pascal F, Guerreiro C, Synthesis of amino acid esters by papain, *Tetrahedron* (1987), 43 (8), 1823-1826.
19. Mitin YV, Kashparov IA, Kuhl P, Scheller D, Papain-catalyzed Esterification of N-Benzoyloxycarbonylalanine with Sorbitol, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* (1999), 25 (4), 243-246.
20. Hausmann R, Zavazava N, Steinmann J, Muller-Ruchholtz W, Interaction of papain-digested HLA class I molecules with human alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL), *Clinical & Experimental Immunology* (1993), 91 (1), 183-188.
21. Kumpel BM, Bakács T, Comparison of lysis of bromelain and papain treated red cells in ADCC assays, *Immunology Letters* (1992), 31 (3), 237-240.
22. Segura-Ceniceros EP, Iliina A, Montalvo-Arredondo JI, et al., Evaluation of the effect of pectin-papain interactions on the enzyme stability and mechanical properties of maracuya's pectin films for the treatment of skin wounds, *Moscow University Chemistry Bulletin* (2006), 61 (1), 59-65.
23. Ogi SA, Ianishpol'ski VV, Tertykh VA, Properties of papain, immobilized on organosilica, *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* (1990), 62 (6), 48-52.
24. Zhuang P, Allan Butterfield D, Structural and enzymatic characterizations of papain immobilized onto vinyl alcohol/vinyl butyral copolymer membrane, *Journal of Membrane Science* (1992), 66 (2-3), 247-257.
25. Eckstein. H, Renner H, Brun H, Immobilization of papain on epoxy-polymers for papain-catalyzed peptide synthesis, *Biomedica Biochimica Acta* (1991), 50 (10-11), S114-S117.
26. Ganapathy R, Manolache S, Sarmadi M, Denes F, Immobilization of papain on cold-plasma functionalized polyethylene and glass surfaces, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* (2001), 12 (9), 1027-1049.
27. Turkiewicz B, Rucka M, Zboinska GPE, Biofunctional membranes from poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide) with self-cleaning properties, *Enzyme and Microbial Technology* (2006), 39, 527-530.
28. Allan Butterfield D, Lee J, Ganapathi S, Bhattacharyya D, Biofunctional membranes Part IV. Active-site structure and stability of an immobilized enzyme, papain, on modified polysulfone membranes studied by electron paramagnetic resonance and kinetics, *Journal of Membrane Science* (1994), 91 (1-2), 47-64.
29. Wang A, Wang H, Zhou C, et al., Ag-induced Efficient Immobilization of Papain on Silica Spheres, *Chinese Journal of Chemical Engineering* (2008), 16 (4), 612-619.
30. Wang A, Liu M, Wang H, et al., Improving Enzyme Immobilization in Mesocellular Siliceous Foams by Microwave Irradiation, *The Society for Biotechnology, Japan* (2008), 106 (3), 286-291.
31. Na W, Wei Q, Zou Z-C, Li Q-Y, Nie Z-R, Large pore 3D cubic mesoporous silica HOM-5 for enzyme immobilization, *Materials Letters* (2008), 62, 3707-3709.
32. Sankalia MG, Mashru RC, Sankalia JM, Sutariya VB, Papain Entrapment in Alginate Beads for Stability Improvement and Site-Specific Delivery: Physicochemical Characterization and Factorial Optimization Using Neural Network Modeling, *AAPS PharmSciTech* (2005), 6 (2), E209-E222.

33. Tsubaki T, Irukayama K: *Minamata Disease*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co., 1977. p. 1.
34. Shukor Y, Baharom NA, Rahman FA, et al., Development of a heavy metals enzymatic-based assay using papain, *Analytica Chimica Acta* (2006), 566, 283–289.
35. Mat I, Maah MJ, Johari A, Trace metal geochemical associations in sediments from the culture-bed of *Anadara granosa*, *Marine Pollution Bulletin* (1994), 28 (5), 319-323.
36. Krawczynski vel Krawczyk T, Moszczyńska M, Trojanowicz M, Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urea biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* (2000), 15 (11-12), 681-691.
37. Baumstark-Khan C, Khan RA, Rettberg P, Horneck G, Bacterial Lux-Fluoro test for biological assessment of pollutants in water samples from urban and rural origin, *Analytica Chimica Acta* (2003), 487 (1), 51-60.
38. Sun B, Nirmalakhandan N, Hall E, et al., Estimating Toxicity of Organic Chemicals to Activated-Sludge Microorganisms., *Journal of Environmental Engineering* (1994), 120 (1), 1459–1469.
39. Farré MI, García M-J, Tirapu L, Ginebreda A, Barceló D, Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxalert® and Microtox® bioluminescence inhibition assays, *Analytica Chimica Acta* (2001), 427 (2), 181-189.
40. El-Sherif H, Martelli PL, Casadio R, et al., Urease immobilisation on chemically grafted nylon membranes: Part 1: Isothermal characterisation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2001), 14 (1-3), 15-29.
41. Fernandes KF, Lima CS, Lopes FM, Collins CH, Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline, *Process Biochemistry* (2004), 39 (8), 957-962.
42. Kim I-B, Bunz UHF, Modulating the Sensory Response of a Conjugated Polymer by Proteins: An Agglutination Assay for Mercury Ions in Water, *Journal of the American Chemical Society* (2006), 128, 2818-2819.
43. Wu L, Yuan X, Sheng J, Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning, *Journal of Membrane Science* (2005), 250, 167-173.
44. Wang Y, Hsieh Y-L, Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes, *Journal of Membrane Science* (2008), 309, 73-81.
45. Ren G, Xu X, Liu Q, et al., Electrospun poly(vinyl alcohol)/glucose oxidase biocomposite membranes for biosensor applications, *Reactive and Functional Polymers* (2006), 66, 1559-1564.
46. Huang X-J, Ge D, Xu Z-K, Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization, *European Polymer Journal* (2007), 43, 3710–3718.
47. Colowick SP, Kaplan NO (eds): *Methods in Enzymology*. Vol. XIX (2 Ed.). New York: Academic Press, 1971, pp. 226-230.
48. McKee MG, Hunley MT, Layman JM, Long TE, Solution Rheological Behavior and Electrospinning of Cationic Polyelectrolytes, *Macromolecules* (2005), 39 (2), 575-583.
49. Zhang C, Yuan X, Wu L, Sheng J, Drug-loaded ultrafine poly(vinyl alcohol) fibre mats prepared by electrospinning, *e-Polymers* (2005), 72.
50. Ding L, Yao Z, Li T, Yue Q, Chai J, Study on Papain Immobilization on a Macroporous Polymer Carrier, *Turkish Journal of Chemistry* (2003), 27 (5), 627-638.
51. Xue Y, Nie H, Zhu L, Li S, Zhang H, Immobilization of Modified Papain with Anhydride Groups on Activated Cotton Fabric, *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2010), 160 (1), 109-121.

52. Klein IB, Kirsch JF, The mechanism of the activation of papain, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1969), 34 (5), 575-581.
53. Asboth B, Stokum E, Khan IU, Polgar L, Mechanism of Action of Cysteine Proteinases: Oxyanion Binding Site Is Not Essential in the Hydrolysis of Specific Substrates, *Biochemistry* (1985), 24, 606-609.

Listado de figuras

Figura 1.- Algunas casos de aplicaciones de la papaína.	119
Figura 2.- Impacto de la concentración de la enzima en la morfología de las nanofibras a)0%, b) 5%, c) 10%, d) 16% y e) 33%.....	131
Figura 3.- Distribución de diámetros de las morfologías mostradas en la figura 2.....	131
Figura 4.- Efecto del tiempo de entrecruzamiento en la morfología de las nanofibras de PVA: a) 15 minutos, b) 30 minutos, c) 60 minutos.....	132
Figura 5.- Espectros de infrarrojo correspondientes a nanofibras de PVA sin carga enzimática (a), y a una muestra de papaína encapsulada en nanofibras de PVA (b).....	133
Figura 6.- Efecto del proceso de entrecruzamiento en la actividad enzimática de las muestras de papaína inmovilizada.	135
Figura 7.- Efecto del porcentaje de papaína presente en la solución electrohilada sobre la eficiencia en la carga enzimática y la actividad específica de la papaína inmovilizada.....	136
Figura 8.- Actividad Relativa después de varios ciclos de ensayos repetidos.....	138
Figura 9.- Efecto del tiempo de almacenamiento en la actividad enzimática de la papaína inmovilizada.....	139
Figura 10.- Efecto del tipo de sustrato en la actividad enzimática de la papaína en solución. 1) BAPA, 2) BAPA y cisteína, 3) BAPA, cisteína y EDTA.....	140

Figura 11.- Sensibilidad de la actividad enzimática de la papaína hacia el cambio de concentración de los diversos metales. Cobre (Cu), mercurio (Hg), zinc (Zn) y plata (Ag).....142

Figura 12.- Sensibilidad de la papaína en solución hacia la presencia de iones de mercurio en el medio de reacción.143

Figura 13.- Sensibilidad de la papaína inmovilizada en PVA hacia la presencia de iones de mercurio en el medio de reacción.....145

Conclusiones Generales

- Se confirmó la hipótesis general al comprobarse la efectividad de las enzimas inmovilizadas y/o encapsuladas en nanofibras de poli (vinil alcohol) (PVA) mediante la técnica de electrohilado en sus funciones como biosensores y sistemas de liberación de proteínas.
- La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) etiquetada con el colorante ANS encapsulada en nanofibras electrohiladas de poli (vinil alcohol) (PVA) comprobó ser un biosensor efectivo en la detección de lactato.
- La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) encapsulada en nanofibras electrohiladas de PVA comprobó ser un modelo efectivo de alto peso molecular en la liberación sostenida de proteínas.
- La papaína inmovilizada en nanofibras electrohiladas de PVA comprobó ser un biosensor efectivo en la detección de iones de metales pesados, especialmente de iones de mercurio (Hg^{2+}).