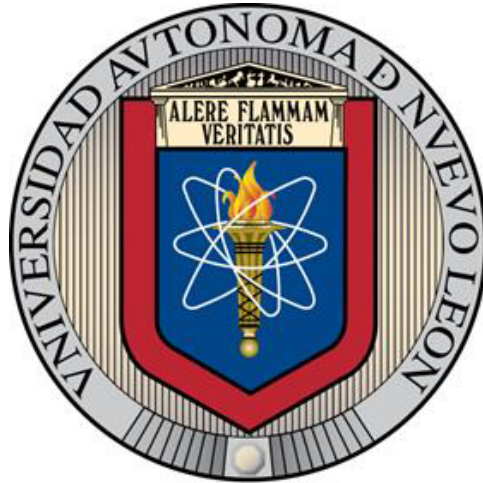


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA



TESIS

**INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA PEPSINA EN
NANOFIBRAS POLIMÉRICAS MEDIANTE TÉCNICA DE ELECTROHILADO**

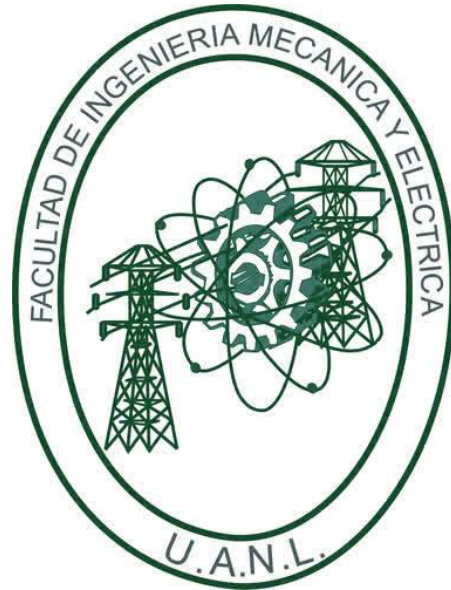
POR

JULIA MARGARITA LOREDO ALEJOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON
ORIENTACIÓN EN NANOTECNOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2017

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



TESIS

**INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA PEPSINA EN
NANOFIBRAS POLIMÉRICAS MEDIANTE TÉCNICA DE ELECTROHILADO**

POR

JULIA MARGARITA LOREDO ALEJOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON
ORIENTACIÓN EN NANOTECNOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERIA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que la Tesis “inmovilización y caracterización de la enzima pepsina en nanofibras poliméricas mediante técnica de electrohilado” realizada por el alumno(a) Julia Margarita Loredo Alejos, con número de matrícula 1451548, sea aceptada para su defensa como opción al grado de Maestría en Ciencias con orientación en Nanotecnología.

El comité de tesis



Dr. Iván Eleazar Moreno Cortez

Director



Dr. Raúl Lucio Porto

Revisor



Dr. Reynaldo Esquivel González

Revisor



Vo.Bo.

Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado



SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

NOVIEMBRE 2017

Dedicatorias

A mis padres Margarita Alejos Pitacua y Roberto Gerardo Loredó Chapa por haberme forjado como la persona que soy ahora; muchos de mis logros se los debós a ustedes entre los que se incluyen este. Me forzaron con reglas y con algunas libertades, pero al final, me motivaron constantemente para alcanzar mis metas.

A mis hermanos por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de mi carrera.

A mi novio Luis Eduardo Reyes Rodríguez por tu ayuda que ha sido fundamental, has estado conmigo incluso en los momentos más turbulentos, este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían.

A mi amiga Karina, que tu ayuda ha sido fundamental, te agradezco por ayudarme cuando siempre lo necesité. Te agradezco no solo por la ayuda brindada, sino por los buenos momentos en los que convivimos.

A Juan Pablo García, gracias por estas conmigo a lo largo de mi carrera, te agradezco por tus consejos y tu excelente ayuda, gracias por compartirme buenos momentos, por ser mi mejor amigo y por tus grandes enseñanzas.

Agradecimientos

Agradezco a mi asesor Iván E. Moreno Cortez por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

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

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

A Andrea por toda su ayuda y su apoyo condicional; te agradezco por estar conmigo cuando te necesite, por aportar considerablemente en mi proyecto. Te agradezco no solo por tu ayuda brindada, si no por los buenos momentos en los que convivimos.

A mis compañeros de laboratorio quienes me han apoyado y me brindaron de su sabiduría durante todos estos años.

Contenido

Lista de figuras	9
Lista de tablas	10
Resumen	11
1. Introducción.....	12
2.1 Antecedentes.....	14
2.1.1 Enzimas	14
2.1.1.1 Las enzimas como catalizadores biológicos.....	16
2.1.1.3 Factores que influyen en la estabilidad de las enzimas	16
2.1.1.4 Propiedades de las enzimas	17
2.1.1.5 Función de las enzimas.....	17
2.1.1.6 Usos de las enzimas.....	17
2.1.1.7 La necesidad de encapsular e inmovilizar	18
2.2 Pepsina.....	18
2.2.1 Definición y usos.....	18
2.2.2 Sitio activo.....	19
2.2.3 Métodos de inmovilización de la enzima pepsina.....	20
2.3 Técnicas de inmovilización de enzimas	21
2.4. Condiciones para la actividad enzimática	23
2.5 Biorreactores en la inmovilización.....	24
2.6 Nanoestructuras en la inmovilización de enzimas.....	24
2.7 Nanofibras	25
2.7.1 Mecanismos de Obtención de Nanofibras.....	25
2.8 Técnica del electrohilado.....	26
2.8.1 Aspectos Fundamentales del electrohilado.....	26
2.8.2 Parámetros de la técnica electrohilado	27
2.8.3 Parámetros de la solución.....	28
3. Hipótesis	29
4. Objetivo general	29
5. Objetivos específicos.....	29
6. Experimentación.....	30

6.1 Materiales y reactivos.....	30
6.2 Equipos utilizados	30
6.3 Elaboración de PVA.....	31
6.4 Montaje de electrohilado	31
6.5 Encapsulación de enzima pepsina electrohilada en una matriz de PVA	31
6.5.1 Inmovilización de pepsina.....	32
6.6 Determinación de actividad enzimática de las nanofibras.....	33
6.7 Determinación de carga enzimática.....	34
6.7.1 Actividad enzimática en las nanofibras en ciclos.....	35
6.7.2 Actividad enzimática de las nanofibras almacenadas.....	35
6.7.3 Actividad enzimática a diferentes pH.....	36
7. Equipos utilizados	36
7.1 Caracterización.....	36
8. Resultados y discusiones	37
8.1 Morfología.....	37
8.1.1 Efecto de entrecruzamiento sobre la morfología de las nanofibras.....	40
8.2. Presencia de la enzima pepsina en nanofibras de PVA.....	43
8.2.1 Análisis por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	43
8.3 Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	44
8.4 Actividad enzimática de la enzima pepsina inmovilizada.....	48
8.4.1 Análisis de carga y actividad enzimática.....	48
8.4.1.1 Análisis del efecto del tiempo de entrecruzamiento en la actividad enzimática ...	50
8.4.1.2 Efecto del efecto del pH del medio de reacción sobre la actividad enzimática.....	52
8.4.1.3 Ciclos de Reutilización de la enzima pepsina inmovilizada.....	54
8.4.1.4 Efecto del tiempo de almacenamiento en la actividad de la enzima inmovilizada	56
9. Conclusiones.....	58
9.1 Comentarios finales	59
10. Referencias	60

Lista de figuras

Figura 1: Modelo llave-candado.....	14
Figura 2: Estructura del sitio activo de la pepsina.....	19
Figura 3: Clasificación de los métodos de inmovilización.....	22
Figura 4: Representación esquemática del Sistema de electrohilado.....	26
Figura 5: Proceso de encapsulación e inmovilización de la enzima pepsina.....	31
Figura 6: Proceso de medición de actividad enzimática.....	33
Figura 7: Imágenes de SEM con aumento de la concentración enzimática en nanofibras con matriz de PVA. a) PVA, b) 5%, c) 10%, d) 15%, e) 20%, f) 25%, g) 30%.....	37
Figura 8: Distribución de diámetros de nanofibras al incrementar la concentración enzimática. a) PVA, b) 5%, c) 10%, d) 15%, e) 20, f) 25, g) 30%.....	38
Figura 9: Efecto de tiempo de entrecruzamiento en la morfología de las nanofibras. a) 1 hora, b) 2 horas, c) 3 horas, d) 4 horas, e) 5 horas, f) después del buffer.....	40
Figura 10: Distribución de diámetros de las nanofibras entrecruzadas a diferentes horas. a) 1 hora, b) 2 horas, c) 3 horas, d) 4 horas, e) 5 horas, f) después del buffer.....	41
Figura 11: Fibras con concentración y tiempo de entrecruzamiento óptimo expuestas a goteo de solución.....	42
Figura 12: Espectros de infrarrojo. a) Fibra PVA b) Enzima Pepsina c) Fibra PVA con Enzima Pepsina encapsulada d) Fibra Entrecruzada de PVA con Enzima Pepsina, e) Glutaraldehído.....	44
Figura 13: Calorimetría diferencial de barrido a diferentes tiempos de entrecruzado de las fibras de matriz de PVA con concentración 25% de enzima pepsina. a) 1 hora, b) 2 horas, c) 3 horas, d) 4 horas, e) 5 horas.....	46
Figura 14: Calorimetría diferencial de barrido de diferentes concentraciones de enzima en matriz polimérica de PVA. a) 5%, b) 10%, c) 15%, d) 20%, d) 25%, e) 30%.....	48
Figura 15: Efecto de la carga enzimática y la actividad enzimática sobre la concentración enzimática de pepsina en las nanofibras con matriz polimérica de PVA.....	50
Figura 16: Tiempo de exposición del vapor de glutaraldehído sobre las nanofibras con enzima inmovilizada.....	52

Figura 17: Efecto del pH en la actividad enzimática.....	54
Figura 18: Actividad normalizada después de varios ciclos de reutilización.....	55
Figura 19: Tiempo de almacenamiento de las fibras encapsuladas.....	57

Lista de tablas

Tabla 1: Enzimas típicas empleadas en procesos industriales.....	14
Tabla 2: Beneficios de la pepsina.....	18
Tabla 3: Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas.....	21
Tabla 4: Mecanismos de obtención de fibras.....	24

Resumen

En el presente trabajo de investigación se reporta el uso de la técnica de electrohilado para la preparación de nanofibras de poli (vinil alcohol) (PVA) esto con la finalidad de encapsular e inmovilizar enzimas. La encapsulación es un método mediante el cual, sustancias bioactivas son introducidas en una matriz para evitar su pérdida y así mismo, facilitar su incorporación en diferentes productos; no obstante, durante este proceso, es preciso tener en cuenta la técnica y las condiciones de proceso para conseguir la formación de capsulas. El objetivo fue determinar las condiciones adecuadas para encapsulación de la enzima pepsina. La evaluación del proceso se realizó en función de las variables independientes: voltaje, concentración de material de recubrimiento y el flujo de alimentación; además de las variables dependientes: características del espectro y morfología. A las partículas obtenidas se les midió las características morfológicas microscopio electrónico de barrido (SEM), la presencia de la enzima dentro de las nanofibras de PVA se confirmó por espectroscopia infrarroja (FTIR) y Calorimetría de barrido diferencial (DSC). La inmovilización de enzimas se realizó mediante reticulación de vapor de glutaraldehído (GAvt). La actividad enzimática se determinó mediante UV-VIS, se realizó mediante el método de folien, esto para la determinación de fenoles totales se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 750 nm. Los resultados se expresan en unidades de tirosina. Para la determinación de la carga enzimática se realizó a través del ensayo Bradford, esto para la determinación de proteínas totales, la absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm.

1. Introducción

Las enzimas constituyen herramientas fundamentales en diversas áreas de la ciencia y la tecnología. Las enzimas son ampliamente utilizadas como catalizadores en numerosos procesos industriales [1,2], en el análisis químico y clínico [3,4], en el procesamiento de alimentos [5,6], en la agricultura [7] y en la biotecnología [8]. Otra aplicación importante de estas biomoléculas lo constituye su uso como fármacos para la enzimoterapia de numerosas enfermedades [9,10]. Sin embargo, la utilización de las enzimas como catalizadores en procesos industriales a gran escala se ha visto limitada por los altos costos de producción y su baja estabilidad durante periodos prolongados de almacenamiento. Durante su uso, la estabilidad de las mismas decrece debido a cambios en el pH, temperatura, cambios conformacionales como resultado de la fricción, la presión osmótica impuesta por el ambiente que la rodea y el efecto acumulativo de todos estos factores como función del tiempo de duración de utilización de las mismas.

En segundo lugar, como las enzimas son solubles, la recuperación de las mismas de la mezcla del medio de reacción para su reuso no es económicamente rentable, por lo que los procesos enzimáticos son costosos [11]. Por estas razones los métodos para la inmovilización de enzimas juegan un papel fundamental en el incremento de los esfuerzos por reemplazar los procesos enzimáticos convencionales por procesos que empleen preparaciones enzimáticas inmovilizadas. La inmovilización de enzimas es una estrategia empleada comúnmente para incrementar la estabilidad de las mismas, permite su reutilización, facilita la separación de los productos obtenidos por la reacción enzimática del medio de reacción y como resultado de su uso los procesos enzimáticos son más económicos [12].

Numerosas metodologías se han empleado en la inmovilización de enzimas, pero para su clasificación se dividen en dos grandes grupos: métodos físicos y químicos. Los métodos físicos se basan en interacciones no covalentes que se establecen entre la enzima y el soporte. Los métodos químicos consisten en el establecimiento de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte [13].

El uso de glutaraldehído (GAvt) como reactivo para activar la superficie de soportes y enlazar covalentemente enzimas a los mismos es una estrategia de inmovilización en fase sólida

ampliamente utilizada [14,15]. Matrices como: agarosa [16], nylon [17], perlita [18] y quitosana [19], se han utilizado con buenos resultados para inmovilizar enzimas después de ser activadas con glutaraldehído. La síntesis de nuevos soportes para la aplicación de esta metodología a la inmovilización de enzimas tiene una especial importancia para la tecnología enzimática. El poli (vinil alcohol) (PVA) ha sido ampliamente utilizado obteniendo buenos resultados en nuestro grupo de investigación para la inmovilización de enzimas después de ser activadas con glutaraldehído (agregar referencia)

La aplicación del polímero PVA en la inmovilización de enzimas en fase sólida se ha visto favorecida por el hecho de que este presenta las siguientes características deseables: su bajo costo, biocompatibilidad, biodegradabilidad, se puede preparar de diferentes formas físicas y dispone de grupos funcionales con los cuales se puede inmovilizar las enzimas por enlace covalente o por absorción: hidroxilo, carboxilo y grupos amino. [14,20,21].

Por otra parte, la pepsina es una enzima digestiva que degrada las proteínas de los alimentos. Es segregada por las células de las paredes del estómago y esta se libera en forma de pepsinógeno. Generalmente en la naturaleza estas enzimas se presentan como un sistema multienzimático: tripsina-quimotripsina-peptidasa y pepsina. Estas enzimas tienen amplia aplicación en las industrias de los alimentos [22] y la textil [23]. Sin embargo, su uso en estas áreas se ha visto limitado por su inestabilidad ante la variación en los valores de pH y temperatura.

El principal objetivo de este trabajo se centra en el estudio de la inmovilización de la enzima pepsina mediante la técnica de electrohilado. Además, se estudiará la influencia que sobre las propiedades de la enzima ejercerá el proceso de absorción o de unión covalente sobre la matriz de nanofibras poliméricas electrohiladas. La determinación de la actividad enzimática se realizó utilizando la técnica de espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis). La morfología y distribución del diámetro de las nanofibras fue caracterizada mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM). La presencia de la enzima dentro de las nanofibras de PVA se confirmó por espectroscopia infrarroja (FTIR). El análisis térmico de las nanofibras se llevó a cabo mediante el calorímetro diferencial de barrido (DSC).

2.1 Antecedentes

2.1.1 Enzimas

Se considera que una enzima es una proteína con propiedades catalíticas debidas a su poder de activación específico [24]. Las enzimas catalizan las reacciones metabólicas que tienen lugar en el interior de las células de organismos vivos, por lo que su actividad catalítica se desarrolla en las condiciones de un medio de reacción biológico. Es por ello por lo que su actividad catalítica se caracteriza por:

- Tener lugar en condiciones suaves de temperatura y pH
- Son altamente específicas hacia un sustrato o hacia sustratos muy similares desde el punto de vista químico
- La velocidad de reacción es muy alta
- Gran variedad de enzimas y, por tanto, multitud de reacciones pueden llevarse a cabo. Este hecho es consecuencia de la especificidad de la enzima, de manera que cada proceso biológico es catalizado por una sola enzima.

Las enzimas se clasifican según su actividad catalítica y el sustrato sobre el que actúan. En la Tabla 1 se muestran algunas enzimas de interés industrial. Las oxidoreductasas catalizan reacciones redox, en las que existen transferencia de electrones de una molécula a otra. En los sistemas biológicos más comunes estas enzimas catalizan la eliminación de hidrógeno (deshidrogenasas), oxígeno (oxidasas) y peróxidos (peroxidasas). Las transferasas catalizan la transferencia de determinados grupos funcionales o átomos desde una molécula a otra.

Clase	Enzimas
<input type="checkbox"/> Oxidorreductasas	<input type="checkbox"/> Peroxidasas, Catalasas, Glucosa-oxidasas, Lacasas
<input type="checkbox"/> Transferasas	<input type="checkbox"/> Fructosil-transferasas, Glucosil-transferasas
<input type="checkbox"/> Hidrolasas	<input type="checkbox"/> Amilasas, Celulasas, Lipasas, Pectinasas, Proteasas, Pululanasas
<input type="checkbox"/> Liases	<input type="checkbox"/> Pectato-liasas, Alfa-acetolactato decarboxilasas
<input type="checkbox"/> Isomerasas	<input type="checkbox"/> Glucosa-isomerasas
<input type="checkbox"/> Ligasas	<input type="checkbox"/> Sin empleo actual en la industria

Tabla 1: Enzimas típicas empleadas en procesos industriales.

Las enzimas proteolíticas más importantes en la industria son las serinoproteasas, que se dividen en dos tipos principales: las proteasas con actividad catalítica similar a la de la quimotripsina, y las de actividad catalítica tipo subtilisina. En ambos casos, las serinoproteasas actúan mediante un ataque nucleofílico formando un complejo acil- enzima y una posterior ruptura del complejo, liberando los productos de reacción y la enzima libre, tal como se aprecia en la figura 1.

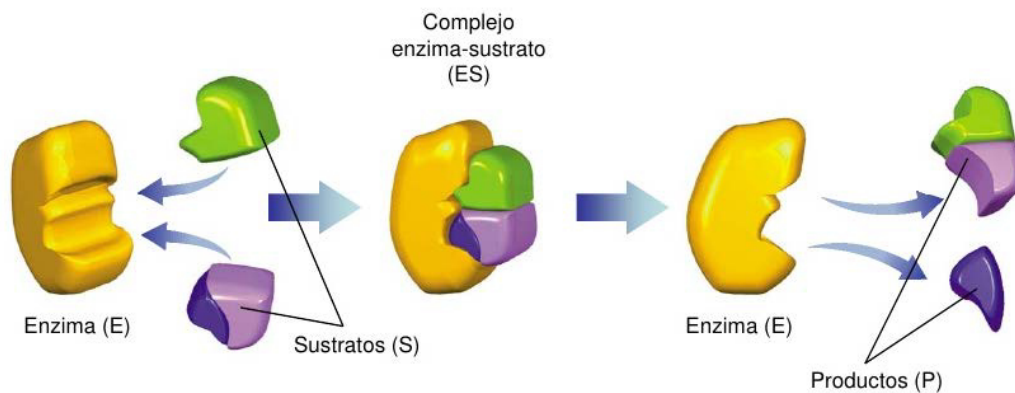


Figura 1: Modelo llave-candado

2.1.1.1 Las enzimas como catalizadores biológicos

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos, es decir, que aceleran las reacciones en el organismo multiplicando su velocidad en factores de 10^6 a 10^{12} veces, las cuales transcurren bajo ciertas condiciones de temperatura, presión atmosférica y en un rango de valores de pH. Además, estas proteínas son capaces de llevar a cabo reacciones en medio acuoso [25,26].

Las enzimas poseen alto grado de especificidad por sus sustratos, además constituyen herramientas indispensables en diversas áreas de la ciencia y la tecnología. Siendo en la actualidad utilizadas como catalizadores importantes en diversos procesos industriales [27,28,29], en el análisis químico y clínico [30], en el procesamiento de alimentos [31], en la agricultura [32] y en la biotecnología [33].

La función catalítica que desempeñan las enzimas está estrechamente relacionada con su compleja estructura molecular tridimensional, la cual define la conformación del sitio activo de estos biocatalizadores.

2.1.1.3 Factores que influyen en la estabilidad de las enzimas

La estructura tridimensional de una proteína se estabiliza por diferentes tipos de interacciones no covalentes y covalentes, entre las que se destacan: la formación de puentes de hidrogeno, las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, las fuerzas de Van der Waals, la formación de puentes disulfuro y la presencia de enlaces de coordinación en las proteínas [34].

Una enzima perfectamente conformada puede perder su actividad biológica por la variación de uno o varios de los diferentes factores fisicoquímicos del medio de reacción tales como pH, temperatura y fuerza iónica. Lo anterior provoca el desplegamiento de su estructura terciaria

hasta obtenerse diferentes poblaciones moleculares con estructuras parcialmente desordenadas. Estos cambios estructurales pueden conllevar a una pérdida irreversible de la actividad enzimática, como consecuencia del desplegamiento total de la proteína y la ocurrencia de procesos fisicoquímicos secundarios en estas nuevas formas estructurales.

2.1.1.4 Propiedades de las enzimas

Las enzimas son catalizadores típicos: son capaces de acelerar la velocidad de reacción sin ser consumidas en el proceso. Algunas enzimas, como la [pepsina](#) y la [tripsina](#), que intervienen en la hidrólisis de muchos tipos de proteínas, controlan muchas reacciones diferentes, mientras que otras como la ureasa, son muy específicas y sólo pueden acelerar una reacción. La especificidad entre el sustrato y la enzima se ha concebido como la relación de una “llave” y su “cerradura”. La molécula del sustrato constituye la llave y la proteína constituye la cerradura; en la superficie de la proteína existe una zona específica, denominada sitio activo o catalítico, a la cual se une la molécula del sustrato para experimentar la transformación catalítica [35,36].

2.1.1.5 Función de las enzimas

Las enzimas son [proteínas](#) que catalizan todas las reacciones bioquímicas. Además de su importancia como catalizadores [biológicos](#), tienen muchos usos médicos y comerciales una vez aisladas y purificadas. Un catalizador es una sustancia que disminuye la energía de activación de una reacción química. Al disminuir la energía de activación, se incrementa la velocidad de la reacción. En este sentido, la mayoría de las reacciones de los sistemas vivos son reversibles, es decir, que en ellas se establece el equilibrio químico. Por lo tanto, las enzimas aceleran la formación de equilibrio químico, pero no afectan las concentraciones finales del equilibrio [35].

2.1.1.6 Usos de las enzimas

La fermentación alcohólica y otros procesos industriales importantes dependen de la acción de enzimas, sintetizadas por las levaduras y bacterias empleadas en el proceso de producción.

Algunas enzimas se utilizan con fines médicos. En ocasiones son útiles en el tratamiento de zonas de inflamación local; la tripsina se emplea para eliminar sustancias extrañas y tejido muerto de las heridas y quemaduras [37].

2.1.1.7 La necesidad de encapsular e inmovilizar

La encapsulación de enzimas es una metodología similar a la de atrapamiento debido a que la enzima inmovilizada esta confinada en una matriz polimérica. En la encapsulación, los materiales utilizados como soporte presentan poros por lo que son semipermeables [38].

Un aspecto determinante para aplicar de manera exitosa la encapsulación de enzimas es la elección adecuada del tamaño de poro del soporte [39,40].

La principal ventaja de este método es que la enzima inmovilizada presenta una alta actividad ya que esta ocluida en la capsula en forma soluble. Esta metodología puede presentar problemas de difusión debido a que en algunos casos los productos formados de la reacción enzimática pueden acumularse de manera rápida causando el rompimiento de la capsula. Otra limitante de la encapsulación es que no puede ser aplicada para catalizar procesos donde el sustrato sea de alto peso molecular, ya que estos pueden presentar problemas de transferencia a través de la capsula [41,42,43]

2.2 Pepsina

2.2.1 Definición y usos

La enzima llamada pepsina es liberada por algunas células que se pueden encontrar principalmente en el estómago. Esta enzima tiene la capacidad y el papel de degradar las proteínas alimentarias en péptidos, produciendo así la digestión. Las otras enzimas digestivas importantes son la tripsina y la quimotripsina. De igual manera la pepsina fue la primera enzima animal en ser descubierta, por Theodor Schwann en 1836. [38,39,40,41]. La

pepsina también se produce dentro de estas células de la pared digestiva, siendo excretada como una respuesta a los alimentos que entran en el tracto digestivo. Al ser el componente principal de los jugos del estómago, esta enzima tiene muchos beneficios para la salud que hace que el cuerpo humano funcione correctamente. [42,43]

Los usos de la pepsina están conectados principalmente a la preparación de anticuerpos. La enzima tiene un papel importante en su producción, ya que ayuda a digerir la inmunoglobulina, que es una sustancia que escinde todas las cadenas pesadas cerca de la región bisagra. Además de esto, la pepsina también se utiliza en la preparación de colágeno con fines cosméticos. Algunos de los principales beneficios de la pepsina se muestran en la tabla 3 [38].

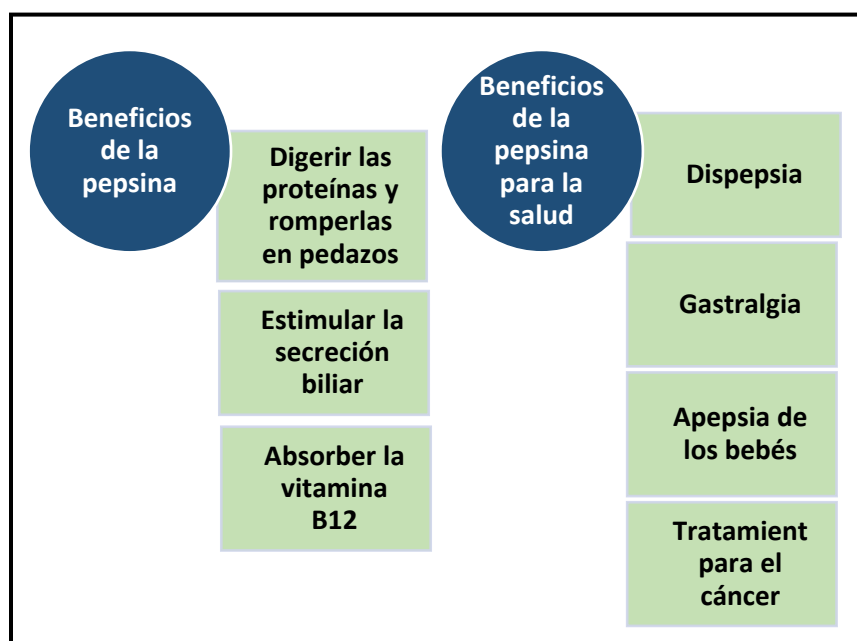


Tabla 2: Beneficios de la pepsina [38].

2.2.2 Sitio activo

Las proteinasas de ácido son la enzima de coagulación de la leche renina (quimosina) y la catepsina D de los lisosomas de tejidos animales. Estas enzimas parecen tener centros catalíticos similares, ya que se inhiben selectivamente mediante reactivos dirigidos al sitio activo tales como éster etílico de diazoacetil-L-fenilalanina y p-toluenosulfonil-L-fenilalanildiazometano [39] o éster metílico de diazoacetil-DL-nor-leucina [40]. En el caso de la pepsina gástrica [41]

y penicillopepsina, [42] se ha demostrado que el sitio de ataque de tales compuestos diazo es el grupo P-carboxilo de un resto aspartilo en secuencias homólogas (pepsina: Ile-Val-Asp-Thr-Gly- Thr-Ser, penicillopepsina: Ile-Ala- Asp-Thr-Gly-Thr-Leu). Más aún, se ha observado homología considerable en las secuencias de aminoácidos de pepsina y renina [43].

La secuencia completa de la pepsina ya se ha reportado [44], y el residuo aspartilo sensible a compuestos diazoicos se ha identificado como Asp-215. Además, Asp-32 se ha identificado como el residuo sensible al epóxido [45] que inhiben la pepsina figura 3. El modo de acción de la pepsina expone la participación de dos grupos carboxílicos enzimáticos, uno que actúa como donador de protones, el otro (en su forma carboxilada) como nucleófilo [46], todo lo cual actúa en la separación de un sustrato RCO-NHR'.

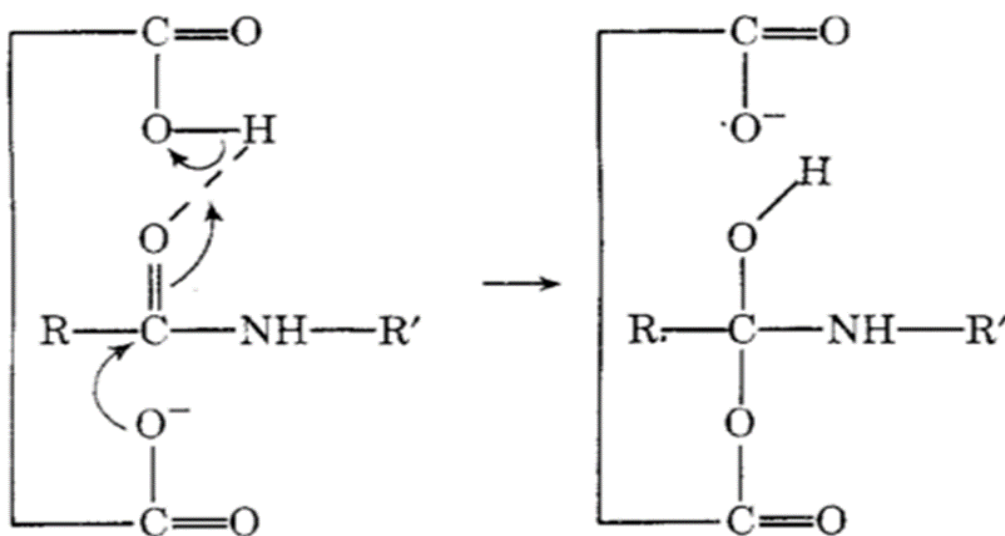


Figura 2: Estructura del sitio activo de la pepsina

2.2.3 Métodos de inmovilización de la enzima pepsina

En la literatura podemos encontrar publicaciones donde la enzima pepsina ha sido inmovilizada en nanoestructuras, por ejemplo, en la inmovilización por unión covalente a un derivado de quitosano en donde la pepsina conservó una actividad específica del 80% y mostró una mayor

estabilidad en el almacenamiento que la enzima soluble [46]. De igual manera la enzima pepsina también se ha inmovilizado en perlas de quitosano a través de un estudio comparativo entre la enzima pepsina libre e inmovilizada para la determinación de temperatura óptima, pH óptimo, estabilidad térmica, estabilidad de pH, estabilidad operativa, estabilidad de almacenamiento y parámetros cinéticos, obteniendo como resultado intervalos óptimos de temperatura para la pepsina libre y la pepsina inmovilizada de 30-40 y 40-50 °C, respectivamente. La pepsina inmovilizada mostró mayor actividad a pH 2 – 4. Con lo cual se demostró que la pepsina inmovilizada en perlas de quitosano presentó una resistencia mejorada contra la desnaturalización térmica. Se encontró que la estabilidad térmica y la estabilidad al almacenamiento de la pepsina inmovilizada eran mayores que la de la pepsina libre [47].

También se ha reportado la inmovilización de la enzima sobre microesferas modificadas de PMMA, para la cual se reportó que, para una óptima inmovilización enzimática, la máxima cantidad de enzima que puede unirse al soporte alcanza los 82mg/g. En este reporte de igual manera realizaron una comparación con la enzima libre, en donde el K_m de enzima inmovilizada aumenta, mientras que el V_{max} disminuye. Además, el valor V_{max} / K_m para la pepsina inmovilizada es aproximadamente el 50% del valor para la enzima libre [48].

2.3 Técnicas de inmovilización de enzimas

A pesar de las claras ventajas que representa el uso de lipasas como biocatalizador, se presentan problemas tales como la baja estabilidad, baja actividad o selectividad encontrada en algunos tipos de estas enzimas; así como también los altos costos en su aislamiento y purificación, la inestabilidad de sus estructuras una vez que son aisladas de su entorno natural, además al ser solubles en agua y operar en sistemas de reacción homogéneos, contaminan el producto y no pueden ser recuperadas para ser reutilizadas, lo cual se convierte en un problema económico debido a que estos factores provocan la pérdida de gran parte de la actividad enzimática [49]. Considerando lo anterior, la inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o

localiza la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizados repetidamente. Las ventajas de utilizar enzimas inmovilizadas se muestran en la tabla 4. [50,51]

Ventajas de inmovilizar enzimas	Desventajas de inmovilizar enzimas
Se pueden reutilizar y utilizar en forma continua.	Se añade una nueva etapa en la preparación del biocatalizador.
Permiten aumentar la concentración de la enzima en el medio de reacción.	La actividad catalítica se puede afectar negativamente.
Se facilita su separación del medio de reacción.	Los fenómenos de difusión pueden limitar la velocidad de reacción.
Se suele producir un aumento en la estabilidad de la enzima.	

Tabla 3: Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas

Existen numerosos métodos para lograr la inmovilización de enzimas y cada uno implica diferentes grados de complejidad y eficiencia. Estos métodos se pueden clasificar en dos categorías: unión química y retención física [51], como se muestra en la Figura 3.



Figura 3: Clasificación de los métodos de inmovilización

2.4. Condiciones para la actividad enzimática

La actividad enzimática, sin embargo, se realiza con diferente eficacia según ciertas condiciones que puedan existir en el cuerpo. Por ejemplo, una mayor concentración del sustrato o bien una mayor concentración de la enzima aumenta la velocidad con la que se produce la reacción enzimática hasta cierto límite [52].

Por otra parte, un aumento de 10°C duplica la velocidad de la reacción, pero llegado cierto límite, el calor pasa a ser contraproducente con la actividad enzimática ya que al acrecentar la temperatura aumenta la fracción de moléculas capaces de tener una energía suficiente para alcanzar un "estado activado" que luego se transforme en producto de la reacción por formación o ruptura de enlaces químicos. Además, el pH óptimo de la actividad enzimática es 7 (excepto en las enzimas digestivas, situadas en el contexto [ácido](#) del estómago) [52].

2.5 Biorreactores en la inmovilización

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos [35]. Son de una gran actividad catalítica, alta especificidad de sustrato y muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

Muchas enzimas usadas en la industria son demasiado costosas, presentan una baja estabilidad a las condiciones de trabajo y, al ser usualmente solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil y por lo tanto no se pueden reutilizar [36]. Cuando son insolubilizadas en una matriz adecuada resulta un biocatalizador que puede ser reusado varias veces, y por lo tanto se disminuyen los costos del proceso [53,54], permitiendo un mejor control de la reacción y el diseño de reactores que pueden ser fácilmente incorporados dentro de una línea de un proceso continuo [53].

Los métodos de inmovilización de enzimas ya mencionados anteriormente existen las ventajas de las enzimas inmovilizadas se encuentra el aumento de la estabilidad de la enzima, la posibilidad de reutilizar la enzima disminuyendo costos del proceso y aumentando su productividad y la facilidad para el uso de biorreactores de procesos en continuo. [35,54,55]

2.6 Nanoestructuras en la inmovilización de enzimas

Al principio de la interacción, las enzimas fueron inmovilizadas en materiales nanoestructurados por métodos convencionales, como el simple atrapamiento o el enlace covalente. Las nanoestructuras utilizadas pueden ser nanoesferas, nanofibras, nanotubos o materiales nanoporosos. Estas preparaciones presentan ventajas tales como una mayor superficie de reacción, mayor carga enzimática, y en muchos casos mayor estabilidad que las enzimas

convencionalmente inmovilizadas, Sin embargo, actualmente se explora aprovechar otras propiedades de los materiales nanoestructurados, además de la del tamaño. El perfecto control sobre el tamaño de poro, la conductividad eléctrica, el magnetismo, la hidrofobicidad o hidrofiliidad, son características de los nanomateriales que han revolucionado la biocatálisis [56,57,58].

2.7 Nanofibras

2.7.1 Mecanismos de Obtención de Nanofibras

Las nanofibras poliméricas pueden ser procesados por un número de técnicas tales como se muestran en la tabla 5 [59].

Estirado (Drawing)	Síntesis por molde	Separación de fase	Auto ensamblaje	Técnica del electrohilado
<ul style="list-style-type: none"> Las nanofibras pueden ser fabricadas a través del proceso de "drawing". En esta una micropipeta con un diámetro de unos pocos micrómetros es sumergida dentro de una gota cerca de la línea de contacto usando un micromanipulador 	<ul style="list-style-type: none"> Este método implica el uso de un molde o plantilla para obtener un material o estructura deseada. Para la fabricación de nanofibras, se utiliza una membrana de óxido metálico con unos poros cuyo diámetro está en el rango nanométrico. 	<ul style="list-style-type: none"> En esta técnica un polímero es mezclado con un solvente antes de que experimente la gelificación. El principal mecanismo de este proceso es como su nombre lo sugiere, la separación de fase debido a la incompatibilidad física. El solvente es extraído dejando la otra fase restante. 	<ul style="list-style-type: none"> Se refiere a la construcción de nanofibras usando moléculas pequeñas como componente básico. El principal mecanismo para un auto ensamblaje son las fuerzas intermoleculares que mantienen juntas las pequeñas unidades. 	<ul style="list-style-type: none"> El proceso del electrohilado permite obtener fibras por medio de estiramiento coaxial de una solución viscoelástica, estas fibras poseen diámetros que van de las sub micras a los nanómetros rangos en los que es posible encontrar características únicas, entre las que se encuentra: un área superficial muy grande en relación al volumen (en el caso de las nanofibras, esta relación puede ser un aproximado de 10^3 veces más que una microfibras)

Tabla 4: Mecanismos de obtención de fibras

2.8 Técnica del electrohilado

En 1969, Taylor [60] estudió fundamentalmente la forma de la pequeña gota polimérica en la punta de la aguja y demostró que esta tenía la forma de un cono en el que el chorro de polímero era expulsado desde el vértice del cono referido como el “cono de Taylor”. En los años siguientes la mayoría de los investigadores enfocaron su estudio sobre la morfología estructural y caracterización de las fibras.

Desde 1980 y especialmente en años recientes, un gran esfuerzo ha sido concentrado sobre la técnica electrohilado debido a un renovado interés en la nanotecnología, lo cual derivó en nuevas y potenciales aplicaciones de las nanofibras en diferentes áreas tales como son membranas para filtraciones, trajes protectores, soporte para catálisis y materiales adsorbentes.

2.8.1 Aspectos Fundamentales del electrohilado

Las características básicas de la técnica del electrohilado son descritas en la figura 4, en la que un electrodo es insertado en la solución polimérica y el otro electrodo al colector, el cual a su vez es conectado a tierra. Cuando un alto voltaje es aplicado, la repulsión de cargas en la superficie del fluido provoca una fuerza directamente opuesta a la tensión superficial del fluido. Cuando el campo eléctrico es incrementado, la superficie semiesférica del fluido en la punta de la aguja del inyector se elonga hasta llegar a la forma cónica llamado “cono de Taylor”. Un chorro de fluido cargado es expulsado desde la punta del cono de Taylor, cuando la fuerza electrostática vence la tensión superficial en un valor crítico del campo eléctrico. Una característica observada durante este proceso es la salida aleatoria del chorro polimérico conocida como “*whipping*”. La evaporación del solvente toma lugar desde las fibras poliméricas cargadas hasta el camino al colector produciendo sobre el colector una estera de fibras no tejidas [60].

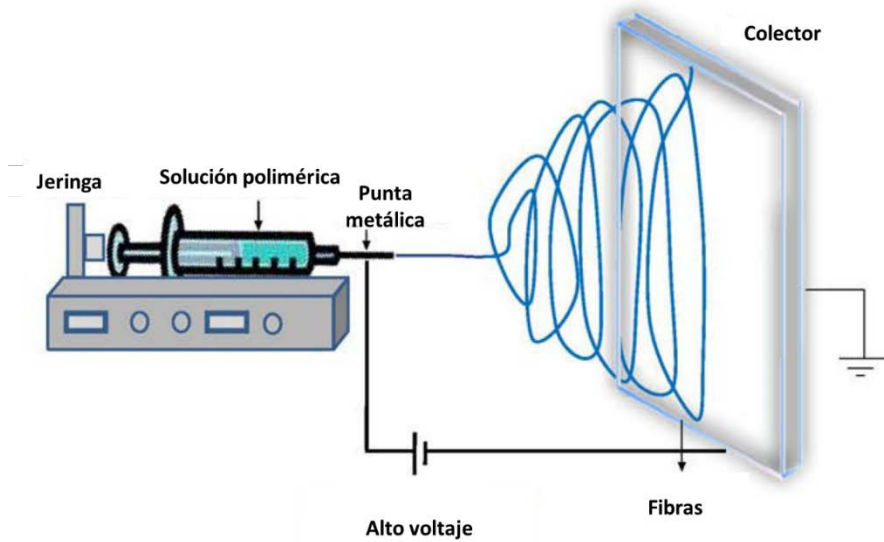


Figura 4: Representación esquemática del Sistema de electrohilado

2.8.2 Parámetros de la técnica electrohilado

Aunque la mayoría de las fibras que son producidas a través de esta técnica son filamentos sólidos de forma circular; hay ocasiones en las que estructuras tipo tubos, cintas, alambres, o tipo gotas se hacen presentes en la morfología de las nanofibras electrohiladas.

Hay muchos factores que afectan la producción de nanofibras en la técnica electrohilado [61]:

- Las propiedades de la solución polimérica, tales como: la concentración de la solución, la elasticidad, la conductividad y la tensión superficial.
- Parámetros del proceso, tales como: el intervalo de separación entre la punta de la aguja del inyector y el colector, el voltaje aplicado y la presión hidrostática en el contenedor de la solución.
- El efecto del medio ambiente, tales como: la temperatura, humedad y el flujo de aire.

2.8.3 Parámetros de la solución

Se ha demostrado que los parámetros de la solución influyen notablemente en la obtención de fibras y en la morfología de las mismas. Se describen a continuación algunos de los parámetros más importantes a considerar [62,63,64]

- **Efecto de la concentración:** Se requiere de una concentración crítica para que los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permitan la formación de fibras bajo la acción del campo eléctrico aplicado. Si la concentración de polímero se encuentra debajo de una concentración crítica, los entrecruzamientos físicos entre las cadenas poliméricas no alcanzan a contrarrestar estas fuerzas y el microchorro se rompe, obteniendo un pulverizado de gotas.
- **Viscosidad:** La viscosidad de la solución polimérica está relacionada con el peso molecular del polímero disuelto y el solvente. A mayor peso molecular, mayor es la viscosidad de la solución.
- **Solventes:** Los solventes utilizados influyen y determinan varios aspectos del proceso de electrohilado. En primer lugar, afectan la conformación de las cadenas poliméricas en solución, e influyen en la facilidad del transporte de la carga del microchorro.
- **Conductividad:** La conductividad de la solución polimérica es fundamental en la producción de fibras por electrohilado, dado que influye en la repulsión electrostática de las cargas superficiales presentes en la solución.
- **Tensión superficial:** La tensión superficial de la solución es la fuerza principal a vencer para lograr el estiramiento del microchorro y la producción de nanofibras.
- **Factores ambientales:** Por último, si bien en la mayoría de los casos se realiza el proceso de electrohilado en atmósfera de aire, también puede realizarse en presencia de nitrógeno u otros gases que modifican el proceso de secado del microchorro y la pérdida de cargas eléctricas superficiales al ambiente.

3. Hipótesis

Es posible la inmovilización de la enzima pepsina en nanofibras poliméricas mediante la técnica de electrohilado.

4. Objetivo general

La inmovilización de la enzima pepsina en nanofibras poliméricas será posible a través de la técnica de electrohilado, mediante la optimización del proceso de inmovilización de la enzima pepsina se mejorará la actividad enzimática bajo distintas condiciones de pH, temperatura y diferentes ciclos de reutilización. La enzima pepsina inmovilizada tendrá potenciales aplicaciones en el área médica en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas tales como la artritis y en la industria alimenticia dado las propiedades de degradación de colágeno de esta enzima proteasa.

5. Objetivos específicos

- Encontrar los parámetros de óptimos de operación y de solución para el electrohilado de soluciones de PVA conteniendo diferentes concentraciones de la enzima pepsina.
- Encontrar las condiciones óptimas de electrohilado para obtener una mejor morfología en las nanofibras electrohiladas.
- Establecer y optimizar la metodología para la medición de la actividad enzimática de la enzima pepsina inmovilizada en nanofibras electrohiladas poliméricas.
- Medir la actividad enzimática de la enzima inmovilizada bajo distintas condiciones de pH, temperatura, tiempo de entrecruzamiento, ciclos de reutilización y tiempo de almacenamiento.

- Analizar las interacciones que puedan presentarse entre las moléculas pertenecientes a la enzima inmovilizada y la matriz polimérica de nanofibras sintetizadas, por medio de las técnicas espectroscópicas y calorimétricas.

6. Experimentación

6.1 Materiales y reactivos

Pepsina de la mucosa gástrica porcina (E.C. [3.4.23.1](#) ≥ 400 u/mg), Poli (vinil alcohol) (PVA) con 87-89% hidrolizado y un peso molecular promedio en (Mw) de 13-23 kg/mo, Poli (vinil alcohol) (PVA) de medio peso 99+% hidrolizado, glutaraldehído grado I 50% acuoso (Mw 100.12 g/mol), tyrosine and trichloroacetic acid, Tris buffer, ácido acético grado reactivo ACS $\geq 99.7\%$, Fosfato de potasio dibásico grado reactivo ACS $\geq 98\%$ (P.M. 174.18), albúmina de suero bovino (BSA) polvo liofilizado $\geq 96\%$, ensayo proteínico Bradford/Bio-Rad reactivo colorante, reactivo de Folin-Ciocalteau.

6.2 Equipos utilizados

Microscopio electrónico de barrido (MEB) modelo FEI Nova Nano Sem Model 200, Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), calorímetro diferencial de barrido (DSC) modelo TA Instruments Q1000, espectrofotómetro de ultravioleta-visible (UV/Vis) modelo Perkin Elmer Lambda UV 35, fuente de alto voltaje de corriente directa marca *Gamma*, bomba de inyección marca *New Era PumpSystems, Modelo No. NE-300*.

6.3 Elaboración de PVA

Para la preparación de la solución de PVA se pesaron 2.5 g de Poli (vinil alcohol) de medio peso y 2.5g de Poli (vinil alcohol) de bajo peso y se depositaron en un matraz bola de 50ml, posteriormente se agregaron 50ml de agua desionizada, una vez realizado ese procedimiento es recubierto con aluminio en toda su totalidad esto ayudara a distribuir el calor de manera uniforme sobre el matraz, esto se deja en agitación una hora a una temperatura no mayor a 100°C hasta obtener una solución homogénea. El PVA permanece estable durante largos períodos de tiempo en recipientes cerrados.

6.4 Montaje de electrohilado

El típico montaje para la ejecución de la técnica de electrohilado, consta de un capilar a través del cual debe ser expulsada la solución polimérica (aguja, cono, etc.); una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno al lugar de salida de la solución y otro directamente al plato colector (lamina de metal conductor con un área superficial de 5x5 cm²) donde se depositarán las fibras posteriores a la evaporación del disolvente. La bomba de inyección se utilizó para liberar la solución de PVA a una concentración determinada de enzima, la velocidad utilizada para esta experimentación fue 0.50ml/h utilizando una corriente de 15 kV, utilizando una distancia de 10cm entre la aguja y el colector metálico.

6.5 Encapsulación de enzima pepsina electrohilada en una matriz de PVA

Las muestras de papaína inmovilizada se prepararon utilizando una solución de poli (vinil alcohol) (PVA) de 10% v/w utilizando ambos tipos de polímeros alto y bajo peso molecular. Se agrego enzima en solución polimérica hasta obtener los porcentajes deseados (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%) con respecto al peso del polímero, posteriormente se realiza el electrohilado

manteniendo un voltaje de 20 kV y una velocidad de 0.50ml/h para cada una respectivamente. Cada una se dividió en 4 partes para utilizarlas en distintas pruebas.

6.5.1 Inmovilización de pepsina

La inmovilización de la enzima pepsina encapsulada en la matriz de PVA se llevó a cabo por medio de entrecruzamiento mediante glutaraldehído. De manera general, los métodos de inmovilización de enzimas se clasifican en físicos y químicos. Su diferencia radica en que en los físicos las interacciones entre la enzima y el soporte son débiles, mientras que, en los químicos, la enzima y el soporte se unen a través de enlaces covalentes. En el caso de entrecruzamiento químico, el aldehído es el agente de entrecruzamiento más utilizado para realizar la inmovilización de enzimas, este método se ha utilizado en nuestro grupo de investigación en trabajos previos (agrega referencias). Para esto las fibras fueron expuestas al vapor de glutaraldehído a diferentes pedidos de tiempo (1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas). Posteriormente se colocaron las muestras en una estufa a 50°C, una vez terminado el periodo de tiempo las muestras se retiran de la estufa y se almacenan a temperatura ambiente para ser usadas posteriormente.

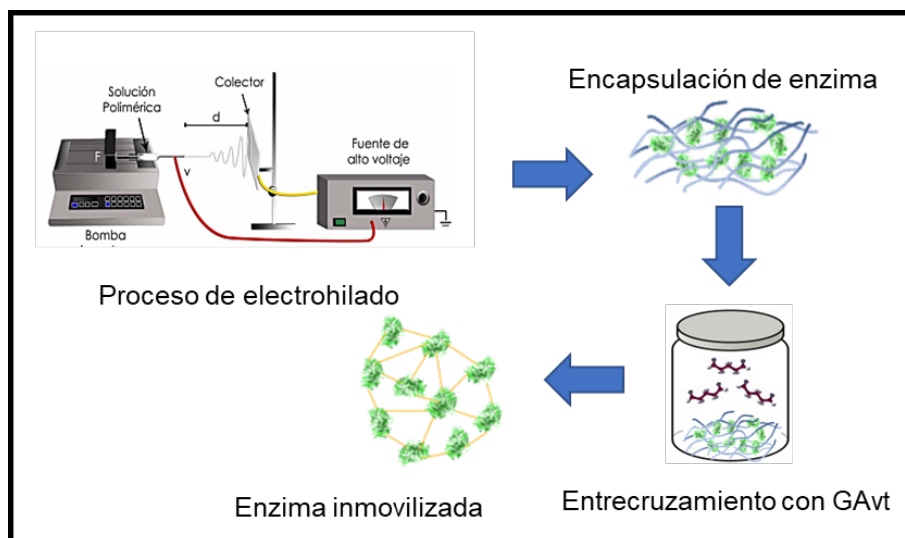


Figura 5: Proceso de encapsulación e inmovilización de la enzima pepsina

6.6 Determinación de actividad enzimática de las nanofibras

Se utilizó el método Folin-Ciocalteu basada en el ensayo de Giuseppe Cirillo y colaboradores [65]. El Folin-Ciocalteu, se utiliza para cuantificar los polifenoles totales. Para su cálculo es necesario que la sustancia esté en disolución. Se basa en la interacción de los polifenoles con el reactivo Folin activado con el carbonato de sodio. La reacción entre el reactivo Folin y los polifenoles se realiza en medio ácido. Como resultado da un rango de colores; da una coloración azul, cuyo máximo de absorción es a una longitud de onda de 750 nm. Este procedimiento se realizó para calcular la actividad de la enzima en estado libre y de la enzima inmovilizada en las nanofibras de matriz polimérica PVA.

Para realizar la determinación de la actividad enzimática de la enzima pepsina libre e inmovilizada se determinó midiendo la concentración de tirosina producida por la enzima. En un vial de vidrio se pesan 0.010 g de albúmina de suero bovino (BSA), posteriormente se agrega la nanofibra inmovilizada con 3 ml de buffer pH 3, el vial se coloca en la plancha aplicando calor a 40°C y se deja en agitación 30 min. Una vez terminado este proceso la reacción se detiene mediante la adición de 1 ml de una solución de ácido tricloroacético (TCA). La mezcla se deja reposar durante 30 min a 4°C para posteriormente ser centrifugado a una velocidad de 9500 rpm durante 30 min. Terminando el centrifugado se toma 1 ml del sobrenadante diluido en 6 ml de agua desionizada y 1 ml de Folin-Ciocalteu. Después de 3 min, se añadieron 3 ml de carbonato de sodio y la mezcla se dejó reposar durante 2 h con agitación intermitente. La absorbancia se midió a 750 nm frente a un control, y se comparó con la curva de calibración de tirosina libre.

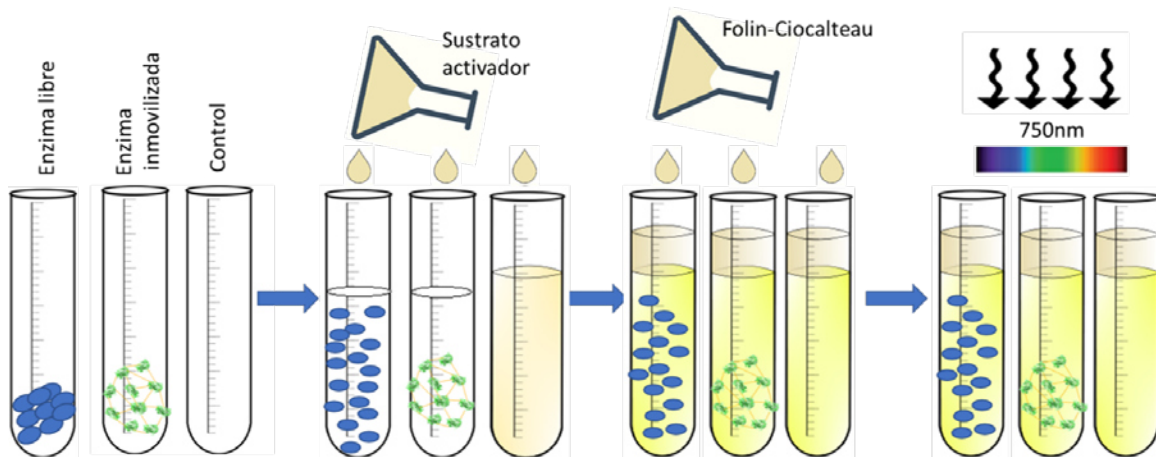


Figura 6: Proceso de medición de actividad enzimática

6.7 Determinación de carga enzimática

La determinación de proteínas por el método de Bradford es ampliamente usada ya que es simple, rápida, barata y sensible. La estructura terciaria de las proteínas y aminoácidos específicos son importantes en este método de determinación enzimática. Esta unión se realiza a través de grupos ionizados y consiste en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible del colorante cuando éste se une a la proteína, así el colorante cambiaría de color de marrón a azul proporcionalmente en función del contenido proteico de la muestra. Para llevar a cabo esta experimentación se realizó el ensayo Bio-Rad. Lo cual se obtuvo una curva de calibración a partir de soluciones tomando diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml), tomando como blanco 20 μ l de agua desionizada. Para cada una de las muestras se le agregó 1 ml de ensayo Bradford y se deja en reposo entre 5 a 10 min, una vez terminado el tiempo de reacción se lleva al UV-VIS para realizar su correspondiente lectura a 595 nm.

El ensayo se utiliza para la determinación de la cantidad de enzima en las nanofibras, lo cual se coloca un tubo de ensayo, se le agrega la nanofibra y se le coloca 3 ml de solución buffer PBS pH8 0.01M y se deja en reposo por 24 horas, una vez pasando el tiempo de reposo se toman 20

μl del sobrenadante que serán depositados en viales de vidrio para así agregar 1 ml del reactivo Bradford y dejarlo en reposo de 5 a 10 min una vez concluido el tiempo se lleva al UV-VIS para realizar la lectura a cada una de las muestras a una longitud de onda de 595nm [65].

6.7.1 Actividad enzimática en las nanofibras en ciclos

La determinación de esta actividad se obtuvo utilizando las fibras con la concentración enzimática ya establecida utilizando el mismo ensayo ya mencionado anteriormente, cada una de las fibras fueron colocadas en tubos de ensayo, posteriormente se pesó 0.010 g de albúmina de suero bovino (BSA), se agregaron 3 ml de pH 3, y se dejó en agitación por 30 min a 45°C. Terminado este proceso se detiene la reacción con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) y se deja reposar 30 min a 4°C. Una vez terminando el tiempo de reposo las fibras se retiran y se colocan en un tubo de ensayo que contiene buffer acetato pH 3 estas se dejan reaccionar una hora. Pasando el periodo de tiempo las fibras fueron retiradas y se volvieron a colocar en un nuevo tubo de ensayo conteniendo pH 3 y se dejó actuar por otra hora, mientras la reacción anterior fue detenida la mezcla se centrifuga a 9500 rpm por 30 min, terminando el proceso se toma 1 ml del sobrenadante agregando 6 ml de agua desionizada y 1 ml de Folin-Ciocalteu, dejando reposar 3 min se agregan 3 ml de carbonato de sodio y se deja en agitación por 2 horas para posteriormente obtener la lectura en el UV-VIS a una longitud de onda de 750nm. Cada vez que un ciclo se detiene, se repetirá el mismo procedimiento.

6.7.2 Actividad enzimática de las nanofibras almacenadas

Para determinar la actividad en las nanofibras almacenadas seguiremos utilizando el mismo ensayo ya mencionado anteriormente. Las fibras que se utilizarán serán las fibras con concentración enzimática ya establecidas las cuales fueron depositadas en tubos de ensayo cada una respectivamente; este ensayo es parecido al de la actividad enzimática en ciclos, la

diferencia radica en que en este procedimiento la fibra se enjuaga en un tubo de ensayo que contiene 3 ml de buffer pH3 la cual se deja en agitación por 3 min, se retira la fibra y se almacena en el refrigerador por un periodo de horas. Terminado el periodo de horas se vuelve a realizar el mismo ensayo sobre la misma fibra y se repite el proceso de enjuague de la fibra y posteriormente se vuelve a almacenar, este proceso se realizó a diferentes tiempos de almacenamiento (1 hora a 7 horas y 1 día a 14 días).

6.7.3 Actividad enzimática a diferentes pH

Esta actividad se realizó preparando buffers a diferentes escalas de pH de 1 a 5. La preparación de cada pH se realizó a partir de ácido acético y acetato de sodio. Para la realización de esta actividad, se tomó el ensayo de Folin-Ciocalteu ya utilizado anteriormente, el buffer pH 3 se reemplazó utilizando para cada ensayo los pH de diferentes escalas de 1 a 5 ya mencionadas con anterioridad. Cada una de las pruebas se realizó obteniendo las fibras con la concentración enzimática óptima, todas las fibras fueron depositadas en tubos de ensayo individuales, a los cuales se les agregó 5 ml de cada buffer a pH distintos y se dejó actuar por una hora, terminando el proceso se detiene la reacción con ácido tricloroacético (TCA). Una vez terminado todo el proceso se lleva al UV-Vis para realizar la lectura a 750nm.

7. Equipos utilizados

7.1 Caracterización

Para el estudio de la morfología de las nanofibras electrohiladas se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM). Con ayuda del software ImageJ, se realizó la medición de diámetros para las nanofibras. Para realizar estas pruebas se usó un equipo de modelo FEI Nova

Nano SEM Model 200. La presencia de la enzima en las nanofibras electrohiladas fue confirmada por medio de espectroscopia de infrarrojo (FTIR) con un espectrofotometro Perkin Elmer FT-IR/FIR Spectrometer Frontier. Para el análisis térmico de las nanofibras se realizaron pruebas a través del método calorimétrico diferencial de barrido (DSC) modelo TA Instruments Q1000. Las pruebas para la medición de la actividad enzimática, así como la carga enzimática fueron medidas a través de espectroscopía de Ultravioleta-visible y llevadas a cabo utilizando un equipo Shimadzu 2401.

8. Resultados y discusiones

8.1 Morfología

Para la realización del análisis morfológico se utilizó un equipo de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Para este trabajo de investigación se obtuvieron fibras por el método de electrohilado a partir de una solución de poli (vinil alcohol) a diferentes concentraciones de enzima para cada prueba. El análisis de morfología de fibras se realizó mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), donde se encontraron diámetros con rangos de 70 a 207nm.

En la figura 7 se muestra el efecto de la concentración de enzima sobre la morfología final de las nanofibras de PVA, en donde se puede observar el efecto que provoca el aumento de la concentración de enzima pepsina en la solución de polímero electrohilada. Las nanofibras de PVA sin contenido enzimático se muestran en la (figura 7A), donde se puede observar una morfología sin defectos y un diámetro promedio de 96nm. Posteriormente la enzima se encapsuló obteniendo un aumento gradual en el diámetro conforme se incrementaba el contenido de enzima en la solución polimérica. Este incremento de diámetro se ha reportado para sistemas de inmovilización de enzimas en nanofibras poliméricas [66], así como la aparición de defectos superficiales en el análisis de morfología reportado para estos trabajos. Es

en este sentido que tomando como referencia la fibra sin ninguna carga enzimática (figura 7a), en la que se presenta una morfología libre de defectos, conforme se aumenta la cantidad de enzima encapsulada se puede apreciar la presencia de algunos defectos en forma de cuenta; sin embargo, estos no afectaron de manera significativa el rango de diámetro obteniendo así rangos de diámetros entre 70 a 207nm para cada concentración respectivamente, ni en las interacciones de las nanofibras en las pruebas de actividad enzimática realizadas posteriormente (figura 7 y 8). Debido a que todas las fibras se trabajaron con las mismas condiciones de electrohilado, para esta investigación se consideró óptima la morfología obtenida utilizando un 25% de contenido enzimático, ya que esta demostró estar casi libre de defectos, así como una mayor actividad enzimática como será reportada posteriormente en las pruebas de actividad enzimática.

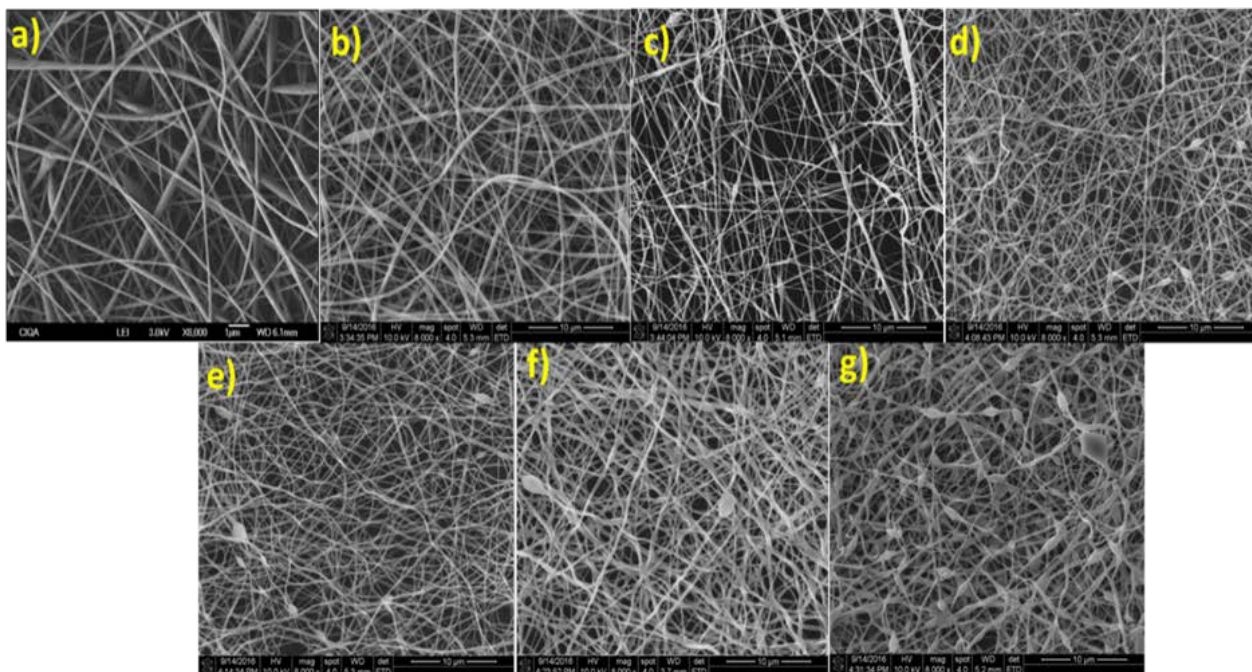


Figura 7: Imágenes de SEM con aumento de la concentración enzimática en nanofibras con matriz de PVA.

a) PVA, b) 5%, c) 10%, d) 15%, e) 20%, f) 25%, g) 30%.

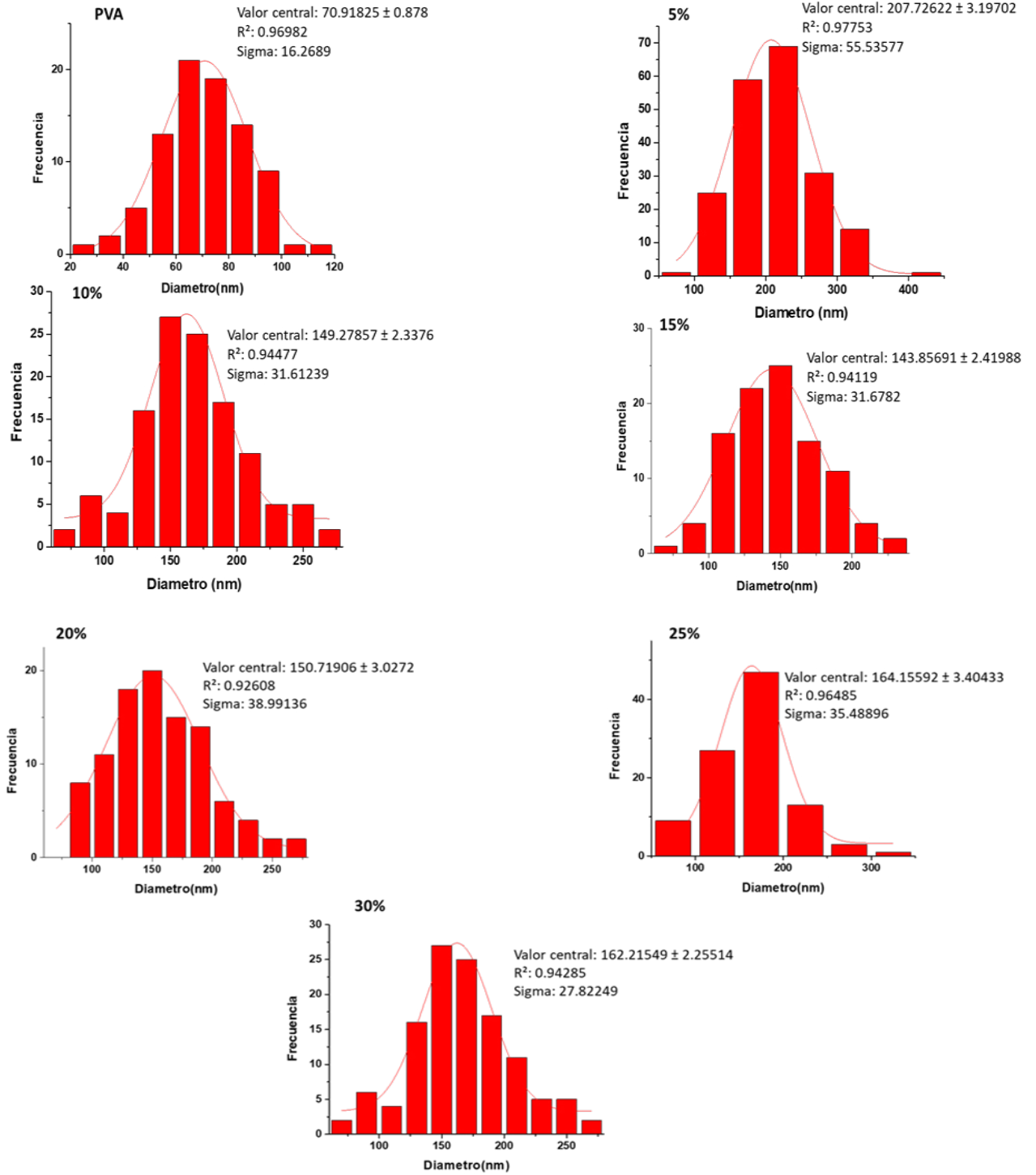


Figura 8: Distribución de diámetros de nanofibras al incrementar la concentración enzimática.

a) PVA, b) 5%, c) 10%, d) 15%, e) 20%, f) 25%, g) 30%

Se realizó el análisis de distribución de diámetros con ayuda del programa ImageJ, esto para demostrar que las nanofibras se encontraran dentro del diámetro nanométrico. En las figuras 7 y 8 se puede apreciar que hay una tendencia al incremento de diámetro en la distribución Gaussiana obteniendo valores centrales entre 162 y 207 nm. Cada una de estas distribuciones de diámetro muestran un grado de ajuste mayor a los 0.90 en el modelo Gaussiano.

8.1.1 Efecto de entrecruzamiento sobre la morfología de las nanofibras

Para este trabajo se analizó el efecto del proceso de entrecruzamiento por exposición a vapor de glutaraldehído sobre la morfología de las nanofibras (figura 9). Como se discutió anteriormente, las nanofibras conteniendo la concentración enzimática de 25% fueron expuestas a vapor de glutaraldehído durante diferentes periodos de tiempo (1, 2, 3, 4, 5 h). En la figura 9a se puede apreciar la morfología de la muestra de nanofibras que se sometió a vapor de GAvt por 1 hora. La muestra presentó una morfología libre de defectos y un valor central en la distribución de diámetro de 132 nm (figura 10).

Por otra parte, se observa que a mayores tiempos de exposición a vapor de GAvt. las nanofibras empiezan a perder su estructura nanofibrosa obteniendo un aumento drástico en la distribución de diámetros (figura 10). De igual manera a partir de la tercera hora, se observa la presencia de defectos en forma de cuenta en la superficie de la nanofibras. No obstante, se pueden mencionar similitudes de diámetro entre la morfología de las muestras sometidas a 1 y 2 horas de entrecruzamiento por exposición a vapor de GAvt. Este tipo de efecto del tiempo de entrecruzamiento en la morfología de las nanofibras electrohiladas se ha reportado antes por nuestro grupo en la encapsulación e inmovilización de distintas enzimas proteasas utilizando este mismo método [66,67,68].

Tomando en cuenta los resultados anteriores podemos deducir que la morfología óptima para esta investigación se dio a una hora de exposición a vapor de GAvt, ya que fue en este tiempo de entrecruzamiento cuando se cumplió con las características requeridas para la realización de este trabajo, a saber: mantener la morfología nanofibrosa, menor cantidad de defectos en forma de cuenta posibles y mantener su diámetro en el rango nanométrico.

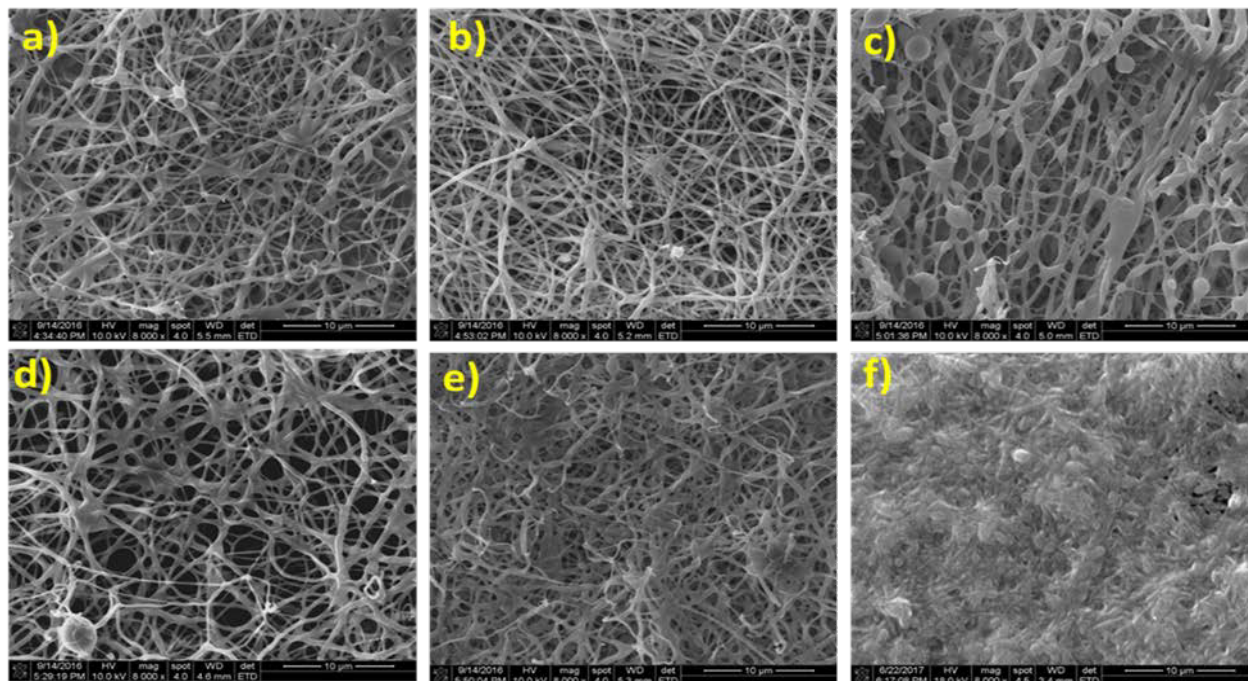


Figura 9: Efecto de tiempo de entrecruzamiento en la morfología de las nanofibras a) 1hora, b) 2horas, c) 3horas, d) 4horas, e) 5 horas, f) después del buffer.

En el análisis de distribución de diámetro se observa un aumento cada vez que aumentamos el tiempo de exposición de glutaraldehído a las fibras (figura 10). Esto puede deberse a la acción que ejercen las moléculas de glutaraldehído absorbidas por la matriz de PVA y la interacción con el grupo funcional con la misma.

En la (figura 9f) se muestran la fibra con tiempo de entrecruzamiento óptimo, la cual fue sometida al contacto con el medio de reacción. Podemos observar en esta figura como la mayor parte de la morfología nanofibrosa de las muestras fue conservada después de su contacto con el medio de reacción [65]. La (figura 10f) se muestra el análisis de distribución de diámetro, lo cual se muestra un incremento en el diámetro, esto podría estar relacionado con la absorción del vapor del glutaraldehído dentro de la estructura de la nanofibra.

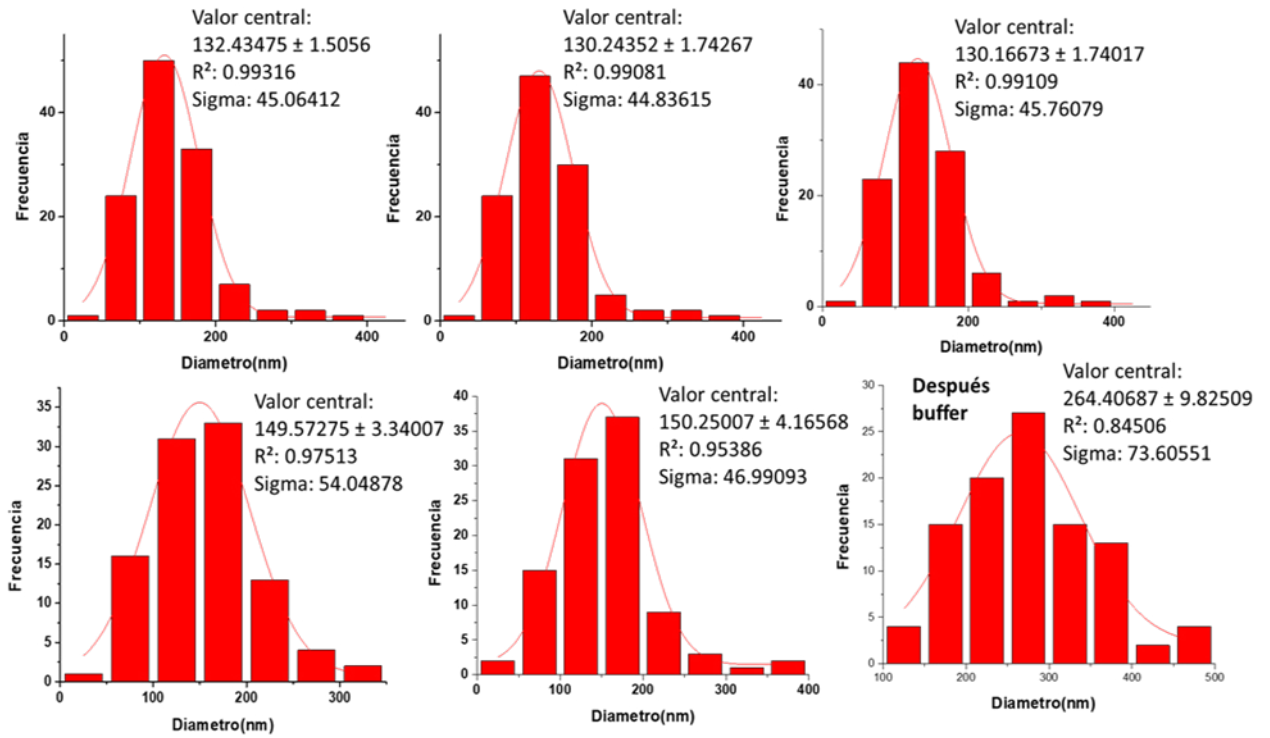


Figura 10: Distribución de diámetros de las nanofibras entrecruzadas a diferentes horas.

a) 1 hora, b) 2 horas, c) 3 horas, d) 4 horas, e) 5 horas, f) después del buffer.

8.2. Presencia de la enzima pepsina en nanofibras de PVA

8.2.1 Análisis por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

La presencia de la enzima pepsina en nanofibras electrohiladas de PVA, se realizó mediante el análisis de infrarrojo por transformada de fourier (FT-IR). En la figura 12 se muestra una comparativa entre la fibra de PVA, la enzima pepsina en polvo, PVA con la enzima pepsina encapsulada, PVA con enzima pepsina encapsulada expuesta a vapor de glutaraldehído respectivamente.

A primera vista las fibras de PVA se puede observar que hay un estiramiento del enlace C-O en 1091 cm^{-1} , también se observa una banda de estiramiento de 3315 cm^{-1} que corresponde a la presencia del grupo OH.

En la figura 12 b se puede observar el espectro de la enzima libre con bandas de absorción características de la pepsina libre a 1648 cm^{-1} asignada a la región de la amida I y a 1536 cm^{-1} correspondiente a la región de la amida II.

En la figura 12c se puede observar el espectro correspondiente a la enzima encapsulada en las nanofibras de PVA, en el cual podemos observar la banda de absorción a 1648 cm^{-1} correspondiente a la amida I y también la banda de absorción de 1536 cm^{-1} , que corresponde a la amida II, estas vibraciones se han atribuido a la flexión de N-H y las vibraciones de tensión de C-N, respectivamente [69,70]. Ya que la presencia de estas bandas es característica de la estructura proteínica de las enzimas, podemos confirmar la presencia de la enzima pepsina en las nanofibras de poli vinilalcohol. Por otra parte, en el espectro de las nanofibras entrecruzadas se observa una banda de absorción a 1720 cm^{-1} correspondiente a los grupos aldehídos, lo cual confirma la presencia del glutaraldehído en la estructura nanofibrosa (figura 12d). Este pico de absorción también se puede apreciar en el espectro del glutaraldehído (figura 12e). De igual manera en el espectro de las muestras entrecruzadas también se puede apreciar el pico de

absorción a 1143 cm^{-1} indicando la formación del enlace C-O-C generado por la reacción entre el grupo funcional OH en la estructura molecular de PVA y el enlace - C - de la molécula de glutaraldehído (figura 12d) [66,71].

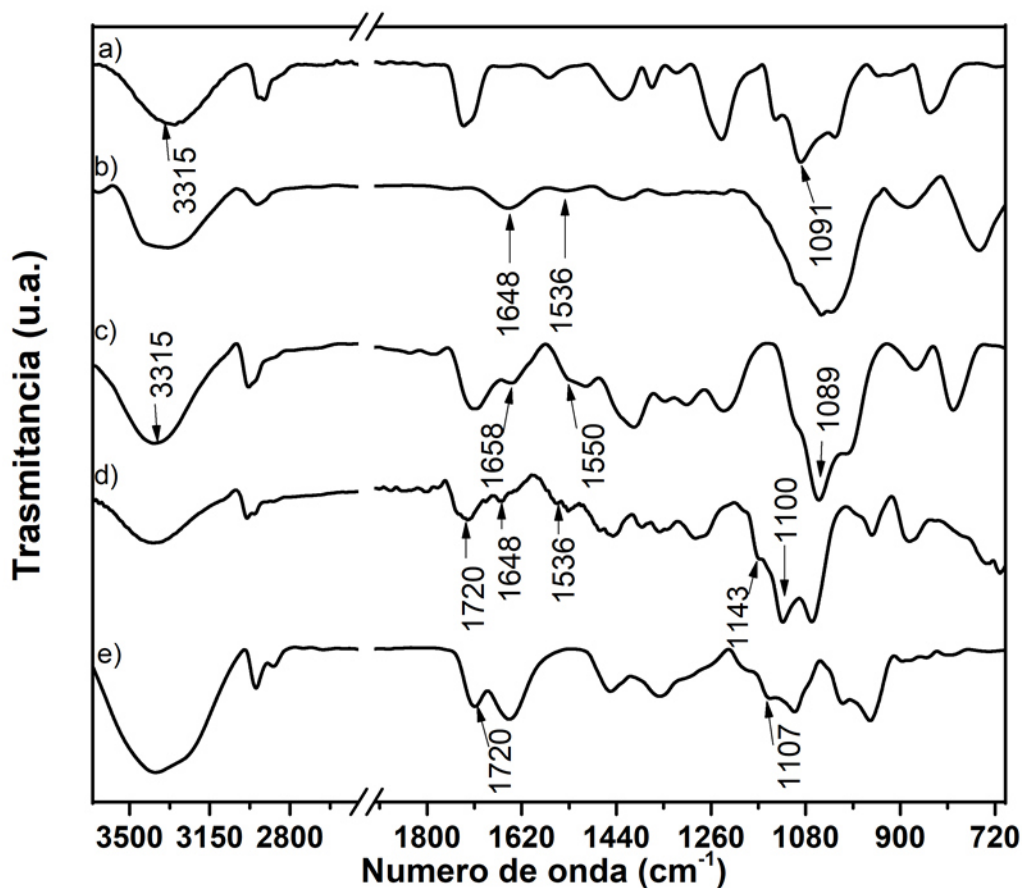


Figura 12: Espectros de infrarrojo

a) Fibra PVA b) Enzima Pepsina c) Fibra PVA con Enzima Pepsina encapsulada d) Fibra Entrecruzada de PVA con Enzima Pepsina, e) Glutaraldehído

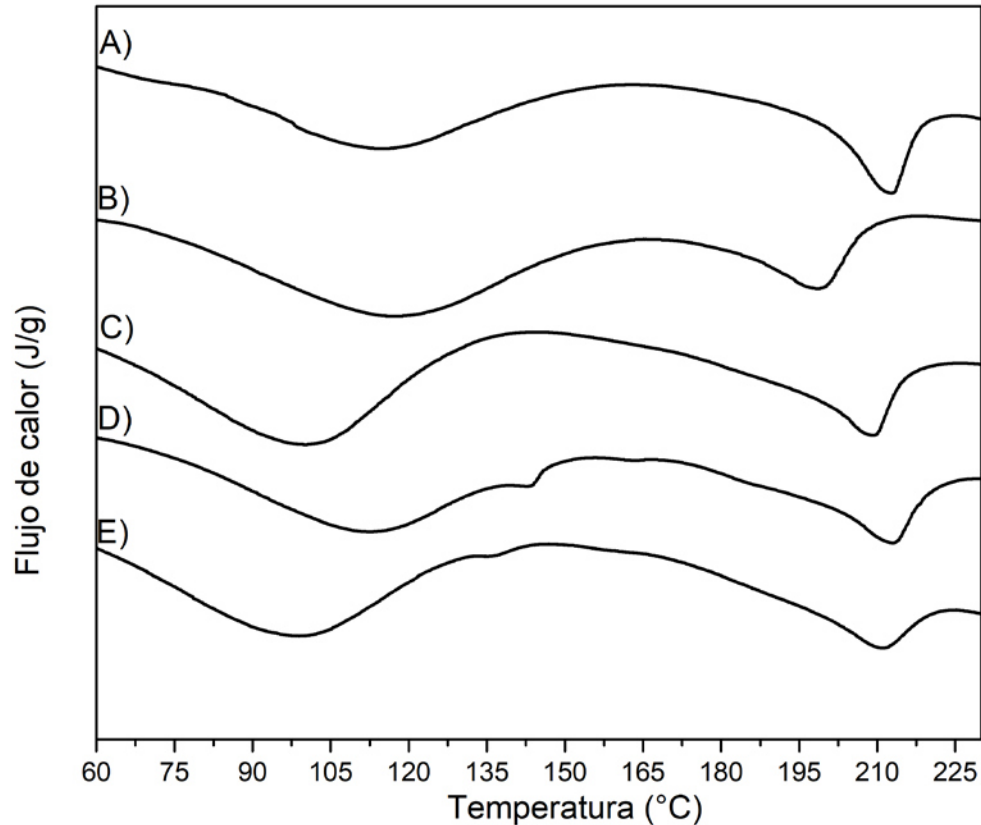
8.3 Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La técnica más utilizada para determinar la T_g es la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la cual detecta la transición vítrea en base al cambio en la capacidad calorífica (Δc_p) durante esta transición. La muestra se calienta a una velocidad constante en una cápsula sellada, y en

general se utiliza una cápsula vacía como referencia. El instrumento registra las diferencias en absorción del flujo de calor entre la muestra y la referencia en función de la temperatura y del tiempo mientras ambas se someten a una misma rampa de temperatura [72,73,74,75].

En esta sección se analizaron las interacciones de las moléculas de la enzima pepsina con las cadenas de PVA a través del estudio de la temperatura de transición vítrea (T_g) y el calor de fusión (H_f) de las muestras por exploración diferencial calorimetría (DSC). En la figura 13 se muestra el análisis de efecto del tiempo de reticulación en la temperatura de transición vítrea (T_g) de la matriz de nanofibras de PVA conteniendo pepsina inmovilizada.

El análisis de la influencia del tiempo de reticulación en el comportamiento térmico de las muestras se estudió a partir de un tiempo de entrecruzamiento de 1 h. En este análisis, a partir del tiempo de entrecruzamiento de 2 h la T_g disminuyó rápidamente. Estos resultados sugieren que, a partir de 2 h de tratamiento de reticulación por medio de exposición a vapor de GAvt, el exceso de moléculas de GAvt que no alcanzó a reaccionar con las macromoléculas de PVA y la enzima se aglutinó en una sola fase, la cual comenzó a tener un efecto plastificante sobre la fase total de la matriz nanofibrosa [76,77,78].



**Figura 13: Calorimetría diferencial de barrido a diferentes tiempos de entrecruzado de las fibras de matriz de PVA con concentración 25% de enzima pepsina.
a) 1 hora, b) 2 horas, c) 3 horas, d) 4 horas, e) 5 horas**

Se analizó una correlación del pico de fusión de la matriz de PVA con enzima pepsina inmovilizada y el tiempo de reticulación. Lo cual se observó una disminución progresiva del pico de fusión cada vez que aumentamos la concentración de enzima, esta variación asegura una disminución en la cristalinidad unida a una reacción en el tamaño del cristal en la matriz polimérica esto se debe al aumento en el número de moléculas de la enzima pepsina en la matriz de PVA [78,82]. Por lo tanto, podemos decir que la matriz de PVA está formada por un dominio cristalino, en el que hay poca presencia de moléculas enzimáticas y un dominio amorfo donde la enzima pepsina interactúa con las moléculas de PVA mediante fuertes de interacciones intermoleculares [78,83].

En la figura 14 se muestra el efecto de la cantidad de enzima inicial sobre la T_g de la matriz de nanofibras de PVA que contiene la enzima pepsina encapsulada. Como podemos observar la T_g alcanza un máximo en 15% de contenido enzimático con respecto al peso del polímero. A una concentración de 30% la temperatura de transición vítrea es menor a la que se presentó a 15% de contenido enzimático pero mayor a la presentada por el contenido inicial de 5% de peso en polímero.

El aumento de la T_g hasta llegar a un máximo en 15% de contenido enzimático puede deberse a un entrecruzamiento físico debido a enlaces tipo puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las moléculas de PVA y los grupos amino de las moléculas enzimáticas, lo cual limita el movimiento entre las cadenas poliméricas provocando un aumento de la T_g . Este tipo de entrecruzamiento físico se ha reportado anteriormente para sistemas de encapsulamiento de proteínas utilizando el polivinil alcohol como matriz polimérica [78,79,80]. Siguiendo este razonamiento, la disminución de la T_g para la máxima cantidad contenido enzimático puede explicarse debido a una saturación de los grupos funcionales disponibles en la cadena polimérica para interactuar con los grupos amino de las moléculas de enzima encapsulada, como se ha sido reportado anteriormente por nuestro grupo [79,80,81].

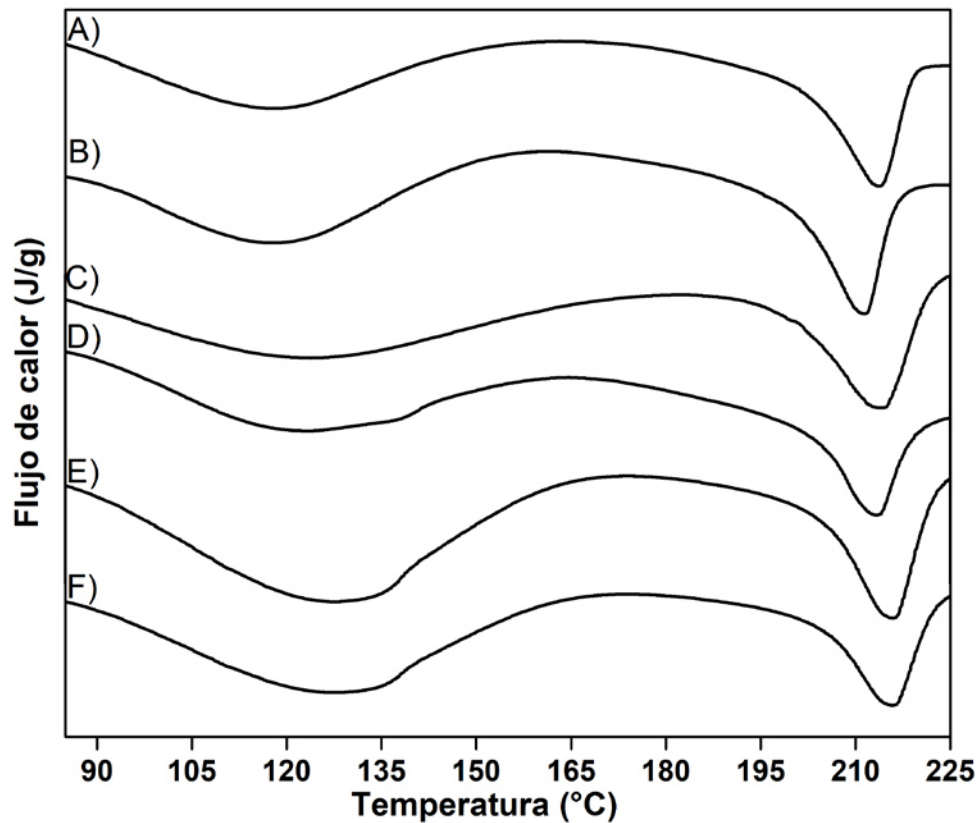


Figura 14: Calorimetría diferencial de barrido de diferentes concentraciones de enzima en matriz polimérica de PVA
a) 5%, b) 10%, c) 15%, d) 20%, d) 25%, e) 30%

8.4 Actividad enzimática de la enzima pepsina inmovilizada

8.4.1 Análisis de carga y actividad enzimática

Para las mediciones de la actividad de la pepsina se emplearon dos ensayos estándar reportados anteriormente por nuestro grupo: actividad enzimática y carga enzimática (agrega referencias).

En la figura 15 se muestra el efecto de la concentración enzimática inicial sobre la actividad enzimática de las muestras electrohiladas. La actividad enzimática máxima se obtuvo en la

muestra de concentración enzimática más “alta” que en este caso fue la de 25%. Este comportamiento podría referirse a la existencia de la colisión que hay entre las moléculas enzimáticas en la catálisis de oxidación del sustrato, lo cual esto limita a la actividad enzimática. Por otra parte, se puede observar que la actividad enzimática no permanece constante, pero llega hasta un punto de saturación, en el que la cantidad limitada de sustrato no permitió un aumento adicional en la actividad enzimática.

Igualmente, se ha investigado y se ha encontrado que las enzimas inmovilizadas en la matriz polimérica de nanofibras sufren una disminución en su actividad enzimática principalmente debido a restricciones relacionadas con un confinamiento de la enzima en una matriz sólida y al hecho de que no todas las moléculas enzimáticas inmovilizadas tienen el mismo acceso al sustrato [84,85].

Las altas concentraciones iniciales de enzima en combinación con el proceso de reticulación podrían limitar la difusión del sustrato hacia el sitio activo de las enzimas inmovilizadas, esto se puede observar en resultados similares publicados en literaturas previas [71].

El alto valor de la carga enzimática corresponde a que la mayoría de las moléculas de enzima inmovilizadas permanecieron activas después del proceso de inmovilización inclusive a altas concentraciones enzimáticas. Es importante mencionar que la tendencia que hay entre la actividad enzimática y la carga enzimática a aumentar para luego conforme se incrementa la cantidad de contenido enzimático se ha reportado en diferentes casos de inmovilización de enzimas electrohiladas [86,87,88,89,90]. Sin embargo, en este trabajo cabe resaltar que tanto la actividad enzimática como la carga enzimática tuvieron una tendencia al alza conforme se incrementó el contenido enzimático en la solución electrohilada; y no fue hasta llegar a una concentración de 25% cuando ambos indicadores de la actividad enzimática comenzaron a disminuir debido a los factores antes mencionados. Debido a los resultados presentados en esta sección y al análisis de morfología de las nanofibras, se tomó la decisión de utilizar la concentración de 25% con respecto al peso del polímero añadido en la solución polimérica a

electrohilar en las pruebas posteriores de actividad enzimática. Por último, cabe resaltar que la actividad relativa de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima libre fue de 96 %, la cual es superior a las actividades relativas con respecto a la enzima libre reportadas en anteriores trabajos de inmovilización de la enzima [85,91].

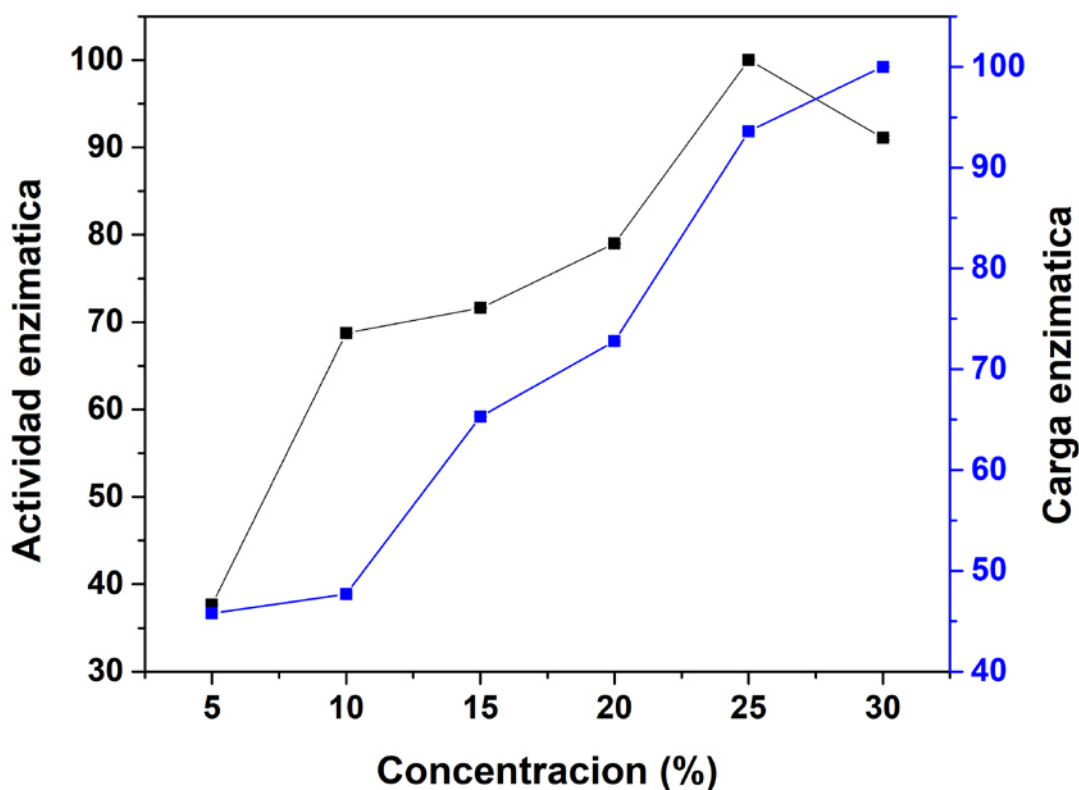


Figura 15: Efecto de la carga enzimática y la actividad enzimática sobre la concentración enzimática de pepsina en las nanofibras con matriz polimérica de PVA.

8.4.1.1 Análisis del efecto del tiempo de entrecruzamiento en la actividad enzimática

El proceso de reticulación se llevó a cabo mediante la exposición de la pepsina encapsulada en nanofibras poliméricas al vapor de glutaraldehído (GAvt) durante diferentes períodos de tiempo. Este tipo de proceso de reticulación usando GAvt es el método más común de inmovilización

enzimática usado en matrices poliméricas, debido a su alta afinidad hacia los grupos amina e hidroxilo [84,91].

En la figura 16 muestra una disminución constante de la actividad enzimática de la enzima inmovilizada con el aumento del tiempo de reticulación. Se sabe por otra parte que el proceso de reticulación limita la accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima inmovilizada, llevando incluso a la inactivación completa de la enzima [84,85].

Por otro lado, mientras mayor sea el tiempo de reticulación, mejor será la resistencia al agua de las nanofibras entrecruzadas. Por lo tanto, considerando este análisis y la evidencia experimental discutida con anterioridad respecto al tiempo máximo de reticulación que se podía tener sin afectar la morfología de las nanofibras, se llegó a la conclusión que el tiempo óptimo de entrecruzamiento por reticulación para este trabajo era de 1 hora.

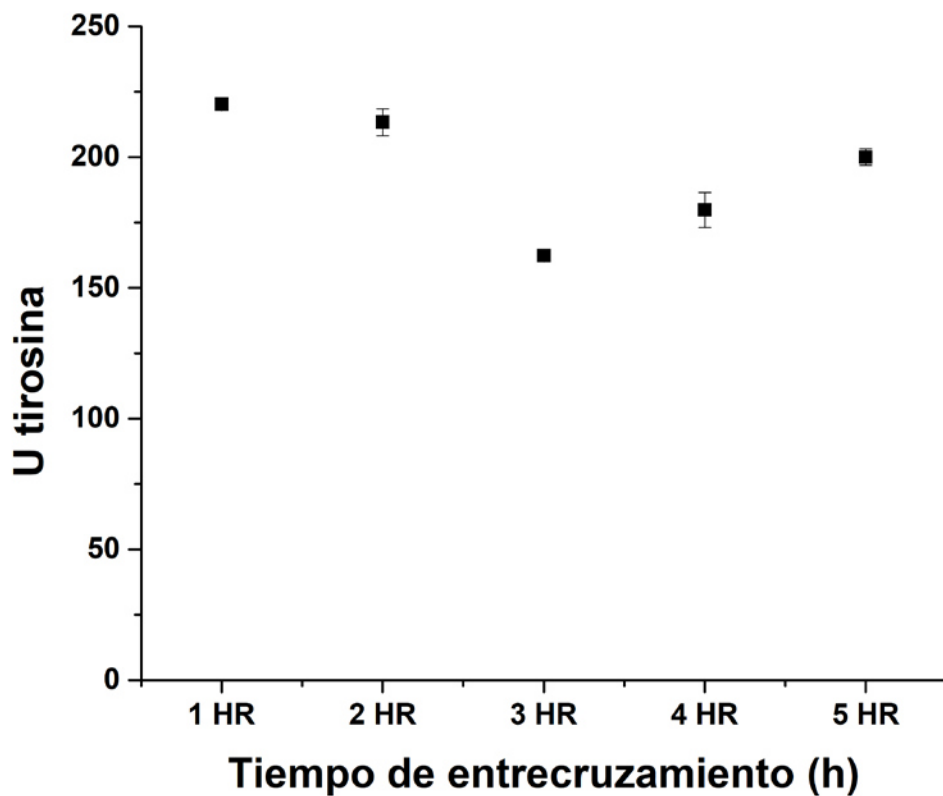


Figura 16: Tiempo de exposición del vapor de glutaraldehído sobre las nanofibras con enzima inmovilizada.

8.4.1.2 Efecto del efecto del pH del medio de reacción sobre la actividad enzimática

Todas las enzimas tienen en su estructura primaria aminoácidos con grupos radicales ionizables. Dependiendo del pH del medio de reacción en el que se encuentren pueden no tener carga, o por el contrario estar cargados, bien positiva o negativamente. Estas cargas sirven para estabilizar la conformación natural de la proteína y cuando el pH las cambia, también se modifica la estructura tridimensional, llevando en último extremo a la desnaturalización de la proteína, y en el caso de las enzimas a la pérdida de actividad.

Como consecuencia de lo anterior la actividad enzimática muestra una dependencia significativa de los valores de pH del medio de reacción. Conforme el valor de pH aumenta, la actividad se incrementa hasta un máximo (pH óptimo) y decae a valores de pH extremos (pH alcalinos). El comportamiento que se presenta a diferentes valores de pH se debe a dos efectos: la participación directa de grupos iónicos en los mecanismos catalíticos y la participación de los grupos cargados en la estabilización de la estructura de la proteína. Los grupos iónicos frecuentemente se encuentran asociados con la catálisis enzimática en la que el estado de protonación es esencial para la reacción. Las desviaciones en los valores de pH óptimo alteran el estado de ionización de los grupos involucrados e inhiben los procesos catalíticos [93,94,95,96,97]

En este trabajo se llevó a cabo el estudio de la influencia del pH del medio sobre la estabilidad de la actividad enzimática de la enzima pepsina libre e inmovilizada. Para ello, se midió la actividad enzimática de la pepsina a distintos valores de pH en un intervalo comprendido entre 1 y 5. En el caso de la pepsina, una enzima digestiva, el análisis de su actividad enzimática se realizó a diferentes pH tanto inmovilizada en la matriz de PVA como en solución. En la siguiente figura 17 se muestra el valor máximo de la actividad enzimática fue evaluada a distintos pH. Para ambos casos (enzima libre y enzima inmovilizada) la mayor actividad se observó a pH 3 y no hubo diferencias relevantes entre la enzima y la enzima inmovilizada en este pH.

El hecho de que la pepsina presente su máxima actividad en un intervalo muy amplio de valores de pH, concretamente entre 1 y 3 para la enzima inmovilizada y 2 y 3 para el caso de la pepsina libre lo cual muestran una elevada estabilidad en un amplio intervalo de pH, es una gran ventaja desde el punto de vista de su aplicación industrial ya que puede operar en un intervalo amplio de pH sin una disminución significativa de la actividad. Por último, es importante recalcar que en todo el intervalo de pH analizado la enzima inmovilizada mostró una mayor actividad enzimática que la enzima libre. Esto habla de la efectividad del proceso de inmovilización en nanofibras electrohiladas a la hora de proporcionar estabilidad a la estructura tridimensional de la enzima bajo condiciones variantes de pH en el medio de reacción.

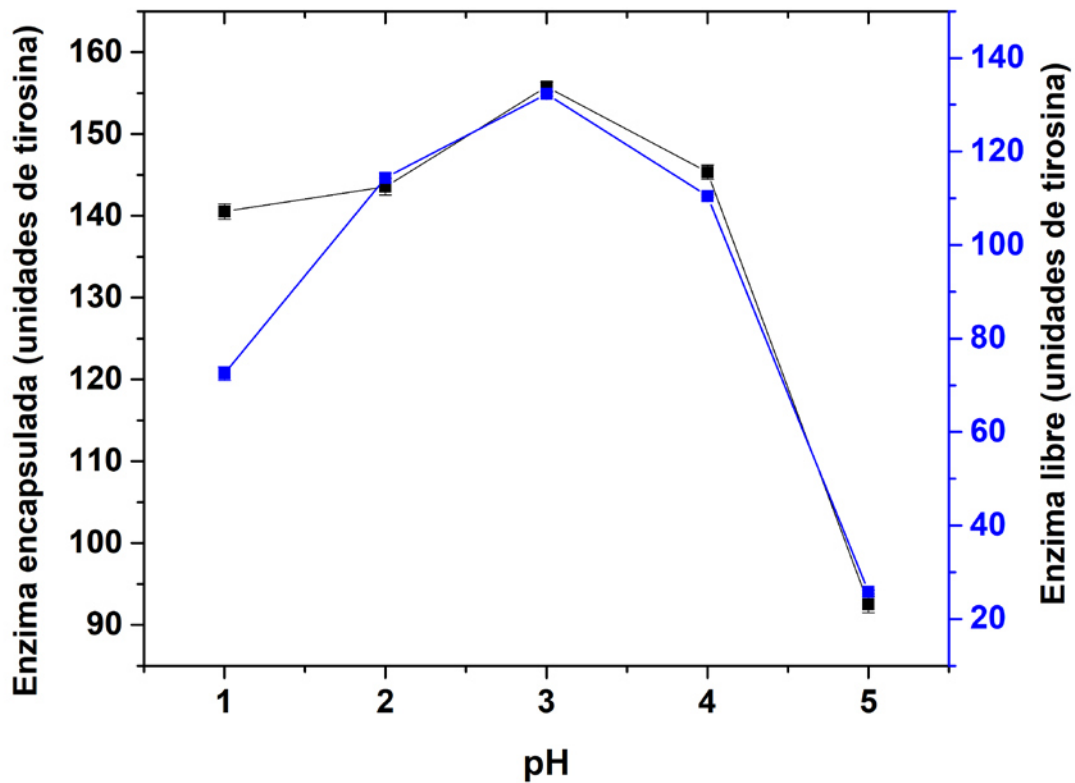


Figura 17: Efecto del pH en la actividad enzimática

8.4.1.3 Ciclos de Reutilización de la enzima pepsina inmovilizada

En este trabajo se realizó un análisis de reutilización a la enzima pepsina inmovilizada en nanofibras electrohiladas, mediante pruebas de actividad enzimática durante distintos ciclos de reutilización.

En la figura 18 se puede observar la actividad normalizada de la pepsina inmovilizada en donde se muestra que después de cuatro ciclos de reutilización, la enzima pepsina inmovilizada retenía alrededor del 20% de su actividad enzimática inicial. Esta estabilidad de

la enzima inmovilizada después de varios ciclos de reutilización podría ser ventajosa para aplicaciones industriales y médicas, tales como biosensores. Esta actividad es mejor a algunos otros resultados publicados de enzimas inmovilizadas [98,99]. Por otra parte, se ha reportado que la disminución de la actividad enzimática en las enzimas inmovilizadas después de varios ciclos de reutilización podría estar relacionada con el desprendimiento de moléculas enzimáticas que no se inmovilizaron adecuadamente en la membrana de nanofibras de PVA durante el proceso de reticulación, sino que sólo se incorporaron físicamente en la matriz polimérica [80,85,88,92,].

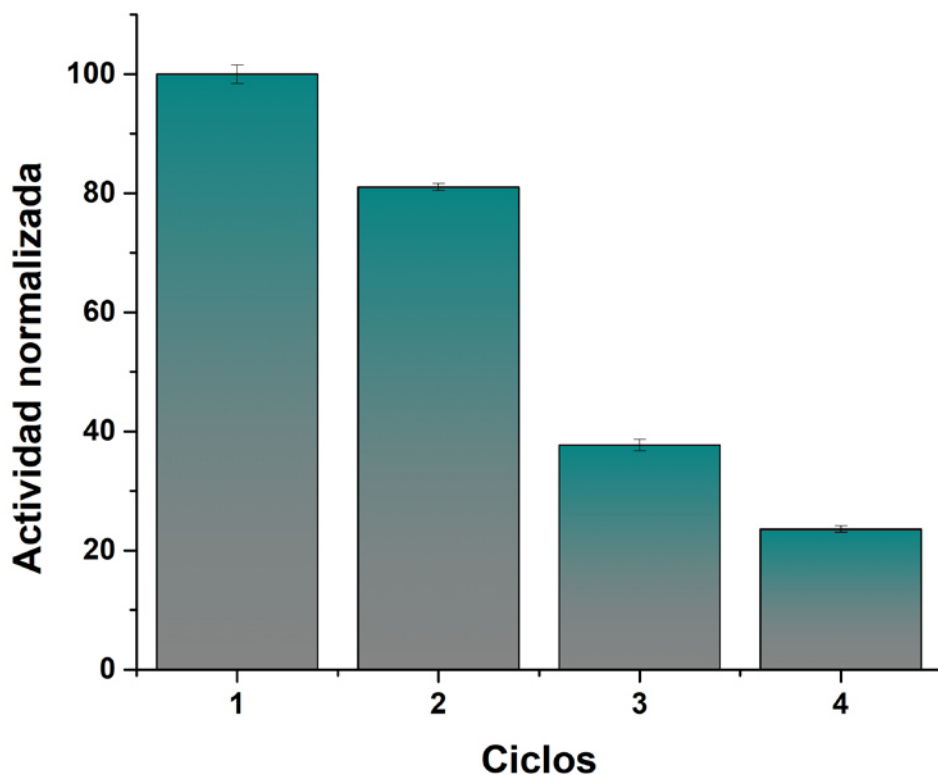


Figura 18: Actividad normalizada después de varios ciclos de reutilización

8.4.1.4 Efecto del tiempo de almacenamiento en la actividad de la enzima inmovilizada

De igual manera en esta tesis se reporta la reusabilidad de las fibras con enzima inmovilizada, la cual fue puesta a prueba durante diferentes periodos de almacenamiento. Para realizar este procedimiento se tomaron intervalos de tiempo de una a seis horas en la que la fibra fue guardada para posteriormente medir su actividad enzimática en el tiempo señalado anteriormente, una vez terminado el periodo de tiempo señalado las fibras fueron almacenadas y posteriormente fueron mediadas de 1 a 14 días. Como se muestra en la figura 19, en las primeras 6 horas se muestra un descenso lineal en la actividad enzimática de las fibras, mientras que la actividad permaneció constante con el paso de los días.

Es importante resaltar que la pepsina inmovilizada conserva alrededor del 30% de su actividad inicial después de 14 días de almacenamiento. Los enlaces intermoleculares entre la pepsina y las nanofibras de PVA, formados por la reacción de reticulación con GAvt, tienen aparentemente un efecto positivo durante el tiempo de almacenamiento sobre el comportamiento catalítico de la papaína inmovilizada [85,99].

Esto demuestra que las fibras pueden ser utilizadas en la industria bajo distintos tiempos de almacenamiento, así como también, son capaces de mantener su actividad enzimática conforme va transcurriendo el tiempo de almacenamiento.

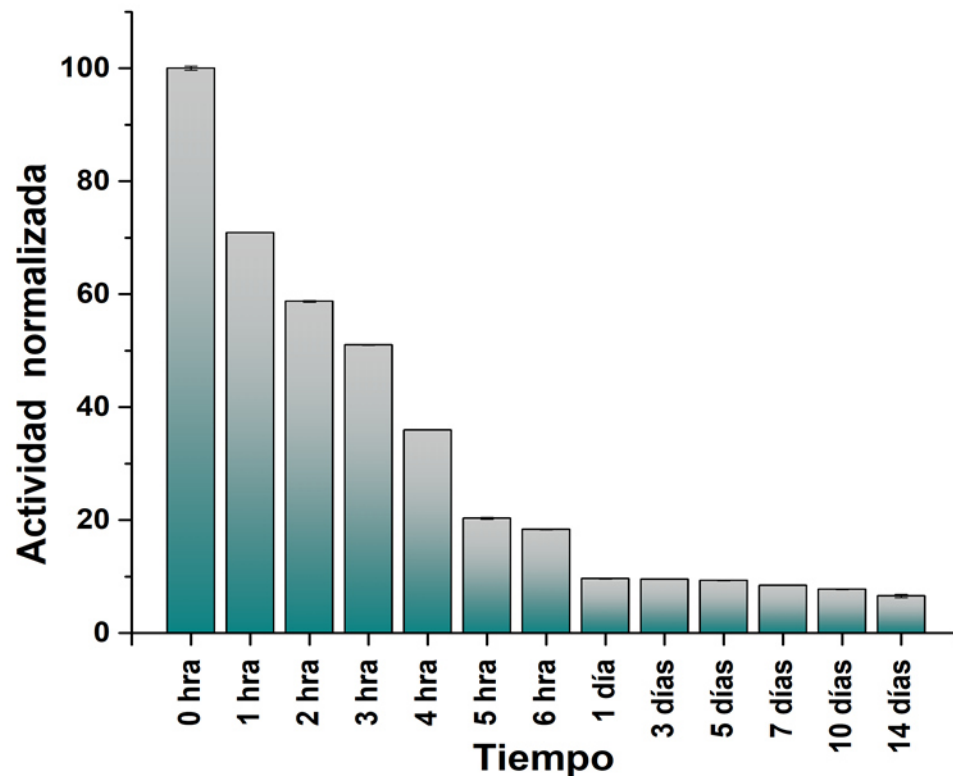


Figura 19: Tiempo de almacenamiento de las fibras encapsuladas

9. Conclusiones

- Si es posible la inmovilización de la enzima pepsina en nanofibras poliméricas mediante la técnica de electrohilado.
- Se establecieron las condiciones óptimas para el proceso de electrohilado
- A medida que la concentración de la enzima aumenta, aumentan los defectos en la morfología final de las fibras electrohiladas.
- Se establecieron las concentraciones óptimas de enzima en la solución electrohilada para potenciar tanto la carga enzimática como actividad de la enzima pepsina inmovilizada en nanofibras poliméricas.
- Es posible variar la cantidad de enzima inmovilizada en las fibras y seguir mostrando actividad enzimática.
- Se comprobó la eficiencia del proceso de inmovilización mediante exposición a glutaraldehído para mantener la actividad de la enzima pepsina a diferentes niveles de pH, demostrando que el pH 3 es el óptimo coincidiendo con lo reportado en la literatura.
- Se establecieron que el tiempo entrecruzamiento de 1 hora era el adecuado para obtener una actividad enzimática óptima de la enzima inmovilizada y al mismo tiempo conservar una adecuada morfología libre de defectos.
- Se demostró que es posible la reutilización de la fibra con la enzima después de varios ciclos de reuso.
- Al igual que se demostró la viabilidad de las fibras después de diferentes periodos de almacenamiento.

9.1 Comentarios finales

En el desarrollo de este trabajo se establecieron las bases principales para utilizar el electrohilado como método de inmovilización de la enzima pepsina. En este sentido, la tecnología enzimática tiene como objetivo superar aquellos inconvenientes que puedan retrasar la aplicación de las enzimas en procesos a escala industrial. Esta área tiene aplicaciones desde tiempos remotos, y actualmente se utiliza en diferentes industrias, ya que implica la utilización de sistemas enzimáticos diversos que optimizan el procesamiento en la obtención de detergente, aditivos alimenticios, productos químicos y farmacéuticos. La tecnología enzimática se presenta como alternativa biotecnológica para que las industrias desarrollen productos de calidad homogénea, aprovechen óptimamente sus materias primas, aceleren sus procesos de producción y minimicen desperdicios.

Como trabajo futuro, en nuestro grupo de investigación se buscará trabajar con algunas otras enzimas de la familia de las proteasas, así como la utilización de algún sustrato que sea óptimo para la realización de electrohilado; así como también obtener nanofibras, esferas u obtención de elastómeros para analizar el comportamiento de su actividad o poderlo utilizar como método de liberación. Por último, se buscará utilizar la enzima pepsina inmovilizada en nanofibras poliméricas de polivinilalcohol (PVA) en alguna aplicación biotecnológica concreta, tal y como biosensores y sistemas de liberación controlada de proteínas.

10. Referencias

1. Ranganathan, S. V.; S. L. Narasimhan; K. Muthukumar. "An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel". *Biores. Tech.* 99: 3975-3981, 2008.
2. Idris, A.; N. A. Mohd zain; M. S. Suhaimi. "Immobilization of Baker's Yeast invertase in PVA– Alginate Matrix Using Innovative Immobilization Technique". *Process Biochem.* 43: 331–338, 2008.
3. Hudson, E. P.; R. K. Eppler; D. S. Clark. "Biocatalysis in Semi-Aqueous and Nearly Anhydrous Conditions". *Current Opinion in Biotech.* 16: 637-643, 2005.
4. Yildiz, H. B. et al. "Immobilization of Tyrosinase and Alcohol Oxidase in Conducting Copolymers of Thiophene Functionalized". *Int. J. Biol. Macrom.* 41: 332–337, 2007.
5. Tuncagil, S.; S. Kiralp; S. Varis; L. Toppare. "Immobilization of Invertasa on a Conducting Polymer of 1-(4-Nitrophenil)-2,5-di(2-thienyl)-1H-Pyrrole". *React. Func. Polym.* 68: 710-717, 2008.
6. DIZGE, N.; O. GUNAYDIN; F. YILMAZ; A. TANRISEVEN. "Immobilization of Invertasa Onto Poly(3-Methylthienylmethacrylate)/Poly (3- Thiopheneacetic Acid) Matrix". *Biochem. Eng. J.* 40: 64– 71, 2008.
6. Vallejo, V. et al. "Immobilization of Recombinant Invertase (re-INVb) from *Zymomonas mobilis* on D-Sorbitol Cinnamic Ester for Production of Invert Sugar". *J Agric Food Chem.* 56: 1392–7, 2008.
7. Sasaki, E. et al. "Preparation of Microcapsules by Electrostatic Atomization". *J. of Electrostatics* 66: 312–318, 2008.
8. Khan, A. A.; M. A. Alzohairy. "Recent Advances and Applications of Immobilized Enzymes Technologies: a Review". *Res. J. Biol. Sci.* 5: 565-575, 2010.
9. Veronese, M. F.; G. Pasut. "PEGylation, Successful Approach to Drug Delivery". *Drugs Disc. Today.* 10: 1451-1458, 2005
10. Kotwal, S. M.; V. Shankar. "Immobilized invertase". *Biotech. Adv.* 27: 311–322, 2009.
11. Torabi, S. et al. "Covalent attachment of Cholesterol Oxidase and Horseradish Peroxidase on Perlite Through silanization: Activity, stability and co-immobilization." *J. Biotech.* 131: 111–120 (2007).

12. Cetinus, S.; H. Oztop. "Immobilization of Catalase on Chitosan film". *Enzyme. Microb. Techn.* 26: 497–501, 2000.
13. Bryjak, J.; P. Kruczkiewicz; W. Rekuć; A. Peczyńska-CZOCH. "Laccase Immobilization on Copolymer of Butyl Acrylate and Ethylene Glycol Dimethacrylate". *Biochem. Eng. J.* 35: 325–332, 2007.
14. López Gallego, F.; L. Betancour; C. Mateo; A. Hidalgo et al. "Enzyme stabilization by Glutaraldehyde Crosslinking of Adsorbed Proteins on Aminated Supports". *J. Biotech.* 119: 70–75, 2005.
15. Pahujani, Sh.; Sh. Kanwar; G. Chauhan; R. Gupta. "Glutaraldehyde Activation of Polymer Nylon-6 for Lipase Immobilization: Enzyme characteristics and stability". *Bioresour. Tech.* 99: 2566-2570, 2008.
16. Torabi, S.; Kh. Khajeh; S. Ghasempura; N. Ghaemian et al. "Covalent Attachment of Cholesterol Oxidase and Horseradish Peroxidase on Perlite Through Silanization: Activity, stability and co-immobilization". *J. Biotech.* 131:111–120, 2007.
17. JIANG, D. et al. "Immobilization of *Pycnoporus Sanguineus* Laccase on Magnetic Chitosan Microspheres." *Biochem. Eng. J.* 25: 15–23, 2005
18. Gómez, L.; H. L., Ramírez; M. L. Villalonga; R. Villalonga. "Immobilization of Chitosan-Modified Invertase on Alginate-Coated Chitin Support Via Polyelectrolyte Complex Formation". *Enzyme Microb. Technol.* 38: 22-27, 2006.
19. Foresti, M.; M. Ferreira. "Chitosan-Immobilized Lipases for the Catalysis of Fatty Acid Esterifications". *Enzyme Microb. Technol.* 40: 769-777, 2007.
20. Tenkanen, M.; M. L. Niku-Paavola; M. Linder; L. Viikari. "Cellulases in Food Processing". *Food Sci. Eng.* 122: 771–789; 2003
21. Cavaco Paul, A.; L. Almeida; D. Bishop. "Hydrolysis of Cotton Cellulose by Engineered Cellulases from *Trichoderma reesei*". *Text. Res. J.* 68: 273–280, 1998.
22. Rastall, L. (ed.) (2007). *Novel enzyme technology for food applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
23. Haard, N. F., 1992 A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food product Technology*.

24. Dixon M. and Webb E. C. Enzymes. 3rd ed. Longman, London. United Kingdom. 1979
Edens
25. Biochemistry, 4th Edition, Donald Voet, Judith G. Voet
26. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Second Edition, Robert A. Copeland Ph.D.
27. Hansen KS, Kristensen C, Tattersall DB, Jones PR, Bak S, Møller BL (2003) The in vitro substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyanohydrin glucosyltransferase from *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* 64: 143–151
28. Khantaphant S, Benjakul S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comp Biochem Physiol B*.
29. Ligand Binding Energy and Catalytic Efficiency from Improved Packing within Receptors and Enzymes Dudley H. Williams, Elaine Stephens and Min Zhou
30. Hosseinkhani, S. and Nemat-Gorgani, M. (2003), *Enzyme Microb. Technol.* 33(2–3), 179–184. morato et al., 2000
31. Morato T, Watson R, Pitcher TJ, Pauly D. Fishing down the deep. *Fish and Fisheries*. 2006;7(1):23–33.
32. Hassine-Belghith, N. B. (2009). Exporting, Technical Efficiency and Product Quality: An Empirical Analysis of the Agricultural Sector in the Mediterranean Countries. *Journal of Development Studies*, 45(5), 769-788.
33. Yamabhai M, Emrat S, Sukasem S, Pesatcha P, Jaruseranee N, Buranabanyat B. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *J Biotechnol.* 2008.
34. Harper, Harold A., Mayes, Peter A. Rodwell, Víctor W. *Bioquímica de Harper*.
35. *Química de los alimentos Cuarta edición* Salvador Badui Dergal Director Técnico Grupo Herdez, S.A. de C.V.
36. *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*, DR. Miguel Arroyo.
37. *Bioquímica de Harper, I Edición*. Editorial El manual moderno S.A de C.V. Santafé, Bogotá.

38. Moehlenbrock, M.J. y Minter, S.D. (2011). Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. En: *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols*. (S.D. Minter, ed.)
39. Novick, S.J. y Rozzell, J.D. (2005). Immobilization of enzymes by covalent attachment. En: *Microbial Enzymes and Biotransformations*, (J.L. Barredo ed.) Pp. 247-271. Humana Press, Totowa.
40. Bickerstaff, G.F. (1997). Immobilization of enzymes and cells. Some practical considerations. En: *Immobilization of Enzymes and Cells* (G.F. Bickerstaff, ed.) Pp. 1-11. Humana Press, Totowa.
41. Brady, D. y Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilization. *Biotechnology Letters* 31, 1639-1650.
42. Differences in the P1 substrate specificities of pepsin A and chymosin. Kageyama H, Ueda H, Tezuka T, Ogasawara A, Yuichi N, Kageyama T, Ichinose M. *The Journal of Biochemistry*.
43. Overview of pepsin-like aspartic peptidases. Dunn BM. *Current Protocols in Protein Science*. 21.3:1-6 (2001).
44. Dunn, B.: Structure and Mechanism of the Pepsin-like Family of Aspartic Peptidases , *Chem Rev* 102, 4431, 2002.
45. Dunn, B., and Fink, A.: Cryoenzymology of Porcine Pepsin , *Biochemistry* 23, 5241, 1984.
46. Bioquímica, F. B. Armstrong, Frank Bradley Armstrong, Thomas Peter Bennett.
47. The pepsin residue glycine-76 contributes to active-site loop flexibility and participates in catalysis. Okoniewska M1, Tanaka T, Yada RY.
48. T. G. Rajagopalan, W. H. Stein, and S. Moore, *J. Biol. Chem.*, 241, 4295 (1966).
49. R. S. Bayliss, J. R. Knowles, and G. R. Wybrandt, *Biochem. J.*, 113, 377 (1969).
50. J. Sodek and T. Hofmann, *Can. J. Biochem.*, 48, 1014 (1970). V. B. Pederson and B. Foltmann, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.*, 35, 250 (1973).
51. Alkorta, I., et al., Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 1998. 33(1): p. 21-28.

52. Vaillant, F., et al., Co-immobilized pectinlyase and endocellulase on chitin and Nylon supports. *Process Biochemistry*, 2000.
53. Guisan, J.M., Immobilization of Enzymes and Cells. Second ed. *Methods in Biotechnology*. Vol. 22. 2006: Humana Press.
54. Bickerstaff, G., Immobilization of Enzymes and Cells. *Methods in Biotechnology*. Vol. 1. 1997, Totowa NJ.W: Humana Press.
55. Del Monte-Martínez, A. (2000): «Obtención de un nuevo material para ser utilizado como biocatalizador inmovilizado en Química Fina a partir de la anémona marina *Stichodactyla helianthus*.
56. Kim, J.; H. Jia y P. Wang (2006): «Challenges in Biocatalysis for Enzyme-based Biofuel Cells», *Biotechnology Advances*, vol. 24, pp. 296-308.
57. Wan, P. (2011): *Nanoscale Biocatalysis: Methods and Protocols*, Human Press, New York.
58. Fraccionamiento y desmetalización biocatalítica de asfaltenos de crudo castilla, L. I. Mogollón, R. Rodríguez¹, W. Iarrotta, C. Ortiz y R. Torres.
59. Seeram Ramakrishna, Kazutoshi Fijihara. “An introduction to electrospinning and nanofibers”. National University of Singapore. World Scientific (2005).
60. A.L. Andrady, Science and technology of polymer nanofibers, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2008.
61. S. Ramakrishna, K. Fujihara, W-E. Teo, T-Ch. Lim, Z. Ma, An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, New Jersey, London, Singapour, 2005.
62. L.A. Bosworth, S. Downes, Electrospinning for tissue regeneration, Woodhead publishing, Oxford-Cambridge-Philadelphia-New Delhi, 2011.
63. Kim KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol* 2005a;120: 327–39.
64. Ki CS, Baek DH, Gang KD, Lee KH, Um IC, Park YH. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer* 2005;46:5094–102.

65. Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand, Giuseppe, Cirillo et al., 2014
66. Moreno-cortez, I. E.; Romero-garcía, J.; González-gonzález, V. *Mater. Sci. Eng. C* 2015, 52, 306
67. Ik, N. *Acta Polym. Sin.* 2014, 5, 701.
68. Xu, R.; Si, Y.; Li, F.; Zhang, B. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015, 22, 3838.
69. Martínez-Rodríguez, M. A.; Garza-Navarro, M. A.; Moreno-Cortez, I. E.; Lucio-Porto, R.; González-González, V. A. *Carbohydr. Polym.* 2016, 136, 46.
70. Wu, L.; Yuan, X.; Sheng, J. J. *Membr. Sci.* 2005, 250, 167
71. Shaikh, R. P.; Kumar, P.; Choonara, Y. E.; Toit, L. C.; Pillay, V. *Biofabrication* 2012, 4, 025002.
72. C.; Pan, Z-q.; Luan, X-j.; Wang, L. M. *Acta Polym. Sin.* 2013, 12, 1508.
73. Ik, N. *Acta Polym. Sin.* 2014, 5, 701.
74. Pan, C.; Ding, R.; Dong, L.; Wang, J.; Hu, Y. J. *Nanomater.* 2015, 2015,1.
75. Li, C.; Zhou, L.; Wang, C.; Liu, X.; Liao, K. *RSC Adv.* 2015, 5, 41994.
76. Amooghin, A. E.; Mona Zamani, P.; Omidkhah, M.; Yegani, R. *Greenh. Gases Sci. Technol.* 2013, 3, 378.
77. Pu-you, J.; Cai-ying, B.; Li-hong, H.; Yong-hong, Z. J. *For. Prod. Ind.* 2014, 3, 151.
78. Mohsin, M.; Hossin, A.; Haik, Y. J. *Appl. Polym. Sci.* 2011, 122, 3102.
79. Liu, D.; Zhu, C.; Peng, K.; Guo, Y.; Chang, P. R.; Cao, X. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013, 52, 6177.
80. Dou, Y.; Zhang, B.; He, M.; Yin, G.; Cui, Y. J. *Macromol. Sci. A* 2014, 51, 1009.
81. Thermal stability of the immobilization process of horseradish peroxidase in electrospun polymeric nanofibers, Sofia E. Rodríguez-deLuna, Ivan E. Moreno-Cortez, M. A. Garza-Navarro, Raúl Lucio-Porto Luis López Pavón, 2017
82. Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor, Moreno-Cortez et al., 2015
83. Figueiredo, K. C. S.; Alves, T. L. M.; Borges, C. P. *Brazilian J. Chem. Eng.* 2014, 31, 747.

84. Zhu, J.; Sun, G. *React. Funct. Polym.* 2012, 72, 839
85. Niu, J.; Xu, J.; Dai, Y.; Xu, J.; Guo, H.; Sun, K.; Liu, R. *J. Hazard. Mater.* 2013, 246–247, 119.
86. Ik, N. *Acta Polym. Sin.* 2014, 5, 701.
87. Amitai, G.; Andersen, J.; Wargo, S.; Asche, G.; Chir, J.; Koepsel, R.; Russell, A. J. *Biomaterials* 2009, 30, 6522.
88. Xu, R.; Si, Y.; Li, F.; Zhang, B. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015, 22, 3838.
89. Xu, R.; Yuan, J.; Si, Y.; Li, F.; Zhang, B. *RSC Adv.* 2016, 6, 3927.
90. Fennema O. (1985) *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Editorial Reverté, S.A. pp: 332-350.
91. Ahmadi, S.; Farokhi, M.; Padidar, P.; Falahati, M. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 17289.
92. Zhu, J.; Sun, G. *React. Funct. Polym.* 2012, 72, 839.
93. Bisswanger H. 2008. *Enzyme Kinetics Principles and Methods*. Editorial Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemania)
94. Xu, R.; Chi, C.; Li, F.; Zhang, B. *Bioresour. Technol.* 2013, 149, 111.
95. Moyo, M.; Okonkwo, J. O. *Sens. Actuators B: Chem.* 2014, 193, 515
96. Azevedo, A. M.; Martins, V. C.; Prazeres, D. M. F.; Vojinovic', V.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2003, 9, 199.
97. Fernandes, K. F.; Lima, C. S.; Pinho, H.; Collins, C. H. *Process Biochem.* 2003, 38, 1379.
98. Xu, R.; Si, Y.; Li, F.; Zhang, B. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015, 22, 3838
99. Arecchi, A.; Scampicchio, M.; Drusch, S.; Mannino, S. *Anal. Chim. Acta* 2010, 659, 133.