



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**Manufactura de materiales antimicrobianos
de Polietileno Tereftalato (PET) mediante
inmovilización de lisozima**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUIMICO**

P R E S E N T A:

LISSET MONSERRATH FLORES VILLAVICENCIO

Director:

DR. EMILIO BUCIO CARRILLO

Asesor:

M. EN I. CRESENCIANO ECHAVARRIETA ALBITER

Asesor:

I.Q. DOMINGA ORTIZ BAUTISTA



Ciudad de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al financiamiento del proyecto PAPIIT DGAPA-UNAM No. IN202320 por la beca otorgada, al Dr. Gabriel G. Flores Rojas y al Dr. Emilio Bucio Carrillo por abrirme las puertas del ICN y por instruirme en este proceso

Dedicatorias

A mi madre, porque todo lo que he conseguido, te lo debo a ti, eres una mujer fuerte, con bondades que te hacen el ser más noble. Me siento orgullosa y agradecida de ser tu hija, porque tu amor de Madre es capaz de darlo todo por nosotros. TE AMO.

A mis hermanos, que aportan siempre en mi día a día y que estaban ahí, aunque no me comprendieran mucho. Quiero que sepan que cuentan conmigo para todo.

A mis amigos de FES-Z, que me acompañaron en mi formación haciendo todo más ameno, recordándome que la amistad duplica las alegrías y divide las angustias.

A mis amigos de P-3, todos tomamos diferentes caminos en la vida, pero no importa a donde vayamos, siempre llevo conmigo un recuerdo de cada uno que me hace sonreír.

A mi amiga Karime S., que a pesar de la distancia somos inseparables, locas y felices.

A Gonzalo R. O., eres pieza clave en mi vida, cuando sentía que no podía y que mis sueños se escapaban, me alentaste para continuar. Eres la manera más bonita que la vida me ha enseñado que vale la pena arriesgarse. Sé que el camino será largo, pero quiero recorrerlo junto a ti.

A la UNAM, que es la cuna de tanto conocimiento, incluyendo a todos los maestros que me puso en el camino, sobre todo a aquellos que aman la enseñanza.

“Dichoso es el que hace la voluntad del Señor”

Índice

| | |
|---|-----------|
| Lista de Nomenclaturas | 6 |
| 1. Introducción | 8 |
| 2. Definiciones Generales | 9 |
| 2.1. Polímeros | 9 |
| 2.2. Procesos de Polimerización | 10 |
| 2.3. Distribución y peso molecular | 11 |
| 2.4. Propiedades mecánicas | 13 |
| 2.5. Aplicaciones médicas de los polímeros | 14 |
| 2.6. Estrategias de inhibición de microorganismos en dispositivos médicos y contenedores alimenticios | 16 |
| 2.6.1. Liberación Controlada de medicamentos..... | 16 |
| 2.7. Enzimas | 18 |
| 2.7.1. Inmovilización de enzimas..... | 18 |
| 2.7.2. Retención física..... | 19 |
| 2.7.3. Inmovilización de enzimas por unión química..... | 19 |
| 2.7.3.1. Adsorción..... | 20 |
| 2.7.3.2. Unión covalente | 21 |
| 2.7.4. Enzimas con actividad antimicrobiana..... | 21 |
| 2.8. Bacterias Gram-positivo y Gram-negativo | 22 |
| 2.9. Lisozima | 24 |
| 2.10. Panorama de la producción y consumo de plásticos | 26 |
| 2.11. Polietilentereftalato (PET) | 26 |
| 2.11.1. Procesos de síntesis del PET y sus componentes químicos | 27 |
| 2.11.2. Propiedades del PET..... | 29 |
| 2.11.2.1. Solubilidad | 29 |
| 2.11.2.2. Estabilidad térmica..... | 30 |
| 2.11.2.3. Degradación del PET | 30 |
| 2.12. Espectroscopía Infrarroja | 31 |
| 2.12.1. El espectro infrarrojo y sus zonas características..... | 33 |
| 2.12.2. La región de los grupos funcionales..... | 33 |
| 2.13. Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) | 35 |
| 2.14. Espectrofotometría de Absorción | 35 |
| 2.15. Ángulo de contacto | 36 |
| 3. Hipótesis | 37 |
| 3.1. Objetivos Generales | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. <i>Objetivos Particulares</i> | 37 |
| 4. Procedimiento experimental | 38 |
| 4.1 <i>Materiales</i> | 38 |
| 4.2 <i>Metodología</i> | 38 |
| 4.2.1. <i>Funcionalización de la película de PET con etilendiamina</i> | 38 |
| 4.2.2. <i>Funcionalización de la película de PET con grupos carbonilo</i> | 38 |
| 4.2.3. <i>Inmovilización de lisozima sobre la película de PET funcionalizada con grupos carbonilo</i> | 39 |
| 4.2.4. <i>Evaluación de la actividad enzimática de la lisozima inmovilizada sobre la película de PET</i> | 39 |
| 5. Resultados | 40 |
| 5.1. <i>Análisis de la pérdida de masa de las películas de PET de acuerdo al tiempo de reacción con EDA</i> | 40 |
| 5.2. <i>Cuantificación de la presencia de grupos amino en las películas funcionalizadas mediante titulación</i> | 40 |
| 5.3. <i>Estudio de ángulo de contacto</i> | 41 |
| 5.4. <i>FTIR-ATR Análisis</i> | 42 |
| 5.5. <i>Análisis térmico</i> | 43 |
| 5.6. <i>Análisis de la actividad antimicrobiana</i> | 44 |
| 6. Conclusiones | 47 |
| 7. Referencias | 48 |
| 8. Anexos | 52 |
| <i>Anexo A. Graficas proporcionadas por el equipo de Infrarrojo</i> | 52 |
| <i>Anexo A.1. PET-V</i> | 52 |
| <i>Anexo A.2. PET-DIET</i> | 53 |
| <i>Anexo A.3. PET-ALDH</i> | 54 |
| <i>Anexo A.4. PET-LYZ</i> | 55 |
| <i>Anexo B. Graficas proporcionadas por el equipo de TGA</i> | 56 |
| <i>Anexo B.1. PET-V</i> | 56 |
| <i>Anexo B.2. PET-DIET</i> | 57 |
| <i>Anexo B.3. PET-ALDH</i> | 58 |
| <i>Anexo B.4. PET-LYZ</i> | 59 |

Lista de Nomenclaturas

| | | | |
|-------------|--|-----------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico | MPa | mega Paaes |
| AER | Actividad enzimática relativa | NAG | N-acetilglucosamina |
| BHET | Tereftalato de bis-hidroxietila | NAM | N-acetilmurámico |
| C | Celcius | PE | Polietileno |
| cLyz | Lisozima de pollo | PET | Polietilentereftalato |
| DMT | Dimetiltripamina | PET-ALDH | Películas de PET funcionalizadas con grupos carbonilo |
| DP | Grado de polimerización | PET-AMIN | Películas de PET funcionalizadas con grupos amino |
| DSC | Calorimetría diferencial de barrido | PET-LYZ | Películas de PET con lisozima inmovilizada |
| EDA | Etilendiamina | PET-V | Películas de PET original |
| FDA | Food and Drug Administration | PGA | Ácido poliglicólico |
| FTIR | Infrarrojo por transformada de Fourier | PHA | Polihidroxialcanoato |
| hLyz | Lisozima de humano | PLA | Ácido poliláctico |
| K | Kelvin | PMMA | Polimetilmetacrilato |
| kDa | kilo Dalton | PP | Polipropileno |
| M | molar | | |

PS

Poliestireno

PTFE

Politetrafluoroetileno

PVA

Acetato de polivinilo

PVC

Policloruro de vinilo

SEM

Microscopía electrónica de barrido

TA

Ácido tereftálico

T_g

Transición vítrea

TGA

Análisis termogravimétrico

UCR

Unidad constitucional repetitiva

UV

Ultravioleta

1. Introducción

La presencia y proliferación de microorganismos en materiales poliméricos de uso médico y contenedores alimenticios, pueden causar efectos negativos para la salud de quien los usa, así como de los alimentos almacenados. Por lo tanto, los materiales poliméricos capaces de inhibir la proliferación de microorganismos han cobrado una gran relevancia en estas áreas, necesitando el desarrollo de nuevos materiales más duraderos, eficientes y capaces de inhibir la proliferación no solo de bacterias sino también de hongos e incluso virus, que pueden provocar infecciones en heridas abiertas, complicando el proceso de recuperación del paciente o alterar las propiedades organolépticas de los alimentos, afectando directamente la calidad del producto al producir compuestos secundarios que pueden ser nocivos para su consumo.

La síntesis de materiales poliméricos con propiedades antimicrobianas puede llegar a ser compleja debido a que el material debe cumplir ciertas características químicas y físicas que actúen de manera conjunta haciendo que el material sea estable químicamente y duradero en el medio de aplicación, además permitir su funcionalización con agentes antimicrobianos. Sin embargo, muchas de las características que hacen que estos materiales poliméricos sean inadecuados para proporcionarles una actividad antimicrobiana, requiriendo una funcionalización química, la cual muchas veces es llevada a cabo de manera superficial.

Una de las ventajas de las funcionalizaciones superficiales es que permite el uso de una amplia variedad de condiciones de reacción y compuestos químicos sin afectar de manera completa las propiedades mecánicas del material original, confiriendo nuevas propiedades como hidrofiliidad, respuesta a pH, temperatura e intensidad de luz, así como grupos químicos funcionales necesarios para reacciones futuras de inmovilización o carga como medicamentos, enzimas, nanopartículas o agentes terapéuticos.

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es funcionalizar superficialmente películas de polietileno tereftalato (PET) con grupos amino, que permitirán la inmovilización covalente de lisozima, confiriendo propiedades antimicrobianas al material frente a distintos microorganismos del tipo Gram-positivo y Gram-negativo, manteniendo las propiedades mecánicas de la matriz polimérica.

2. Definiciones Generales

2.1. Polímeros

Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión repetida de una o varias moléculas unidas por enlaces covalentes. El término macromolécula significa molécula muy grande. Polímero y macromolécula no son equivalentes, ya que las macromoléculas, en principio, no requieren estar formadas por unidades en repetición o unidad constitucional repetitiva (UCR).^[1]

La longitud de la cadena del polímero viene determinada por el número de UCR que se repiten en la cadena. Esto se llama grado de polimerización (DP), y su peso molecular viene dado por el peso del (UCR) multiplicado por el grado de polimerización (DP). Dependiendo de su origen los polímeros pueden ser naturales o sintéticos. Los sintéticos contienen normalmente entre uno y tres tipos diferentes de unidades que se repiten, mientras que los naturales o biopolímeros (como la celulosa, el ADN o las proteínas) presentan estructuras mucho más complejas.^[2]

Los polímeros sintéticos, tienen mayor interés desde el punto de vista comercial y se pueden clasificar en tres diferentes tipos de materiales:

Los elastómeros: Sustancias que poseen la elasticidad que caracteriza al caucho y al igual que este se emplean para fabricar gomas, mangueras o neumáticos.

Las fibras: materiales capaces de orientarse para formar filamentos largos y delgados como el hilo. Poseen una gran resistencia a lo largo del eje de orientación, tal como ocurre con el algodón, la lana y la seda. Tienen su principal aplicación en la industria textil.

Los plásticos: son polímeros que pueden ser moldeados a presión y transformados en diversos objetos con formas diferentes, o bien, usados como pinturas o recubrimientos de superficies.^[3]

Las moléculas que se combinan para formar los polímeros se denominan monómeros y las reacciones a través de las cuales éstos se obtienen se conocen como reacciones de polimerización. Cuando se parte de un único tipo de molécula se habla de homopolimerización y de homopolímero.

Cuando son dos o más moléculas diferentes las que se repiten en la cadena, se habla de copolimerización, comonómeros y copolímero.

Para que una sustancia pueda considerarse como monómero, esta debe tener una funcionalidad mayor o igual a 2 (). La funcionalidad está relacionada con el número de grupos funcionales presentes en la molécula, así, por ejemplo, el ácido acético tiene una funcionalidad de 1, mientras que la etilendiamina tiene una funcionalidad de dos.

Las reacciones de polimerización se suelen dividir en dos grandes grupos: de adición y de condensación, los polímeros obtenidos por cada una de estas vías se conocen como polímeros de adición y polímeros de condensación.

2.2. Procesos de Polimerización

La polimerización de condensación o de reacción por etapas es por completo análoga a la condensación en los compuestos de bajo peso molecular. En la formación del polímero la condensación tiene lugar entre dos moléculas polifuncionales para producir una molécula pequeña como el agua. La reacción continúa hasta que casi la totalidad de uno de los reactivos ha sido utilizada; se establece un equilibrio que puede desplazarse a voluntad a altas temperaturas controlando las cantidades de los reactivos y los productos.

Las características generales de la polimerización en etapas (condensación) son:

- a) La polimerización transcurre mediante reacción entre grupos funcionales, usualmente de distinta naturaleza, tales como; hidroxilo (-OH), cloruros de acilo (-COCl), carboxilo (-COOH), amina (-NH₂), etc. Y por lo general con eliminación de una molécula pequeña.
- b) El grupo funcional resultante de la reacción de los grupos funcionales de los monómeros forma parte de la cadena principal del polímero, repitiéndose ininterrumpidamente a lo largo de ella.
- c) En cualquier instante a lo largo de la polimerización, la mezcla de reacción consiste en una distribución continua de tamaños moleculares que comprende desde el mismo monómero hasta polímero de elevado peso molecular.

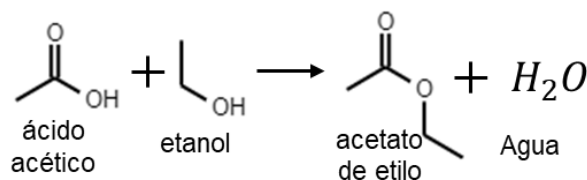


Figura 1. Ejemplo de reacción de polimerización por condensación

Por su parte las características más relevantes de la polimerización en cadena (adición) se resumen a continuación:

- La polimerización transcurre mediante la adición continua de monómero a una cadena en crecimiento, que contiene un extremo activado hasta el momento de su terminación.
- La reacción transcurre sin pérdida de materia, por lo que la unidad constitucional repetitiva del polímero y el monómero presentan una estequiometría idéntica.
- En cualquier instante a lo largo de la polimerización, la mezcla de reacción tiene una composición constituida por monómero y polímero de elevado peso molecular

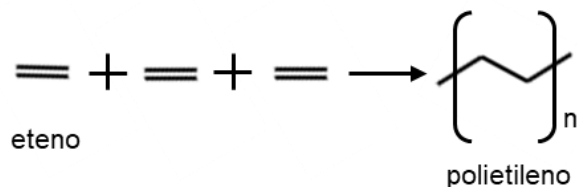


Figura 2. Polimerización por adición

Con algunas excepciones, los polímeros formados por reacciones en cadena contienen solamente átomos de carbono en la cadena principal (polímeros de homocadena), mientras que los polímeros obtenidos por reacciones escalonadas pueden tener otros átomos, cuyo origen está en los grupos funcionales del monómero, como parte de la cadena (polímeros de heterocadena).^[4]

2.3. Distribución y peso molecular

Tanto en los polímeros de cadena como en los escalonados la longitud de la cadena es determinada por sucesos puramente aleatorios. En las reacciones por etapas, la longitud de cadena

es determinada por la disponibilidad local de grupos reactivos en los extremos de las cadenas en crecimiento. En la polimerización de radicales, la longitud de la cadena es determinada por el tiempo durante el cual la cadena crece antes de difundirse hacia un segundo radical libre y que ambos reaccionen.

Por contraste con las moléculas de cadena lineal (Fig. 3a), algunos polímeros tienen cadenas ramificadas (Fig. 3b), con frecuencia como resultado de reacciones laterales durante la polimerización. Existen otros casos en los que se forman estructuras de enlaces cruzados o reticulares (Fig. 3c), como en la utilización de monómeros que contienen más de dos grupos reactivos en la polimerización por etapas. Los polímeros ramificados no pueden acomodarse fácilmente en una red cristalina como lo hacen los polímeros lineales. Por otra parte, los polímeros ramificados son mucho menos solubles que sus homólogos lineales y los polímeros entrecruzados son materiales insolubles. El entrecruzamiento puede ocurrir durante el proceso de polimerización o después mediante reacciones químicas diversas. El entrecruzamiento es usado para impartir buenas propiedades elásticas en algunos elastómeros, así como también para proporcionar rigidez y estabilidad dimensional a algunos materiales llamados termoplásticos.^[5]

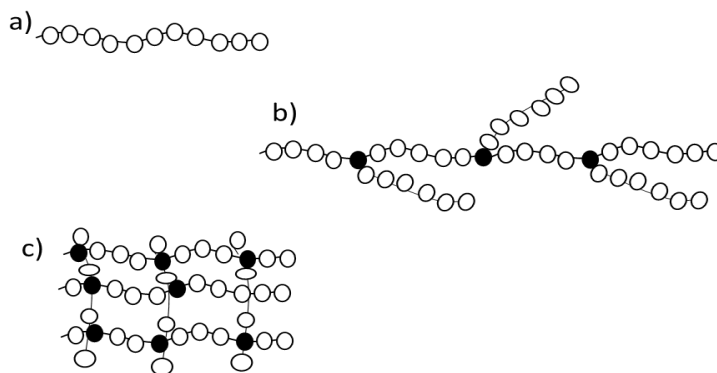


Figura 3. Representación esquemática de polímeros de cadena; a) lineal, b) ramificada y c) reticulada

En estado de fusión, las cadenas de polímero se mueven libremente, aunque a veces, con enorme viscosidad, resbalan unas sobre otras si se aplica una fuerza. Este es el principio utilizado en la fabricación de la mayoría de los artículos poliméricos, y es el ejemplo de la plasticidad de la que el propio nombre de plásticos deriva.^[6]

El peso molecular de los polímeros es una propiedad de fundamental importancia para su aplicación. La utilidad y las propiedades mecánicas, asociadas a los los materiales poliméricos, son consecuencia de su peso molecular.

Así, en la mayoría de los casos, es únicamente para un determinado intervalo de pesos moleculares, donde una dada propiedad de un polímero será óptima para la aplicación particular.^[7]

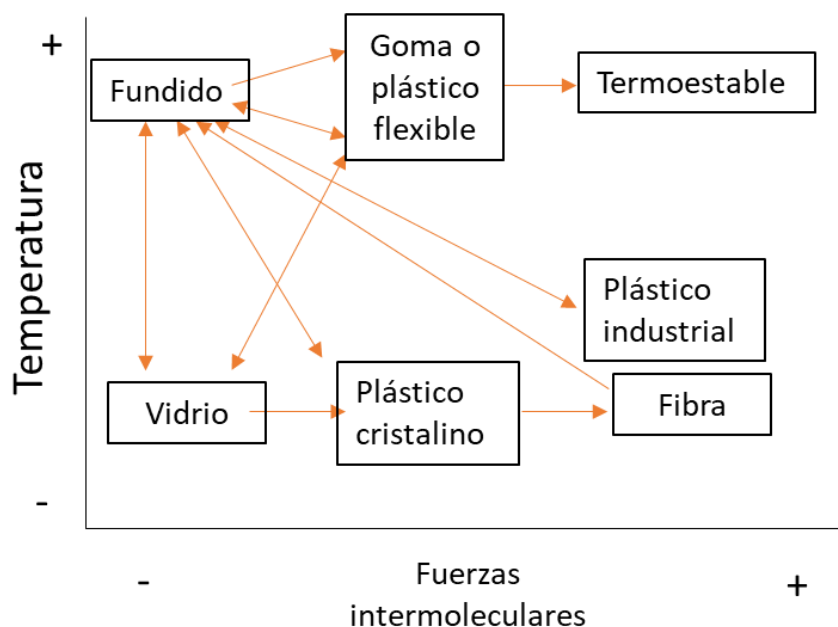


Figura 4. La interrelación de los estados de polímeros en masa. Las flechas indican las direcciones en las que los cambios de un estado a otro pueden tener lugar

2.4. Propiedades mecánicas

Muchas propiedades de los polímeros, como pueden ser la resistencia a los solventes, resistencia química o resistencia eléctrica son muy importantes para usos específicos. Sin embargo, la principal consideración en la utilidad o aplicación general de un polímero es su comportamiento mecánico, más específicamente su deformación al ser sometido a la tensión.

Los polímeros con alta resistencia mecánica tienen altos grados de cristalinidad, entrecruzamiento o una alta temperatura de transición vítrea (T_g); mientras que los polímeros flexibles y con poca resistencia mecánica, tienen características contrarias.

Dependiendo de las propiedades características de cada polímero, éstos pueden ser empleados como fibras, plásticos rígidos o elastómeros. En algunos casos pueden ser usados en más de una categoría.^[8]

Dentro de los polímeros sintéticos, se menciona anteriormente que pueden ser empleados como fibras, plásticos y elastómeros; dependiendo de las propiedades de cada uno. Por ejemplo:

Los elastómeros cuentan con la característica de tener una elasticidad instantánea completamente recuperable e ilimitada; las fibras tienen propiedades como la resistencia, extensibilidad, rigidez, elasticidad y tenacidad, mientras que los plásticos sus propiedades son intermedias entre los elastómeros y fibras. Gracias a esto tienen una infinidad de aplicaciones que se pueden dividir de la siguiente manera:

a) Plásticos de uso general: son materiales que se fabrican a bajo costo, y en grandes cantidades y son empleados en forma de recipientes, enseres domésticos, juguetes, etc.

b) Plásticos de ingeniería: Se caracterizan por tener propiedades particulares para aplicaciones específicas, por tener un volumen de producción menor y precios más elevados, los cuales pueden competir con materiales metálicos o cerámicos a los que aventajan por su menor densidad.

c) Plásticos avanzados: son materiales que se diseñan con una constitución molecular definida para satisfacer una aplicación concreta. Estos materiales tienen propiedades excepcionales que los califican como polímeros de vanguardia para el futuro. Entre las propiedades más relevantes destacan la biocompatibilidad.

Los plásticos con mayor aplicación industrial y comercial son los siguientes: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), polimetilmetacrilato (PMMA), policloruro de vinilo (PVC), politetrafluoroetileno o Teflón (PTFE), plásticos termo estables, poliamidas y poliésteres, teniendo esta última como el PET el poliéster más fabricado.^[9]

2.5. Aplicaciones médicas de los polímeros

Las infecciones causadas por bacterias son una de las principales causas de mortalidad en los hospitales de todo el mundo. Las bacterias pueden crecer en diferentes superficies y, cuando

esto ocurre, las bacterias colonizan la superficie formando así biopelículas. Dentro de este contexto, una de las principales preocupaciones es la formación de biopelículas en dispositivos médicos (catéteres urinarios, válvulas cardíacas, marcapasos, prótesis, etc.), en los materiales utilizados para el envasado de alimentos, en la industria textil y en los utilizados en la electrónica. En las anteriores aplicaciones se suelen utilizar materiales poliméricos que se ha prestado para la investigación y el desarrollo de elaborar polímeros antimicrobianos para evitar la proliferación de bacterias.^[10]

La mejora de los procesos de manufactura de los polímeros ha incrementado su uso en el campo de la medicina, especialmente en la ingeniería de tejidos. En general se usa la matriz plástica temporal en forma de soporte físico y biológico, que se elabora para el crecimiento de células hasta que los tejidos estén completamente restaurados.

Las propiedades requeridas para esta aplicación son la biodegradabilidad, biocompatibilidad, bioadhesividad, hemo compatibilidad, no toxicidad, capacidad de estiramiento y resiliencia. Los polímeros de origen petroquímico tienen propiedades mecánicas, físicas predecibles y reproducibles, pero muchos no son biodegradables.

Por otra parte, las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles fabricados para la aplicación de vendajes, deben tener capacidad de absorción de agua, permeabilidad y transmisión de vapor de agua. El PVA ha sido mezclado con quitosano, almidón, glucano y gelatina. Las mezclas obtenidas mejoraron las actividades biológicas de PVA y mostraron propiedades materiales adecuados para el vendaje y la cicatrización de heridas.



Figura 5. Principales aplicaciones de polímeros como material

En cuanto a los empaques aplicados en la industria, se utilizan películas formadas mediante la mezcla de dos o más polímeros, por lo general dan como resultados propiedades físicas y mecánicas modificadas en comparación con películas hechas de los componentes iniciales. La mezcla de polímeros naturales y sintéticos pueden mejorar la relación costo/rendimiento de las películas resultantes. Los envases de plástico para aplicaciones alimentarias y no alimentarias, generalmente no son biodegradables, y también consumen recursos no renovables valiosos y escasos como el petróleo. Los principales biopolímeros y polímeros utilizados en empaques para alimentos son almidón, celulosa, quitosano, caseína, colágeno, PLA, PHA, PVA y PGA.^[11]

2.6. Estrategias de inhibición de microorganismos en dispositivos médicos y contenedores alimenticios

Además del uso de empaques para inhibir el crecimiento de microorganismos en dispositivos médicos y contenedores alimenticios, se emplea la esterilización mediante la exposición de rayos UV, autoclaves, tratamientos químicos y radiación.

Por otro lado, se utiliza también la carga de medicamentos de amplio espectro sobre los dispositivos médicos para evitar la formación de la biopelícula.

También es sabido que la inmovilización de enzimas y recubrimiento con otros polímeros con propiedades antimicrobianas son una opción para mantener los dispositivos médicos y los contenedores alimenticios libres del crecimiento de bacterias.^[12]

2.6.1. Liberación Controlada de medicamentos

Una de las estrategias habituales para combatir las bacterias que generan infecciones relacionadas con dispositivos médicos, se basa en el uso de fármacos de liberación controlada o antibióticos. Este enfoque tiene algunos beneficios evidentes, ya que inhibe la formación de biopelículas, reduce los riesgos de sufrir infecciones y por tanto reduce la mortalidad en los pacientes. Desafortunadamente, el uso de antibióticos de amplio espectro puede aumentar el riesgo de desarrollar bacterias multirresistentes además de causar toxicidad sistemática.^[13]

Además del tratamiento con antibióticos, una estrategia común es el uso de recubrimientos antiincrustantes o antimicrobianos. Los recubrimientos antimicrobianos se pueden preparar a partir de polietilenglicol, recubrimientos basados en enzimas y recubrimientos superhidrofóbicos. La

funcionalización de superficies con etilenglicol confiere resistencia a la adhesión a proteínas y otros agentes biológicos. Por otro lado, no solo la modificación química, sino la micro o nano estructura de la superficie y la arquitectura de la superficie, nos permite la modificación de los materiales antimicrobianos.

En el ámbito de la tecnología farmacéutica, los sistemas que modulan la liberación respondiendo a estímulos específicos se conocen como inteligentes y pueden desempeñar su función en circuito abierto y cerrado (Figura 6).^[14] En los sistemas que actúan como circuito abierto, denominados pulsátiles, la regulación se consigue aplicando estímulos externos, sin que se altere significativamente su funcionamiento cuando se modifican las condiciones del entorno biológico.

En cambio, los sistemas autorregulados, que funcionan en circuito cerrado, detectan directamente ciertos cambios que se producen en el medio biológico (por ejemplo, en el pH, la temperatura o la concentración de ciertas sustancias) activando o modulando consecuentemente una respuesta que se plasma en la activación y desactivación del sistema.^[15] Por lo tanto, en este caso, es una variable biológica la que regula el proceso.

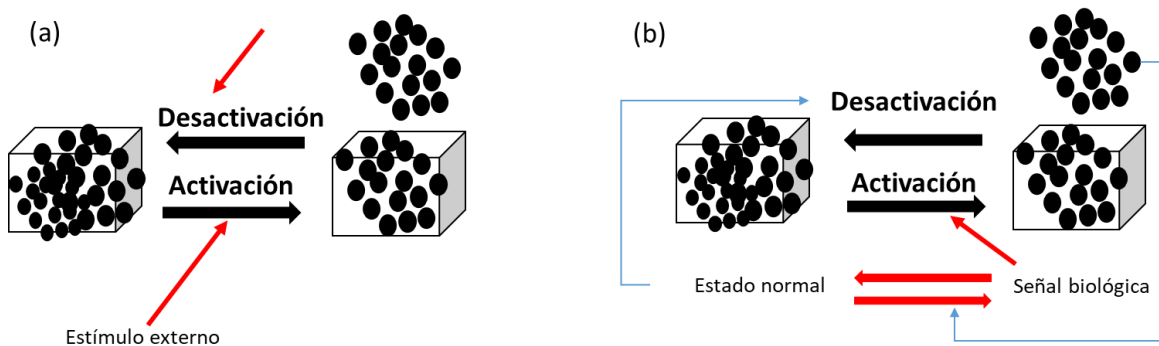


Figura 6. Esquema de un sistema inteligente cuando funciona en un; a) circuito abierto o b) circuito cerrado

Para que un polímero se pueda utilizar como componente de un sistema inteligente de liberación de medicamentos tiene que estar dotado de funcionalidad. Por funcionalidad se entiende como un efecto macromolecular específico, derivado de determinadas características químicas y estructurales, que se pueden manifestar con diferentes niveles de complejidad. La hidrofobicidad superficial o la capacidad para inmovilizar proteínas son ejemplos de funcionalidad a nivel básico.

La funcionalidad más compleja de los polímeros sensibles a estímulos se manifiesta, por ejemplo, como una aptitud para cambiar la solubilidad, la forma, el volumen o el estado de agregación en respuesta a un estímulo externo (por ejemplo, irradiación, aplicación de calor o de un campo eléctrico) o por una alteración del medio (cambio de pH o incorporación de una determinada sustancia).^[16]

2.7. Enzimas

Las enzimas son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, que catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas. La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su plegamiento, es decir, su estructura tridimensional. En esta estructura tridimensional se forman cavidades, llamadas “sitio activo”, las cuales muestran afinidad por las moléculas específicas (sustratos) que se convertirán en productos.

La combinación de grupos funcionales químicos presentes en estas cavidades genera un conjunto de interacciones covalentes y no covalentes entre la proteína y el sustrato.^[17]

Las características de una enzima son las siguientes:

- Permiten que se produzcan reacciones químicas en los seres vivos
- Actúan como matrices de anclaje de los compuestos que se tienen que procesar (sustratos)
- Logran acelerar la velocidad de numerosas reacciones
- Son de naturaleza proteica (las proteínas son cadenas de unidades de aminoácidos que se encuentran unidos por medio de enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y el grupo amino).^[18]

2.7.1. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente.^[19]

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar:

1. El aumento de la estabilidad de la enzima
2. La posible reutilización del derivado

Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son:

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo
2. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos categorías: retención física y unión química.^[20]

2.7.2. Retención física

La retención física o atrapamiento, consiste en la retención física de la enzima en las cavidades anteriores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguido se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante adición de un reactivo químico.

El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Adicionalmente, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura.

2.7.3. Inmovilización de enzimas por unión química

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplie el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Se ha utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño,

densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos lo encontramos en forma de cilindros, hojas y fibras.

Existen soportes inorgánicos, dentro de este grupo tenemos los naturales (arcillas, piedra pómez, sílice, etc.) y los manufacturados (óxidos de metales, vidrio, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.). Y los soportes orgánicos, en donde se encuentran los polímeros naturales y los polímeros sintéticos.

2.7.3.1. Adsorción

En la adsorción la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción son:

- a) El pH del medio ya que controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido;
- b) La fuerza iónica que al aumentar se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína;
- c) El diámetro de poro debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima;
- d) La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Como principales ventajas de este método destaca su preparación sencilla, bajo coste, no cambios de especificidad enzimática y los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido de agua.

Por otro lado, los inconvenientes de la adsorción son principalmente la optimización de las variables que controlan la adsorción, los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico y la unión al soporte es débil.^[21]

2.7.3.2. Unión covalente

La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Los aminoácidos más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina. Existen más aminoácidos que se encuentran en la estructura de las enzimas, que no sirven

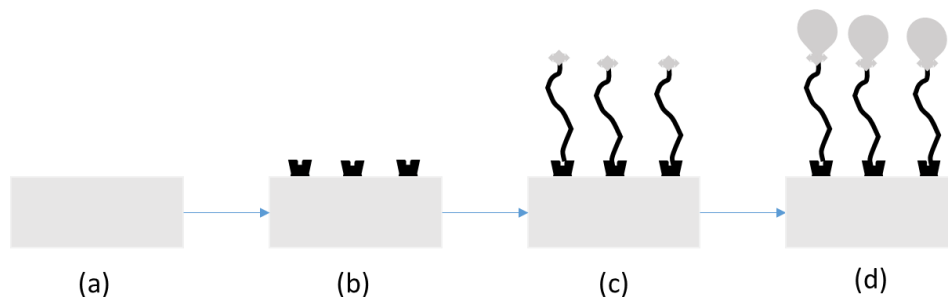


Figura 7. Modificación superficial de un polímero:(a) Superficie del polímero. (b) Superficie del polímero funcionalizada. (c) Superficie del polímero funcionalizada con espaciadores. (d) Superficie del polímero biofuncionalizada.

para la formación de enlaces con el soporte ya que son de carácter hidrófobo y no se encuentran expuestos en la superficie proteica. Este método presenta como ventajas que la manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla, la carga de la enzima permanece constante después de la inmovilización y ofrece una mayor resistencia a la desactivación por efecto de la temperatura, disolventes orgánicos o cambios del pH.^[22]

Por otro lado, el material que será el soporte debe cumplir ciertas características para que se lleve a cabo la inmovilización, características tales como: que sea compatible con la biomolécula y que no sea tan hidrófobo ya que esta puede causar la desnaturalización de la enzima. Desafortunadamente, la mayoría de los polímeros suelen ser muy hidrófobos así que es necesario llevar a cabo la modificación ya sea superficial o en masa del material para así acondicionarlo para la inmovilización.

Finalmente, cabe mencionar que la inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.^[23]

2.7.4. Enzimas con actividad antimicrobiana

Las enzimas pertenecen a una gran diversidad de moléculas de origen natural y, como parte de sus atributos, algunas poseen actividad antimicrobiana. Las enzimas presentan características

particulares que las convierten en excelentes catalizadores biológicos y aceleran la velocidad a la que se llevan a cabo las reacciones biológicas específicas para formar o degradar un producto.^[24]

En los microorganismos las enzimas tienen un papel primordial en sus funciones biológicas, como la división y el desarrollo celular, la defensa y la adaptación a condiciones desfavorables en un ambiente dado.

Hasta ahora, las enzimas antimicrobianas que han sido estudiadas son, entre otras, las proteolíticas, las oxidativas y las que tienen la capacidad de hidrolizar polisacáridos, incluidas las amilasas, las liasas y las lisozimas. En particular, se ha reportado ampliamente la actividad de las lisozimas contra varios microorganismos debido a su capacidad de hidrolizar los polímeros presentes en la pared celular de las bacterias, especialmente a aquellas que pertenecen al grupo Gram positivo. Estudios recientes han reportado también la capacidad que tiene esta enzima de hidrolizar la pared celular de hongos y levaduras. Así mismo se ha reportado su efectividad como agente antibacterial y antifúngico cuando se combina con otros compuestos activos. Las moléculas biopoliméricas como el quitosano se han utilizado en la preparación de materiales funcionales o de compuestos formulados a base de lisozimas.^[25]

2.8. Bacterias Gram-positivo y Gram-negativo

Para entender la clasificación de estas bacterias, explicaré que Hans Christian Gram fue un bacteriólogo danés (1853-1938) que ideó el método de tinción de bacterias que, en su honor, posteriormente fueron nombradas Gram.

La técnica de la tinción Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología que permite diferenciar rápida y fácilmente las bacterias según sus características morfológicas. El principio del método se basa en la tinción de todas las bacterias mediante cristal violeta o violeta de genciana y posteriormente agregar alcohol-acetona a los microorganismos y

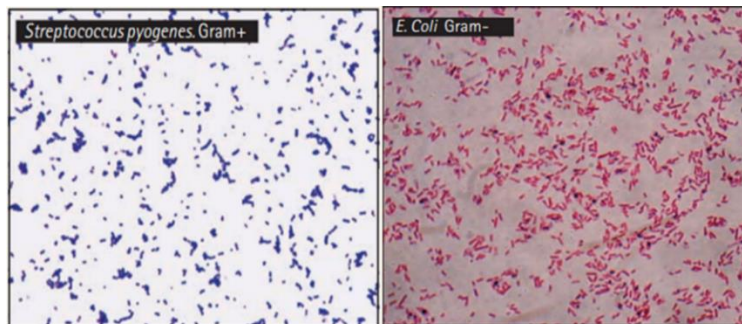


Figura 8. Ejemplos de cómo se visualizan las bacterias de tipo Gram-positivo y Gram-negativo después de teñirlas, respectivamente

aquí pueden suceder dos cosas, la primera que se decolore (pertenecen a los Gram-negativo) y la segunda que mantengan su coloración (pertenecen a los de tipo Gram-positivo).

Posteriormente se utiliza un colorante de contraste para visualizar los microorganismos, de este modo se podrá visualizar las bacterias Gram-positivo de color azul mientras que las Gram-negativo de visualizan de color rojo/rosa.^[26]

Se cree que la diferencia en la coloración que adquieren los dos grupos de bacterias se debe a la distinta composición química de la pared celular. Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de mureína o peptidoglicano (de 20-80 nm de espesor) en su pared,^[27] mientras que las bacterias Gram negativas no retienen el colorante de cristal violeta durante el proceso de coloración porque presentan una capa muy delgada de peptidoglicano en su pared celular y su capa más externa está cubierta por una capa de lipoproteínas, lipopolisacáridos y lípidos ^[28]

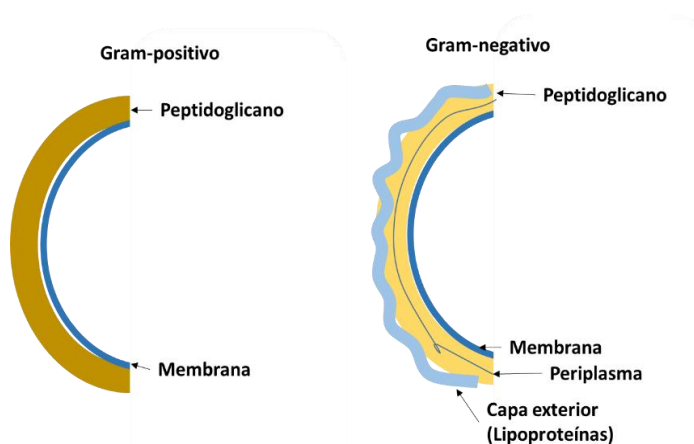


Figura 9. Esquema general de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

Tabla 1. Listado de algunas bacterias del tipo Gram-positivas y Gram negativas.^[26]

| Bacterias Gram positivo | Bacterias Gram negativo | |
|--|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Bacillus • Listeria • Staphylococcus • Streptococcus • Enterococcus • Clostridium | <ul style="list-style-type: none"> • Haemophilus • Klebsiella • Legionella • Pseudomonas • Escherichia • Proteus | <ul style="list-style-type: none"> • Enterobacter • Salmonella • Pasteurella • Bordetella • Riemerella |

También causan diferentes tipos de infecciones, y hay distintos tipos de antibióticos eficaces contra ellas.

Tabla 2. Lista de antibióticos eficaces para cada tipo de bacterias.^[26]

| Antibióticos eficaces contra Gram-positivo | Antibióticos eficaces contra Gram-negativo |
|---|--|
| Penicilinas, amoxicilinas, ampicilina y cefalosporinas. | Neomicina, gentamicina y estreptomina |
| Bacitracina y enrofloxacin | Enrofloxacin |
| Sulfamidas | Sulfamidas |
| Tetraciclinas | Tetraciclinas |
| Tilosina | Colistina |

Las bacterias Gram-positivas son cada vez más resistentes a los antibióticos. Tomemos en cuenta que la gran mayoría de las bacterias Gram-positivas causan ciertas infecciones entre las cuales destacan: carbunco, difteria, infecciones por enterococos, erisipelotricosis, listeriosis, infecciones neumocócicas, infecciones por staphylococcus aureus, infecciones por estreptococo y síndrome de choque tóxico, entre otros.^[29]

2.9. Lisozima

La lisozima o muramidasa es una enzima de origen natural que forma parte del grupo de las hidrolasas glucosídicas y cataliza la hidrólisis del enlace β (1-4) entre la N-acetilglucosamina (NAG) y el ácido N-acilmurámico (NAM) de las paredes celulares de las bacterias.

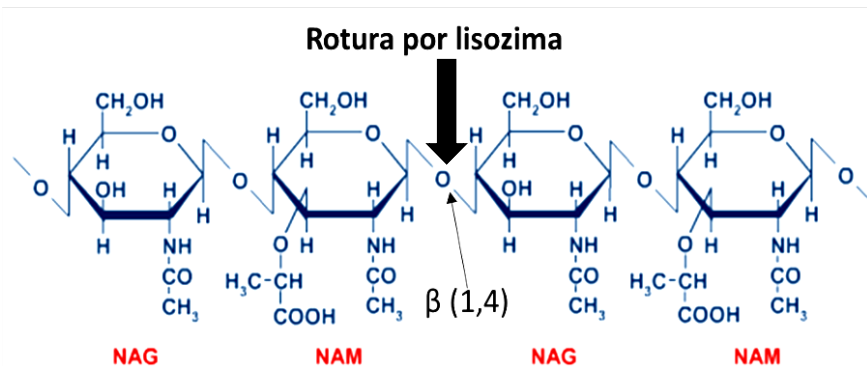


Figura 10. Rotura por lisozima del enlace β (1,4) de la pared celular de las bacterias.

Su estructura primaria está formada por una cadena polipeptídica simple cuyo número de residuos de aminoácidos varía: 130 en la lisozima humana (hLyz) y 129 en la lisozima de pollo. Sin embargo, ambas tienen una estructura muy similar. La cLyz es una enzima con 14.6 kDa y un alto punto isoeléctrico de 11.16, en tanto que la hLyz tiene 14.47kDa y un punto isoelectrico de 9.28.^[30]

La lisozima tiene diversas funciones siendo una de las principales su acción antiinflamatoria, inmunológica y antibacteriana; es abundante en numerosas secreciones como la saliva, las lágrimas y el moco, por ejemplo. Para su uso industrial se extrae principalmente de las claras de huevo las cuales contienen una gran cantidad de lisozima.^[31]

Esta enzima tiene participación en la inmunoestimulación del organismo, esto quiere decir que son capaces de ejercer una actividad de estimulación a la producción de anticuerpos contra diversos antígenos, mejorar la resistencia a enfermedades contra infecciones, etc. Así mismo participan como parte de los mecanismos de defensa del cuerpo.

La función antibacteriana de la lisozima se produce a través de la acción directa bacteriolítica fijándose en la pared celular bacteriana o con la estimulación de la función fagocítica de los macrófagos. En el caso de las bacterias Gram positivas, la lisozima provoca lisis de estas mediante

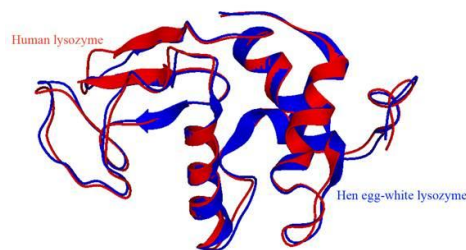


Figura 11. Comparación estructural de la Lisozima de humano y la lisozima obtenida del huevo de gallina

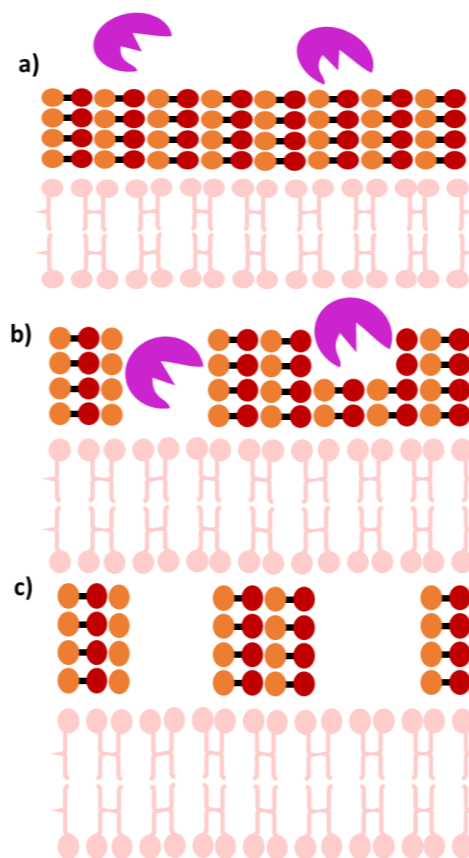


Figura 12. Amplio espectro de acción contra bacterias Gram positivas donde a) La lisozima se localiza en la pared celular bacteriana (peptidoglicano); b) Destrucción del enlace glucosídico; c) Hidrolización de la pared con consecuente muerte bacteriana.

la alteración de las propiedades de la estructura de la superficie de la célula destruyendo el enlace glucosídico entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina en el peptidoglicano, que es componente importante de la pared celular.^[32]

La composición química de las paredes celulares de las bacterias Gram negativas está compuesta por dos capas, la interna se compone de una sola capa de peptidoglicano y la externa por una capa gruesa de lipopolisacárido. La mayoría de las bacterias Gram negativas no son susceptibles a la acción de la lisozima sola porque su membrana externa impide el acceso a la enzima a la capa de peptidoglicano.^[33]

2.10. Panorama de la producción y consumo de plásticos

La producción y consumo de plásticos en América Latina ha tenido un enorme crecimiento en las últimas cuatro décadas. En 1980 el consumo en la región era de 7 kg de plástico por habitante en un año. Hoy en día el consumo se encuentra en general por encima de 30kg/habitante/año. En México y Chile, los dos países con consumos más altos per cápita, se consumen más de 50 kg/habitante/año.

Al igual que a nivel global, uno de los usos más importantes que tiene el plástico en la región latinoamericana, son los envases y embalajes. México y Argentina representan más del 40% del consumo de plásticos, y dentro de los envases, aquellos usados por la industria de alimentos y bebidas conforman el segmento más importante. México es el mayor consumidor de agua embotellada del mundo, con un valor en torno a los 200 litros/habitante/año.^[34]

2.11. Polietilentereftalato (PET)

El material polietilén tereftalato es un poliéster obtenido a partir de una reacción de policondensación entre el ácido tereftálico (TA) y el etilenglicol. Su producción comenzó en 1941 en Inglaterra, donde fue patentado por Whinfield y Dickson, y cinco años más tarde ya se utilizaba industrialmente como fibra. Aun así, tuvo que esperar veinte años para empezar a producirse en forma de botellas, su principal destino actual.

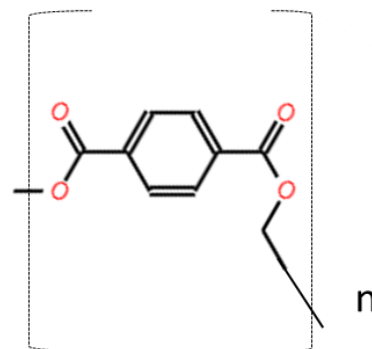


Figura 12. Estructura molecular del PET

Su creciente importancia como material de envase alimentario se debe a que en las últimas décadas ha sustituido al vidrio y al policloruro de vinilo debido a su mayor manejabilidad e inocuidad, respectivamente. Además de estas características, es transparente, ligero, fuerte, seguro, irrompible y reciclable. Su función principal es la de proteger el contenido manteniendo la totalidad de sus características y beneficios intactos.

Por su parte, la mejora en las tecnologías de barrera del PET aumenta la protección de las propiedades naturales de los productos envasados frente a la migración del oxígeno y el dióxido de carbono pero, al ser el PET el plástico más reciclado a nivel mundial, la posible interacción con tóxicos genera preocupación; la infraestructura de reciclado está totalmente establecida, pudiendo llevarse a cabo el reciclado en varias ocasiones consecutivas y ahorrándose por cada kilogramo de PET reciclado utilizado, un 84% de la energía necesaria y reduciéndose en un 71% las emisiones de gases de efecto invernadero, por lo que es un proceso que interesa a nivel ambiental. En cuanto a su posible toxicidad, el PET está aprobado para estar en contacto con alimentos y bebidas por la Food and Drug Administration (FDA) a nivel internacional.^[35]

El PET es un polímero termoplástico lineal, con un alto grado de cristalinidad. Como todo los termoplásticos puede ser procesado mediante extrusión, inyección, soplado de preforma y termo conformado. Para evitar el crecimiento excesivo de las esferulitas y lamelas de cristales, este material debe ser rápidamente enfriado, con esto se logra una mayor transparencia, la razón de su transparencia al enfriarse rápido consiste en que los cristales no alcanzan a desarrollarse completamente y su tamaño no interfiere con la trayectoria de la longitud de onda de la luz visible de acuerdo con la teoría cuántica.^[36]

2.11.1. Procesos de síntesis del PET y sus componentes químicos

El PET es un polímero conseguido a partir de reacciones de polimerización por condensación, en cada una de las cuales se pierde una molécula de agua. Pertenece al grupo de los copolímeros, ya que su formación es el resultado de la unión de ácido tereftálico y etilenglicol.

La mayoría de los polímeros están formados a partir de productos de la refinación del petróleo, estimándose que en torno a un 3% del petróleo crudo se destina a este tipo de productos petroquímicos.

Una de las materias primas utilizadas en la fabricación del PET es el xileno, comúnmente conocido como dimetilbenceno, molécula que posee varios isómeros que se diferencian por sus puntos de ebullición con la finalidad de aislar el para-xileno, que es el isómero empleado en la producción de polímeros. Los xilenos se encuentran en los gases de coque, que es un combustible sólido formado por la destilación del carbón, en los gases obtenidos en la destilación seca de la madera y algunos petróleos. A partir del para-xileno se lleva a cabo la formación de ácido tereftálico puro, que es un líquido incoloro e inflamable con un olor similar al del tolueno.

El primer paso en la formación del PET es la polimerización, que consiste en la unión de monómeros productores de PET (para-xileno y etileno). El etileno es tratado con oxígeno, en presencia de plata como catalizador de la reacción, para producir óxido de etileno, el cual reacciona con el agua en presencia de un ácido para producir etilenglicol. Por su parte, el para-xileno es oxidado para producir el ácido tereftálico, que más tarde será esterificado a dimetil tereftalato (DMT); esta oxidación se lleva a cabo por un catalizador de cobalto en presencia de metanol.

A nivel industrial, se puede partir de dos moléculas distintas para la producción del monómero tereftalato de bis-hidroxieta (BHET), que son el TA y el DMT, mediante la esterificación con el etilenglicol. El producto obtenido se fuerza a pasar a través de una matriz por la presión que ejerce el nitrógeno, lo que da lugar a fibras alargadas que caen en agua, donde se enfrían y consolidan. Estas fibras pasan después por una peletizadora que las reduce a pellets, los cuales se almacenan para el posterior conformado en productos útiles.^[37]

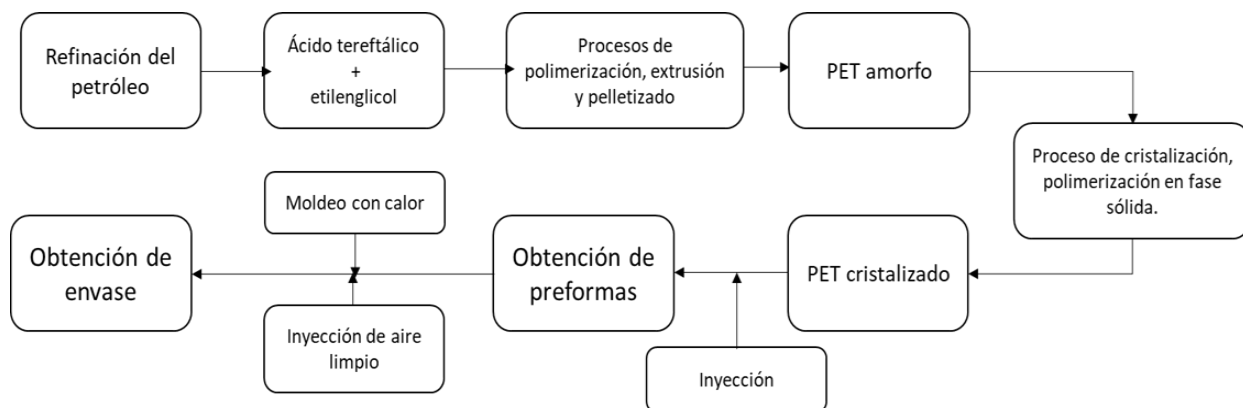


Figura 13. Diagrama de flujo de obtención de un envase de PET.

2.11.2. Propiedades del PET

Presenta las siguientes características:

- Alta transparencia, aunque admite cargas de colorantes.
- Alta resistencia al desgaste y corrosión.
- Muy buen coeficiente de deslizamiento.
- Buena resistencia química y térmica.
- Muy buena barrera a , aceptable barrera a y humedad.
- Compatible con otros materiales barrera que mejoran en su conjunto la calidad de barrera de los envases y por lo tanto permiten su uso en mercados específicos.
- Reciclable, aunque tiende a disminuir su viscosidad con la historia térmica.
- Aprobado para su uso en productos que estén en contacto con productos alimenticios.
- No tóxico, a cierto grado, ya que todos los plásticos tienen cierto grado de toxicidad.
- Inerte
- Resistencia a esfuerzos permanentes y al desgaste, ya que presenta alta rigidez y dureza.
- Liviano
- Estabilidad a la intemperie.
- Alta resistencia al plegado y baja absorción de humedad que lo hace muy adecuado para la fabricación de fibras.

Las propiedades físicas del PET y su capacidad para cumplir diversas especificaciones técnicas han sido las razones por las que el material haya alcanzado un desarrollo relevante en la producción de fibras textiles y en la producción de una gran diversidad de envases, especialmente en la producción de botellas, bandejas y láminas.

2.11.2.1. Solubilidad

El PET es insoluble en solventes orgánicos, aunque presenta una solubilidad en mayor o menor grado a algunos solventes como cetonas, compuestos clorados y alcoholes de 4 u 8 carbonos, solventes halogenados, aromáticos, cetonas de bajo peso moléculas y bases.

2.11.2.2. Estabilidad térmica

Generalmente los poliésteres cuando se les aplica temperaturas mayores a los 70 °C, van perdiendo sus propiedades debido a que el calor provoca cambios químicos en la masa plástica, produciendo: reacciones de eliminación, despolimerización, descomposición, fragmentación y reacciones de grupos funcionales.³⁸

2.11.2.3. Degradación del PET

El PET es un material particularmente resistente a la biodegradación debido a su alta cristalinidad y a la naturaleza aromática de sus moléculas, por lo cual se le considera no biodegradable.

El PET si puede ser degradado mediante un proceso químico por el cual se modifica su estructura molecular para reutilizar el material para un nuevo producto u obtención de combustibles.

La degradación química de PET puede darse mediante reacciones de hidrólisis, glicólisis, aminólisis, entre otras. En este tipo de reacciones un agente nucleófilo ataca al grupo carbonilo del PET ocasionando la ruptura de la cadena con subsecuente eliminación de etilenglicol. El agente nucleófilo quedará unido al final de la cadena acortando la longitud de ellas, dando lugar a un nuevo material, que en función de sus propiedades puede ser utilizado para diferentes fines.^[39]

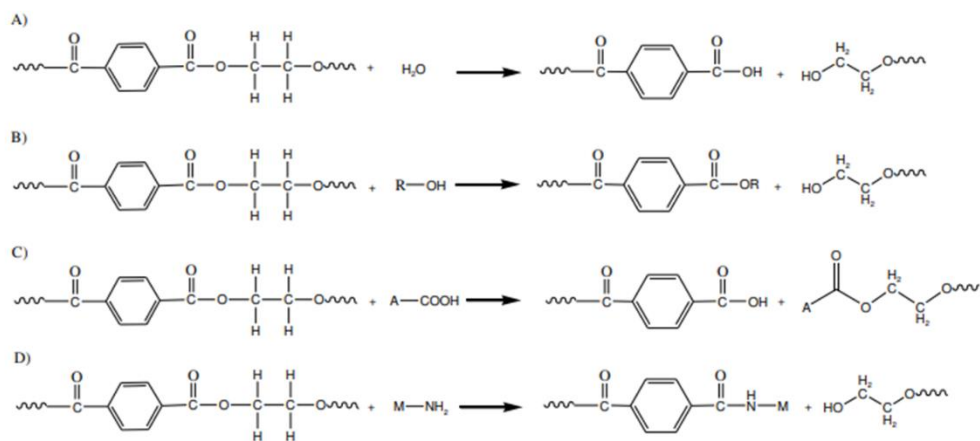


Figura 15. Tipos de reacciones de la degradación química de PET, A) Hidrólisis, B) Glicólisis, C) Acidólisis y D) Aminólisis

La degradación por medio de un fluido supercrítico, usando disolventes en condiciones supercríticas. Comúnmente son utilizados para la degradación de PET los disolventes como el tolueno, acetona, benceno, xileno y etilbenceno a temperaturas de entre 583-643 K y presiones de 4-6MPa.

Mediante el proceso anterior mencionado se obtiene estireno y otros hidrocarburos aromáticos con tiempos de reacción muy cortos, gracias a la buena transferencia de masa y calor que se genera a tales condiciones. [40]

La degradación de PET con etilendiamina y etanolamina incorpora grupos amina y amida respectivamente a las cadenas obtenidas de la degradación de PET.

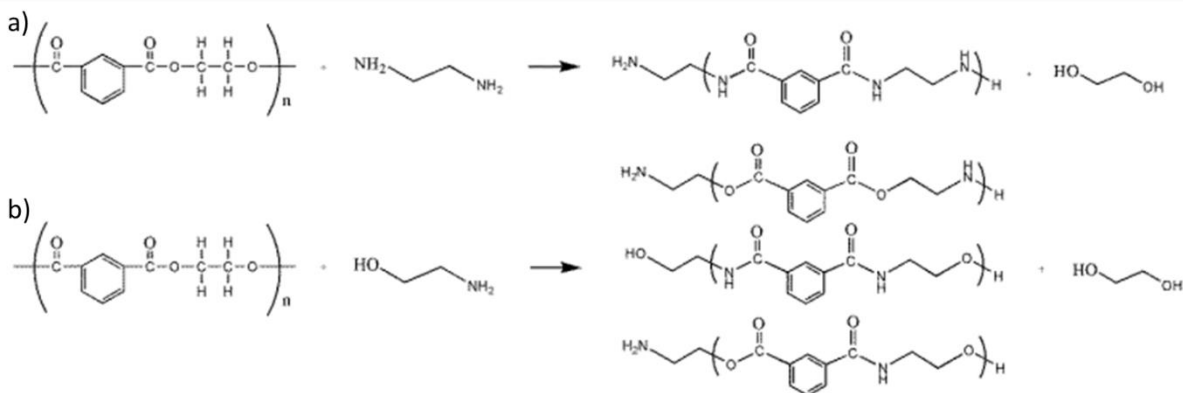


Figura 16. Reacciones de la degradación química de PET con a) etilendiamina b) etanoamina

2.12. Espectroscopía Infrarroja

Ahora hablaré de los equipos de medición (caracterización), éstos son intérpretes de una realidad que no podemos ver. El equipo donde se lleva a cabo la interacción entre la materia (muestra) y la radiación infrarroja es un espectrómetro de infrarrojo. Actualmente a estos equipos también se les conoce como espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier. El resultado de la interacción entre la muestra y la energía en infrarrojo se lee en un espectro infrarrojo. [41]

Los espectrómetros infrarrojos son una de las herramientas más importantes para observar espectros vibracionales.

Las características más relevantes de la espectroscopía infrarroja son:

1. Si dos moléculas están constituidas por átomos distintos, o tienen distinta distribución isotópica, o configuración, o se encuentran en ambientes distintos, los espectros infrarrojos serán distintos.

2. Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia.

3. Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos.

4. A partir de los espectros se pueden inferir las estructuras moleculares. Para ello se requiere un modelo en el cual basar los cálculos.

5. Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla, son generalmente proporcionales a las concentraciones de las componentes individuales. Por lo tanto, es posible determinar la concentración de una sustancia y realizar análisis de muestras de varias componentes.

6. Es posible, mediante el uso de dispositivos experimentales adecuados, obtener espectros infrarrojos sin alteración de la muestra, lo que constituye a esta espectroscopía como una herramienta de análisis no destructiva.

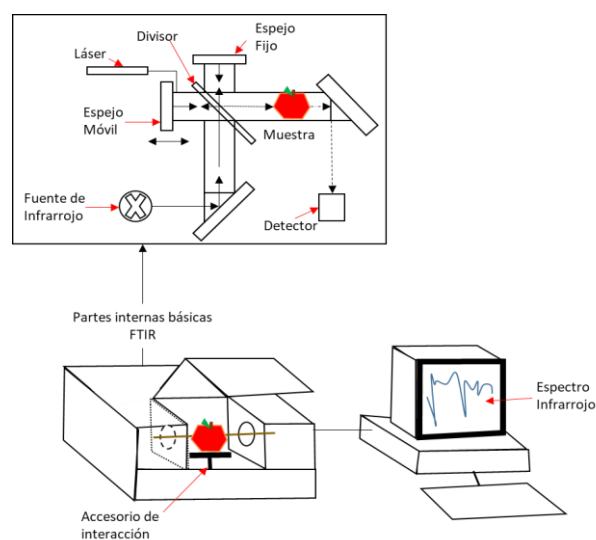


Figura 17. Representación de un espectrómetro de infrarrojo

2.12.1. El espectro infrarrojo y sus zonas características

El resultado que se obtiene de un análisis de espectroscopía de infrarrojo está dado por un espectro infrarrojo. En la Figura 18 están mostradas las zonas principales de un espectro infrarrojo, usando como ejemplo el espectro de una muestra de miel de abeja.

En el eje de equis (x) se encuentra indicada la intensidad de la radiación infrarroja en número de onda, y en el eje (Y) se encuentra indicada la intensidad de la radiación infrarroja absorbida. Como se

observa en la Figura 18, el espectro consta de una serie de picos llamadas bandas de absorción, los cuales se ubican en diferentes posiciones, alturas y anchuras. Para el caso particular de la miel de abeja que en su mayoría está compuesta por agua y carbohidratos, se pueden observar las bandas asociadas a estos componentes.^[42]

En general, un espectro de infrarrojo se divide en dos partes, la primera entre 4000 y 1500 en donde el número de onda proviene de vibraciones de enlaces presentes consideradas como grupos funcionales y la segunda región comprendida entre 1500 y 500, llamada región de huella digital, son generados por varias vibraciones presentes en la estructura de la molécula, estas estructuras son únicas de cada molécula o grupo de moléculas.^[43]

2.12.2. La región de los grupos funcionales

Un grupo funcional es aquel que absorbe radiación en un intervalo específico de frecuencias, independientemente a que esté unido en una molécula. Es decir, la banda que se genera en un espectro se ubica siempre en la misma zona. Además de los grupos funcionales, existen varias regiones importantes en un espectro, en donde se presentan bandas de absorción características de muchos compuestos. La tabla siguiente (Tabla 3) muestra las bandas de absorción características para los grupos más comunes.^[44]

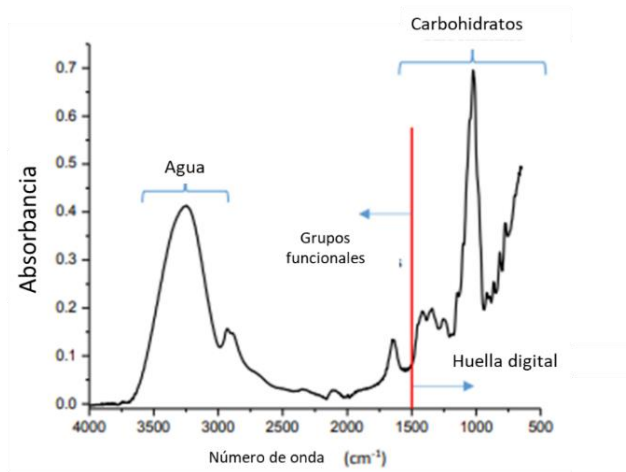


Figura 14. Espectro de infrarrojo de la miel de abeja, en donde se resaltan las principales zonas del espectro.

Tabla 3. Bandas de absorción características para los grupos funcionales más comunes [45]

| Grupo | | Banda (cm ⁻¹) | Grupo | | Banda (cm ⁻¹) |
|---------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|
| Alcanos | $C - H$ | 2950 - 2800 | Cloruros de Acido | $C = O$ | 1810 - 1775 |
| | CH_2 | 1465 | | $C - Cl$ | 730 - 550 |
| | $C3$ | 1375 | Anhídridos | $C = O$ | 1830 - 1800, 1775 - 1740 |
| | CH_2 | 720 | | $C - O$ | 1300 - 900 |
| Alquenos | $C = H$ | 3100 - 3010 | Aminas | $N - H$ | 3500 - 3300 |
| | $C = C$ (Aislado) | 1690 - 1630 | | $N - H$ | 1640 - 1500 |
| | $C = C$ (Conjugado) | 1640 - 1610 | | $C - N$ (alquil) | 1200 - 1025 |
| | $C - H$ (en el plano) | 1430 - 1290 | | $C - N$ (aril) | 1360 - 1250 |
| | $C - H$ (monosustituido) | 990 - 910 | | $N - H$ | 800 |
| | $C - H$ (disustituido) | 970 - 700 | Amidas | $N - H$ | 3500 - 3180 |
| | $C - H$ (trisustituido) | 815 | | $C = O$ | 1680 - 1630 |
| Alquinos | $C - H$ (acetilénico) | 3300 | | $N - H$ | 1640 - 1550 |
| | $C \equiv C$ | 2150 | $N - H$ | 1570 - 1515 | |
| | $C - H$ | 650 - 600 | Haluros de Alquilo | $C - F$ | 1400 - 1000 |
| | $C - H$ | 3020 - 3000 | | $C - Cl$ | 785 - 540 |
| $C = C$ | 1600, 1475 | $C - Br$ | | 650 - 510 | |
| $C - H$ (mono) | 770 - 730, 715 - 685 | $C - I$ | | 600 - 485 | |
| Aromaticos | $C - H$ (orto) | 770 - 735 | Nitrilos | $CN(tr)$ | 2250 |
| | $C - H$ (meta) | 880, 780, 690 | Isocianatos | $-N = C = O$ | 2270 |
| | $C - H$ (para) | 850 - 800 | Isotiocianatos | $-N = C = S$ | 2125 |
| | Alcoholes | $O - H$ | 3650, 3400 - 3300 | Iminas | $R_2C = NR$ |
| $C - O$ | | 1260 - 1000 | Grupos Nitro | $-NO_2$ (alifático) | 1600 - 1530 |
| Eteres | $C - O - C$ (diaquil) | 1300 - 1000 | | $-NO_2$ (aromático) | 1550 - 1490 |
| | $C - O - C$ (diaril) | 1250, 1120 | Mercaptanos | $S - H$ | 2250 |
| Aldehidos | $C - H$ | 2850, 2750 | Sulfoxidos | $S = O$ | 1050 |
| | $C = O$ | 1725 | Sulfonas | $S = O$ | 1300, 1150 |
| Cetonas | $C = O$ | 1715 | Sulfanatos | $S = O$ | 1350, 1175 |
| | $C - C$ | 1300 - 1100 | | $S - O$ | 1000 - 750 |
| Acidos Carboxilicos | $O - H$ | 3400 - 2400 | Fosfinas | $P - H$ | 2320 - 2270 |
| | $C = O$ | 1730 - 1700 | | PH | 1090 - 810 |
| | $C - O$ | 1320 - 1210 | Oxidos de fosfina | $P = O$ | 1210 - 1140 |
| | $O - H$ | 1440 - 1400 | | | |
| Esteres | $C = O$ | 1750 - 1735 | | | |
| | $C - C(O) - C$ (acetatos) | 1260 - 1230 | | | |
| | $C - C(O) - C$ (restantes) | 1210 - 1160 | | | |

2.13. Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica industrial que permite el análisis cualitativo y cuantitativo de sustancias sometiéndolas a una temperatura elevada. El dispositivo TGA ayuda a evaluar cambios en la masa con respecto al cambio de temperatura. De esta manera, se pueden determinar varios parámetros físicos y químicos pertinentes a una sustancia en particular. Para la industria del plástico se utiliza principalmente para: estimar la estabilidad térmica y la durabilidad o vida útil del material.^[46]

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) consiste en calentar una muestra, así como también un compuesto de referencia de tal manera que la temperatura sea en todo momento igual al de la muestra como al compuesto de referencia. Esto se consigue midiendo las temperaturas con sensores y ajustando las potencias de calentamiento. La representación de la potencia de calentamiento frente a la temperatura es lo que se denomina DSC.

Para muestras biológicas, esta técnica hoy en día está considerada como la más adecuada para estudiar la energética de las transiciones plegamiento-desplegamiento de las proteínas. Permite la caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura en proteínas, ácidos nucleicos y biomembranas.^[47]

2.14. Espectrofotometría de Absorción

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

El espectrofotómetro consta de una fuente de energía radiante, un monocromador para la

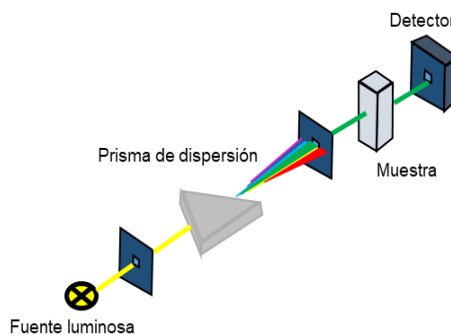


Figura 15. Partes del espectrofotómetro

selección de radiaciones de una determinada longitud de onda, un compartimiento donde se aloja el recipiente con la muestra (pueden ser de cuarzo o plástico transparente), un detector de luz y un registrador o sistema de lectura de datos.

El primer paso para operar el equipo es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida. Después se mide la absorbancia de disolvente (conocido como blanco) y al que se le asigna el valor de cero mediante el ajuste del mando, de forma que la intensidad incidente y transmitida sean iguales y por lo tanto la absorbancia es cero. Finalmente se pone la celda con la muestra y se lee la absorbancia de esta.^[48]

2.15. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es una medida de la capacidad de un líquido para mojar la superficie de un sólido. La forma que toma una gota en una superficie depende de la tensión superficial del líquido y de la naturaleza de la superficie. En el límite entre las gotas y el entorno gaseoso, la tensión superficial provoca un contorno curvo.

En el borde de la gota, donde el contorno se fusiona con la superficie de apoyo, el ángulo de contacto entre la interface líquido/sólido y la tangente a la interface líquido/gas. La determinación de la tensión superficial o interfacial mediante el análisis de la forma de una gota de un líquido que pende de la punta de una aguja o tubo, o bien que flota cuando la gota del fluido es menos densa que la fase exterior.

El ángulo de contacto es un parámetro que se usa en materiales para caracterizar las propiedades de humectabilidad de estos o la hidrofiliidad. Si el líquido corre uniformemente sobre la superficie sólida, se produce una completa humectación con un ángulo de contacto de 0° . Si el ángulo está entre 0° y 90° , la superficie es mojable. Un ángulo entre los 90° y 180° significa que la superficie no es mojable, o sea que es hidrofóbica. Si el ángulo se aproxima claramente al valor de 180° es una superficie ultra hidrofóbica (completamente repelente a los líquidos).^[49]

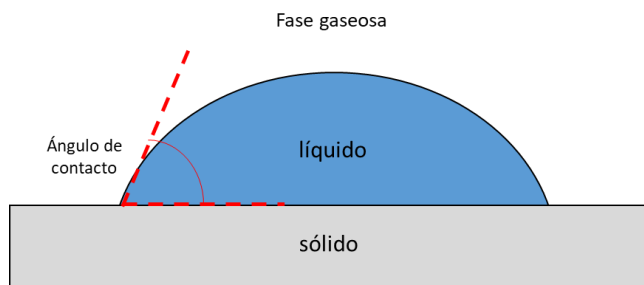


Figura 16. Explicación gráfica del ángulo de contacto

3. Hipótesis

La inmovilización de lisozima sobre las películas de (PET) proporcionará una mayor estabilidad de la lisozima frente a diferentes cambios fisicoquímicos del medio, así como actividad antimicrobiana al material polimérico mediante “contact-kill” (muerte por contacto) de microorganismos Gram- positivo y Gram-negativo.

3.1. Objetivos Generales

- 1) Realizar la funcionalización química de las películas de PET
- 2) Llevar a cabo la inmovilización de lisozima sobre las películas de PET funcionalizadas
- 3) Evaluar la actividad antimicrobiana frente a un modelo

3.2. Objetivos Particulares

- 1) Encontrar las condiciones óptimas para realizar la modificación de las películas de PET con etilendiamina, disminuyendo al mínimo la pérdida de masa de la película.
- 2) Determinar la cantidad de grupos amino presentes en la superficie de la película mediante titulación ácido-base.
- 3) Encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo la reacción con glutaraldehído y su reducción con borohidruro de sodio.
- 4) Realizar la inmovilización de lisozima sobre las películas de PET activadas con grupos carbonilo para llevar a cabo la unión covalente entre la película y la enzima.
- 5) Determinar la cantidad de lisozima inmovilizada sobre la película mediante espectrofotometría.
- 6) Evaluar la actividad antimicrobiana mediante espectrofotometría frente a un modelo de *Micrococcus lysodeikticus* a diferentes valores de pH y temperatura.
- 7) Determinar las propiedades mecánicas de los materiales mediante pruebas de tensión uniaxial.
- 8) Determinar la morfología superficial y de sección transversal de los nuevos materiales usando microscopía electrónica de barrido (SEM).
- 9) Determinar las propiedades térmicas de los materiales mediante análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido.

4. Procedimiento experimental

4.1 Materiales

Películas de polietileno tereftalato grado alimenticio de 150 μm de espesor por 1.2 cm de ancho y 5 cm de largo. Dicho material será obtenido mediante el reutilizado de botellas de refresco. Adicionalmente se requieren los siguientes disolventes y reactivos: etilendiamina, glutaraldehído, borohidruro de sodio, agua destilada, metanol, etanol, fosfato disódico, ácido clorhídrico, hidruro de sodio, lisozima, *micrococcus lysodeikticus*.

4.2 Metodología

4.2.1. Funcionalización de la película de PET con etilendiamina

Se colocarán 5 películas de PET previamente pesadas en 10 ml de etilendiamina a 25 °C y constante agitación. Se removerá una película del sistema de reacción a un tiempo establecido de 0.5, 1, 2, 3, 4 h. Las películas tomadas del sistema de reacción serán lavadas exhaustivamente con agua destilada y secadas a vacío. Una vez lavadas y secadas adecuadamente las películas se pesarán y determinará el porcentaje de pérdida de peso, así como su porcentaje en peso de funcionalización mediante titulación y espectroscopia de infrarrojo. Este procedimiento se realizará por triplicado.

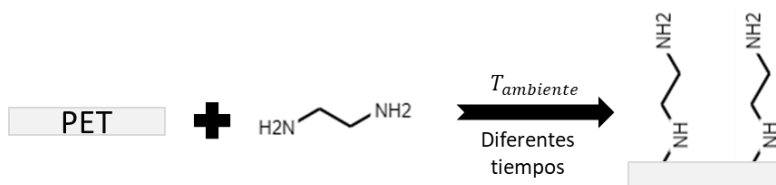


Figura 17. Esquema de reacción de la película de PET con etilendiamina, obteniendo películas funcionalizadas con grupos amino (PET-EDA).

4.2.2. Funcionalización de la película de PET con grupos carbonilo

A partir de los resultados previos se tomarán las películas con el mayor grado de funcionalización con grupos amino y se harán reaccionar con glutaraldehído. Se colocará una película en 10 ml de agua destilada y diferentes cantidades de glutaraldehído 1, 2 y 3 ml, y se mantendrá la reacción a 25 °C por un tiempo de 1 h. Posteriormente la película será removida del medio de reacción y colocada en 10 ml de metanol, agregándose 10 mg de borohidruro de sodio,

la reacción se mantendrá en el sistema de reacción durante 1 h. Finalmente, la película será lavada exhaustivamente con agua destilada.

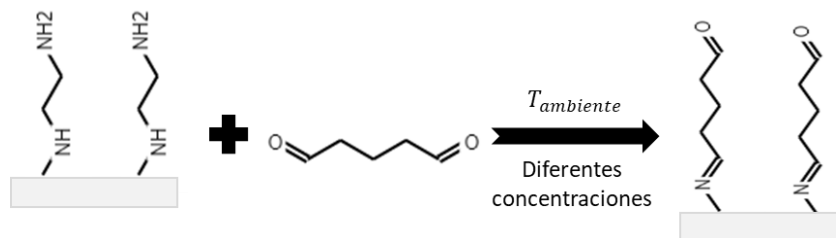


Figura 22. Reacción de las películas (PET-EDA) con glutaraldehído para la obtención de las películas funcionalizadas con grupos carbonilo (PET-ALDH)

4.2.3. Inmovilización de lisozima sobre la película de PET funcionalizada con grupos carbonilo

La reacción de inmovilización de lisozima se realizará colocando las películas funcionalizadas con grupos carbonilos obtenidas con diferentes concentraciones de glutaraldehído, en 5 ml de solución amortiguadora pH 7.4 con diferentes concentraciones de lisozima 5, 10, 15, 20 mg/ml. La reacción se mantendrá a 5 °C por un tiempo de 12 h. Las películas obtenidas se lavarán con agua y almacenadas a 5 °C hasta su uso.

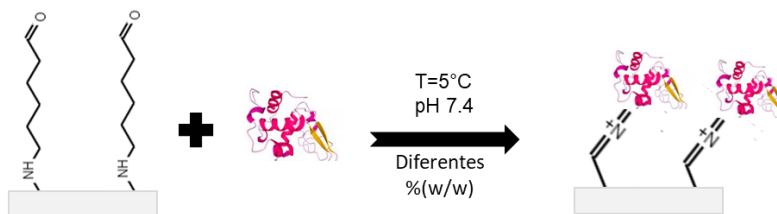


Figura 23. Inmovilización de la enzima (lisozima) sobre las películas funcionalizadas con grupos carbonilo (PET-ALDH).

4.2.4. Evaluación de la actividad enzimática de la lisozima inmovilizada sobre la película de PET

La evaluación de la actividad enzimática será realizada colocando una película de 1x1 cm con lisozima inmovilizada en una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* con una absorbancia de 0.6 y se monitoreará la disminución de la absorbancia mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 450 nm a diferentes intervalos de tiempo. La actividad enzimática también será evaluada a diferentes valores de pH (2-12) y a diferentes valores de temperaturas (20-70 °C) monitoreando la disminución de la absorbancia para cada caso.

5. Resultados

5.1. Análisis de la pérdida de masa de las películas de PET de acuerdo al tiempo de reacción con EDA.

Las películas de PET fueron lavadas exhaustivamente, secadas y pesadas antes de meterlas al medio de reacción para su funcionalización. El medio de reacción se llevó a cabo usando etilendiamina como reactivo. Se realizó a diferentes tiempos de reacción a 25 °C, como resultado obtuvimos películas funcionalizadas con grupos amino, pero se observó que mientras más tiempo permanecían en el medio de reacción aumentaba la pérdida de masa de la película y en consecuencia aumenta la degradación del material que al momento de ser lavada se desprendían pequeñas partículas blancas.

Tomando en cuenta la pérdida de masa y la desintegración del material que se empezaba a presentar después de 2 horas de reacción, y que en el estudio de FTIR-ATR no se presentaban diferencias significativas en la presencia de grupos amino, se seleccionaron las películas modificadas con un tiempo de reacción de 1 hora para continuar con la funcionalización de películas con grupos carbonilo.

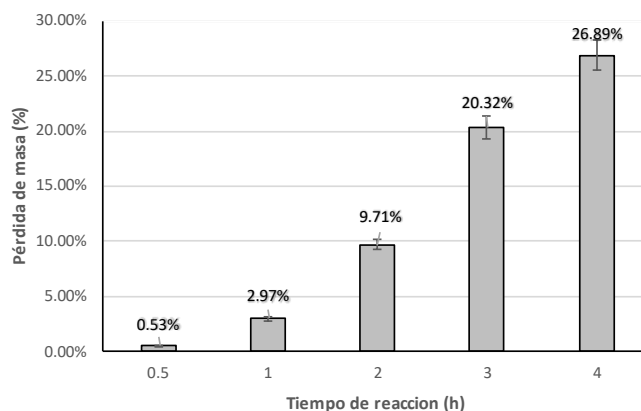


Gráfico 1. Esquema de la pérdida de masa en porcentaje de las películas de PET con respecto del tiempo de reacción con EDA para su funcionalización.

5.2. Cuantificación de la presencia de grupos amino en las películas funcionalizadas mediante titulación.

Para la cuantificación de la presencia de grupos amino sobre las películas de PET se calcularon mediante titulación ácido-base, colocando 5 películas de PET-DIET, de área conocida, en 10 ml de una solución de ácido clorhídrico con una concentración de 0.01904 M en constante agitación durante 24 horas, después se tituló el exceso de ácido clorhídrico con una solución de

carbonato de sodio con una concentración de 0.007990 M. Con los datos anteriores se calcula la cantidad de grupos amino con la siguiente ecuación (Ec.1):

$$mmoles\ de\ grupos\ amino = [(V_{HCl} * C_{HCl}) - (V_T * C_{NaCo})] * A \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

V_{HCl} : Volumen de la solución de ácido clorhídrico

C_{NaCo} : Concentración de la solución de carbonato de sodio

C_{HCl} : Concentración de la solución de ácido clorhídrico

A : Área total de las películas de PET-DIET

V_T : Volumen del gasto de la titulación

Sustituyendo:

$$mmoles\ de\ grupos\ amino = [(3ml * 0.01904) - (7.12ml * 0.00799)] * (32.5\ cm^2) \quad (\text{Ec. 2})$$

Calculando, se obtuvo que las películas presentaron una cantidad promedio de grupos amino primarios en la superficie de $0.007514\ mmoles \cdot cm^{-2}$.

5.3. Estudio de ángulo de contacto

De acuerdo a los estudios del ángulo de contacto, se puede observar cómo cambia la hidrofiliicidad con respecto a cada etapa del procedimiento para la inmovilización de enzimas. Para la película PET-V se obtuvo un ángulo de 91.2° y disminuyó después de la reacción con EDA para la película de PET-EDA con un ángulo de 74.3° , para la película PET-ALDH se obtuvo un ángulo de 60.2° y para la película PET-LYZ hubo un pequeño aumento con un ángulo de 67.9° , finalmente hubo un aumento de la hidrofiliicidad correspondiente a las características del material.

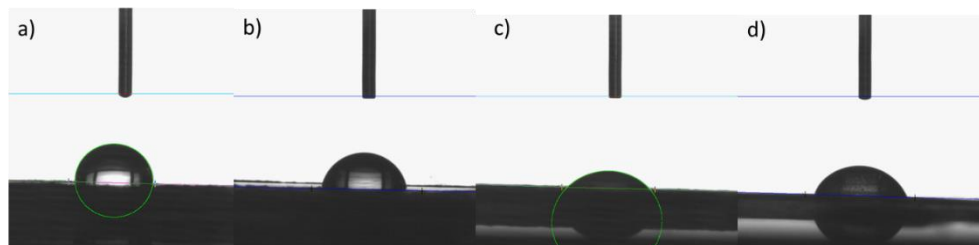


Figura 24. Ángulo de contacto del material en cada una de las fases del procedimiento a) PET-V, b) PET-EDA, c) PET-ALDH, d) PET-LYZ

5.4. FTIR-ATR Análisis

A continuación, se muestran los espectros FTIR-ATR de las películas de PET en cada paso de la funcionalización e inmovilización de la enzima, en donde se obtuvo información sobre los nuevos grupos funcionales y la presencia de la lisozima sobre las películas de PET.

Para la película de PET-V se muestran las bandas características del PET el enlace (C-O-C) que se encontraron en el área de 1240-1117 cm^{-1} , los enlaces correspondientes al enlace del grupo éster (C=O) en 1713 cm^{-1} y el enlace (C-H) del metileno en el área de 2967-2908 cm^{-1} .

A partir de la película PET-EDA en donde se muestran las bandas en el intervalo de 3301-2968 cm^{-1} que son pertenecientes a la vibración del enlace (–OH) y el enlace (–NH₂) de los grupos amino y en el área de los 1714 cm^{-1} la presencia del enlace (C=O) del grupo de la amida provenientes de la reacción con etilendiamina que es conveniente para la inmovilización de la lisozima.

Finalmente, en la película PET-LYZ, se muestra la banda de los grupos carbonilo de las amidas en el área de 1680-1630 cm^{-1} en donde se generó un enlace (N-C=O) que indica la presencia de la lisozima.

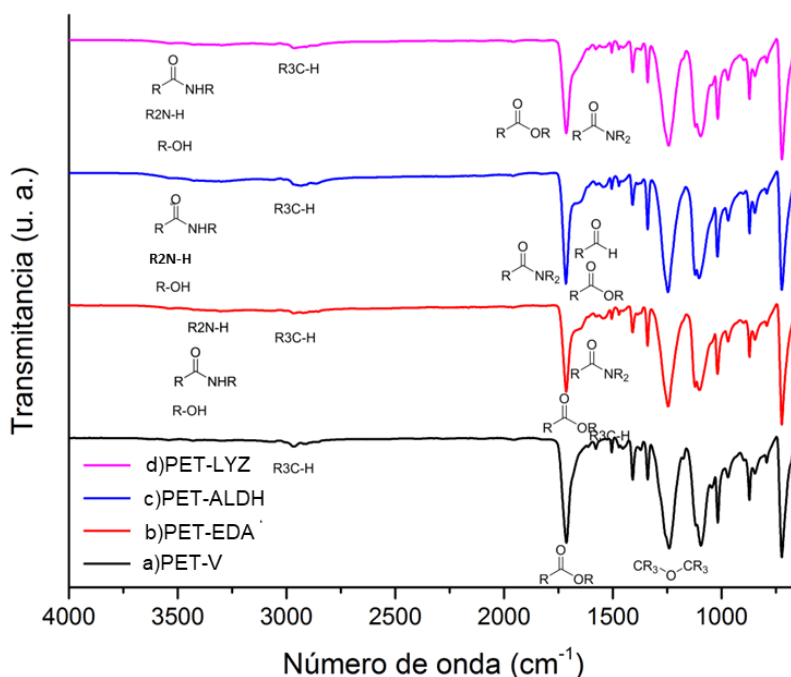


Gráfico 2. Espectros de infrarrojo de las películas de PET en cada una de las etapas para la inmovilización de lisozima, a) Película de PET-V, b) Película PET-EDA, c) Película PET-ALDH y d) Película PET-LYZ.

5.5. Análisis térmico

El análisis termogravimétrico mostró una descomposición simple con una temperatura de descomposición mayor a 337 °C para todas las muestras en el proceso de inmovilización de lisozima. En el caso de la pérdida de peso al 10% no mostró mayor cambio en comparación con la película de PET-V, siendo esta temperatura de entre 411-413 °C para las muestras y un mayor porcentaje de residuo para la película PET-ALDH.

Tabla 4. Temperatura de descomposición de las películas de PET en cada uno de los pasos del proceso de inmovilización de lisozima.

| Muestra | Temperatura de descomposición al 10% de pérdida en masa (°C) | Temperatura de descomposición (°C) | Residuo (w%) |
|----------|--|------------------------------------|--------------|
| PET-V | 411.45 | 439.29 | 14.94 |
| PET-DIET | 411.98 | 437.97 | 14.68 |
| PET-ALDH | 413.22 | 439.92 | 20.63 |
| PET-LYZ | 411.17 | 437.34 | 15.97 |

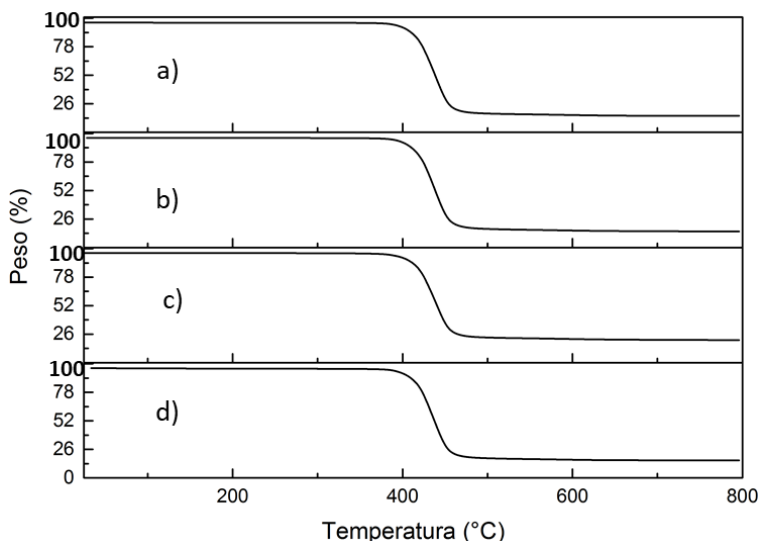


Gráfico 3. Análisis de TGA en atmósfera de N₂, con una rapidez de calentamiento de 10°C min⁻¹ de las películas de a) PET-V, b) PET-EDA, c) PET-ALDH y d) PET-LYZ

5.6. Análisis de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana fue medida poniendo la mitad de una película PET-LYZ en una solución de 4ml de suspensión de micrococcus con una absorbancia inicial de 0.6 monitoreando la disminución de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm y a diferentes pH de solución, que de acuerdo a la literatura (Montenegro R., Viana M. 2000), la escala óptima de pH para la actividad de la lisozima tipo C, es de 5.5 - 6.7. Por lo tanto, se obtuvo que la película con la lisozima inmovilizada, aumentó el rango de pH mostrando su actividad en un rango de 5-8 a temperatura ambiente y la película que mejor actividad tuvo fue en el medio con pH de 7.

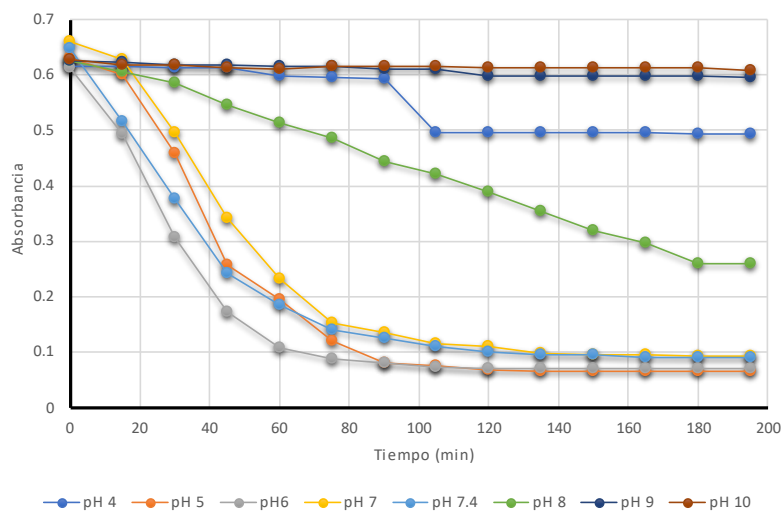


Gráfico 1. Actividad de las películas PET-LYZ a diferentes valores de pH.

Posteriormente se monitoreó la disminución de absorbancia mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm para medir la actividad enzimática de las películas de PET-LYZ a diferentes temperaturas en un medio de pH 7, lo esperado según la referencia, la temperatura óptima para la actividad antimicrobiana de las lisozimas en la mayoría de los estudios indica que es aproximadamente de 40 °C (Bautista, S. et.

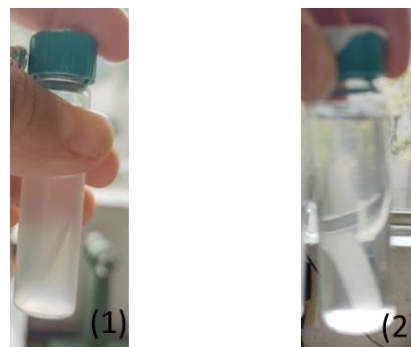


Figura 18. Comparación de la solución de micrococcus lysodeikticus (1) con la película PET-LYZ antes de la lisis (2) de la solución con la película PET-LYZ después de la lisis. Esto con un pH 7 a temperatura ambiente.

al 2020), obteniendo una mejor actividad a los 25 °C e incrementando el rango de actividad hasta los 50 °C y a partir de los 60 °C disminuyó la actividad significativamente, que se debe a que por las altas temperaturas se genera un daño en la lisozima.

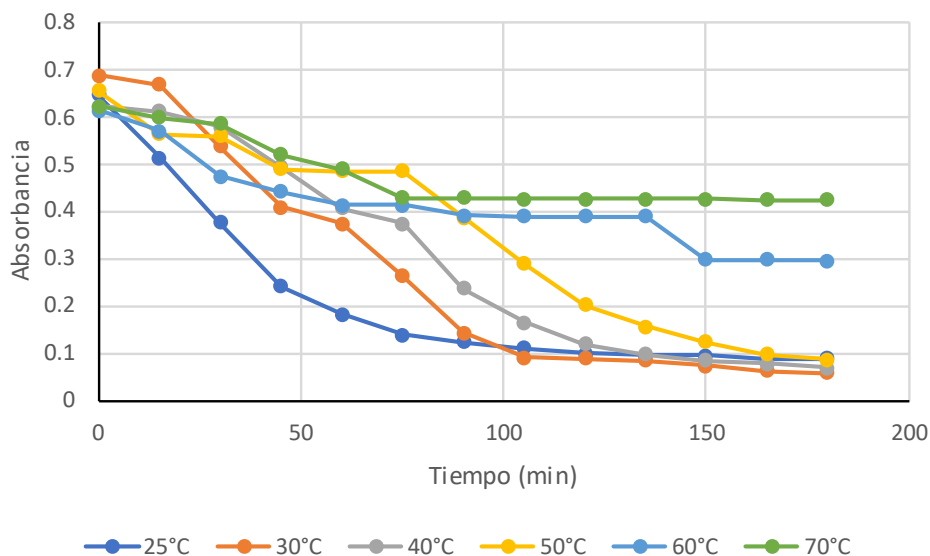


Gráfico 5. Actividad de las películas PET-LYZ a diferentes temperaturas en un medio con pH de 7.4

Para el cálculo de la actividad enzimática relativa AER se calculó utilizando como referencia la película con la mejor actividad enzimática, obtenida para cada uno de los casos (diferentes pH y diferentes temperaturas), utilizando la ecuación 3.

$$\%AER = \frac{Ab_i - Ab_f}{Ab_1 - Ab_2} * 100 \quad \text{Ec.3}$$

Donde:

- | | | | |
|--------|--|--------|--|
| Ab_i | absorbancia inicial de la película | Ab_2 | absorbancia final registrada para la actividad enzimática óptima |
| Ab_f | absorbancia final de la película | | |
| Ab_1 | absorbancia inicial registrada para la actividad enzimática óptima | | |

A diferentes valores de pH, así como a diferentes temperaturas se observa lo siguiente:

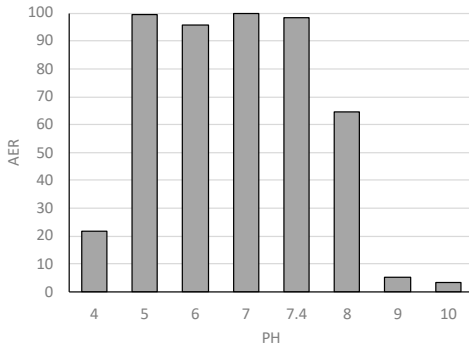


Gráfico 3. Actividad enzimática relativa para diferentes valores de pH a temperatura ambiente.

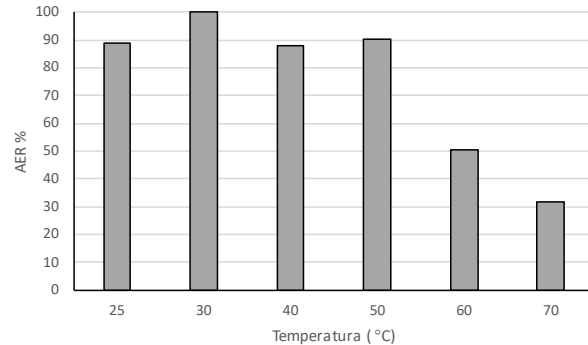


Gráfico 3. Actividad enzimática relativa a diferentes temperaturas a pH 7.

De acuerdo con los resultados anteriores, las mejores condiciones para la actividad enzimática de las películas fueron en un medio con un pH de 7 y una temperatura de 30 °C, así que se tomó la película PET-LYZ que se utilizó a esas condiciones para valorar la actividad enzimática en diferentes ciclos de repetición (bajo las mismas condiciones de pH y temperatura) y ver si la película mantenía la actividad.

Los resultados del cálculo de la AER de cada repetición se muestran en el Gráfico 8. Es en este gráfico que se observa que la actividad en cada repetición no disminuye de manera significativa hasta la prueba 4 que disminuye su actividad a un 50%.

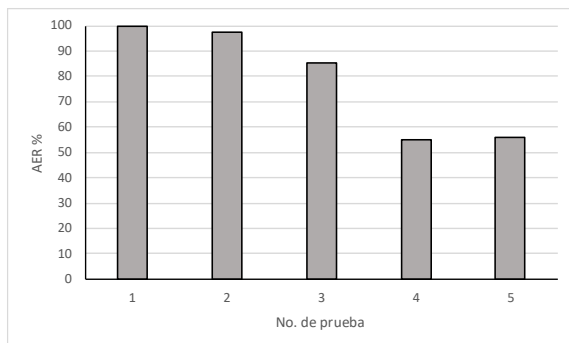


Gráfico 8. Actividad enzimática relativa de la película PET-lyz-28oct de diferentes repeticiones con pH 7 y a 30°C.

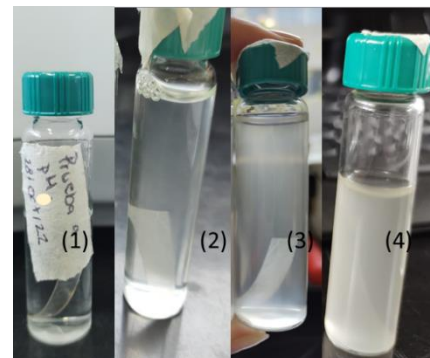


Figura 19. Comparación de la solución de micrococcus lysodeikticus después de la lisis con la película PET-LYZ-28-oct, en donde a partir de la repetición 4 no se muestra mucha actividad.

6. Conclusiones

La inmovilización de la enzima lisozima sobre las películas de PET se logró gracias a que las condiciones seleccionadas en el primer paso fueron óptimas para llevar a cabo la modificación del material generando grupos amino y la menor pérdida de masa de la película, conservando las propiedades mecánicas que nos interesan del material. Es importante mencionar que, al retirar la película de PET de la reacción en el primer paso, se debe lavar de manera exhaustiva para evitar que siga reaccionando el material y evitar grandes diferencias en cada repetición. En el segundo paso era importante observar el material durante la reacción ya que el cambio de coloración en la película, es signo de que la reacción se llevó a cabo exitosamente y monitorear el tiempo en el que se logró la reacción para poder reproducir el proceso.

El procedimiento para la inmovilización de la enzima sobre la superficie de PET puede alterar el centro activo de la lisozima, por eso es importante hacer la solución de lisozima con pH de 7.4 en un vaso de precipitados completamente limpio y mantenerlo a 5 °C.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana de la película con la enzima inmovilizada (PET-LYZ) mostró como condiciones óptimas de actividad un pH de 7 y una temperatura de 30 °C, aunque en general, haya aumentado el rango de pH y temperatura en donde la lisozima muestra actividad antimicrobiana.

Las condiciones experimentales del proceso no causan la desnaturalización o desactivación de la enzima, provocando que el material obtenido se pueda reutilizar conservando la actividad antimicrobiana. En este caso, considerando la disminución de actividad en las últimas repeticiones, es probable que haya sido contaminada la película al momento de almacenar el material.

Finalmente se puede considerar la aplicación del material obtenido en el área médica y de alimentos ya que, gracias al soporte utilizado en el presente trabajo, hubo considerable aumento en los rangos de temperatura y pH en donde se mostraba evidente actividad antimicrobiana.

7. Referencias

- [1] Young, R., Lovell, P. (2011), Introduction to Polymers. 3rd Edition. CRC Press.
- [2] Billmeyer, F. (2020), Ciencia de los polímeros. 2nd Edition. Reverté.
- [3] Carrasquero, F. (2004), Fundamentos de polímeros sintéticos: revisión bibliográfica. University of the Andes.
- [4] Beltrán, Marcilla (2012). Tecnología de polímeros. Diazotec.
- [5] Propiedades Físicas: Polimeros. (n.d.). Polimeros. Retrieved septiembre 28, 2022, Disponible en: <https://polimeros39.webnode.com.ar/propiedades-fisicas/>
- [6] Ceballos, M. (2011), Fundamentos de Polímeros. Academia
- [7] Mier, Artiaga & García (2015). Síntesis de polímeros. Pesos moleculares. Universidad de Coruña.
- [8] Coreño, Méndez, (2010), Relationship between structure and properties of polymers. Scielo.
- [9] Billmeyer, F. (2004), Ciencia de los Polímeros. Reverté
- [10] Rodriguez S, (2016) Aplicaciones de mezclas de biopolímeros y polímeros sintéticos. Revista Científica. Disponible en el link: <https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/revcie/article/view/10424/11790>
- [11] Kaumon, Chen (2015) Crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications. Arabian Journal of Chemistry.
- [12] Flores, G. (2018), Tesis: Síntesis de Biomateriales de injerto de glicidil metacrilato y etilenglicol dimetacrilato para inmovilización de enzimas con actividad antimicrobiana.
- [13] Hassan, C. (2000). Cellular PVA hydrogels produced by freezer/thawing. Journal of Applied Polymer Science.
- [14] Kost, J. (2001), Responsive polymeric delivery systems.
-

- [15] Sershen, S. (2002), Implantable, polymeric systems for modulated drug delyvery.
- [16] Alexander, Shakesheff (2006), Responsive polymers at the biology materials science interface.
- [17] Ramírez, Ayala, (2014), Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan?, Repositorio Universitario de la DGTIC. Disponible en el link: <https://www.ru.tic.unam.mx/handle/123456789/2274>
- [18] Equipo editorial, Etecé, (2021), Enzimas. Argentina. Consultado 20 de agosto 2022. <https://concepto.de/enzimas/>
- [19] Voet, Voet, (2006), Bioquímica. Montevideo
- [20] Wingard, L. (1972), Enzyme Engineering, Interscience publishers, N.Y.
- [21] Ochoa, et.al. (2011), Inmovilización de células y enzimas. Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.
- [22] Taylor, R. (1991) Protein immobilization: fundamental applicatios, Marcel Dekker.
- [23] Arroyo, M. (1998), Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones.
- [24] Hardin, Bertoni y Kleinsmith, (2016), Enzymes: the catalysts of life. 9thEdition. Pearson.
- [25] Gálvez, et.al. (2019), Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology.
- [26] Mora, X. (2012) Diferenciando Bacterios Gram+ y Gram-, Selecciones Avícolas.
- [27] Tinción de Gram, Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Consultado el 7 de noviembre de 2022. Disponible en el siguiente Link: https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35696/tincion_de_gram.pdf
- [28] Mollinedo, et.al. (2014). Bacterias Gram negativas. Revista de actualización Clínbica Investiga, 49, 2609.

http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014001000005&lng=en&nrm=iso&tlng=es

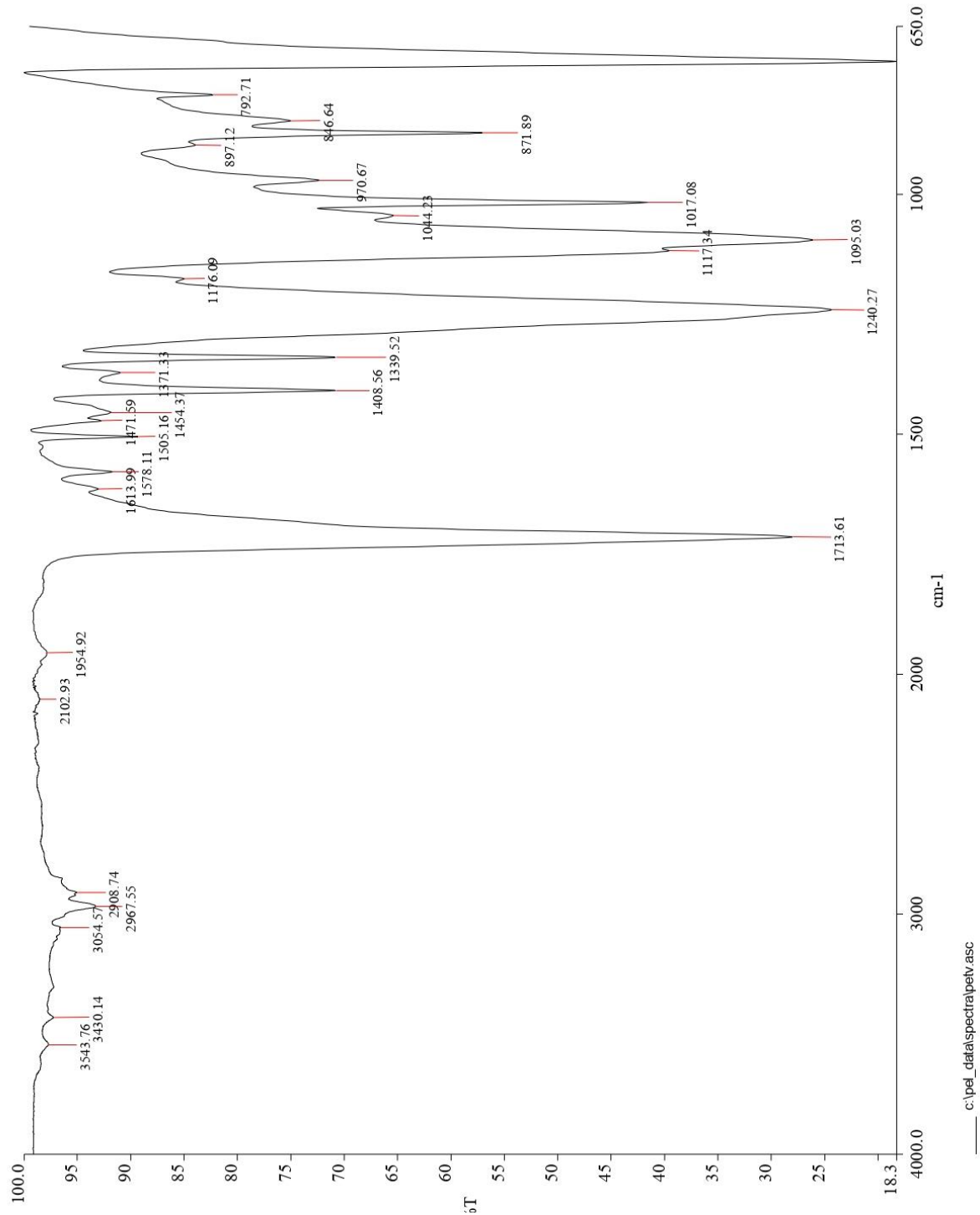
- [29] Bush, et.al. (2021), Introducción a las bacterias grampositivas. Manual MSD.
- [30] Cao et.al (2015). Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *Journals*.
- [31] Sheng, et.al. (2016). The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the eggs storage. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- [32] Sahoo, et.al. (2012), Lysozyme in livestock: A guide to selection for disease resistance.
- [33] Ellison III, Giehi (1991), Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. National Library of Medicine.
- [34] Bianco C., (2021). Breve reseña de su producción, consumo e impactos ambientales. Taller Ecologista. Argentina.
- [35] Ferro, et.al., (2008), El envase de polietilentereftalato: su impacto medioambiental y los métodos para su reciclado. Editorial Universitaria.
- [36] Anexo 1-PET, Visitado 26 agosto 2022.
<https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/15405/ANEXO%201-PET.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- [37] Suasnavas, D. (2017), Degradación de materiales plásticos “PET” (polyethylene terephthalate), como alternativa para su gestión. Monografía de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- [38] Ríos, R. (2016). El polietilén tereftalato (PET) como envase de aguas minerales. Universidad Complutense, España.
- [39] Bermúdez, et.al. (2021), Degradación del polietilentereftalato por medio de microorganismos. Vol. 85 EBSCO.

- [40] Berthomieu, S. (2009) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Photosynthesis Research. Visitado el 10 de junio de 2022. <https://www.quimicaorganica.org/blog-usuarios-quimica-organica/924-espectroscopia-de-infrarrojo.html>
- [41] Coates, J. (2000), Interpretation of infrared spectra, a practical approach. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Ed. Meyers.
- [42] Fundamentos de química orgánica, Tema 9: Determinación de estructuras mediante métodos físicos. Disponible en:
<http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA9FQO.pdf>
- [43] Savin, A. (2016), Espectroscopia de infrarrojo. Universitatis Chemia.
- [44] Rodríguez, D. (2020) Fundamentos del análisis termogravimétrico. Visitado 13 de octubre 2022. <https://espectrometria.com.mx/fundamentos-del-analisis-termogravimetrico/>
- [45] Universidad de Granada. (Agosto de 2002). Recursos Educativos de Química Orgánica. Obtenido de Absorciones IR para grupos funcionales representativos. Recuperado de: https://www.ugr.es/~quiorred/lab/tablas_espec/ir.htm
- [46] Brown, M. (2001). Introduction to Thermal Analysis, 2nd Edition. Kluwer Acad.
- [47] Díaz, et.al. (2010). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación calorimétrica de biomoléculas. Universidad de Córdoba.
- [48] Linseis (2022), Ángulo de contacto- Medición de la tensión superficial. Recuperado el 10 de noviembre de 2022. Disponible en: <https://www.linseis.com/es/propiedades/angulo-de-contacto/>
- [49] Montenegro R., Viana M. (2000), Propiedades Bioquímicas y bacteriológicas de la lisozima de la almeja tivala stultorum. Revista de Ciencias Marinas, Vol. 26.
- [50] Bautista, S. et. al (2020), Lisozimas: Características, mecanismo de acción y aplicaciones tecnológicas en el control de microorganismos patógenos. Revista mexicana de fitopatología.

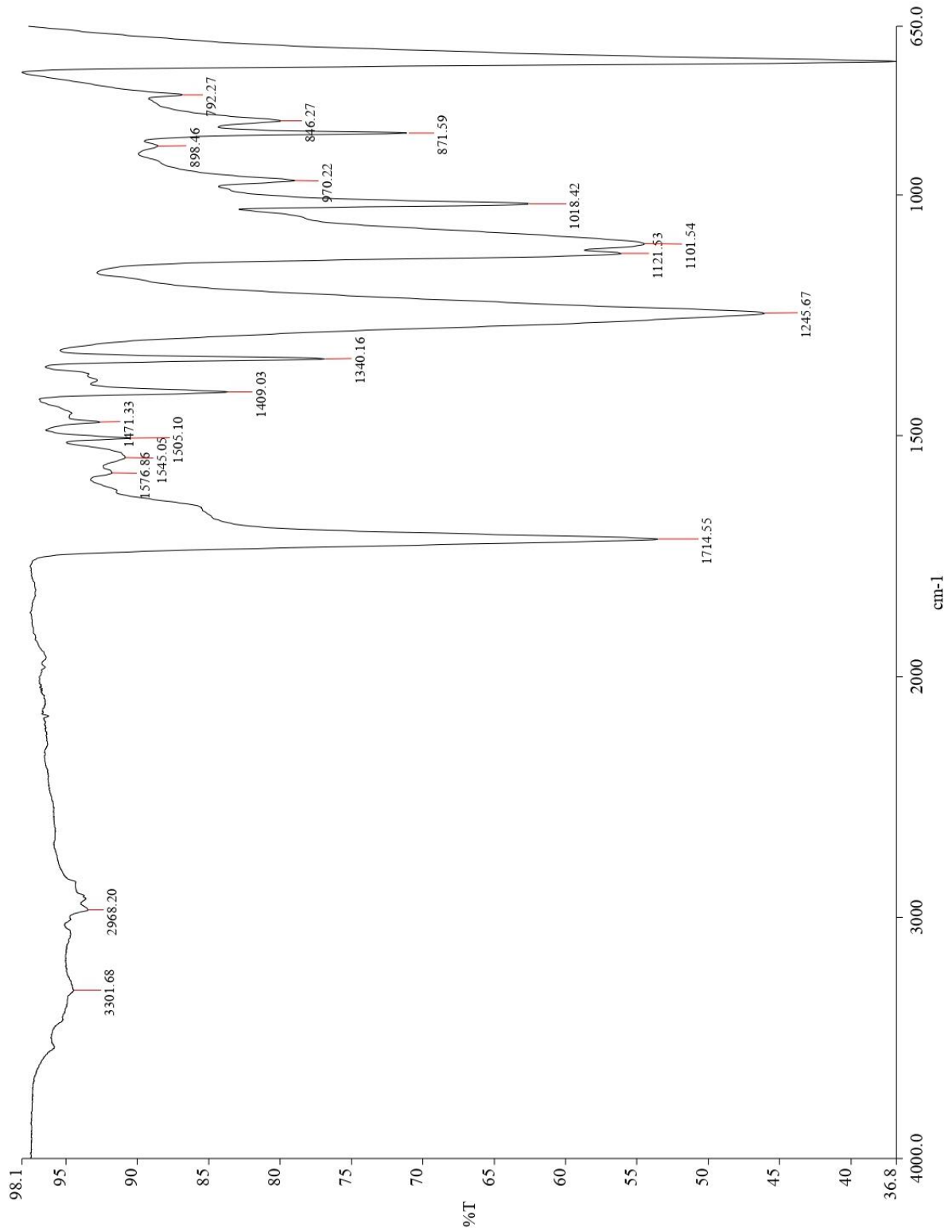
8. Anexos

Anexo A. Graficas proporcionadas por el equipo de Infrarrojo

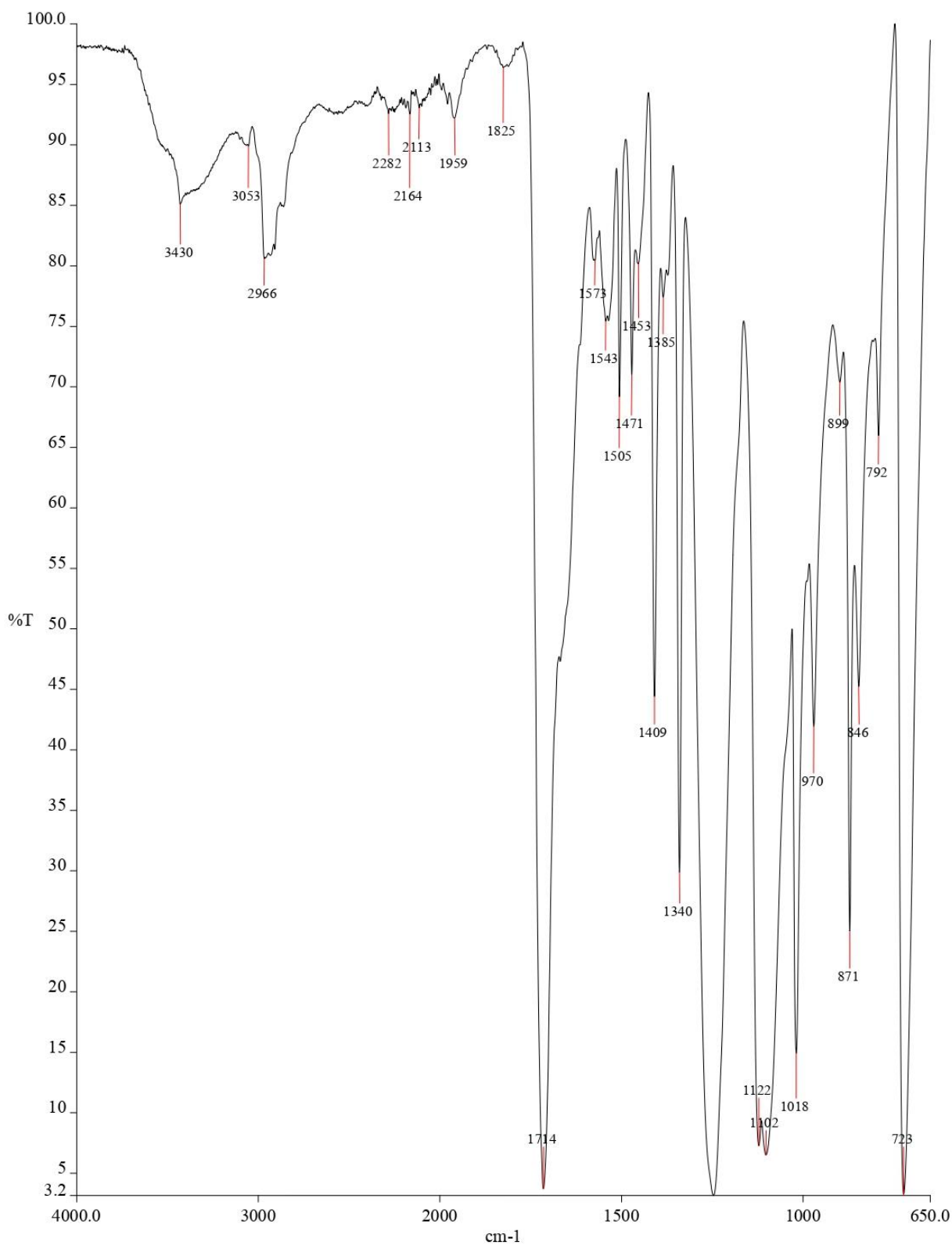
Anexo A.1. PET-V



Anexo A.2. PET-DIET

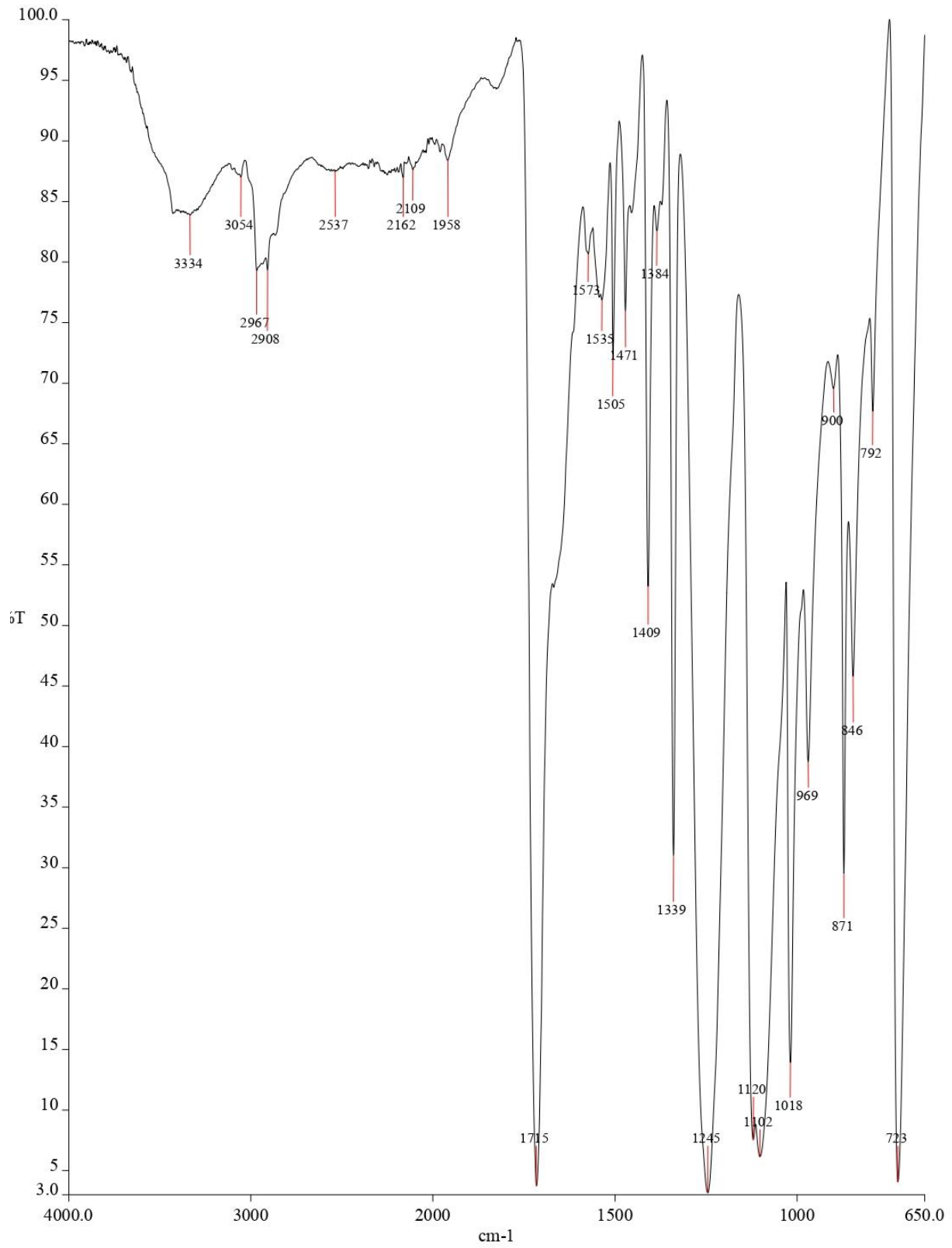


c:\pel_data\spectra\petdiel.asc

Anexo A.3. PET-ALDH

c:\pel_data\spectra\l-pet-ald.sp

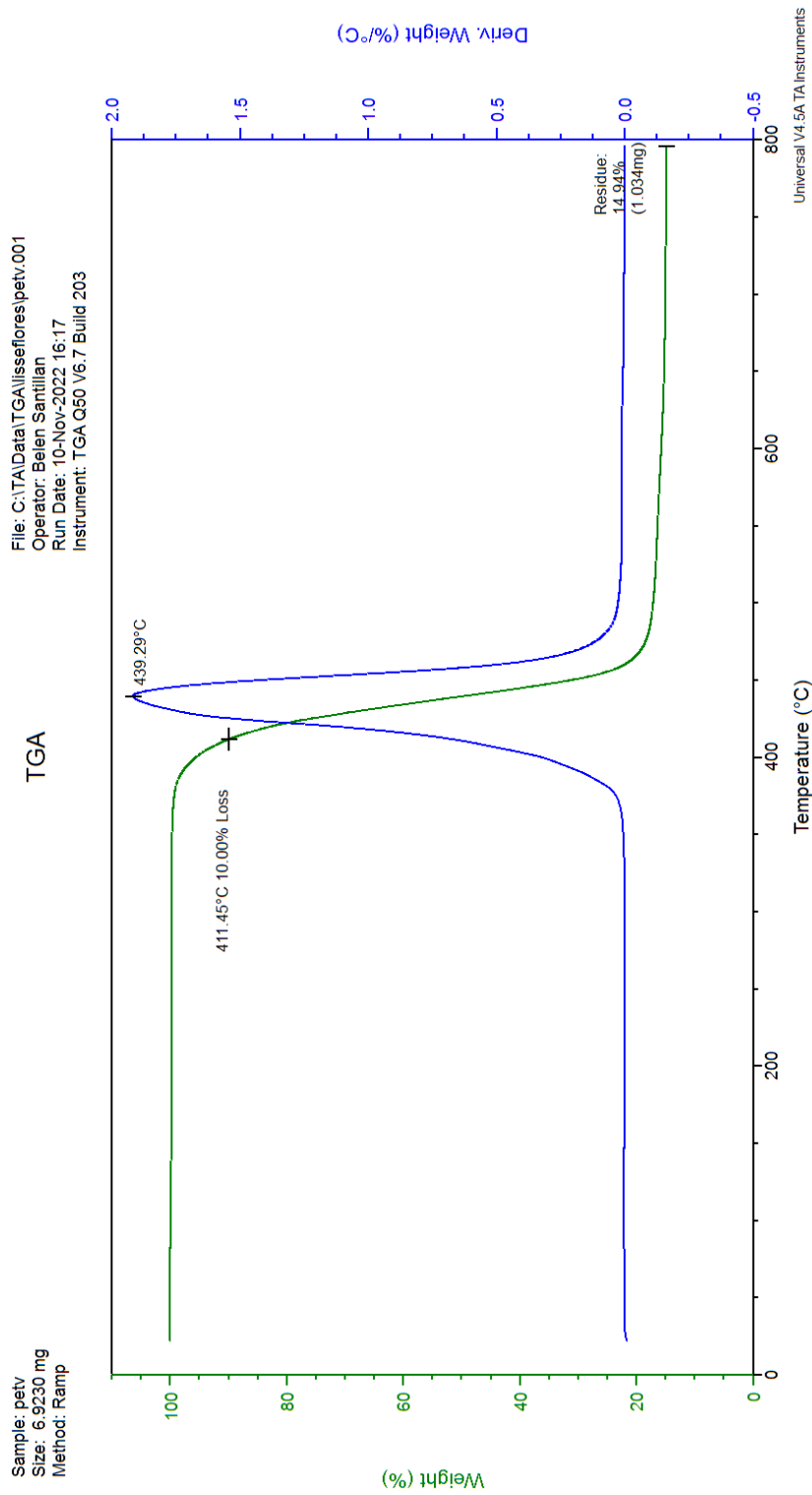
Anexo A.4. PET-LYZ



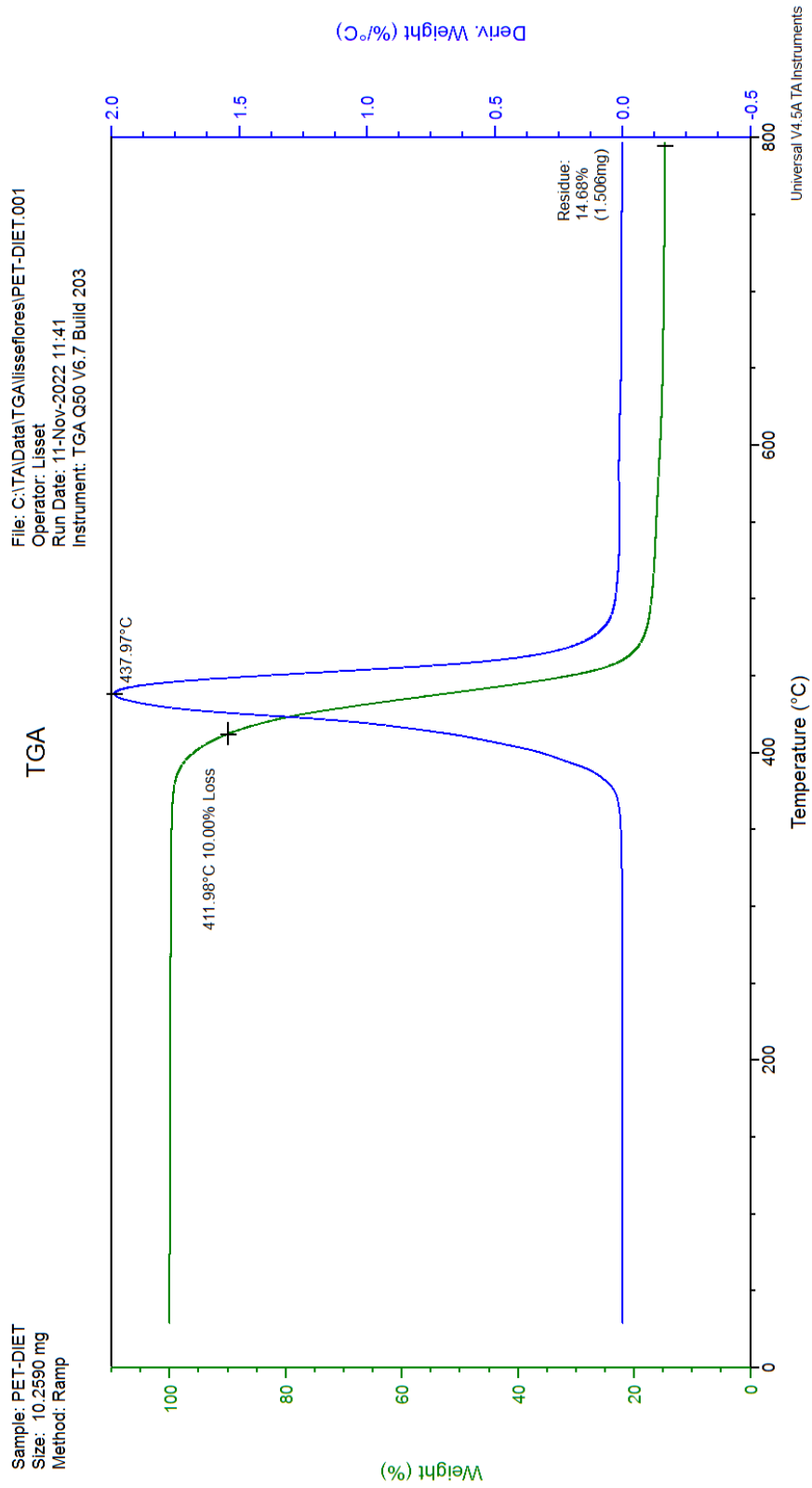
c:\pel_data\spectra\l-pet-ald-lys.sp

Anexo B. Graficas proporcionadas por el equipo de TGA

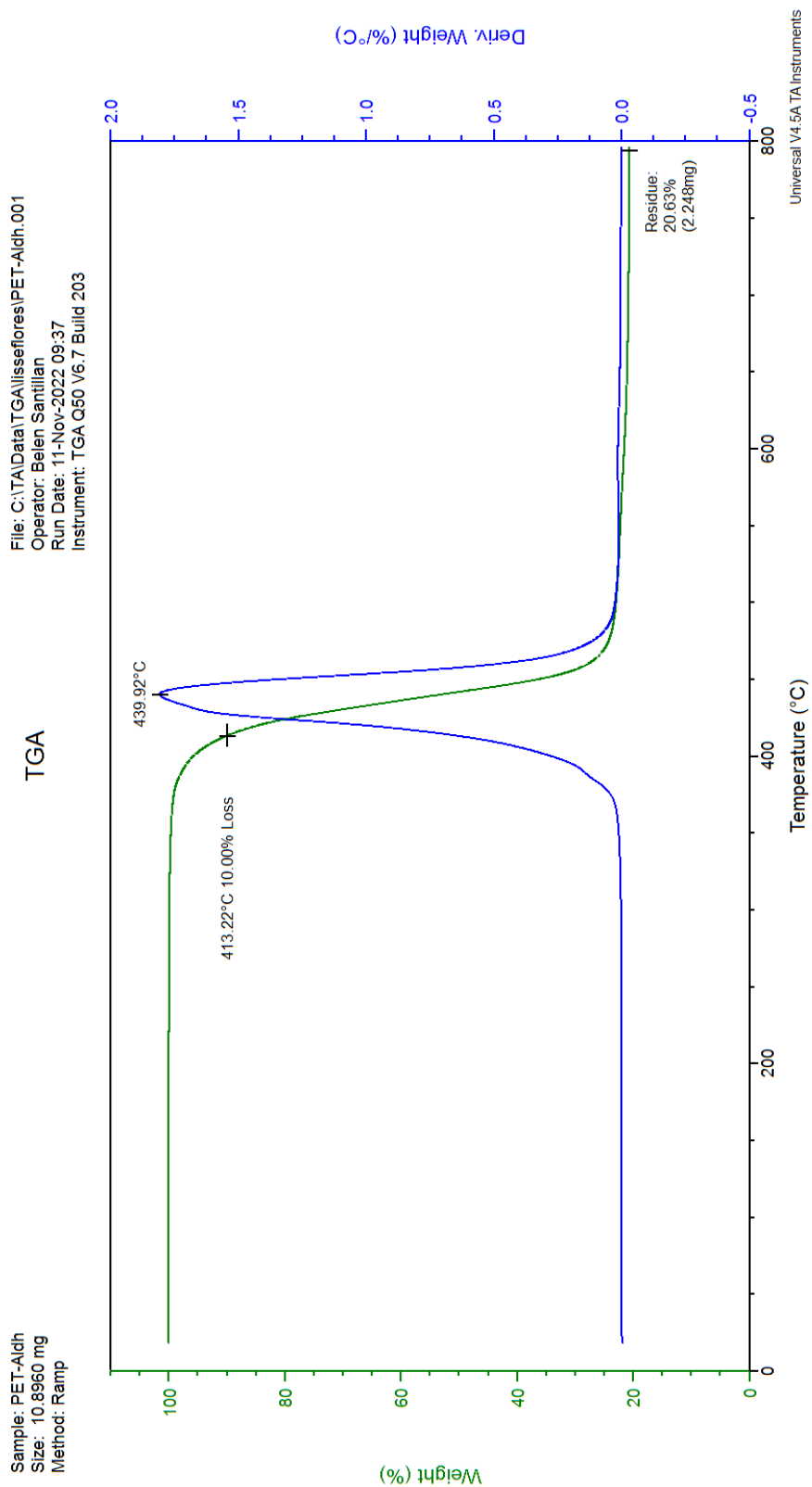
Anexo B.1. PET-V



Anexo B.2. PET-DIET



Anexo B.3. PET-ALDH



Anexo B.4. PET-LYZ

