

FIJACIÓN DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA (ACHE) EN UNA MATRIZ DE POLI(ALCOHOL VINÍLICO) (PVA) UTILIZANDO BENZOATO DE SODIO COMO AGENTE ENTRECRUZANTE

Kevin Quesada-Montero¹, Karla Ramírez-Sánchez¹, Ricardo Starbird-Pérez²

1) Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

2) Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

Recibido: Febrero 2017; Aceptado: Mayo 2017

RESUMEN

En el presente trabajo se establece un protocolo para la inmovilización de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), el cual puede ser utilizado para integrar dicho elemento biológico a un electrodo para la medición de pesticidas. Se evalúa una metodología para la fijación de la enzima en una matriz de poli(alcohol vinílico) (PVA), utilizando benzoato de sodio como agente entrecruzante. Esto se llevó a cabo por medio de la caracterización del proceso de entrecruzamiento del PVA, al irradiar con luz ultravioleta películas de este polímero a 5, 15, 30, 60, y 120 segundos. La formación de la matriz se evidenció por medio de técnicas como FTIR, DSC y TGA. De igual forma, se evaluó la actividad enzimática de la enzima AChE soluble y atrapada en la matriz de PVA, por medio del valor de la velocidad inicial de reacción. Se estableció que el tiempo óptimo de entrecruzamiento del PVA es de 60 segundos de exposición a luz ultravioleta. Se evidencia actividad enzimática de la AChE atrapada en la matriz de PVA.

Palabras claves: Biosensor, acetilcolinesterasa, poli(alcohol vinílico), benzoato de sodio, entrecruzamiento.

ABSTRACT

In this work, we have established a methodology for the immobilization of the acetyl cholin esterase (AChE) enzyme, which could be used for the development of biosensors to measure pesticides. It is evaluated a methodology to fix the acetyl cholin esterase (AChE) enzyme in a polyvinyl alcohol (PVA) matrix, using sodium benzoate as crosslinking agent. This was reached by irradiating PVA films for 5, 15, 30, 60, and 120 seconds with UV light and quantifying the crosslinking process. The matrix formation was studied using techniques as FITR, DSC and TGA. Moreover, the enzymatic activity of the soluble and trapped AChE enzyme was measured using the value of the initial reaction rate. The optimal time of crosslinking the PVA was found within 60 seconds of exposure to UV light. The enzymatic activity of the AChE trapped in the PVA matrix was verified.

Keywords: Biosensor, acetylcholinesterase, polyvinyl alcohol, sodium benzoate, crosslinking.

INTRODUCCIÓN

A raíz de la creciente demanda mundial de cultivos para suplir el mercado alimenticio, se ha incrementado el uso de agroquímicos, para mejorar la producción agrícola [1]. Los clorpirifos (O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato) pertenecen al grupo de pesticidas organofosforados usado en *Costa Rica*. Al tener gran persistencia y toxicidad en suelos, estos compuestos provocan la contaminación de mantos acuíferos por medio de su infiltración a capas inferiores de terreno, producto de lluvias o del mismo riego en las plantaciones [2]. La exposición constante a este químico llega a afectar el sistema nervioso central (*Colovic et al., 2013*).

Los biosensores basados en enzimas colinesterasas (ChEs) han emergido como un sistema de monitoreo de toxinas para el sector ambiental, agrícola, alimenticio, entre otros [4]–[6]. Esto se

debe no solo a su gran sensibilidad y selectividad, sino también al ser una opción más rápida y barata que los procedimientos de laboratorio convencionales como HPLC-MS [7].

Un biosensor es un dispositivo capaz de realizar cualquier tarea que involucre procesos analíticos, como diagnósticos médicos, descubrimiento de nuevos medicamentos, seguridad alimenticia, procesos de control, monitoreo del medio ambiente, entre otros [8]. La relación costo-efectividad de los diferentes métodos analíticos ha incrementado el interés en la investigación en el área de los biosensores en las últimas dos décadas. La selectividad y sensibilidad en el sistema se debe al bioreceptor acoplado al transductor, el cual se encarga de transformar la señal generada por el analito en una señal electrónica que es amplificada por un circuito detector [9].

Un paso determinante en el desarrollo de un biosensor enzimático es la unión estable de la enzima en la superficie del electrodo. Existen diversas estrategias para el anclaje de ChEs como adsorción física, monocapas autoensambladas (de sus siglas en inglés SAM), acoplamiento covalente, inmovilización orientada por medio de marcadores de afinidad y atrapamiento físico. [10]–[12]. La medición de la actividad enzimática se realiza mediante la cuantificación del consumo de sustrato o formación de producto en función del tiempo: El ensayo enzimático continuo mide el proceso de reacción mientras este ocurre y puede ser cuantificado inmediatamente [13].

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero hidrófilo semicristalino producto de la polimerización de monómeros de acetato de vinilo a poli(acetato de vinilo) (PVAc), seguido de la hidrólisis del PVAc en PVA. Este polímero es utilizado como soporte para la fijación de diversas enzimas, gracias a sus propiedades no tóxicas, su resistencia química y biocompatibilidad. Los grupos hidroxilo actúan como sitios para la formación de enlaces covalentes entre cadenas adyacentes, proceso que permite la formación de membranas e hidrogeles [14], [15].

En este trabajo se estudia el entrecruzamiento del polivinil alcohol (PVA) por medio de la irradiación con luz ultravioleta como estrategias para el anclaje de AChE utilizando benzoato de sodio como fotocatalizador [16]. Se confirma la reacción por medio de diversas técnicas y se confirma la actividad de la enzima mediante estudios enzimáticos. Esta estrategia permitiría producir biosensores para aplicaciones ambientales.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos. El benzoato de sodio utilizado, se adquirió en la casa comercial *Merck*. El poli(alcohol vinílico), de peso molecular 89.000–98.000 g/mol, 99% hidrolizado, el reactivo de *Ellman*, la enzima acetilcolinesterasa (AChE) extraída de anguila eléctrica, el sustrato cloruro de acetiltiocolina (ATCh), la N-acetilcisteína, el acetato de sodio, el trisaminometano fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich*.

Instrumentos. Para la caracterización del poli(alcohol vinílico) se realizó un análisis de espectrometría infrarroja utilizando el equipo *Nicolet 380* de *Thermo Scientific* y un *SDT Q600* de *TA Instruments* para el análisis de calorimetría diferencial de barrido y de termogravimetría. Para la irradiación de las muestras se empleó una lámpara ultravioleta *Labino MPXL 35W UV* (H135TL), con longitud de onda de 365 nm. El espectrofotómetro *Evolution 201-UV-Visible* de *Thermo Scientific* fue utilizado para medir la actividad enzimática del sistema.

Preparación polivinilalcohol con benzoato de sodio (PVA:BS). Se preparó una disolución de poli(vinil alcohol) (PVA) al 10% (m/m). Posteriormente, se elaboró una disolución de benzoato de sodio a 70 mM en amortiguador *Britto-Robinson* a pH 7.5, la cual fue mezclada en una proporción 1:1 con el PVA. La concentración final del PVA:BS fue de 5%. Se almacenó en una botella ámbar a 4°C.

Preparación de la película de PVA:BS. Para la preparación de las películas se tomaron alícuotas de 1 mL de la disolución de PVA:BS preparada anteriormente, se vertieron en placas *Petri* de 55 mm de diámetro y se secaron durante 2 horas en una estufa a 50°C. Una vez secas, las películas se removieron de las placas y se procedió a la irradiación con luz ultravioleta en aire a 24°C, empleando una lámpara germicida de 35 W con una longitud de onda de 365 nm, durante distintos tiempos: 0, 5, 15, 30, 60 y 120 segundos.

Análisis por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Las películas de PVA:BS se analizaron por medio de espectroscopia infrarroja transformada de *Fourier* (FTIR), empleando el equipo *NICOLET 380*. La lectura se realizó utilizando el programa *OMNIC®* (*Thermo Scientific*) con 32 escaneos y empleando 1 cm^{-1} de resolución. Los espectros se normalizaron con el valor de la absorción de la banda perteneciente al intervalo 2.912 cm^{-1} , la cual corresponde a la vibración por estiramiento del grupo CH_2 , típica del PVA.

Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA). Se empleó el equipo *SDT Q600* al cual se le colocaron entre 3,5 a 4 mg de muestra y se realizó un calentamiento hasta los 400°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/minuto y a un flujo de nitrógeno de 20 mL/min. Los datos obtenidos se analizaron por medio del programa *TA Universal Analysis*.

Preparación de la Matriz PVA:BS/AChE. Se resuspendió la enzima AChE en amortiguador 20 mM de Tris-HCl a pH 7,5, según las especificaciones del fabricante. La matriz para el entrampamiento físico se preparó mezclando el polímero PVA:BS al 5% descrito anteriormente y la disolución enzimática de AChE con una relación 1:1 (v/v). Tanto la enzima como la mezcla fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Fijación de la matriz PVA:BS/AChE en polimida, entrampamiento físico. La fijación del sistema se realizó sobre polimida, dicho material es útil como soporte en la fabricación de

electrodos flexibles. La lámina de poliimida se limpió con isopropanol y se secó en una estufa a 40°C durante 10 minutos. A esta se le agregaron 2 µL de la disolución PVA:BS/AChE y se liofilizaron por al menos 4 horas. La concentración final de enzima se ajustó a 200 mU. Una vez listas las muestras, se irradiaron con luz ultravioleta durante 60 segundos, mediante el procedimiento descrito anteriormente. Luego de esto, se almacenaron a 4°C.

Método de Ellman (Ellman et al. 1961). Se preparó una disolución madre del reactivo DTNB utilizando una concentración final de 50 mM de acetato de sodio y 2 mM de DTNB en agua grado biología molecular, y se mantuvo en refrigeración. Seguidamente, se preparó una disolución tampón de Tris con una concentración final de 1 M a pH 8. Se realizó una curva de calibración estándar de sulfidrilos (SH) empleando N-acetilcisteína, utilizando las siguientes concentraciones: 10, 50, 100, 150, 200, 250, y 500 µM. El reactivo de trabajo DTNB se preparó añadiendo 75 µL de la disolución madre de DTNB, 150 µL de la disolución Tris y 1.260 µL de agua grado biología molecular, para un volumen final de 1500 µL al añadir 15 µL de muestra. Posteriormente, se mezcló la disolución con cuidado y se colocó en la cubeta del espectrofotómetro UV para tomar la medición del blanco. Se añadieron 15 µL de la muestra en 1.485 µL del reactivo DTNB, se mezcló cuidadosamente y se procedió a la lectura a 412 nm. La preparación de los reactivos se realizó diariamente.

Mediciones enzimáticas. Las mediciones enzimáticas fueron realizadas tanto para AChE soluble como en el tratamiento de entrampamiento físico. Se preparó una disolución madre de 0,1 M de cloruro de acetiliocolina (ATCh) en amortiguador de 20 mM de Tris-HCl a pH 7,5, la cual fue utilizada como sustrato para la reacción enzimática.

Se utilizaron 200 mU de AChE en tampón 20 mM Tris-HCl a pH 7,5 y 200 µM ATCh como sustrato. Esta reacción se llevó a cabo en 5 mL de amortiguador de 0,1 M fosfato de sodio a pH 7,5, con agitación constante y a una temperatura de 37°C. Se tomaron muestras puntuales de 15 µL durante el tiempo de reacción y se realizó la medición de la actividad enzimática mediante el protocolo de Ellman descrito anteriormente. Los valores de absorbancia fueron convertidos a concentración de producto por medio de la ecuación lineal producto de la curva de calibración. Esta medición se realizó por triplicado.

Para esta medición se utilizó la matriz de PVA:BS/AChE mencionada anteriormente, luego de un día de almacenaje a 4°C. La concentración final de AChE fue de 200 mU y 200 µM de ATCh como sustrato. Esta reacción se llevó a cabo en 5 mL de tampón de 0,1 M fosfato de sodio a pH 7,5, con agitación constante y a una temperatura de 37°C. La toma de muestra, medición enzimática y conversión de los datos se realizaron igual que en el sistema de enzima soluble previamente descrito. Esta medición se realizó por duplicado.

Para esta medición se utilizó la matriz de PVA:BS/AChE mencionada anteriormente, luego

de 4 días de almacenaje a 4°C. La concentración de final de AChE fue de 200 mU y 200 µM de ATCh como sustrato. Esta reacción se llevó a cabo en 5 mL de amortiguador de 0,1 M fosfato de sodio a pH 7,5, con agitación constante y a una temperatura de 37°C. La toma de muestra, medición enzimática y conversión de los datos se realizaron igual que en el sistema de enzima soluble. Esta medición se realizó por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) de la matriz de PVA:BS. El material fue caracterizado por métodos espectrofotométricos y las bandas características se reportan en el cuadro 1. Se eligieron las bandas 947, 1.335 y 1.065 cm⁻¹ para el análisis de tendencias (Tabla 2), ya que las bandas restantes no presentan un comportamiento asociado al entrecruzamiento del polímero.

Tabla 1. Cuadro resumen de las vibraciones observadas en las muestras de PVA:BS irradiadas con luz ultravioleta.

Muestra	Número de onda (cm ⁻¹)	Descripción aproximada de las vibraciones	Referencia
Poli(alcohol vinílico) con benzoato de sodio (PVA:BS)	2912	Estiramiento simétrico del grupo CH ₂	Anicuta <i>et al.</i> 2010; Miranda <i>et al.</i> 2001; Shehap, 2008
	947	Grupo = CH ₂ , abertura del anillo del benzoato de sodio	Miranda <i>et al.</i> 2001
	1.553	Estiramiento del anión carboxilato asimétrico del benzoato de sodio	Miranda <i>et al.</i> 2001
	1.596	Vibraciones de tensión del grupo C = C asociado al anillo de benzoato	Miranda <i>et al.</i> 2001
	1.429	Estiramiento del grupo –OH	Fonseca <i>et al.</i> 2006; Miranda <i>et al.</i> 2001; Shehap, 2008
	1.335	Estiramiento del grupo –OH	Anicuta <i>et al.</i> 2010; Miranda <i>et al.</i> 2001
	1.065	Estiramiento del enlace C–O.	Dias <i>et al.</i> 2011; Mansur <i>et al.</i> 2008; Miranda <i>et al.</i> 2001
	1.398	Estiramiento del enlace C–H.	Miranda <i>et al.</i> 2001

La Tabla 1 muestra las bandas encontradas en el análisis del entrecruzamiento del polímero PVA utilizando benzoato de sodio como agente entrecruzante. La banda encontrada a 2.912 cm⁻¹,

correspondiente al estiramiento simétrico del grupo CH_2 típico del PVA, es utilizada para normalizar los datos de las intensidades de las otras bandas, esto debido a que no es afectada por otros grupos y se mantiene constante para todas las muestras [18,19].

Diversos autores como *Anicuta et al.* (2010), *Fonseca et al.* (2006), *Shehap* (2008) y *Miranda et al.* (2001) reportan la presencia de bandas típicas del PVA a longitudes de onda 1.335 y 1.429 cm^{-1} , pertenecientes a la vibración del grupo hidroxilo (O–H). También se señala la banda a 1.398 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento del enlace C–H. Estos resultados concuerdan con las bandas obtenidas en el análisis del entrecruzamiento de las matrices PVA:BS.

Se confirma la presencia de la banda a 947 cm^{-1} correspondiente al grupo = CH_2 producto de la abertura del anillo del benzoato de sodio, la banda 1.553 cm^{-1} debido al estiramiento asimétrico del grupo carboxilato y la banda 1596 cm^{-1} producto de la vibración de tensión del grupo C = C asociado al anillo del benzoato (*Miranda et al.* 2001).

Tabla 2. Relaciones de los valores de las intensidades de las bandas encontradas en muestras de PVA:BS, normalizadas con la absorbancia de la banda 2.912 cm^{-1} .

Muestras	Tiempo de irradiación UV (+1s)	Bandas polivinil alcohol (PVA) (cm^{-1})		
		947	1.335	1.065
Control	0	0.80	0,20	0,00
1	5	1.20	0,30	4,43
3	30	1.95	0,26	6,66
4	60	3.99	0,19	11,99
5	120	1.11	0,19	5,37

En este caso, los radicales libres producto de la fotólisis del benzoato de sodio pueden abstraer un átomo de hidrógeno terciario de la cadena del PVA; permitiendo así la formación de un enlace covalente con los grupos hidroxilo para formar enlaces entre las cadenas poliméricas [19], [23]. El estudio de las bandas asociadas al benzoato de sodio refleja un cambio en la estructura por la acción de la luz ultravioleta. La tendencia de la banda 947 cm^{-1} , presente en la Figura 1, muestra que el tiempo donde ocurre una mayor abertura del anillo del benzoato de sodio, y por ende una mayor formación de radicales libres que promueven un proceso de entrecruzamiento [16], es a los 60 segundos de exposición a luz ultravioleta.

El proceso de entrecruzamiento del PVA está asociado con la disminución de la intensidad de las bandas asociadas a grupos hidroxilo; así mismo, deben apreciarse un incremento en las

intensidades de las bandas pertenecientes a enlaces C–O. Dicho proceso es similar aunque los entrecruzantes utilizados sean distintos, lo cual permite una comparación con sistemas químicos y métodos de irradiación con luz ultravioleta [17–19, 22].

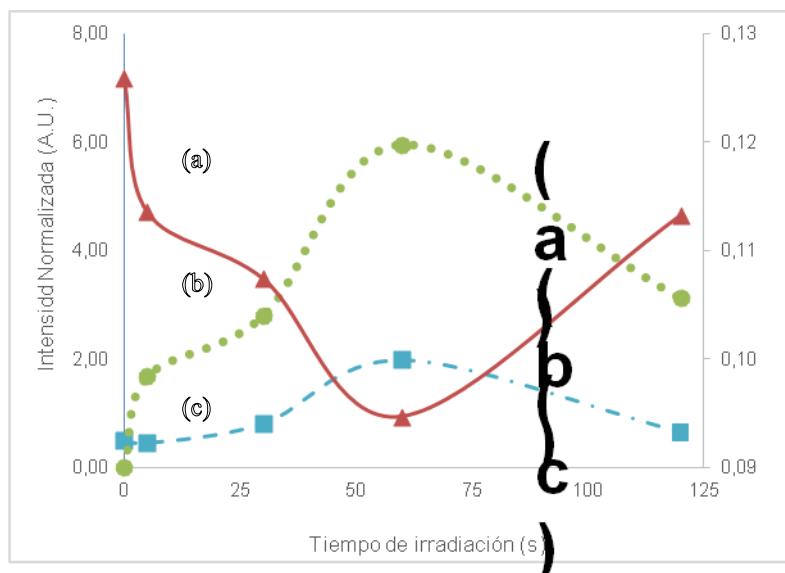


Figura 1. Tendencia de la intensidad normalizada de distintas bandas, resultantes del análisis por medio de FTIR del PVA:BS, asociada con el tiempo de exposición a luz ultravioleta. (a) Banda 947 cm^{-1} (▲), (b) Banda 1.335 cm^{-1} (●) y (c) Banda 1.065 cm^{-1} (■).

Las bandas a 1.335 y 1.065 cm^{-1} , producto de la vibración del grupo hidroxilo (O–H) y el estiramiento del enlace C–O, respectivamente, muestran el comportamiento descrito (Figura 1.B.C.). Por medio del análisis de estas bandas, se deduce que exponer durante 60 segundos una matriz de PVA con benzoato de sodio a luz ultravioleta genera un proceso de entrecruzamiento.

Los gráficos de tendencias presentes en la Figura 1 indican que hay un punto de inflexión referente a la intensidad de las bandas a los 60 segundos de exposición a luz ultravioleta. De igual forma, se resalta el hecho de que la banda 1.065 cm^{-1} aparece en las muestras de PVA:BS hasta que se da la irradiación con luz ultravioleta.

Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la matriz de PVA:BS. Se determinaron las temperaturas de fusión para las muestras de PVA:BS irradiadas a diferentes tiempos con luz ultravioleta (ver Tabla 3). La temperatura de fusión se mantiene constante a lo largo del proceso de fusión para todas las muestras (Figura 2).

Tabla 3. Temperatura de fusión para muestras de PVA:BS expuestas a diferentes tiempos a luz ultra violeta.

Muestra	Tiempo de irradiación UV (±1s)	Temperatura de fusión (±0.1°C)
Control	0	200.4
2	15	200.1
3	30	200.5
4	60	200.4

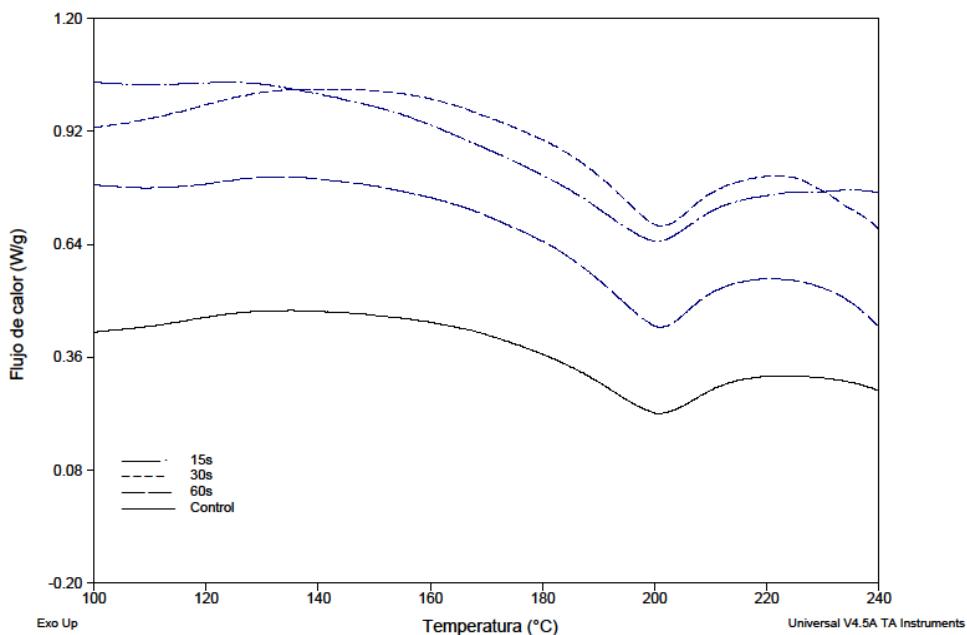


Figura 2. Tendencia de fusión de los gráficos de DSC para muestras de PVA:BS expuestas a diferentes tiempos a luz ultravioleta control (línea sólida), 15 segundos (línea raya-punto), 30 segundos (línea punteada) y 60 segundos (línea rayada).

El análisis de DSC para las muestras de PVA permite generar información de la temperatura de fusión (T_f) y la entalpía del proceso. Siendo de interés para el análisis del proceso de entrecruzamiento del PVA solamente la T_f .

En el presente estudio, se reporta una temperatura de fusión para la muestra de PVA sin irradiación de 200°C (Tabla 3). Diversos autores muestran que esta temperatura puede fluctuar entre un rango de 200 a 225°C [14,24,25], lo cual depende de factores como la configuración y material del crisol para el análisis de la muestra, la atmósfera, velocidad de calentamiento, entre otros. Según *Koo y colaboradores* (2011), el grado de hidrólisis del PVA afecta directamente en la temperatura

de fusión, por lo cual pueden existir distintos valores [26].

Las temperaturas de fusión del PVA, presentes en la Figura 2, no reflejan cambios significativos en las distintas muestras analizadas. Se reporta que las proporciones de mezcla del PVA con otras sustancias afecta el valor de la T_f , provocando un aumento o disminución de este (El-Sayed et al. 2011; Guirguis & Moselhey, 2012 & Gupta et al. 2013). La concentración de benzoato de sodio agregado a todas las muestras de PVA es la misma, por lo cual la temperatura de fusión no presenta cambios significativos.

Análisis por termogravimetría (TGA) de la matriz de PVA:BS. Se calculó la temperatura inicial de descomposición y el porcentaje de pérdida de masa para las muestras de PVA:BS irradiadas a diferentes tiempos con luz ultravioleta. La temperatura inicial de descomposición para las muestras 3 y 4 aumenta respecto al control y a la muestra 2, esto se refleja en la Figura 3. Además, se evidencia una mayor pérdida de masa durante el proceso de descomposición del material para las muestras 3 y 4, las cuales tuvieron las tasas más altas de exposición a luz ultravioleta como se resume en la Tabla 4.

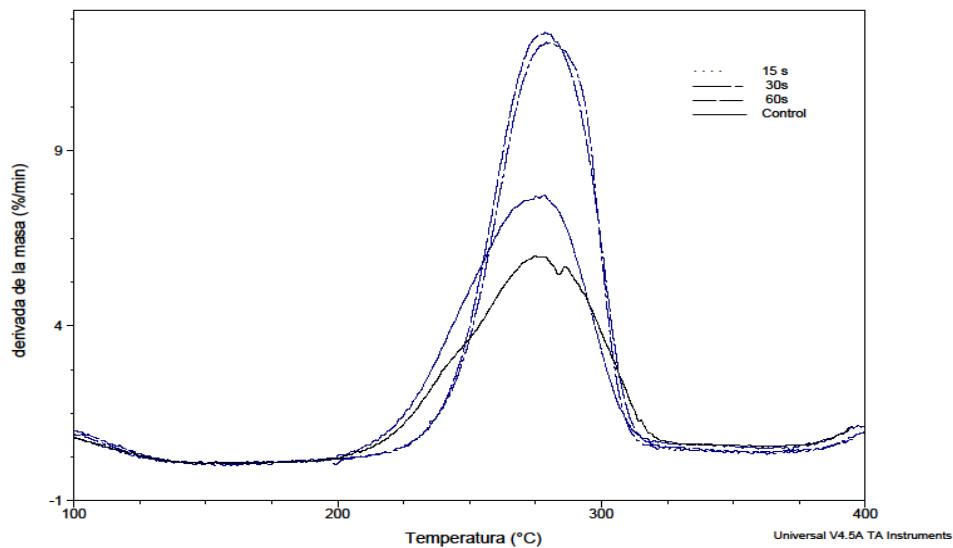


Figura 3. Derivada del proceso de degradación térmica de las muestras de PVA:BS expuestas a diferentes tiempos a luz ultravioleta control (línea sólida), 15 segundos (línea raya-punto), 30 segundos (línea punteada) y 60 segundos (línea rayada).

El análisis termogravimétrico concuerda con el mecanismo de degradación de dos pasos, descrito en la literatura. El primer paso referente a la pérdida de masa en un rango inferior a 100°C se debe a la eliminación de agua en las muestras [27,28]. El segundo proceso de descomposición presente en la Figura 3, ubicado entre 230 y 350°C, indica degradación química del polímero por la ruptura de los enlaces carbón–carbón de su estructura polimérica [14,17,25,28,29].

Tabla 4. Temperatura inicial de descomposición y porcentaje de pérdida de masa para muestras de PVA:BS, expuestas a diferentes tiempos a luz ultravioleta.

Muestra	Tiempo de irradiación UV ($\pm 1s$)	Temperatura de inicial de descomposición ($\pm 0,1^\circ\text{C}$)	Porcentaje de masa perdido ($\pm 0,1\%$)
Control	0	235,1	20,9
2	15	236,0	27,1
3	30	248,0	30,5
4	60	249,0	30,2

La temperatura inicial de descomposición puede ser utilizada como un indicador del proceso de entrecruzamiento que sufren los polímeros. El valor de esta temperatura se desplaza a campos mayores conforme el polímero sufre un proceso de entrecruzamiento, esto debido a la formación de enlaces entre sus cadenas [30–32].

Los resultados de la temperatura inicial de descomposición presentes en la Tabla 4 y la Figura 3, muestran un comportamiento similar al establecido anteriormente. La temperatura inicial de descomposición de la muestra con mayor tiempo de exposición a luz ultravioleta (60 segundos) incrementa en 10°C aproximadamente (248°C), con respecto a la muestra sin irradiar ($235,12^\circ\text{C}$). Esto confirma los resultados obtenidos por FTIR, en donde exponer durante 60 segundos a luz UV las muestras de PVA:BS promueve un proceso de entrecruzamiento. Kenawy *et al.* (2014) reporta que el PVA entrecruzado puede llegar a tener una temperatura inicial de descomposición de 261°C , por lo que el grado de entrecruzamiento con benzoato de sodio no es alto [33].

La estabilidad térmica que adquiere el PVA cuando es entrecruzado no solo genera que su temperatura de descomposición se desplace a campos mayores, también promueve que la pérdida de masa asociada a este proceso sea menor. Esto se ha reportado tanto en procesos de entrecruzamiento de PVA como en mezclas de dicho polímero con otras sustancias [17], [25], [34]. En la Figura 4 se encuentra la tendencia de pérdida de masa de las muestras de PVA, la cual muestra que a mayor tiempo de irradiación la pérdida de masa incrementa. Esto puede deberse a un proceso bajo de entrecruzamiento, ya que no promueve gran estabilidad térmica al polímero; sin embargo, no se puede concluir sobre este proceso por medio del análisis de la tendencia de pérdida de masa.

Actividad enzimática de la acetilcolinesterasa. En la Figura 6 se observan las gráficas de actividad enzimática resultantes de los tres sistemas analizados: AChE soluble, matriz PVA:BS/AChE y matriz PVA:BS/AChE almacenaje. La producción de TCh alcanza su fase estacionaria a partir de los 30 minutos aproximadamente, por lo cual se detiene el proceso de

medición. La fase lineal de los tres sistemas se encuentra antes de que se produzcan 200 μM de TCh.

Se obtuvo la velocidad inicial de reacción mediante el valor de la pendiente de la ecuación lineal, asociada con el proceso de producción de TCh. En la Figura 7 se muestran las pendientes de los sistemas AChE soluble, matriz PVA:BS/AChE y matriz PVA:BS/AChE almacenaje; evidenciándose diferencias entre los tres sistemas. El sistema AChE soluble tiene la velocidad inicial de reacción mayor con 19.4 $\mu\text{M}/\text{min}$, en comparación con los sistemas restantes (Cuadro 6).

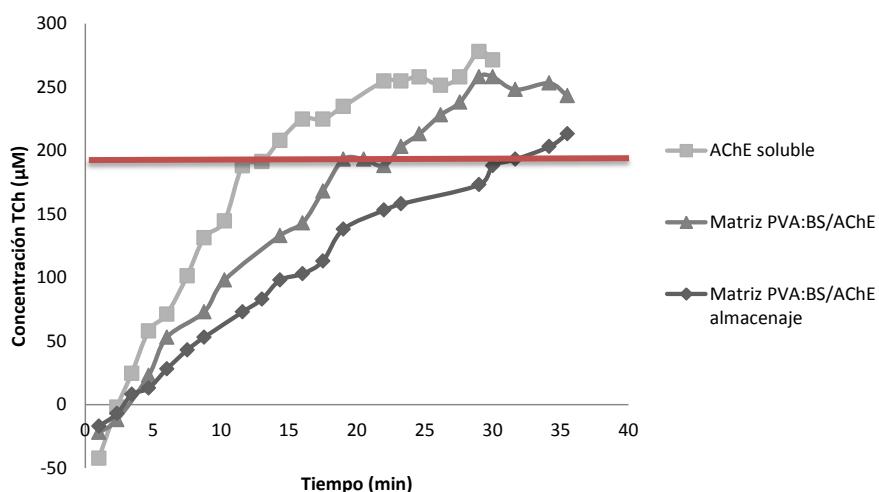


Figura 4. Curva de actividad enzimática promedio para el sistema de AChE soluble (■), matriz PVA:BS/AChE (▲) y matriz PVA:BS/AChE almacenaje (◆). La zona lineal de los tres sistemas se encuentra por debajo de la línea roja.

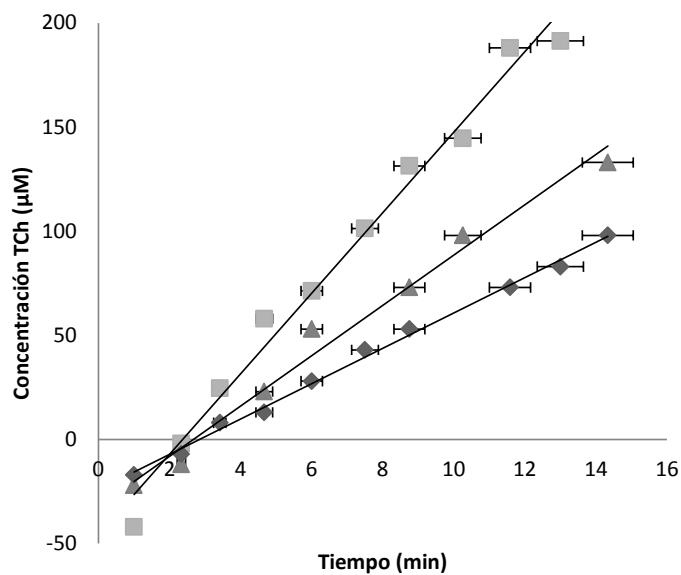


Figura 5. Pendiente de la fase lineal para la producción de TCh, asociada a los sistemas AChE soluble (■), matriz PVA:BS/AChE (▲) y matriz PVA:BS/AChE almacenaje (◆).

Dependiendo del método de inmovilización, las enzimas pueden presentar un aumento o disminución de su actividad enzimática. Meyer (2007) comprueba que la inmovilización de enzimas por medio de adsorción superficial mejora la actividad enzimática, mientras que el atrapamiento físico la disminuye [12]; de igual forma, Zhan *et al.* (2013) reporta que la utilización de PVA como matriz de inmovilización disminuye la actividad enzimática, pero permite la reutilización del complejo enzimático y mejora propiedades térmicas y de almacenaje [35].

Las mediciones enzimáticas para los distintos sistemas se llevaron a cabo bajo los mismos parámetros experimentales, con el fin de evaluar el efecto de la matriz de PVA:BS sobre la enzima AChE. Los resultados presentes en el Tabla 5 revelan una disminución en la velocidad inicial de reacción cuando se inmoviliza la enzima en la matriz PVA:BS. Esto se explica dado que el PVA minimiza la difusión del sustrato hacia la enzima, lo que afecta directamente la rapidez de la reacción [7,10,36].

Tabla 5. Velocidad inicial de reacción para el sistema de AChE soluble, matriz PVA:BS/AChE y matriz PVA:BS/AChE almacenaje.

Muestra	Velocidad de reacción ($\mu\text{M}/\text{min}$)
AChE soluble	$19,4 \pm 1,4$
Matriz PVA:BS/AChE	$12,1 \pm 2,4$
Matriz PVA:BS/AChE almacenaje	$8,48 \pm 0,1$

Otro factor que puede estar asociado con la disminución de la velocidad inicial de reacción es el proceso de entrecruzamiento de la matriz de PVA:BS. Según la metodología propuesta, el PVA debe ser irradiado con luz ultravioleta para promover la formación de nuevos enlaces entre sus cadenas. Diversos autores aseguran que las colinesterasas pueden sufrir procesos de inactivación al irradiarse con luz ultravioleta, lo que afecta su actividad enzimática; así mismo, el proceso de entrecruzamiento genera radicales libres que pueden provocar estrés oxidativo [37–39].

Finalmente se observa una pérdida de la actividad enzimática cuando el sistema PVA:BS/AChE es almacenado durante 4 días a 4°C, lo cual se ve reflejado en la disminución de la velocidad de reacción en comparación con el sistema PVA:BS/AChE (Tabla 6). Bonnet *et al.* (2003) reporta que los biosensores de AChE acoplados a una matriz de PVA presentan buena estabilidad de almacenaje, con una pérdida mínima de su actividad enzimática luego de 50 días [40]. Como se menciona anteriormente, en este ensayo, el grado de entrecruzamiento del PVA parece ser bajo, por lo cual se recomienda incrementar este proceso, pues se asocia directamente con la estabilidad de almacenaje de las enzimas acopladas [41].

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se logra fijar la enzima AChE en una matriz entrecruzada de PVA al emplear benzoato de sodio como fotocatalizador y luz ultravioleta. Se evidencia una disminución en la actividad enzimática al estar fijada en la matriz PVA:BS, sin embargo, se demuestra que la enzima se mantiene activa incluso luego del proceso de fijación. Se recomienda continuar con los estudios enzimáticos que permitan aplicar este conocimiento en sistemas de detección ambientales.

Agradecimientos. Fondos concursables FEES, proyecto “Desarrollo de electrodos para la identificación de pesticidas y/o herbicidas en medio acuoso”. Al *Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC)*, *Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)*, *Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC)*, *Centro de Investigación y Protección Ambiental (CIPA)* y al *Centro de Investigación y Extensión en Materiales (Ciemtec)*.

REFERENCIAS

- [1] Zhu Y-Z, Zhao M-A, Feng YN, Kim JH “Multiresidue method for the determination of 227 pesticides in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) by liquid chromatography with tandem mass spectrometry,” *J. Sep. Sci.*, vol. 37, no. 20, pp. 2947–2954, 2014.
- [2] X. M. Wu, Y. L. Yu, M. Li, Y. H. Long, H. Fang, and S. N. Li, “Prediction of bioavailability of chlorpyrifos residues in soil to earthworms,” *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, vol. 11, no. 1, pp. 44–57, 2011.
- [3] M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pastić, A. M. Bondžić, and V. M. Vasic, “Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 11, no. 3, pp. 315–335, 2013.
- [4] S. Z. U. Hassan, “Acetylcholinesterase Based Detection of Residual Pesticides on Cotton,” *Am. J. Anal. Chem.*, vol. 03, no. 02, pp. 93–98, 2012.
- [5] Istamboulie G, Sikora T, Jubete E, Ochoteco E, Marty J-L, Noguer T “Screen-printed poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT): A new electrochemical mediator for acetylcholinesterase-based biosensors”, *Talanta*, 82(3), 957 (201)
- [6] T. Noguer, T. Sikora, G. Istamboulie, E. Jubete, E. Ochoteco, and J. L. Marty, “Highly sensitive detection of organophosphate insecticides using biosensors based on genetically engineered acetylcholinesterase and poly(3,4- ethylenedioxythiophene),” *J. Sensors*, vol. 2011, 2011.
- [7] S. Andreescu and J.-L. Marty, “Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications,” *Biomol. Eng.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–15, 2006.
- [8] A. P. F. Turner, “Biosensors: sense and sensibility,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 8, p. 3184, 2013.
- [9] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, and E. Reimhult, “Electrochemical Biosensors – Sensor Principles and Architectures,” *Sensors*, vol. 8, no. 3, pp. 1400–1458, 2008.
- [10] B. Brena, P. González-Pombo, and F. Batista-Viera, “Immobilization of enzymes: a literature survey.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1051, pp. 15–31, 2013.
- [11] S. Viswanathan, H. Radecka, and J. Radecki, “Electrochemical biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA.,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 9, pp. 2772–7, May 2009.
- [12] L. N. Meyer, “Effect of Immobilization Method on Activity of Alpha–Amylase,” The Ohio State University, 2007.
- [13] R. K. Scopes, “Enzyme Activity and Assays,” *Encycl. Life Sci.*, pp. 1–6, 2002.
- [14] B. Gupta, R. Agarwal, and M. Sarwar Alam, “Preparation and characterization of polyvinyl alcohol–polyethylene oxide–carboxymethyl cellulose blend membranes,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 127, no. 2, pp. 1301–1308, Jan. 2013.
- [15] Van Etten EA, Ximenes ES, Tarasconi LT, Garcia ITS, Forte MMC, Boudinov h, “Insulating characteristics of polyvinyl alcohol for integrated electronics,” *Thin Solid Films*, **568(1)**, 111 (2014)
- [16] N. Detduangchan and T. Wittaya, “Effect of UV–Treatment on Properties of Biodegradable Film From Rice Starch,” *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, vol. 57, no. 3, pp. 464–469, 2011.
- [17] A. M. Shehata, “Thermal and Spectroscopic Studies of Polyvinyl Alcohol/Sodium Carboxy Methyl Cellulose Blends,” *Egypt. J. Solids*, vol. 31, no. 31, pp. 75–91, 2008.
- [18] S. Anicuta, L. Dobre, M. Stroescu, and I. Jipa, “Fourier transform infrared (FTIR)

spectroscopy for characterization of antimicrobial films containing chitosan," *Analele Univ. din Oradea Fasc. Ecotoxicologie, Zooteh. si Tehnol. Ind. Aliment.*, pp. 1234–1240, 2010.

[19] T. M. R. Miranda, A. R. Gonçalves, and M. T. P. Amorim, "Ultraviolet-induced crosslinking of poly(vinyl alcohol) evaluated by principal component analysis of FTIR spectra," *Polym. Int.*, vol. 50, no. 10, pp. 1068–1072, Oct. 2001.

[20] E. Fonseca, S. Fábia, and H. Sander, "Synthesis and Characterization of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels and Hybrids for rMPB70 Protein Adsorption," *Mater. Res.*, vol. 9, no. 2, pp. 185–191, 2006.

[21] H. S. Mansur, C. M. Sadahira, A. N. Souza, and A. A. P. Mansur, "FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 4, pp. 539–548, May 2008.

[22] L. L. S. Dias, H. S. Mansur, C. L. Donnici, and M. M. Pereira, "Synthesis and characterization of chitosan–polyvinyl alcohol–bioactive glass hybrid membranes," *Biomatter*, 1(1), 114 (2011)

[23] K. Takakura, G. Takayama, and J. Ukida, "Ultraviolet-Induced Crosslinking of Poly(vinyl Alcohol) in the Presence of Sensitizers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 9, pp. 3217–3224, 1965.

[24] El-Sayed S, Mahmoud KH, Fatah AA, Hassen A, "DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends," *Phys. B, Condens. Matter*, 406(21), 4068 (2011)

[25] Guirguis OW, Moselhey MTH "Thermal and structural studies of poly(vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends," *Nat. Sci.*, 4(1), 57 (2012)

[26] Koo OMY, Fiske JD, Yang H, Nikfar F, Thakur A, Scheer B, Adams ML "Investigation into stability of poly(vinyl alcohol)-based Opadry® II films," *AAPS PharmSciTech*, 12(2), 746 (2011)

[27] M. T. Taghizadeh and N. Sabouri, "Thermal Degradation Behavior of Polyvinyl Alcohol / Starch/Carboxymethyl Cellulose/Clay Nanocomposites," *Univers. J. Chem.*, 1(2), 21 (2013)

[28] P. S. Thomas, J.-P. Guerbois, G. F. Russell, and B. J. Briscoe, "FTIR Study of the Thermal Degradation of Poly(vinyl Alcohol)," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 64, no. 2, pp. 501–508, 2001.

[29] A. Valencia, C. Rivera, and E. Murillo, "Estudio de las propiedades de mezclas de alcohol polivinílico–almidón de yuca–sorbitol obtenidas por casting," *Rev. Colomb. Mater.*, 4, 41 (2013)

[30] M. Rodríguez, A. Neira, and C. Aguilera, "Thermogravimetric study of formation of cross-linked structures in the synthesis of poly(methylsiloxane)," *J. Chil. Chem. Soc.*, 48(2), 75 (2003)

[31] R. Vera, F. Hernandez, and J. V. Cauich, "Study of crosslinking density in polydimethylsiloxane networks by DSC," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 55, no. 9, pp. 1317–1327, Feb. 1995.

[32] R. Zong, Z. Wang, N. Liu, Y. Hu, and G. Liao, "Thermal degradation kinetics of polyethylene and silane–crosslinked polyethylene," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 98, no. 3, pp. 1172–1179, 2005.

[33] E. R. Kenawy, E. A. Kamoun, M. S. Mohy Eldin, and M. A. El-Meligy, "Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)–hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications," *Arab. J. Chem.*, vol. 7, no. 3, pp. 372–380, 2014.

[34] K. C. S. Figueiredo, T. L. M. Alves, and C. P. Borges, "Myoglobin entrapment in poly(vinyl alcohol) dense membranes," *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 31, no. 3, pp. 747–756, 2014.

[35] Zhan JF, Jiang ST, Pan LJ "Immobilization of phospholipase A1 using a polyvinyl alcohol–alginate matrix and evaluation of the effects of immobilization" *Brazilian J. Chem. Eng.*, 30(4), 721 (2013)

[36] B. Bolto, T. Tran, M. Hoang, and Z. Xie, "Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 34, no. 9, pp. 969–981, 2009

[37] C. K. Mathews and K. G. Ahern, *Bioquímica*, 3era Edici. Madrid: Pearson Education, 2002.

[38] A. Santi, C. Menezes, M. M. F. Duarte, J. Leitemperger, T. Lópes, and V. L. Loro, "Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (in vitro).," *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 4, no. 3, pp. 149–53, 2011.

[39] M. S. Souza, E. Balseiro, C. Laspoumaderes, and B. Modenutti, "Effect of ultraviolet radiation on acetylcholinesterase activity in freshwater copepods," *Photochem. Photobiol.*, 86(2), 367 (2010)

[40] C. Bonnet, S. Andreeescu, and J.-L. Marty, "Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes," *Anal. Chim. Acta*, vol. 481(2), 209 (2003)

[41] Andreeescu S, Marty J-L "Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications," *Biomol. Eng.*, 23(1), 1 (2006)