



TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE NANOFIBRAS CON LISOZIMA

Autora

María Jesús Lozoya Agulló

Tutores

Ricardo Mallavia Marín

Rocío Díaz Puertas

Alberto Falcó Graciá

Departamento de Farmacología, Pediatría y Química orgánica

Área de Química Inorgánica

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso 2021/2022

RESUMEN

Hoy en día, los nanocompuestos están adquiriendo mayor popularidad en diversos campos, entre ellos el de la biomedicina. Las nanofibras son nanomateriales particularmente útiles para encapsular compuestos terapéuticos. En este trabajo, se realizaron nanofibras empleando un polímero, el óxido de polietileno, y una proteína, la lisozima. La concentración de polímero se mantuvo fija, 3 %, mientras que la de lisozima fue aumentando en un rango de entre 5 y 20 %. De estas disoluciones se comprobó su viscosidad, la cual fue aumentando con la concentración de lisozima y mantuvo una relación con la capacidad para electrohilar y con el diámetro de las nanofibras obtenidas. Además, la proteína encapsulada en las fibras fue capaz de mantener su integridad y estructura, lo que se comprobó mediante electroforesis y espectroscopía de infrarrojos, respectivamente. Los ensayos antimicrobianos permitieron demostrar que la actividad también se mantuvo intacta respecto a las condiciones normales, ya que la bacteria gram positiva *Bacillus circulans* se vio inhibida.

Palabras clave: Electrohilatura, Nanofibras, Lisozima, Antibacteriano

ABSTRACT

*Nowadays, the nanocomposites are becoming more popular in various fields, including biomedicine. Nanofibers are nanomaterials particularly useful for encapsulating therapeutic compounds. In this work, nanofibers were made using a polymer, polyethylene oxide, and a protein, lysozyme. The polymer concentration was set on 3 %, while the lysozyme increased in a range between 5 and 20 %. The viscosity of these solution was verified, which increased with the concentration of lysozyme and has a relation with the capacity for electrospinning and the nanofibers diameter. Furthermore, the encapsulated protein in the fibers was able to maintain its integrity and structure, which was confirmed by electrophoresis and infrared spectroscopy, respectively. Antimicrobial tests showed that the activity was also maintained intact compared to normal conditions, since the Gram-positive bacteria *Bacillus circulans* was inhibited.*

Keywords: Electrospinning, Nanofibers, Lysozyme, Antibacterial

Contenido

1	Introducción	3
1.1	Nanofibras y nanotecnología	3
1.2	Electrohilatura	4
1.3	Proteínas en nanotecnología.....	6
1.4	Polímeros.....	7
2	Objetivos	8
3	Materiales y métodos.....	9
3.1	Preparación de disoluciones	9
3.2	Electrohilatura de fibras	9
3.3	Microscopía óptica	10
3.4	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo	10
3.5	Cuantificación de proteína	11
3.6	Geles de acrilamida	11
3.7	Espectroscopía infrarroja	12
3.8	Ensayos de actividad antimicrobiana	12
3.9	Procesado de datos	14
4	Resultados	15
4.1	Parámetros de las disoluciones.....	15
4.2	Elaboración de nanofibras.....	16
4.3	Caracterización de nanofibras al microscopio óptico	16
4.4	Caracterización de nanofibras al microscopio electrónico	17
4.5	Cuantificación de proteína	21
4.6	Electroforesis en gel de acrilamida	22
4.7	Espectroscopía infrarroja	24
4.8	Ensayos de actividad antimicrobiana	25
5	Discusión	28
6	Conclusión	31
7	Proyección futura	32
8	Bibliografía.....	33

1 Introducción

En los últimos años, la nanotecnología ha ido adquiriendo una mayor importancia en diversos campos, como son el medioambiente, la industria agroalimentaria y la medicina, entre otros [1,2]. En cuanto a la medicina, se han desarrollado nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades y fármacos dirigidos a una diana en concreto, con lo que se pretende lograr una terapia personalizada [3]. Por tanto, se podrán abarcar las enfermedades desde otro punto de vista y así aportar nuevos tratamientos con mayor efectividad.

La nanotecnología está a la orden del día. Sin ir más lejos, las vacunas contra la COVID-19 están formadas por nanopartículas lipídicas que encapsulan el ARNm de la glicoproteína del SARS-CoV-2 [4,5]. Además, el uso de los nanomateriales en las vacunas resulta útil para reducir los efectos secundarios y optimizar la eficacia en personas con el sistema inmune alterado [6].

Actualmente, la incidencia en la población de las enfermedades provocadas por patógenos es bastante alta, acompañada de la muerte en algunos de los casos. Para tratarlas, se usan antibióticos que buscan acabar con dichos patógenos. Sin embargo, el incremento de la resistencia a antibióticos supone un problema alarmante. Entre los motivos más relevantes de esta resistencia se encuentran las mutaciones cromosómicas que sufren las propias bacterias o el exceso de antibiótico administrado, que acaba en la presencia de estos en el medio ambiente, favoreciendo así la proliferación de los microorganismos y produciendo cambios en las comunidades de diferentes especies [7].

La aparición de resistencias a antibióticos implica que los tratamientos de las enfermedades infecciosas sean ineficaces y que no haya forma efectiva de curarlas [8]. Esta es la razón por la cual se requieren nuevas estrategias para aumentar la efectividad y superar las limitaciones con las que se encuentran estos fármacos. Es aquí donde la nanotecnología podría adquirir un papel importante, puesto que permitiría la creación de fármacos antimicrobianos con una gran capacidad de absorción y liberación orientada hacia una diana específica, lo cual supondría una solución a la resistencia que existe hoy en día [9].

1.1 Nanofibras y nanotecnología

La nanotecnología se basa en el uso de la ciencia que emplea materiales en la escala de los nanómetros, generalmente entre 1 nm y 100 nm [10]. Las nanoestructuras pueden tener diferentes morfologías, como son nanoesferas, nanofibras, nanopartículas, etc. [11]. Los

nanomateriales son de gran utilidad para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos a demanda, lo cual resulta beneficioso en el caso de medicamentos muy tóxicos, insolubles o inestables. En concreto, las nanofibras poseen una gran área superficial, alta porosidad y pueden estar constituidas por una gran variedad de polímeros, los cuales constituyen su matriz. Estas características confieren una serie de propiedades como son la protección del fármaco frente a la descomposición en el torrente sanguíneo, su liberación controlada y en la zona a la que va dirigida y la permeabilidad de algunas barreras [12].

Varios estudios recientes han demostrado la capacidad de las nanofibras para encapsular diferentes antibióticos y compuestos. Como ejemplo, tres agentes terapéuticos con propiedades paliativas para los síntomas de la psoriasis (ácido salicílico, salicilato de metilo y capsaicina) se encapsularon en nanofibras de poli(metil vinil éter-alt-ácido maleico monoetil éster) (PMVEMA-ES) y su actividad continuaba siendo prácticamente igual que de manera libre. Además, la combinación de varios de ellos daba lugar a un efecto sinérgico, pudiendo reducirse la concentración de estos y generando mayores beneficios para la salud [13,14].

1.2 Electrohilatura

De entre los diferentes métodos que existen para elaborar nanofibras, la electrohilatura (del inglés, *electrospinning*) es el más usado porque es simple, barato, versátil, reproducible y escalable. La electrohilatura permite crear nanofibras mediante la carga y expulsión de una solución polimérica a través de una aguja sometida a un campo eléctrico de alto voltaje. La disolución con el polímero deseado se introduce dentro de una jeringuilla unida a una aguja y se bombea a una velocidad baja hasta que se forma una gota en la punta de la aguja. Posteriormente, la disolución se somete a una alta carga eléctrica producida por una fuente de alto voltaje. Conforme el voltaje va aumentando, la gota de la punta de la aguja se comienza a deformar hasta que comienza a ejercer una magnitud de fuerza similar a la tensión superficial de la propia disolución. En este momento, comienza a formarse una forma de cono con lados convexos y una punta redondeada, conocido como “cono de Taylor”. Cuando se alcanza un cierto umbral de voltaje se comienza a emitir un chorro de líquido. Durante el movimiento del chorro entre la aguja y el colector, el solvente se evapora y se recolecta una fibra sólida de polímero (Figura 1) [15,16]. El colector también se encuentra conectado a la fuente de alto voltaje y normalmente está formado por un metal conductor [17].

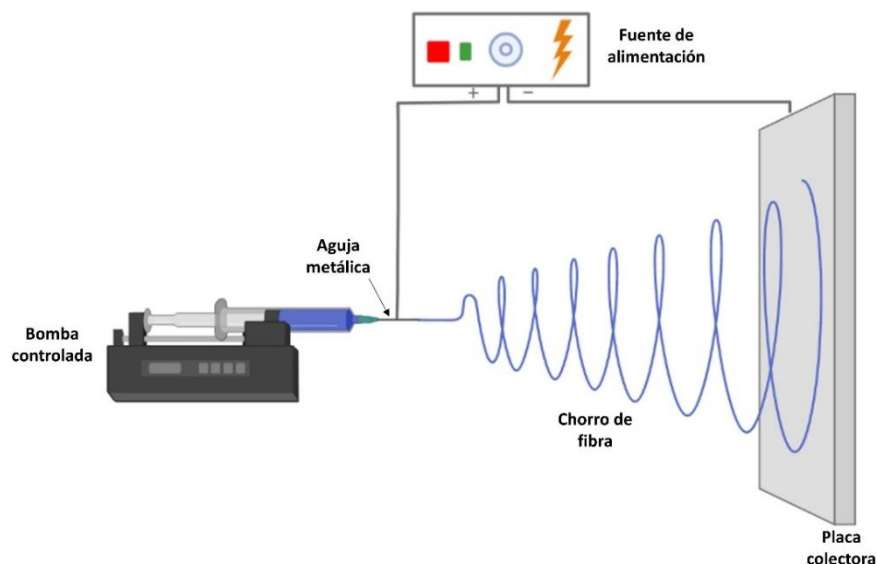


Figura 1. Esquema de un equipo de *electrospinnig*.

La morfología de las nanofibras obtenidas con esta técnica varía en función de su tamaño, área superficial, diámetro y porosidad. Además, existen factores que afectan a las propiedades de las fibras. Parámetros intrínsecos a la disolución son la concentración, su viscosidad, el peso molecular de los polímeros empleados, la tensión superficial y la conductividad. Los parámetros que pueden ser modificados externamente son el voltaje aplicado, la distancia hasta el colector y la velocidad del flujo. Por otro lado, las condiciones ambientales, como la temperatura y la humedad, también influyen en la morfología de las fibras [18].

En el siguiente esquema (Figura 2) quedan recogidos todos estos parámetros a tener en cuenta para llevar a cabo una electrohilatura óptima:

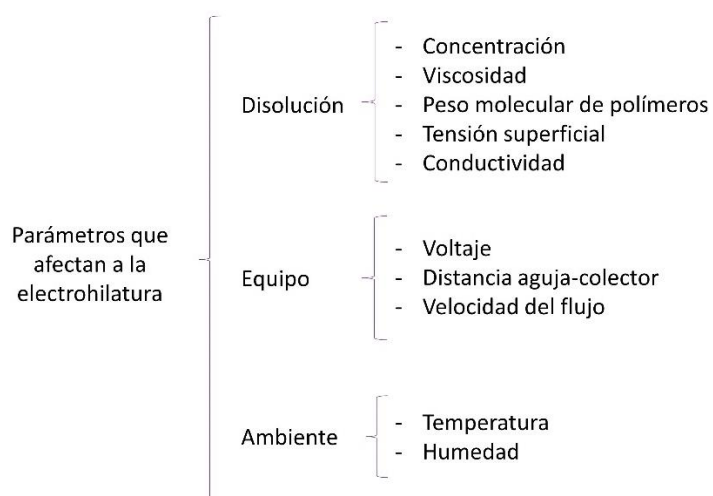


Figura 2. Esquema de los parámetros importantes en la electrohilatura de nanofibras.

La utilización de la mezcla de polímero y fármaco para electrohilar fibras (*blend electrospinning*) es un método que solamente requiere un único paso, en el cual se encapsulan las moléculas de fármaco en la matriz de la fibra. De esta manera, se consiguen fibras con una alta relación superficie:volumen que da lugar a una liberación rápida del fármaco, la cual podría variar según la composición de la disolución [19].

1.3 Proteínas en nanotecnología

Las proteínas son moléculas complejas formadas por aminoácidos que tienen diferentes estructuras, siendo la terciaria la que le confiere funcionalidad. El electrohilado de proteínas supone un desafío debido a la complejidad de sus estructuras, peso molecular, carga superficial, enlaces iónicos, de hidrógeno y disulfuro. Además, la capacidad de electrohilar de las proteínas depende tanto de su solubilidad, como del grado de desplegamiento en un disolvente específico [20]. Es por ello que a la hora de usar proteínas se han de tener en cuenta estos parámetros con tal de que se conserve su actividad.

Las nanofibras basadas en proteínas se pueden clasificar en nanofibras de proteínas, que están constituidas en su totalidad por proteínas, y las nanofibras conjugadas con proteínas, basadas en proteínas unidas a las nanofibras formadas por otro material. Ambas metodologías tienen muchas aplicaciones, como en diagnósticos, a modo de biosensores, en el sector alimentario o para la liberación de fármacos en terapias, entre otros [21].

La lisozima es una proteína formada por 129 aminoácidos y se ocupa de hidrolizar los enlaces entre los residuos de N-acetil-d-glucosamina y N-acetil murámico, los cuales se encuentran en el peptidoglicano de la pared celular bacteriana (Figura 3). Como las bacterias gram positivas tienen un peptidoglicano de mayor grosor y se sitúa en la capa más externa, la proteína actúa más fácilmente en este tipo de bacterias. Esta enzima está presente en la leche de vaca, la saliva humana, lágrimas y en la clara de huevo de gallina, además de en algunas plantas y bacterias [21].



Figura 3. Estructura de la lisozima. Fuente: Protein Data Bank. Código: 1GWD.

1.4 Polímeros

Existen diferentes tipos de polímeros, pudiéndose diferenciar entre naturales y sintéticos. Dentro de los naturales, se encuentran el colágeno, quitosano, alginato, celulosa, fibrinógeno, etc. Estos suelen ser biodegradables, biocompatibles y con baja capacidad antigénica. Por el contrario, son más caros, más difíciles de procesar y tienen bajas propiedades mecánicas [22]. En cuanto a los sintéticos, tienen mejores propiedades mecánicas y electrohilan mejor en comparación con los naturales. Si se trata de polímeros biodegradables, existe un amplio rango de disolventes que consiguen degradarlos. Un uso habitual suele ser para la encapsulación de fármacos y su liberación [23]. Algunos ejemplos son el ácido poliláctico (PLA, por sus siglas en inglés), poliuretano (PU, por sus siglas en inglés), ácido poliglicólico (PGA, por sus siglas en inglés), óxido de polietileno (PEO, por sus siglas en inglés), etc. [24].

El PEO es un polímero de alto peso molecular soluble en agua y en algunos solventes orgánicos. Es uno de los polímeros más usados para retardar la liberación de fármacos. Su estructura es la del polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés) y posee la misma fórmula general [25]. Resulta beneficioso a la hora de la liberación de fármacos encapsulados porque poseen una mayor estabilidad frente a las enzimas, la inmunogenicidad disminuye y es menos probable que las macromoléculas agreguen [26].

2 Objetivos

Teniendo en cuenta el interés que presenta el uso de proteínas para el electrohilado, el objetivo general de este trabajo es la elaboración y caracterización de fibras en escala nanométrica, utilizando para ello un polímero sintético, el PEO, y una proteína, la lisozima, de la que ha quedado demostrada su actividad antibacteriana.

Partiendo del objetivo general ya mencionado, se desarrollarán otros específicos:

- Preparación de disoluciones y comprobación de su capacidad para electrohilar.
- Optimización de los parámetros para la producción de fibras mediante *electrospinning*.
- Caracterización morfológica de las nanofibras obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido.
- Evaluación de la integridad y estructura de la proteína una vez electrohilada.
- Evaluación de la capacidad antimicrobiana utilizando bacterias de diferentes especies, en este caso *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus circulans* y *Escherichia coli*.

3 Materiales y métodos

3.1 Preparación de disoluciones

Para la preparación de disoluciones empleadas para la síntesis de nanofibras se empleó PEO como matriz polimérica (Acros Organics BVBA, Geel, Bélgica) cuyo peso molecular oscila entre 600.000 y 1.000.000 g/mol y lisozima de la clara de huevo de gallina (PanReac AppliChem, Barcelona, España), con un peso molecular de 14.400 g/mol, aproximadamente. El primer paso para poder preparar las disoluciones fue comprobar la solubilidad de la lisozima en agua. Una vez hecho esto, se hicieron las disoluciones que se utilizaron para electrohilar. Todas ellas estaban constituidas por PEO al 3 % p/p, agua Milli-Q y lisozima a unas concentraciones del 5 %, 10 %, 15 % y 20 % p/p. Como control, se utilizó una disolución con PEO al 4 % p/p y agua para ver la capacidad para electrohilar que tenía el polímero por sí solo.

Las disoluciones fueron preparadas en un baño de hielo con tal de mantener la estabilidad de la proteína y se mantuvieron en agitación hasta que los componentes estuvieran disueltos por completo. Para aquellas disoluciones en las que no se consiguió que se disolviera rápidamente, se usó el vórtex. Por otro lado, todas ellas fueron sometidas a ultrasonidos como último paso del proceso. En cuanto a la conservación de estas, se guardaron en refrigeración a 4 °C.

Para conseguir un electrohilado óptimo, se necesitaba una cierta viscosidad en estas disoluciones. Con este fin se empleó un viscosímetro capilar, proporcionado por Vidra foc, con el que se midió el tiempo que tarda en cruzar el líquido dos puntos del tubo de vidrio. Usando la densidad de las disoluciones, una constante correspondiente a cada viscosímetro y el tiempo medido, se calculó la viscosidad en centipoise (cP).

3.2 Electrohilatura de fibras

La técnica elegida para elaborar las fibras fue la electrohilatura. El equipo usado estaba compuesto por una bomba de infusión modelo KdScientific 100 y una fuente de voltaje modelo FC60P2, por Glassman High Voltage Inc.

La jeringuilla utilizada fue de 2 mL, procedente de Becton Dickinson Discardit (Huesca, España). En su extremo se colocó una aguja de acero inoxidable 316 con una longitud de 10,16 cm, un diámetro interno de 0,838 mm y externo de 1,27 mm, proporcionada por Sigma Aldrich. Las fibras fueron recogidas en el colector, donde se colocó un portaobjetos,

proporcionado por Deltalab (Barcelona, España). Este portaobjetos se usó posteriormente para observar las fibras al microscopio óptico y electrónico.

Según el tipo de polímero usado, los parámetros que se establecen para electrohilar fibras pueden variar. Las condiciones ambientales, como son la humedad y la temperatura, también influyeron en el proceso de electrohilatura y fueron monitorizadas.

3.3 Microscopía óptica

Para observar las nanofibras obtenidas mediante *electrospinning* se utilizó el microscopio óptico. De este modo se comprobaron los resultados de manera cualitativa y permitió evaluar si los parámetros establecidos para electrohilar eran los adecuados. Para este fin se utilizó el microscopio óptico LEICA DMI 3000B, provisto con una fuente de luz compacta EL6000 y una cámara digital LEICA DFC3000G. Las imágenes se pudieron tomar gracias al programa informático Leica Application Suite AF 6000 Module Systems. Estas se hicieron a 63× y mediante contraste de fases.

3.4 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

Se empleó el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, *Field Emission Scanning Electron Microscopy*) para analizar las nanofibras detalladamente. El equipo utilizado es el modelo Sigma 300 VP de ZEISS de emisión de campo de cátodo Schottky.

Gracias a la calidad que ofrece este microscopio, se pudieron examinar con mayor precisión las imágenes de las fibras, obteniendo así datos exactos de su morfología.

Una vez se tuvieron las imágenes, se procedió a cuantificar el diámetro de las fibras. Para ello se utilizó el programa informático ImageJ, desarrollado por *National Institutes of Health* (NIH, por sus siglas en inglés). Se tomaron 100 medidas de entre 5 y 8 imágenes de las fibras que había en cada muestra y se procesaron los resultados mediante los programas informáticos Excel y GraphPad.

La presencia de la distribución de la lisozima de las fibras con PEO se determinó usando la espectroscopia de rayos X dispersiva de energía. Las condiciones fueron un voltaje aplicado de 5 kV, apertura de 30 micras, tiempo de medida de 100 segundos, tiempo de amplificación de 3,84 segundos y aumento de 5000×.

3.5 Cuantificación de proteína

La proteína contenida en las nanofibras se cuantificó empleando el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000 de Thermo Scientific, equipado con el programa informático ND-1000, con el que se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 280 nm. En primer lugar, se realizó una recta de calibrado con lisozima en agua a diferentes concentraciones conocidas entre 0 y 1 mg/mL. Posteriormente, se usaron disoluciones de fibras con agua a una concentración de proteína estimada. La finalidad de este ensayo fue comprobar la concentración real de proteína en las fibras.

Después de esto, se hizo una prueba de pérdida de peso tomando fibras del 15 y 20 %. Para ello, se pesó una determinada cantidad de fibras y se metieron en la estufa a 100 °C durante un día. Una vez pasado este tiempo, se volvieron a pesar para comprobar la diferencia obtenida.

3.6 Geles de acrilamida

Los geles de acrilamida fueron empleados para comprobar cambios en la integridad de la lisozima una vez fue electrohilada. Se utilizaron muestras de lisozima sola a 10 mg/mL y de fibras procedentes de las disoluciones al 10, 15 y 20 % normalizadas a 10 mg/mL de proteína. Se prepararon 30 µL de muestra con 10 µL de tampón de carga 4× (Bio-Rad laboratories inc., California, Estados Unidos) con β-mercaptoetanol, obteniéndose una concentración final de 7,5 µg/µL. Las muestras fueron sometidas a una temperatura de 95 °C durante 15 minutos y almacenadas a -40 °C hasta su uso.

Los geles 4-20 % TGX (Bio-Rad laboratories inc.) se cargaron con diferentes volúmenes, 6,7, 3,3 y 1,3 µL de muestra para conseguir una cantidad de proteína de 50, 25 y 10 µg, respectivamente. La electroforesis se llevó a cabo en un tampón TGS (Bio-Rad laboratories inc.) a unas condiciones de 70 V, 3 A y 300 W hasta que el frente estuvo próximo al final del gel. El gel se tiñó durante 1 hora con Comassie 0,2 %, 50 % metanol y 10 % acetona y se destiñó con metanol al 25 % y 10 % de acetona durante toda la noche.

Los pesos moleculares de la muestra se determinaron según los marcadores Bio-Rad “Precision Plus Protein™ Standards”. Se realizó una recta de calibrado sabiendo los pesos moleculares del marcador y la distancia recorrida con la que se obtuvieron los pesos moleculares de la muestra. También se calculó la densitometría de las bandas empleando el programa informático ImageJ.

3.7 Espectroscopía infrarroja

El análisis mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) se utilizó para evaluar cualitativamente los grupos funcionales que componían las muestras utilizadas en el proceso de elaboración de nanofibras. Dichas muestras fueron preparadas a modo de pastillas de bromuro potásico (KBr, procedente de Sigma Aldrich) mezclado con lisozima, polímero o fibras en forma de polvo. Otra de las muestras estaba compuesta directamente por velo polimérico.

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro FT-IR Bruker IFS 66/S (Bruker, Rheinstetten, Alemania), equipado con el programa informático OPUS 5.5 para procesar los datos. Estos registros se realizaron en modo transmisión con 200 barridos en un rango entre 4000 y 500 cm^{-1} .

Esta técnica se basa en la capacidad de las moléculas de absorber radiación infrarroja a una determinada longitud de onda, ya que los subestados de rotación y modos de vibración de estas están excitados provocando un cambio en su momento dipolar. Por lo tanto, asignando transmitancias a grupos funcionales específicos, se obtuvo un espectro diferente de infrarrojo para cada molécula.

3.8 Ensayos de actividad antimicrobiana

Como primer paso, se crecieron las bacterias, que se obtuvieron liofilizadas a través de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las especies fueron: *Escherichia coli*, *Bacillus circulans*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*. Se resuspendieron en 0,5 mL de medio líquido estéril. Esta suspensión se incubó en 5 mL de medio líquido LB y en medio sólido con agar LB (cultivo madre), ambos procedentes de Nyztech, Lisboa, Portugal. Las incubaciones se llevaron a cabo a las condiciones óptimas para los microorganismos, según indican la ficha de la cepa (Tabla 1). Todos estos procedimientos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, lo que se obtuvo gracias a un mechero Bunsen.

Tabla 1. Especies de bacterias, condiciones y antibióticos usados como control positivo.

Bacteria	Tinción de Gram	Incubación		Antibiótico	Cantidad (μg)
		Tiempo (h)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		
<i>E. coli</i>	Negativo	24	37	Neomicina	100
<i>B. circulans</i>	Positivo	48	30	Vancomicina	15
<i>S. epidermidis</i>	Positivo	24	37	Vancomicina	15
<i>B. subtilis</i>	Positivo	48	30	Neomicina	100

El método de Kirby-Bauer fue el elegido para evaluar, de manera cualitativa, la sensibilidad de las bacterias utilizadas a lisozima y a fibras con lisozima. Primero, se realizó un cultivo *overnight* a partir del cultivo madre. Al día siguiente, el cultivo fue centrifugado a 1000 g durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió en 10 mL de tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Gibco, Thermo Fisher Scientific) a 1×. Después, se añadieron 100 µL de la suspensión bacteriana en placas de agar LB para hacer céspedes bacterianos con cada una de las especies, empleando para ello un asa Digrafsky. El siguiente paso fue colocar discos de papel de filtro de 7 mm de diámetro sobre los que se añadieron 10 µL del control o muestra correspondiente y finalmente se incubó la placa a las condiciones óptimas de cada bacteria.

Antes de probar el ensayo con las fibras, se usó lisozima a diferentes concentraciones con tal de conocer su comportamiento en el agar y elegir una concentración óptima utilizada posteriormente como control. En este primer ensayo se usó un antibiótico, diferente según la bacteria contenida en la placa, como control positivo; agua como control negativo y diferentes concentraciones de lisozima en disolución (Figura 4).

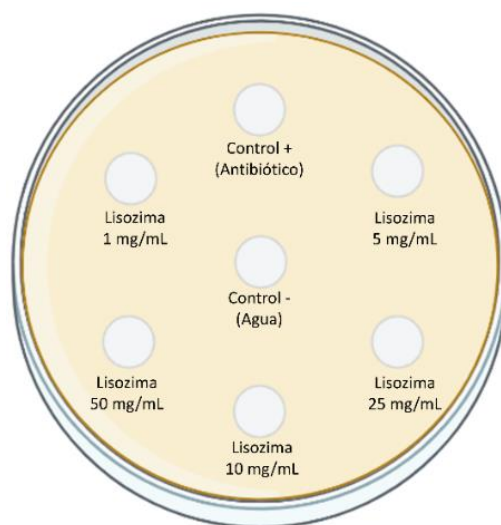


Figura 4. Esquema del primer ensayo de Kirby-Bauer. Distribución de las muestras en la placa.

Una vez conocida la concentración óptima de lisozima, que se usó como control positivo, se realizó el mismo ensayo, pero con nanofibras de PEO y lisozima a diferentes concentraciones disueltas en agua milliQ (Figura 5).

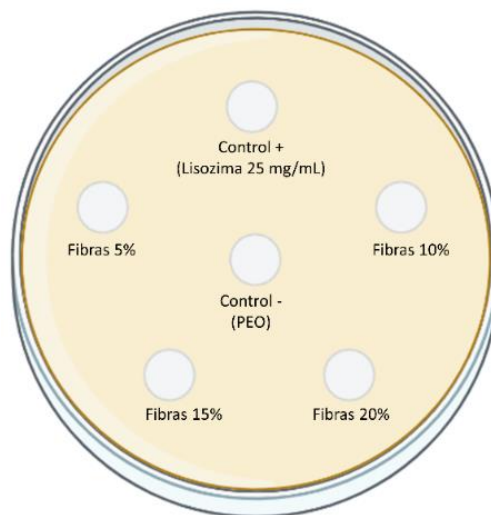


Figura 5. Esquema del segundo ensayo de Kirby-Bauer. Distribución de las muestras en la placa.

3.9 Procesado de datos

Para procesar los datos obtenidos se utilizó Microsoft Excel 365. Las gráficas se realizaron mediante GraphPad Prism8. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

4 Resultados

4.1 Parámetros de las disoluciones

Antes de preparar las disoluciones, se comprobó la solubilidad de la lisozima en agua, llegando a un valor de 500 mg/mL. A partir de esto, se hicieron las diferentes disoluciones sin sobrepasar dicho valor. Para cada una de las disoluciones preparadas, se midió su densidad y su viscosidad. Es necesario que las disoluciones tengan una mínima viscosidad a fin de obtener un electrohilado óptimo.

Se prepararon varias disoluciones control, es decir, con PEO y agua, con el fin de comprobar cuál de ellas presentaba una viscosidad suficiente para poder electrohilar. La de menor concentración preparada fue de PEO al 2 %, aumentándose en un intervalo de 0,5 la concentración hasta un 5 % de PEO. En la Figura 6a quedan reflejadas las diferentes viscosidades, siendo la de la disolución de PEO al 4 % la más adecuada para electrohilar.

En cuanto a las disoluciones compuestas por polímero, proteína y agua, bastaba con una concentración menor de PEO para obtener fibras uniformes, en este caso fue del 3 %. En la Figura 6b se observa la media de la viscosidad de las disoluciones formadas por lisozima en concentraciones crecientes y 3 % de PEO. La viscosidad aumentó conforme lo hizo la concentración de lisozima.

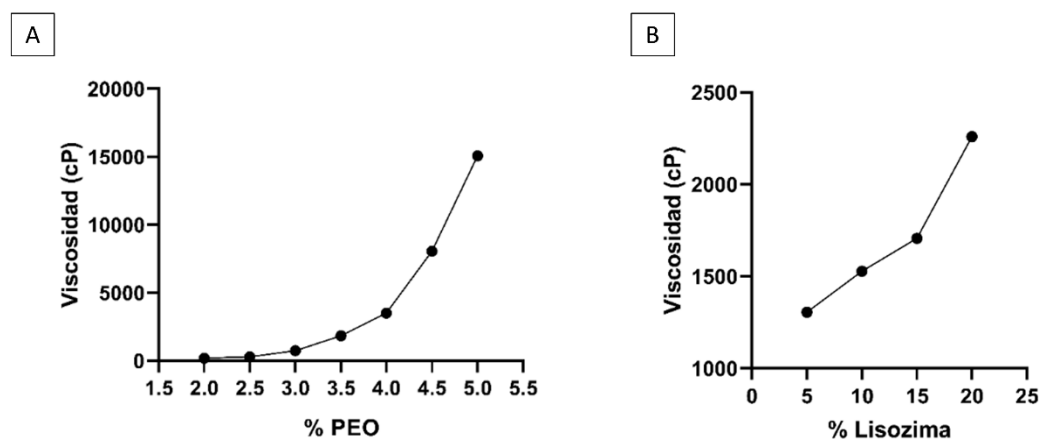


Figura 6. Viscosidad de las disoluciones poliméricas. A. Viscosidad de las disoluciones control de PEO a diferentes concentraciones. B. Viscosidad de las disoluciones de lisozima en concentraciones crecientes y PEO al 3 %. (n=3). Cabe señalar que la desviación estándar obtenida fue tan pequeña en todos los casos que no es apreciable en la gráfica.

4.2 Elaboración de nanofibras

Con el fin de conseguir unas nanofibras adecuadas, se requirió optimizar los parámetros usados en el *electrospinning*, es decir, la distancia entre la aguja y el colector, el voltaje aplicado y el flujo. Se fueron variando estos parámetros según el resultado que se observaba mediante microscopía óptica, hasta llegar a unas fibras cualitativamente óptimas. En este caso, las condiciones experimentales del *electrospinning* fueron todas las mismas, 20 cm de distancia, 17 kV de voltaje y un flujo de 0,25 mL/h.

Además, las condiciones ambientales que influyen en el electrohilado se mantuvieron constantes, siendo la temperatura de 20 °C y la humedad del 55 %.

4.3 Caracterización de nanofibras al microscopio óptico

El uso del microscopio óptico fue útil a la hora de elegir los parámetros para el *electrospinning* y, a su vez, para comprobar si las disoluciones eran las adecuadas con una viscosidad suficiente para crear unas fibras uniformes. En el caso de la disolución control formada por 3 % de PEO, las fibras obtenidas presentaban engrosamientos, con aspecto de perlas encadenadas, por lo que no fueron adecuadas (Figura 7a). Con la disolución de 3,5 % de PEO ocurría igual (Figura 7b). Los resultados de las fibras al 4 % de PEO presentaban una apariencia uniforme, por lo que son las que se utilizaron como control.

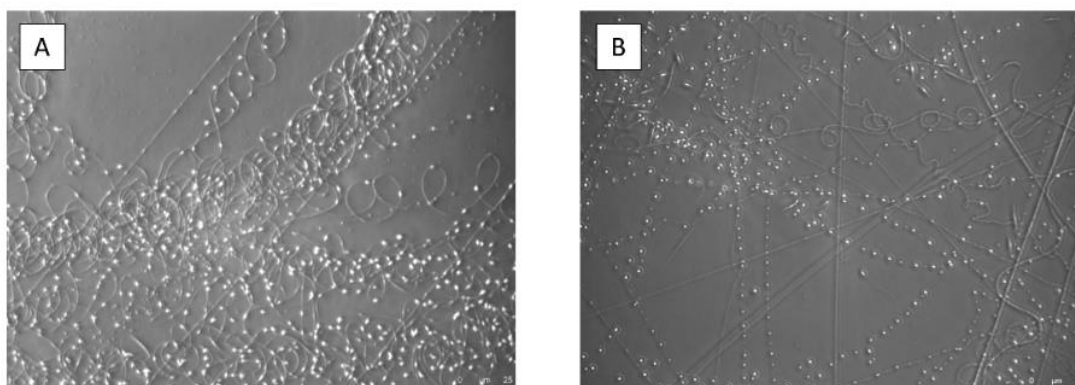


Figura 7. Imágenes representativas de nanofibras de PEO observadas al microscopio óptico. (scale bar = 25 μ m) A. Fibras de PEO al 3 %. B. Fibras de PEO al 3,5 %.

Por otro lado, el resto de las disoluciones se prepararon con el polímero al 3 % y diferentes cantidades de lisozima (Figura 8). Con una menor cantidad de polímero se obtuvieron unas nanofibras óptimas y, conforme se fue aumentando la concentración de lisozima, las fibras presentaban mejor aspecto.

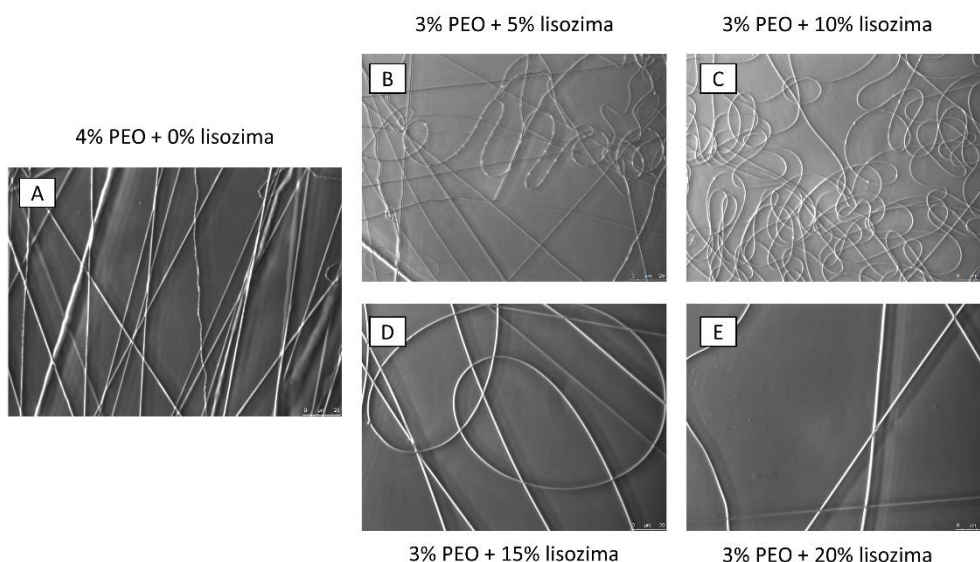


Figura 8. Nanofibras observadas al microscopio óptico. (scale bar = 25 μ m) Proceden de diferentes disoluciones al 4 % PEO (A) y 3 % PEO con diferentes cantidades de lisozima (B) 5 %, (C) 10 %, (D) 15 %, (E) 20 %.

4.4 Caracterización de nanofibras al microscopio electrónico

Una vez se tuvieron las muestras preparadas con los parámetros óptimos, se llevaron a microscopía electrónica. En concreto, se usó el FESEM, que proporciona imágenes de alta resolución para poder observar la morfología de las fibras y cuantificarlas con precisión. A partir de las medidas tomadas de los diámetros, se elaboró un histograma donde se diferencia el tamaño de las fibras fácilmente.

Se usó una concentración de 4 % de PEO como control, ya que fue la concentración más baja de polímero que formaba fibras uniformes al microscopio óptico. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con el microscopio electrónico. Debido a su apariencia poco uniforme (Figura 9), no se pudo cuantificar su diámetro.

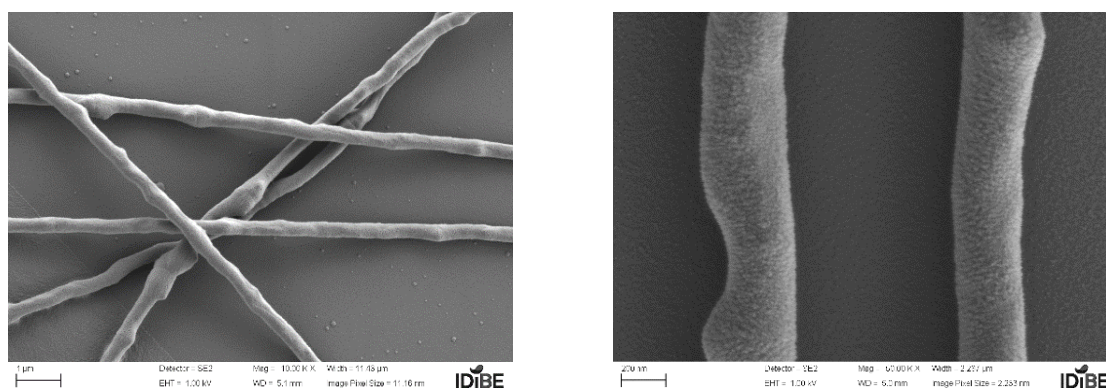


Figura 9. Imágenes de nanofibras de PEO 4 % obtenidas por FESEM.

El resto de nanofibras obtenidas con disoluciones de polímero y proteína, sí pudieron ser cuantificadas, ya que tenían una mejor apariencia. Todas ellas estaban compuestas por PEO al 3 % y diferentes concentraciones de lisozima, del 5 al 20 % (Figuras 10, 11, 12 y 13).

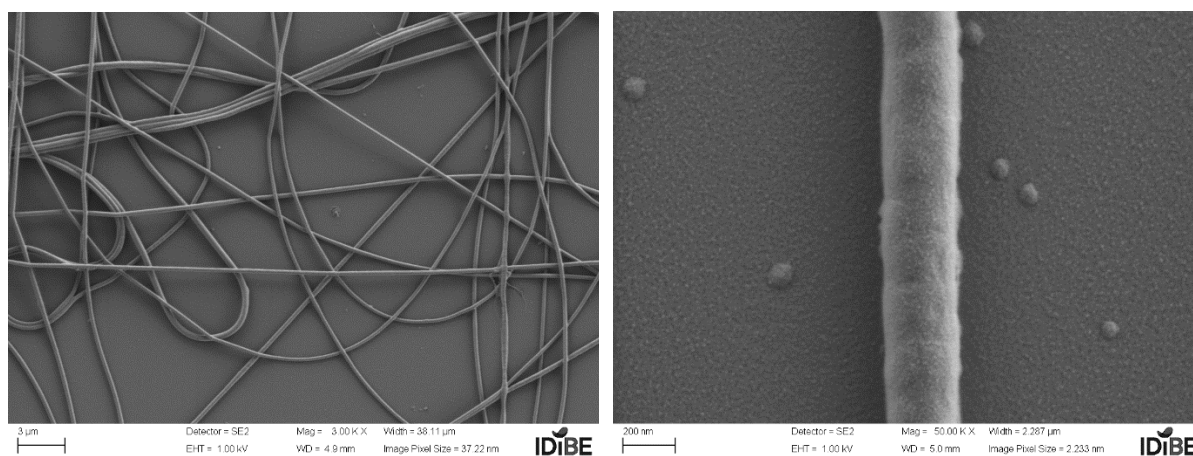


Figura 10. Nanofibras con 5 % de lisozima obtenidas por FESEM.

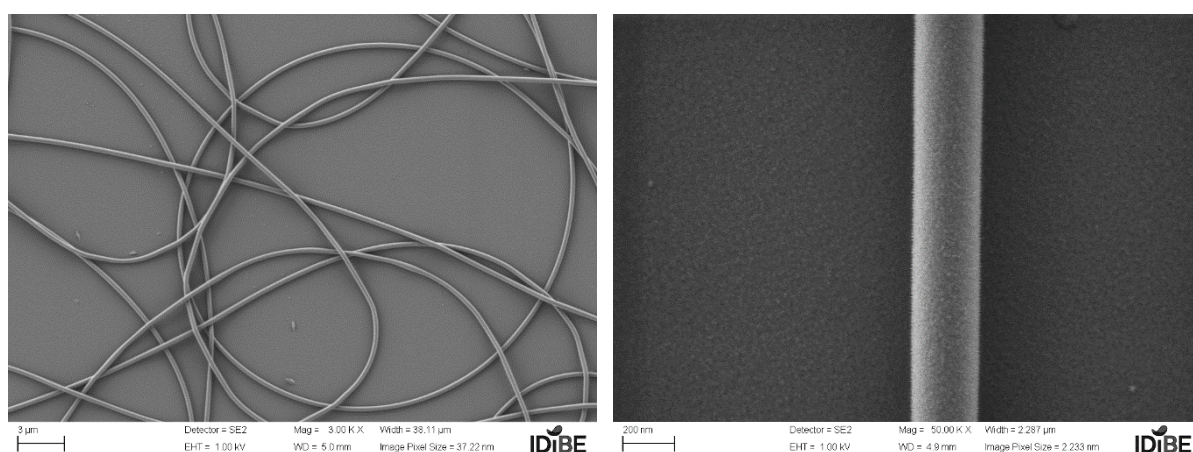


Figura 11. Nanofibras con 10 % de lisozima obtenidas por FESEM.

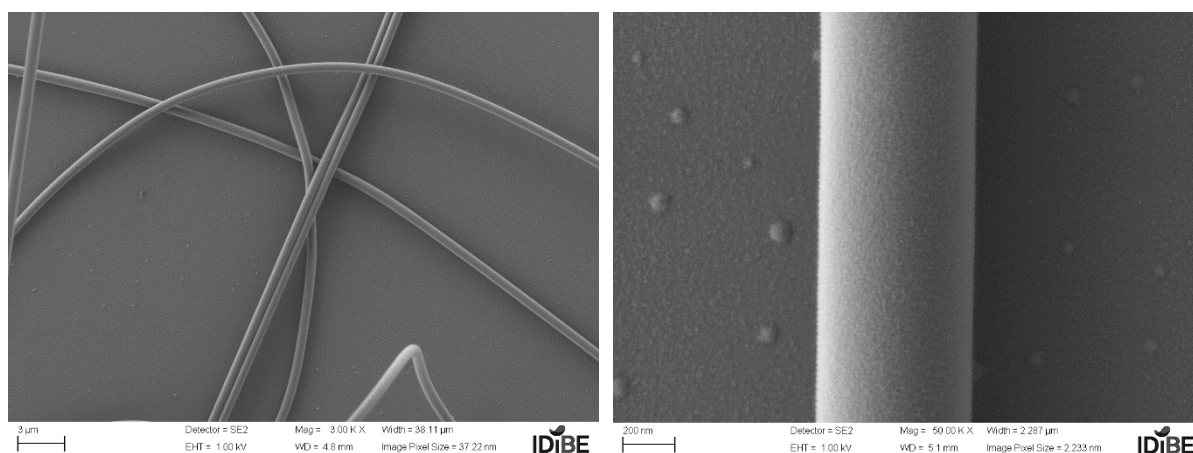


Figura 12. Nanofibras con 15 % de lisozima obtenidas por FESEM.

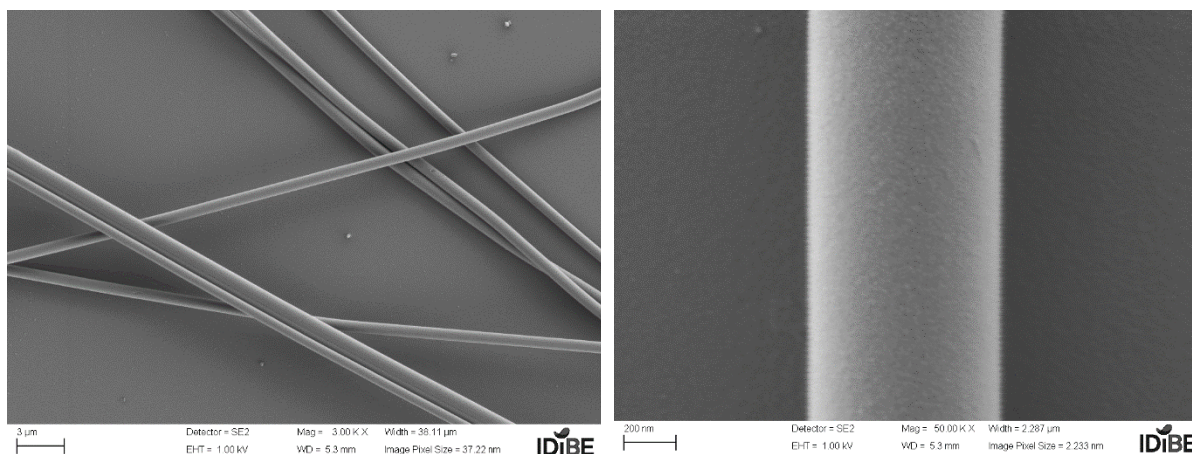


Figura 13. Nanofibras con 20 % de lisozima obtenidas por FESEM.

Como se observa a simple vista, el tamaño de las nanofibras aumentaba conforme lo hacía la concentración de lisozima, obteniendo así unas fibras más gruesas. Además, la superficie de las fibras tuvo un aspecto menos rugoso al aumentar la cantidad de lisozima contenida en ellas.

De cada muestra de fibras se midió su diámetro de la forma en la que se explicó en el apartado 3.2.4, obteniendo un histograma con las diferentes frecuencias de los tamaños de las nanofibras (Figura 14).

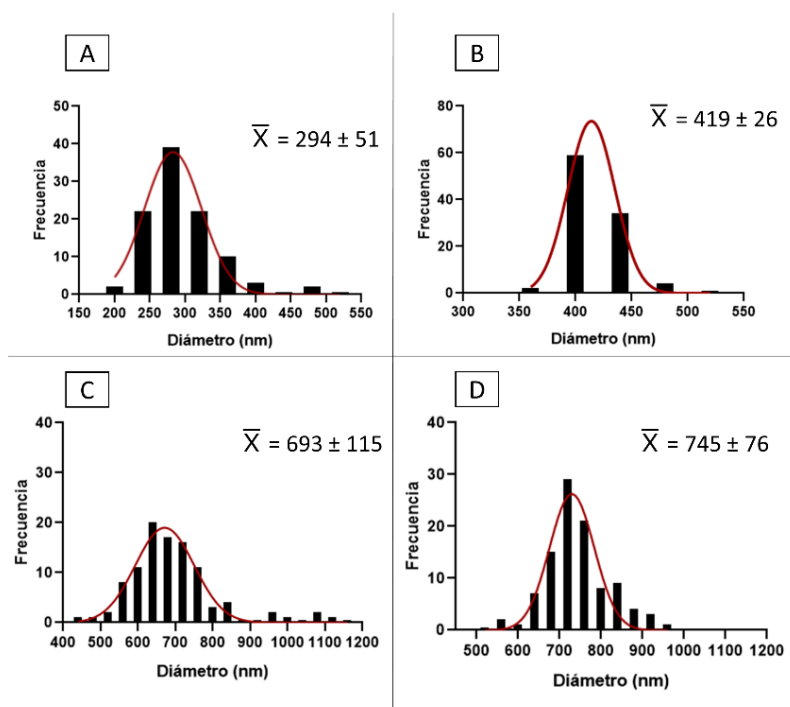


Figura 14. Histogramas de frecuencia del diámetro de nanofibras obtenidas con diferentes porcentajes de lisozima. (n=100). A. 5 % lisozima. B. 10 % lisozima. C. 15 % lisozima. D. 20 % lisozima.

Según se incrementó la concentración de lisozima en las disoluciones, las nanofibras obtenidas tenían un diámetro mayor. Asimismo, se vio que existía más variación en el rango de diámetros obtenidos, es decir, cuanto más cantidad de proteína existe en las fibras, más diversidad de medida tenían estas. Además, se demostró una correlación entre el aumento de viscosidad y el tamaño de las nanofibras (Figura 15).

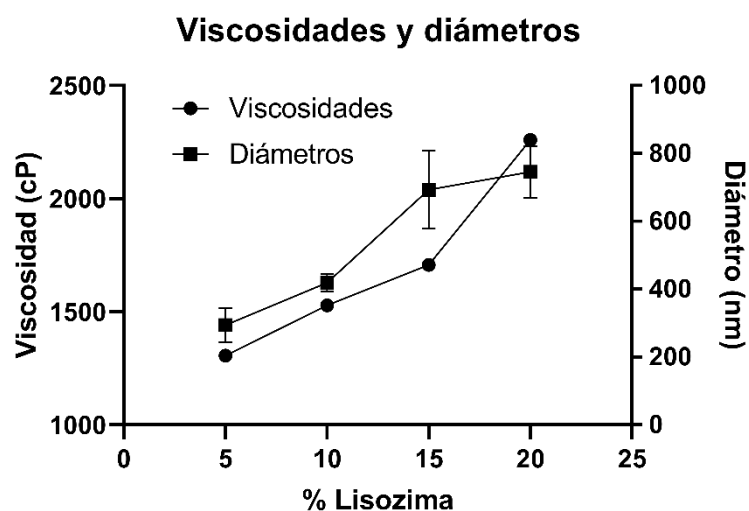


Figura 15. Gráfica de viscosidad y diámetro para cada porcentaje de lisozima.

Más allá de las imágenes que se obtuvieron con el microscopio electrónico, también se hizo un análisis de los compuestos mayoritarios que presentaban las muestras. La técnica usada fue la espectrometría de rayos X, en concreto, la espectroscopía de rayos X dispersiva de energía (EDX por sus siglas en inglés). Gracias a esta técnica, se pudo conocer la composición de las fibras en forma de espectros, correspondiendo cada pico a un elemento.

En la Figura 16 queda representada la intensidad de cada elemento que poseen las diferentes muestras de nanofibras. Conforme incrementó la concentración de lisozima en la muestra, la intensidad de los elementos que las componen también lo hizo, siendo el carbono, el nitrógeno y el oxígeno los que se vieron con más claridad. Además, se puede apreciar que el nitrógeno apareció en todas las muestras excepto en la muestra control sin lisozima.

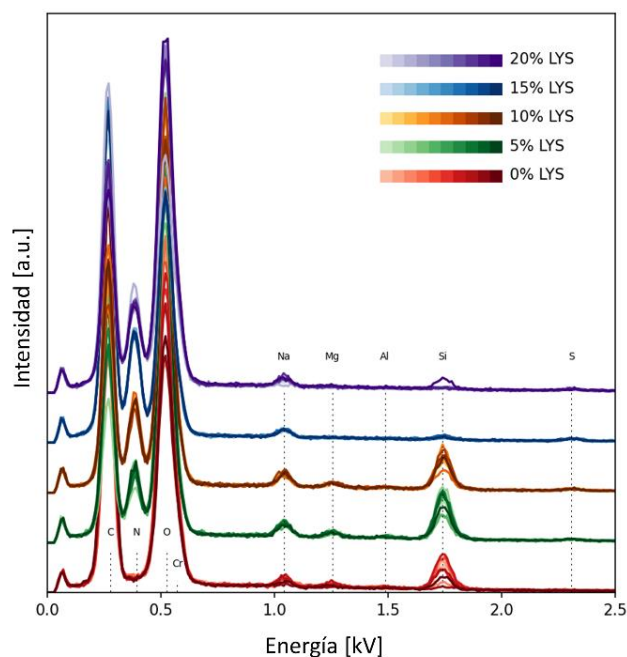


Figura 16. Análisis EDX de todas las fibras sintetizadas con lisozima y una muestra control sin lisozima.

4.5 Cuantificación de proteína

El primer paso que se siguió para medir la concentración de proteína en las muestras utilizadas fue preparar diferentes muestras de lisozima disuelta en agua a concentraciones crecientes de proteína entre 0 y 1 mg/mL. Mediante las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro, se elaboró una recta de calibrado (Figura 17).

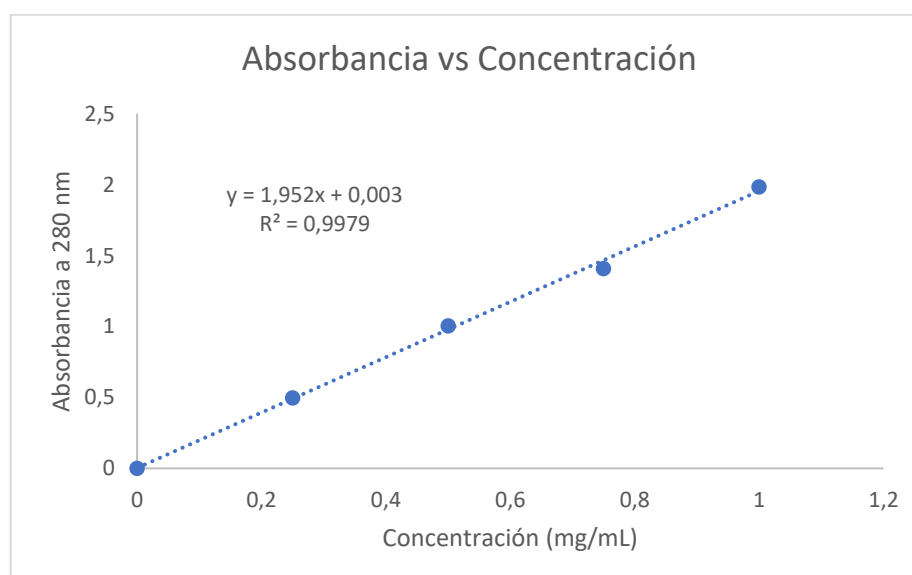


Figura 17. Recta de calibrado con diferentes concentraciones de lisozima.

Una vez obtenida la recta de calibrado, se prepararon muestras de fibras disueltas en agua para medir su absorbancia y extrapolar el valor de la concentración de proteína. Los datos que se obtuvieron fueron los siguientes (Tabla 3):

Tabla 3. Medidas tomadas para cuantificar la lisozima en las fibras.

% Lisozima en disolución	% teórico de lisozima en fibra	C fibras pesadas (mg/mL)	Abs@280nm	C real (mg/mL)	% lisozima real
5	63	1,9	1,250	1,28	67
10	77	3,5	1,241	2,54	72
15	83	6,7	1,542	5,52	82
20	87	5	1,147	4,10	82

C: concentración

Los porcentajes de proteína que se obtuvieron tras hacer los ajustes pertinentes fueron relativamente cercanos a los esperados (segunda y última columna).

Una vez obtenidos los resultados, se hizo una prueba de pérdida de agua con fibras de 15 y 20 % para comprobar el contenido y ver si coincidía con el porcentaje de lisozima real. Se obtuvo que un 3 % y un 7 % correspondían con agua en las fibras de 15 y 20 %, respectivamente.

4.6 Electroforesis en gel de acrilamida

En la Figura 18 se observa el gel de acrilamida obtenido. Las primeras cinco calles contenían un volumen de 6,7 μ L, las siguientes, de 3,3 μ L y, las cinco últimas, de 1,3 μ L; conteniendo una cantidad de 50, 25 y 10 μ g de proteína, respectivamente.

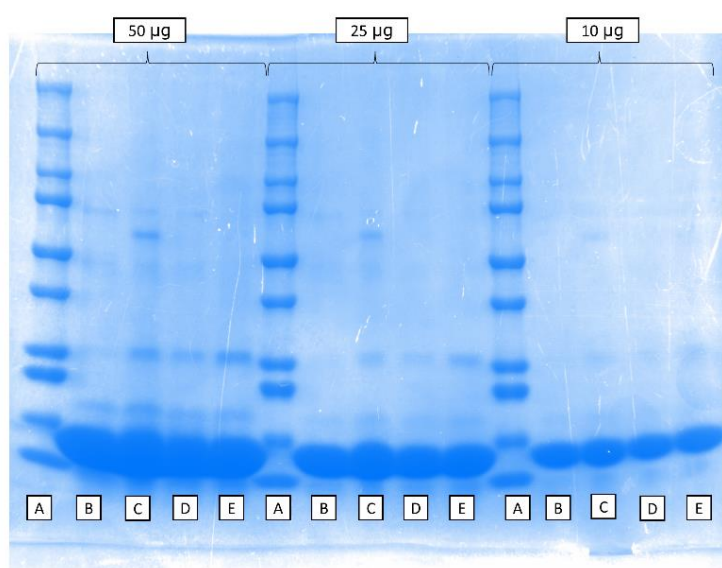


Figura 18. Gel de acrilamida. A. Marcador de peso molecular. B. Lisozima comercial. C. Fibras 10 % de lisozima. D. Fibras 15 % de lisozima. E. Fibras 20 % de lisozima.

Las determinaciones se hicieron con las bandas de 10 µg de proteína. La primera de ellas fue hallar la recta del peso molecular. Para ello, se midieron las distancias entre el frente superior del gel y cada una de las bandas del marcador de peso molecular. Aplicando logaritmos en base diez del peso molecular y las distancias, se halló la recta (Figura 19).

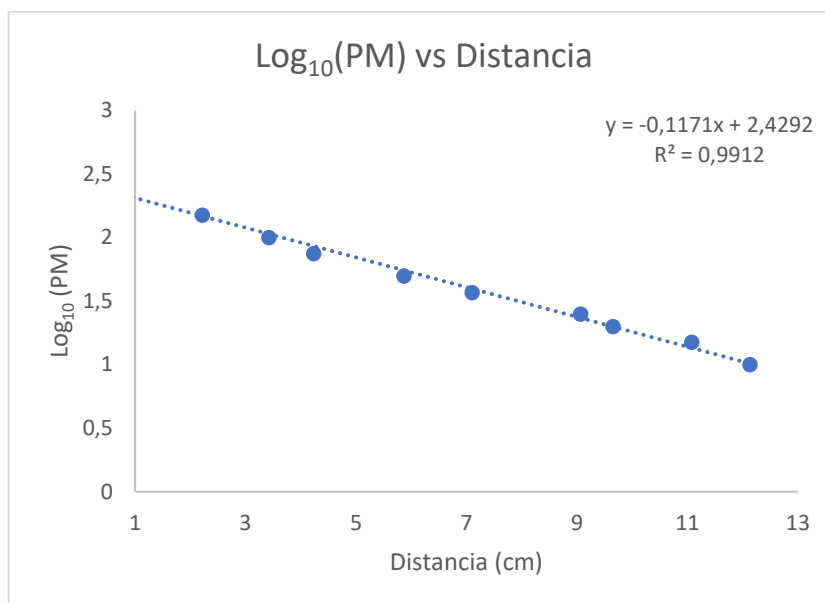


Figura 19. Recta de las distancias recorridas por el marcador de peso molecular.

A partir de esta, se pudieron calcular los pesos moleculares de la lisozima. De igual forma que anteriormente, se midió la distancia entre el frente y la banda de la proteína y se aplicaron los cálculos pertinentes usando la recta obtenida hasta llegar al peso molecular. Las medidas se tomaron por triplicado y se calculó la media con su error. La muestra de lisozima presentó un peso molecular de $12,19 \pm 0,087$ kDa; la de las fibras al 10 %, $12,39 \pm 0,177$ kDa; las de 15 %, $12,39 \pm 0,153$ kDa y las de 20 % $12,49 \pm 0,089$ kDa.

En las primeras cinco calles, donde estaba la muestra a la concentración más alta, se observaron otras bandas a parte de la lisozima, que correspondían con los siguientes pesos moleculares: 17 kDa, 27 kDa, 51 kDa y 84 kDa.

Además de esto, también se calculó la densitometría, que corresponde con el área de cada banda del gel. Para ello, se tomó el área de banda de lisozima como el 100 % y el resto se ajustaron con respecto a esta. Los resultados fueron los siguientes: banda de lisozima 100%, banda de fibras al 10 %, 103 %; banda de fibras al 15 %, 94 % y, banda de fibras al 20 %, 103 %.

4.7 Espectroscopía infrarroja

Otra técnica para identificar los elementos que componen las muestras de fibras fue el uso de la espectroscopía infrarroja. En este tipo de análisis, cada pico del espectro corresponde con las vibraciones de los enlaces entre dos átomos unidos.

En la Figura 20 se representaron tres de los espectros analizados, el de las fibras compuestas por polímero y proteína (en color azul), y estos dos por separado, polímero (verde) y lisozima (rojo). Se comprobó que los espectros de la lisozima y el de la fibra eran muy parecidos, lo que indica la presencia mayoritaria de lisozima en ellas.

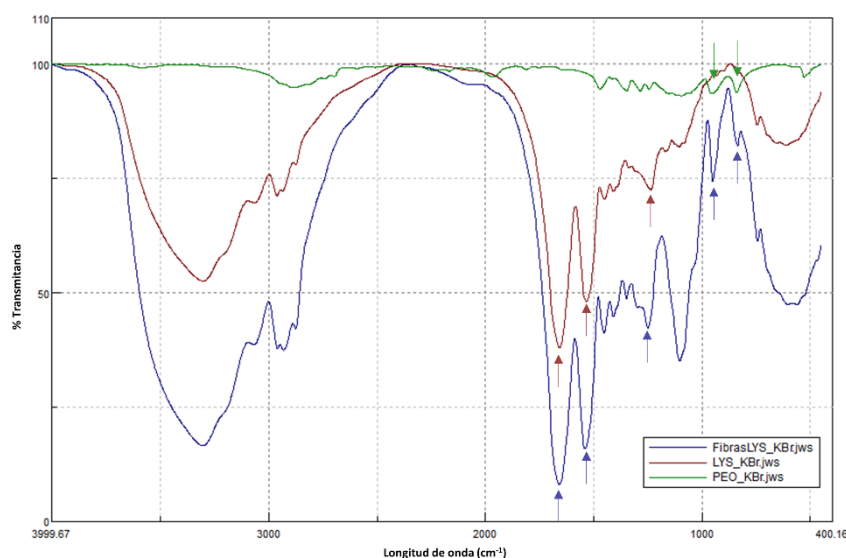


Figura 20. Espectros de infrarrojo de fibras de lisozima, lisozima y PEO en pastillas con KBr. Azul: fibras con lisozima. Rojo: Lisozima. Verde: PEO.

En cuanto al PEO, los picos más relevantes se encontraron a dos longitudes de onda, señaladas en la imagen con dos flechas verdes: 956 y 840 cm^{-1} . Estos picos corresponden con el movimiento de balanceo asimétrico del metileno. Para la identificación de estos, se tomó bibliografía preexistente [27].

Por lo que se refiere a la lisozima, los picos más característicos fueron los relacionados con el enlace peptídico de la propia proteína. A una longitud de onda de 1658 cm^{-1} estaba el pico de la amida I; a 1533 cm^{-1} , el de la amida II; y, a 1237 cm^{-1} , el de amida III. Estos picos quedan marcados en la imagen con flechas rojas. De igual manera, se siguieron estudios previos para interpretar el espectro [28].

Las nanofibras estaban formadas por ambos compuestos comentados anteriormente, por lo que todos los picos que se han comentado para el PEO y la lisozima estuvieron presentes en el espectro de las fibras. Mediante flechas azules están marcados los picos correspondientes. Se destacaron los valores que se superponen con el espectro del polímero, pues esto deja constancia de que las fibras poseen PEO, además de lisozima, que es el componente mayoritario y con el que más solapamiento se produce.

Además de pastillas de KBr, se realizó un espectro de transmitancia del velo directamente sobre el equipo de infrarrojos. Como se aprecia en la Figura 21, el resultado es exactamente igual que el obtenido usando la pastilla de KBr con fibra.

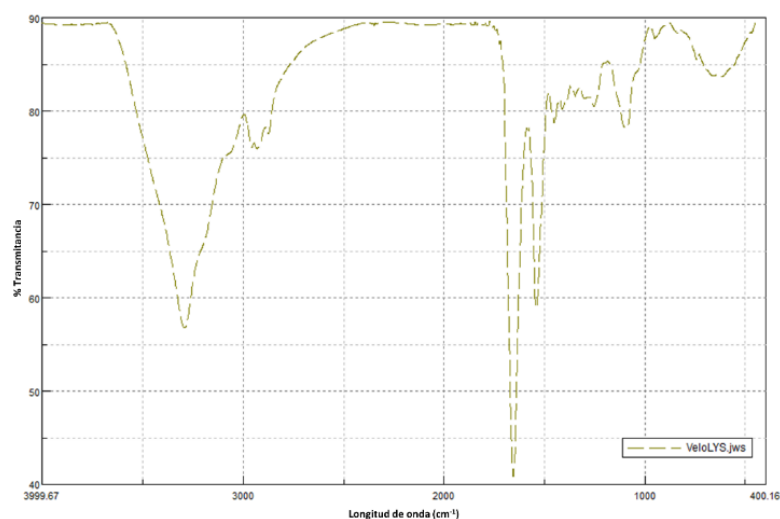


Figura 21. Espectro infrarrojo de un velo de lisozima y polímero.

4.8 Ensayos de actividad antimicrobiana

Para llevar a cabo estos ensayos, se utilizó una bacteria gram negativa, *E. coli*, y el resto fueron gram positivas, *S. epidermidis*, *B. subtilis* y *B. circulans*. El primer ensayo mediante el método de Kirby-Bauer se hizo con lisozima disuelta en agua a diferentes concentraciones, y se siguió la disposición explicada en el apartado 3.2.7. Tras el periodo de incubación a la temperatura que correspondía en cada una de las especies, se obtuvo halo de inhibición únicamente en el disco que contenía el antibiótico en las placas correspondientes a *S. epidermidis*, *B. subtilis* y *E. coli* (Figura 22).

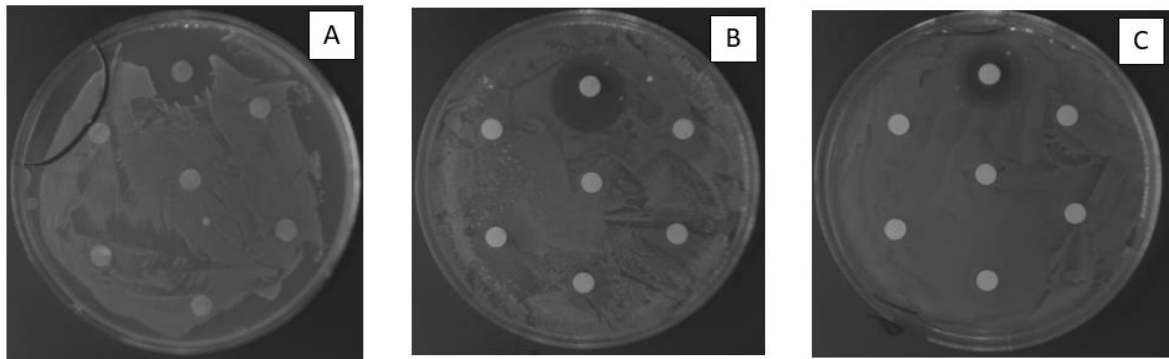


Figura 22. Primer ensayo de Kirby-Bauer. A. *S. epidermidis*. B. *B. subtilis*. C. *E. coli*.

Por otro lado, en la placa con la bacteria *B. circulans*, se obtuvieron diferentes halos de inhibición para cada concentración de lisozima en los discos. En la Figura 23 quedan recogidos los tamaños de cada halo de inhibición. Como se comprobó, conforme aumentó la concentración de la lisozima añadida, el diámetro del halo también lo hizo.

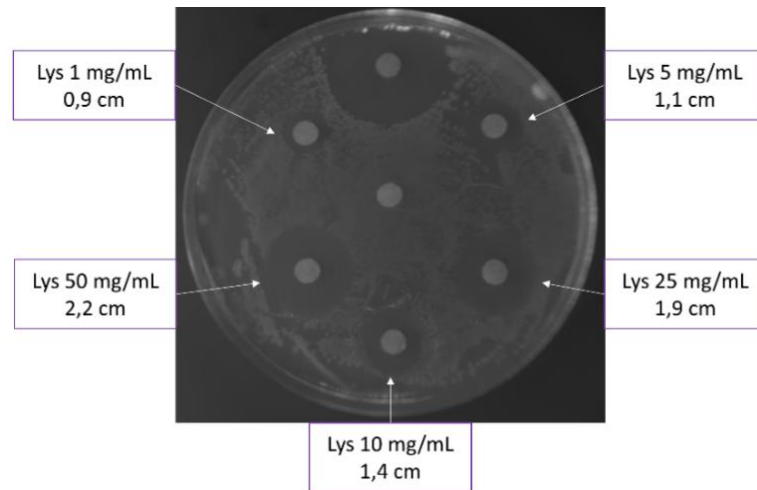


Figura 23. Ensayo de Kirby-Bauer con *B. circulans*. Los halos presentan un tamaño creciente con la concentración de lisozima.

A la vista de los resultados que se obtuvieron en el primer ensayo antimicrobiano con lisozima, se hizo otro usando fibras disueltas en agua. El ensayo se continuó con *B. circulans*, ya que fue la que mostró los resultados deseados. Como concentración óptima se tomó la de 25 mg/mL lisozima, por lo que se pesó la cantidad necesaria de cada muestra de fibras para poder alcanzar esta concentración. Así, los halos que se consiguieron tenían todos aproximadamente el mismo tamaño. La distribución que se hizo de las muestras fue la esquematizada en el apartado 3.2.7. En la Figura 24 se muestra el valor promedio con su error del diámetro de los halos.

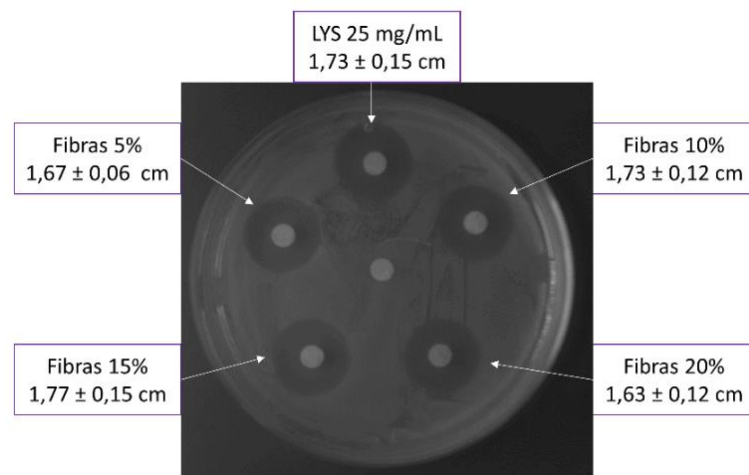


Figura 24. Ensayo de Kirby-Bauer con *B. circulans*. (n=3). Las fibras en disolución muestran inhibición de la bacteria.

5 Discusión

En este trabajo se eligió como polímero el PEO, que sirvió de matriz para elaborar nanofibras con lisozima. En cuanto al PEO, está comprobado que es soluble en agua y presenta baja toxicidad, lo cual resulta adecuado para su uso en la obtención de fibras [29]. La viscosidad de las disoluciones fue un parámetro importante para llevar a cabo una electrohilatura óptima. En las disoluciones que contenían proteína y PEO al 3 % se obtenían fibras, pero el polímero al 3 % solo no fue capaz de electrohilar, obteniéndose *electrospray*. Esta es la razón por la cual se usó la disolución de polímero al 4 % para obtener las fibras control. Se continuó aumentando la concentración de PEO, pero la viscosidad comenzó a ser demasiado alta como para poder electrohilar. Para las disoluciones con lisozima y PEO, la proteína estaba en concentraciones crecientes, 5, 10, 15 y 20 %, y el polímero a 3 %. Las de 15 y 20 % fueron las que mejor apariencia mostraban. Cabe destacar que la viscosidad de la disolución de PEO al 3 % y la de la lisozima al 5 % con PEO al 3 % era similar, pero esta última sí formaba fibras. De esto se concluyó que la viscosidad no es el único parámetro que afecta a la hora de usar el *electrospinning*, sino que hay otros, como la tensión superficial, que contribuyen a un electrohilado de fibras uniformes [30].

En cuanto al uso de las diferentes técnicas de microscopía, en este caso se usaron la óptica y la de barrido, se utilizaron de forma complementaria, es decir, primero se comprobó en el microscopio óptico que las fibras tenían una buena apariencia, y en el electrónico se confirmó o desmintió. Fue el caso de las fibras control de PEO al 4 %, que fueron observadas al microscopio óptico y parecían de calidad, pero en el electrónico no fue así, ya que eran irregulares. Además, conforme aumentaba la concentración de lisozima encapsulada, las nanofibras presentaban un aspecto más liso y un diámetro mayor. Otros estudios ratifican este hecho, pues encapsulando otro tipo de proteínas también se obtenía un tamaño pequeño en el caso de la disolución al 5 % [31].

Uno de los datos más interesantes sobre las nanofibras y su contenido fue comprobar que la proteína inicialmente añadida a la disolución continuaba en las muestras una vez electrohilada a una concentración similar. Para ello, se midieron las absorbancias de las muestras elaboradas y se halló la concentración de proteína. Se calculó el porcentaje real de lisozima y se comparó con el teórico que deberían contener las fibras y la relación fue alta. Además, se hizo un ensayo de pérdida de peso, en el que se introdujeron muestras de fibras

en una estufa a 100 °C durante un día y se comprobó la diferencia en el peso de estas. Esta diferencia fue mínima, pero sirvió para concluir que la variación podría ser debida al agua contenida en las fibras y, consecuentemente, que la eficiencia de proteína contenida en fibra estaba afectada por la presencia de agua.

Otra forma de demostrar el contenido de proteína en las nanofibras fue mediante el EDX. En este se vieron los elementos que forman las muestras observadas mediante la microscopía electrónica. Conforme aumentaba la concentración de lisozima en las muestras, la intensidad del nitrógeno también lo hacía. La característica principal que permitió ver este análisis fue la ausencia de nitrógeno en las fibras compuestas únicamente por PEO, a diferencia del resto, que sí tenía proteína con sus correspondientes enlaces peptídicos.

Los geles de acrilamida sirvieron para identificar el peso molecular exacto de la lisozima usada en este trabajo, además de comprobar que la proteína en las fibras no presenta degradación, ya que al comparar la calle de la proteína sola, que sirvió a modo de control, y las de la proteína en fibras, fueron prácticamente iguales. A pesar de haber usado una sola concentración de proteína en todo el gel y no haber probado diferentes, las bandas que aparecieron cuantificadas mediante densitometría resultaron ser bastante parecidas a las del control, por lo que el experimento fue ajustado adecuadamente. En cuanto a las bandas que no correspondían con la lisozima, la de 17 kDa podría tratarse de la avidina, proteína que también está en la clara de huevo de gallina; la de 27 kDa se trataría de un dímero de lisozima y la de 51 kDa un tetrámero de esta misma proteína y, la de 84 kDa correspondería a la ovotransferrina. A estas conclusiones se llegó gracias a bibliografía preexistente, en la cual se menciona que, a pesar de los tratamientos por los que son sometidas las proteínas, es posible la aparición de estos complejos o restos de otro tipo de proteínas [32].

La espectroscopía de infrarrojo sirvió para identificar la estructura de la lisozima y, mediante la comparación de su espectro con el de las fibras con lisozima, se vio que existían solapamientos entre ellos, por lo que se conservaban los picos y tenían la misma estructura. Esto indicó que el proceso de electrohilado no afectó a la estructura de la proteína. Distintos estudios anteriores sobre nanofibras, con diferentes compuestos a los usados en este trabajo, corroboran que los picos característicos de las fibras coinciden con los de sus componentes por separado [33].

Cuando fue comprobada la integridad de la proteína en las nanofibras, también se quiso probar su actividad en bacterias. Como ensayo preliminar, se probaron muestras de lisozima disuelta en agua sobre discos en las placas sembradas con cuatro especies de bacterias. Se usaron tres especies gram positivas, en las que se esperaba ver inhibición por la lisozima, y una gram negativa, en la que no tenía que haber inhibición. En el caso de *E. coli*, la gram negativa, los resultados fueron los esperados, solo hubo halo de inhibición en el disco que tenía el antibiótico. Para las gram positivas, *S. epidermidis* no mostró inhibición por la lisozima. Esto pudo deberse a que el género *Staphylococcus* tienen una pared celular resistente a la lisozima, como demuestran estudios anteriores [34]. Con *B. subtilis* sucedió lo mismo, se esperaba que la lisozima inhibiera, pero no lo hizo. Investigaciones previas demostraron que esta especie posee una serie de mecanismos de defensa, que involucran varios genes y factores extracitoplasmáticos, por los cuales evita que les afecte la lisozima [35]. Fue con *B. circulans* con la que se obtuvieron los resultados deseados, mostrando un aumento del tamaño del halo de inhibición conforme lo hacía la concentración de lisozima contenida en cada disco.

Una vez escogida la bacteria adecuada y la concentración de inhibición óptima de la lisozima, se hizo el mismo ensayo a esta concentración, pero usando fibras a diferentes porcentajes de lisozima disueltas en agua. Los halos observados fueron aproximadamente del mismo tamaño, pues se cogió la misma concentración de proteína. Con esto se concluyó que la lisozima encapsulada en nanofibras continuaba manteniendo su capacidad de atacar a las bacterias, aun habiendo estado sometida la proteína al *electrospinning*. Este tipo de ensayos también habían sido realizados con anterioridad probando antibióticos encapsulados, los cuales mostraron la misma actividad antimicrobiana que por libre [14].

6 Conclusión

En el presente trabajo final de grado se han conseguido elaborar nanofibras con una matriz de PEO y lisozima como proteína. Este tipo de nanocompuestos resultan de gran interés en la actualidad en el campo de la biomedicina. De los ensayos llevados a cabo, se han podido extraer una serie de conclusiones:

- Se pudieron elaborar disoluciones de hasta un 20 % de lisozima en agua, lo que permitió obtener nanofibras con un elevado contenido en proteína.
- La electrohilatura de las disoluciones de lisozima y PEO al 3 % dio mejores resultados que las de disoluciones formadas solamente por PEO al 3 %. Además, las disoluciones con un mayor porcentaje de lisozima permitieron obtener fibras con un mayor diámetro y una mejor apariencia.
- El proceso de electrohilado no cambia la integridad y estructura de la proteína. Esto quedó comprobado mediante los espectros de infrarrojos y los geles de acrilamida.
- La actividad de la proteína tampoco fue alterada. Fueron los ensayos antimicrobianos los que corroboraron tal hecho, ya que *B. circulans* se vio inhibida tanto por la lisozima disuelta en agua como por las fibras formadas por lisozima.

7 Proyección futura

De cara a nuevos estudios de nanofibras con lisozima, se podrían hacer diferentes ensayos para abordar otros aspectos de estas o utilizar métodos que no se han visto a lo largo de este trabajo para obtener resultados desde otra perspectiva.

En cuanto a la cuantificación de la concentración de proteína, podría utilizarse la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) para optimizar la medición de la proteína contenida en las fibras. Así, se necesitaría una menor cantidad de muestra, puesto que este método de cromatografía es bastante preciso.

Por lo que se refiere a los ensayos de actividad antimicrobiana, también se podrían probar ensayos de microdilución. Para estos, se utilizan placas de 96 pocillos en los que se añaden pequeños volúmenes de muestra. En este caso sería medio líquido, diferentes concentraciones de lisozima y la bacteria en cuestión, además de los controles pertinentes. De esta manera, se podría averiguar cuál sería la concentración mínima inhibitoria que mata a las bacterias.

Otro tipo de ensayo, pero en este caso en células, serían los ensayos de citotoxicidad celular. Para ello se podría emplear el MTT, un compuesto que se usa para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad celular, proliferación y citotoxicidad.

Pasando a otro nivel de experimentación, se podría testar en animales y comprobar la efectividad de las nanofibras en heridas. Se trataría de recoger las nanofibras en parches dérmicos y colocarlos en heridas que puedan tener los animales y, así, evaluar la capacidad para mantener la herida sin ciertos microorganismos, lo que acortaría el tiempo de cura.

8 Bibliografía

1. Salek Maghsoudi, A.; Hassani, S.; Mirnia, K.; Abdollahi, M. Recent Advances in Nanotechnology-Based Biosensors Development for Detection of Arsenic, Lead, Mercury, and Cadmium. *Int J Nanomedicine* **2021**, *16*, 803–832, doi:10.2147/IJN.S294417.
2. He, X.; Deng, H.; Hwang, H. The Current Application of Nanotechnology in Food and Agriculture. *J Food Drug Anal* **2019**, *27*, 1–21, doi:https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.002.
3. Adir, O.; Poley, M.; Chen, G.; Froim, S.; Krinsky, N.; Shklover, J.; Shainsky-Roitman, J.; Lammers, T.; Schroeder, A. Integrating Artificial Intelligence and Nanotechnology for Precision Cancer Medicine. *Adv Mater* **2020**, *32*, e1901989–e1901989, doi:10.1002/adma.201901989.
4. Contera, S.; Bernardino de la Serna, J.; Tetley, T.D. Biotechnology, Nanotechnology and Medicine. *Emerg Top Life Sci* **2020**, *4*, 551–554, doi:10.1042/ETLS20200350.
5. Lamb, Y.N. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. *Drugs* **2021**, *81*, 495–501, doi:10.1007/s40265-021-01480-7.
6. Han, H.J.; Nwagwu, C.; Anyim, O.; Ekweremadu, C.; Kim, S. COVID-19 and Cancer: From Basic Mechanisms to Vaccine Development Using Nanotechnology. *Int Immunopharmacol* **2021**, *90*, 107247, doi:10.1016/j.intimp.2020.107247.
7. Hiltunen, T.; Virta, M.; Laine, A.-L. Antibiotic Resistance in the Wild: An Eco-Evolutionary Perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2017**, *372*, 20160039, doi:10.1098/rstb.2016.0039.
8. Huemer, M.; Mairpady Shambat, S.; Brugger, S.D.; Zinkernagel, A.S. Antibiotic Resistance and Persistence-Implications for Human Health and Treatment Perspectives. *EMBO Rep* **2020**, *21*, e51034–e51034, doi:10.15252/embr.202051034.
9. Lei, Z.; karim, A. The Challenges and Applications of Nanotechnology against Bacterial Resistance. *J Vet Pharmacol Ther* **2021**, *44*, 281–297, doi:https://doi.org/10.1111/jvp.12936.
10. Nasrollahzadeh, M.; Sajjadi, M.; Soufi, G.J.; Iravani, S.; Varma, R.S. Nanomaterials and Nanotechnology-Associated Innovations against Viral Infections with a Focus on Coronaviruses. *Nanomaterials (Basel)* **2020**, *10*, 1072, doi:10.3390/nano10061072.
11. Naidu, K.C.B.; Kumar, N.S.; Banerjee, P.; Reddy, B.V.S. A Review on the Origin of Nanofibers/Nanorods Structures and Applications. *J Mater Sci Mater Med* **2021**, *32*, 68, doi:10.1007/s10856-021-06541-7.
12. Singh, B.; Kim, K.; Park, M.-H. On-Demand Drug Delivery Systems Using Nanofibers. *Nanomaterials (Basel)* **2021**, *11*, 3411, doi:10.3390/nano11123411.
13. Martínez-Ortega, L.; Mira, A.; Fernandez-Carvajal, A.; Reyes Mateo, C.; Mallavia, R.; Falco, A. Development of a New Delivery System Based on Drug-Loadable Electrospun Nanofibers for Psoriasis Treatment. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, doi:10.3390/pharmaceutics11010014.
14. Mira, A.; Sainz-Urruela, C.; Codina, H.; Jenkins, S.I.; Rodriguez-Diaz, J.C.; Mallavia, R.; Falco, A. Physico-Chemically Distinct Nanomaterials Synthesized from Derivates of a Poly(Anhydride) Diversify the Spectrum of Loadable Antibiotics. *Nanomaterials* **2020**, *10*, doi:10.3390/nano10030486.

15. Luraghi, A.; Peri, F.; Moroni, L. Electrospinning for Drug Delivery Applications: A Review. *J Control Release* **2021**, *334*, 463–484, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.033>.
16. Leão, V.N.S.; Araújo, E.S.; Leão, V.N.S.; Araújo, E.S. Metal Oxide Heteronanostructures Prepared by Electrospinning for the Humidity Detection: Fundamentals and Perspectives. *J Mater Sci Chem Eng* **2019**, *07*, 43–54, doi:10.4236/msce.2019.77006.
17. Davoodi, P.; Gill, E.L.; Wang, W.; Shery Huang, Y.Y. Chapter Two - Advances and Innovations in Electrospinning Technology. In *Biomedical Applications of Electrospinning and Electrospraying*; Kasoju, N., Ye, H., Eds.; Woodhead Publishing, 2021; pp. 45–81 ISBN 978-0-12-822476-2.
18. Jain, R.; Shetty, S.; Yadav, K.S. Unfolding the Electrospinning Potential of Biopolymers for Preparation of Nanofibers. *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, *57*, 101604, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101604>.
19. Ding, Y.; Li, W.; Zhang, F.; Liu, Z.; Zanzanizadeh Ezazi, N.; Liu, D.; Santos, H.A. Electrospun Fibrous Architectures for Drug Delivery, Tissue Engineering and Cancer Therapy. *Adv Funct Mater* **2019**, *29*, 1802852, doi:<https://doi.org/10.1002/adfm.201802852>.
20. Akhmetova, A.; Heinz, A. Pharmaceuticals Electrospinning Proteins for Wound Healing Purposes: Opportunities and Challenges. *Pharmaceuticals* **2020**, doi:10.3390/pharma.
21. Sarkar, S.; Gulati, K.; Mishra, A.; Poluri, K.M. Protein Nanocomposites: Special Inferences to Lysozyme Based Nanomaterials. *Int J Biol Macromol* **2020**, *151*, 467–482, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.179>.
22. Coenen, A.M.J.; Bernaerts, K. v; Harings, J.A.W.; Jockenhoevel, S.; Ghazanfari, S. Elastic Materials for Tissue Engineering Applications: Natural, Synthetic, and Hybrid Polymers. *Acta Biomater* **2018**, *79*, 60–82, doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.027>.
23. George, A.; Shah, P.A.; Shrivastav, P.S. Natural Biodegradable Polymers Based Nano-Formulations for Drug Delivery: A Review. *Int J Pharm* **2019**, *561*, 244–264, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.011>.
24. Juncos Bombin, A.D.; Dunne, N.J.; McCarthy, H.O. Electrospinning of Natural Polymers for the Production of Nanofibres for Wound Healing Applications. *Mater Sci Eng C* **2020**, *114*, 110994, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110994>.
25. Vanza, J.D.; Patel, R.B.; Dave, R.R.; Patel, M.R. Polyethylene Oxide and Its Controlled Release Properties in Hydrophilic Matrix Tablets for Oral Administration. *Pharm Dev Technol* **2020**, *25*, 1169–1187, doi:10.1080/10837450.2020.1808015.
26. Fu, Y.; Ding, Y.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Liu, J.; Yu, P. Poly Ethylene Glycol (PEG)-Related Controllable and Sustainable Antidiabetic Drug Delivery Systems. *Eur J Med Chem* **2021**, *217*, 113372, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113372>.
27. Morsi, M.; Abdelrazek, E.; Abdelghany, A. Evaluation of Optical Parameters and Structural Variations of UV Irradiated (PEO/PVP)/Au Polymer Nanocomposites. *Res J Pharm, Biol Chem Sci* **2016**, *7*, 1877–1890.
28. Milošević, J.; Prodanović, R.; Polović, N. On the Protein Fibrillation Pathway: Oligomer Intermediates Detection Using ATR-FTIR Spectroscopy. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26040970.

29. Haryanto; Kim, S.; Kim, J.H.; Kim, J.O.; Ku, S.; Cho, H.; Han, D.H.; Huh, P. Fabrication of Poly(Ethylene Oxide) Hydrogels for Wound Dressing Application Using E-Beam. *Macromol Res* **2014**, *22*, 131–138, doi:10.1007/s13233-014-2023-z.
30. Fong, H.; Chun, I.; Reneker, D.H. Beaded Nanofibers Formed during Electrospinning. *Polymer (Guildf)* **1999**, *40*, 4585–4592, doi:https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00068-3.
31. Cui, S.; Sun, X.; Li, K.; Gou, D.; Zhou, Y.; Hu, J.; Liu, Y. Polylactide Nanofibers Delivering Doxycycline for Chronic Wound Treatment. *Mater Sci Eng: C* **2019**, *104*, 109745, doi:https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109745.
32. Brasca, M.; Morandi, S.; Silveti, T.; Rosi, V.; Cattaneo, S.; Pellegrino, L. Different Analytical Approaches in Assessing Antibacterial Activity and the Purity of Commercial Lysozyme Preparations for Dairy Application. *Molecules* **2013**, *18*, 6008–6020, doi:10.3390/molecules18056008.
33. Amiri, N.; Ajami, S.; Shahroodi, A.; Jannatabadi, N.; Amiri Darban, S.; Fazly Bazzaz, B.S.; Pishavar, E.; Kalalinia, F.; Movaffagh, J. Teicoplanin-Loaded Chitosan-PEO Nanofibers for Local Antibiotic Delivery and Wound Healing. *Int J Biol Macromol* **2020**, *162*, 645–656, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.195.
34. Foster, T.J. Immune Evasion by Staphylococci. *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 948–958, doi:10.1038/nrmicro1289.
35. Ho, T.D.; Hastie, J.L.; Intile, P.J.; Ellermeier, C.D. The Bacillus Subtilis Extracytoplasmic Function σ Factor $\sigma(V)$ Is Induced by Lysozyme and Provides Resistance to Lysozyme. *J Bacteriol* **2011**, *193*, 6215–6222, doi:10.1128/JB.05467-11.