



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Desarrollo de catalizadores que mimetizan el comportamiento enzimático regulatorio del metabolismo en células tumorales.

Autor

Juan Ramis Gual

Directores

Dr. Javier Calzada Funes
Dr. José Luis Hueso Martos

Ponente

Dr. Jesús Santamaría Ramiro

Facultad de Ciencias
2020

Símbolos y acrónimos utilizados

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
CB	Banda de Conducción
CDT	Terapia Quimiodinámica
eV	Electronvoltio
FAD	Dinucleótido de Flavina y Adenina
GO	Óxido de Grafeno
GOx	Glucosa oxidasa
GSH	Glutación
NIR	Radiación infrarrojo cercano
NM	Nanomaterial
NP	Nanopartícula
PDT	Terapia Fotodinámica
PEI	Polietilenimina
PSA	Antígeno Específico de la Próstata
PTT	Terapia Fototérmica
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SDT	Terapia Sonodinámica
SOD	Superóxido dismutasa
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
UV	Radiación Ultravioleta-Visible
VB	Banda de Valencia
XPS	Espectroscopia de fotoemisión de rayos X

Índice

Resumen	3
1. Introducción	3
1.1. Glucosa Oxidasa	6
1.1.1. <i>GOx y el consumo de glucosa intracelular</i>	6
1.1.2. <i>GOX e el ambiente microtumoral</i>	8
1.2. Nanopartículas de TiO₂	9
2. Resultados y discusión	13
2.1. Caracterización de los híbridos GOx-P25	13
2.1.1. <i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i>	13
2.1.2. <i>Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)</i>	14
2.1.3. <i>Espectroscopia de fotoemisión de rayos X (XPS)</i>	16
2.2. Determinación de la actividad catalítica de conversión de glucosa	18
2.3. Capacidad de reutilización de los híbridos GOx-P25	20
2.4. Desactivación catalítica	21
3. Conclusiones	22
4. Bibliografía	22
Anexos	
Anexo 1	
Anexo 2	
Anexo 3	

Resumen

Las enzimas juegan un papel importante en el correcto funcionamiento del metabolismo humano, ya que actúan como catalizadores de reacciones bioquímicas. Presentan alta actividad catalítica y elevada especificidad. Al mismo tiempo ofrecen inconvenientes que dificultan su aplicación práctica tales como su elevado coste de preparación y purificación, una baja estabilidad y una disminución de su actividad catalítica en condiciones ambientales. En los últimos años, se ha incrementado el interés en evaluar la capacidad de distintos nanomateriales inorgánicos como catalizadores enzimáticos artificiales. Estos nanomateriales inorgánicos conocidos como nanozimas, presentan una serie de ventajas potenciales sobre sus análogos naturales que incluyen: i) una estructura robusta y con menor tendencia a la desactivación en condiciones de reacción exigentes como las que se pueden encontrar en entornos tumorales y ii) la posibilidad de síntesis y escalado a partir de precursores de menos coste y relativamente más abundantes. Por ello, estas nanozimas han pasado a ser consideradas como alternativas de gran interés en el campo de la Nanomedicina, ya sea como biosensores o como parte del tratamiento de enfermedades como el cáncer.

En este Trabajo de Fin de Máster se ha llevado a cabo el estudio sistemático de oxidación de glucosa, uno de los metabolitos con mayor incidencia en el desarrollo de células cancerosas. Para ello se ha seleccionado una enzima natural como la glucosa oxidasa (GOx) que cataliza la oxidación de la β -D-glucosa a δ -gluconolactona y un catalizador enzimático artificial de dióxido de titanio (P25-TiO₂) formado en un 70% por anatasa y un 30% de rutilo. Asimismo, se ha evaluado el catalizador híbrido combinando ambos sistemas. Los principales resultados han demostrado una mayor actividad catalítica de los híbridos GOx-P25 tras irradiación a 365 y 405 nm, debido principalmente a las propiedades fotocatalíticas del P25 en la región del ultravioleta-visible.

1. Introducción

El cáncer es la segunda causa mundial de muerte, solo superada por las enfermedades cardiovasculares. Se caracteriza por una proliferación celular descontrolada y una ausencia de muerte celular regulada que, a excepción de los cánceres hematológicos, genera una masa celular anormal o tumor¹. Este tumor primario crece gracias a una nueva vascularización y, con el tiempo, adquiere potencial metastásico y se disemina a otras partes del cuerpo, lo que provoca metástasis y finalmente la muerte del paciente. El cáncer es causado por daños o mutaciones en el material genético de las células debido a factores

ambientales o hereditarios¹. La cirugía y la radioterapia son los tratamientos más eficaces para los cánceres locales y no metastásicos, pero son ineficaces cuando el cáncer se ha diseminado por todo el cuerpo. Para el tratamiento de cánceres metastásicos, se utiliza la quimioterapia, terapias hormonales y biológicas, ya que pueden llegar a todos los órganos del cuerpo a través del torrente sanguíneo². Los fármacos quimioterapéuticos se basan en compuestos tóxicos que principalmente inhiben la rápida proliferación de las células cancerosas, pero desafortunadamente, también afecta a las células normales con tasas de proliferación rápidas, como los folículos pilosos, la médula ósea y las células del tracto gastrointestinal, generando los efectos secundarios característicos de la quimioterapia. La destrucción indiscriminada de células normales, la toxicidad de los fármacos quimioterapéuticos convencionales, así como el desarrollo de multirresistencia mantienen la necesidad de encontrar nuevos tratamientos^{1, 2}.

La multirresistencia a la quimioterapia es un problema que limita la eficacia de los medicamentos contra el cáncer. Las células tumorales pueden generar multirresistencia mediante diferentes mecanismos como: i) el secuestro del fármaco, ii) el aumento de la eliminación del fármaco, iii) la disminución de la afluencia de los fármacos, iv) la modificación del sitio de unión, v) la activación de enzimas desintoxicantes, vi) el bloqueo de la señalización apoptótica y vii) la reparación del ADN³.

En los últimos años se están desarrollando en el área de la nanotecnología multitud de estrategias orientadas a lograr una terapia específica centrada en el tumor, mediante el uso de NPs poliméricas, liposomas, dendrímeros, nanotubos de carbono, NPs superparamagnéticas o NPs que contienen ácidos nucleicos [ADN, ARN de interferencia (ARNi)] para la entrega de medicamentos específicos contra el cáncer, como fármacos de bajo peso molecular y macromoléculas (proteínas, péptidos o genes)³. De esta forma, se consigue mejorar la entrega del medicamento al tejido tumoral, al tiempo que se minimiza su distribución y toxicidad en el tejido sano. También se ha utilizado la terapia enzimática para dirigir una enzima exógena hacia el tumor, y una vez ahí, suministrar en forma de profármaco no tóxico el sustrato de dicha enzima, para que ésta transforme el profármaco en fármaco activo en el microambiente del tumor (TME)⁴.

Las enzimas son piezas fundamentales en el correcto funcionamiento de cualquier sistema biológico ya que actúan como catalizadores de las diferentes reacciones implicadas en el metabolismo⁵. A pesar de que las enzimas naturales tienen ventajas notables, como una alta actividad catalítica, una elevada especificidad por el sustrato y condiciones de reacción suaves, su actividad catalítica está muy influenciada por las condiciones

ambientales. Además, presentan baja estabilidad ya que pueden sufrir procesos de desnaturalización y digestión, y finalmente su elevado coste de preparación y purificación, hacen que sea muy difícil su aplicación práctica⁵. En los últimos años, se ha demostrado que un gran número de nanomateriales presentan actividades catalíticas intrínsecas similares a las de las enzimas⁶. Estos materiales catalíticos se están estudiando de manera muy activa como alternativas artificiales a las enzimas y se denominan nanozimas en la literatura actual^{6, 7, 8}. Estas nanozimas presentan una serie de ventajas intrínsecas como: una estructura más robusta y resistente a condiciones de reacción extremas, un alto rendimiento catalítico en amplios rangos de pH y temperatura y la capacidad para sintetizarlas a partir de precursores de menor coste y relativamente abundantes por lo que se conciben como una alternativa muy prometedoras a las enzimas naturales⁹. Actualmente, hay una gran cantidad de estudios en donde se puede observar que existen multitud de nanomateriales que mimetizan el comportamiento de las enzimas. Entre estos NMs, encontramos NPs de óxido de hierro (Fe_2O_3), de óxido de cerio (CeO_2) que mimetizan la actividad de enzimas como la peroxidasa o la superóxido dismutasa (SOD) o el óxido de manganeso (MnO_2) con actividad oxidasa^{11, 12}. También encontramos NPs de metales nobles como oro o de platino que mimetizan las actividades de enzimas como la catalasa, la peroxidasa y la SOD^{9, 10, 11, 12}. Igualmente, se ha observado como algunos NMs de carbono como el grafeno, el fullereno o los nanotubos de carbono presentan actividad peroxidasa^{9, 10, 11, 12}.

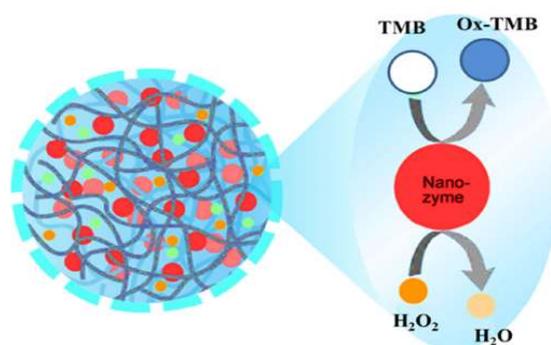


Figura 1. Representación esquemática de la actividad catalítica de nanozimas inorgánicas basadas en nanomateriales con actividad intrínseca similar a la peroxidasa (TMB: 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina, Ox-TMB: 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina oxidada¹²).

Esto ha propiciado la aparición de numerosas aplicaciones en biomedicina. Por ejemplo, se han utilizado nanozimas para la detección de glucosa u otros metabolitos oxidados como el colesterol, la colina o el lactato en sangre. También se han utilizado nanozimas conjugadas con anticuerpos en test de inmuno-ensayos para el diagnóstico de

enfermedades¹¹. Además, el uso de nanozimas junto a otras terapias contra el cáncer ha permitido mejorar su efectividad, por ejemplo, la mejora del efecto de la terapia quimiodinámica (CDT) mediante la sinergia con la terapia fototérmica (PTT), en la cual se combinaba una enzima artificial basada en Fe_3O_4 con un semiconductor nanoestructurado de Bi_2S_3 (Figura 2A)¹³. Zhao *y col*¹³. concluyeron que los nanocatalizadores híbridos de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Bi}_2\text{S}_3$ podían atacar a las células cancerosas mediante el efecto del tratamiento fototérmico con láser a 808 nm, y con el efecto térmico se mejoró la acción de las NPs de Fe_3O_4 , que podían convertir el H_2O_2 en radicales hidroxilo de elevada toxicidad (OH^\bullet) de manera más eficiente (Figura 2B).

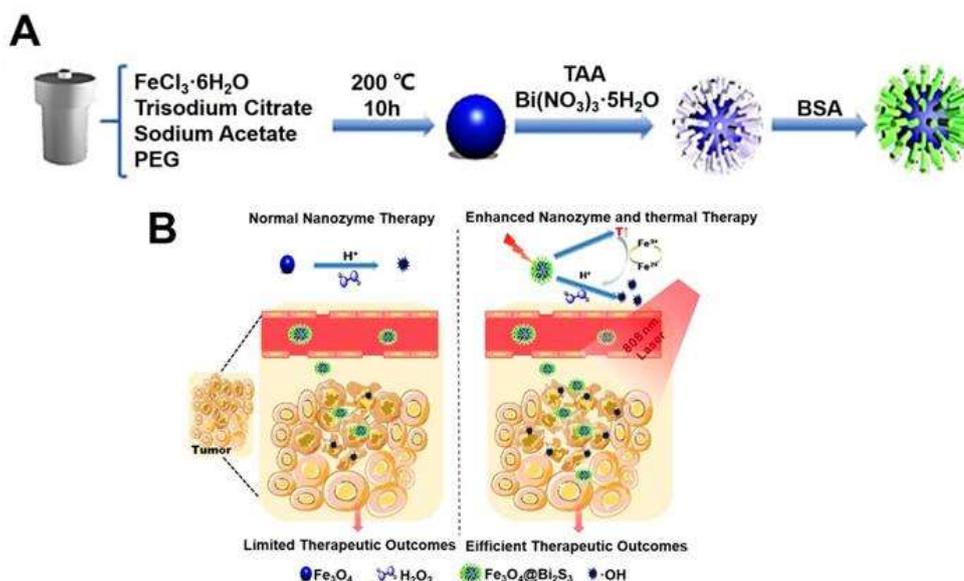


Figura 2. A) Mecanismo de síntesis de los nanocatalizadores $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Bi}_2\text{S}_3$. B) Diagrama esquemático de la terapia fototérmica y quimiodinámica in vivo¹³.

1.1. Glucosa Oxidasa

1.1.1. GOx y el consumo de glucosa intracelular

La mayoría de las células tumorales pueden transportar y metabolizar nutrientes a mayor velocidad que las células sanas a través de sistema vascular intratumoral construido para soportar la proliferación. Entre estos nutrientes, el que juega un papel más importante en el metabolismo tumoral es la β -D-glucosa¹⁴.

La glucosa oxidasa (GOx; EC:1.1.3.4) está ampliamente distribuida en organismos vivos, y se puede purificar a partir de una variedad de diferentes hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y los pertenecientes al género *Penicillium*. GOx es una glicoproteína dimérica formada por dos subunidades de cadena polipeptídicas idénticas. Cada subunidad presenta una zona de unión no covalente al dinucleótido de flavina y adenina

(FAD), que actúan como coenzima, siendo el aceptor final de electrones. GOx cataliza en presencia de oxígeno la oxidación de β -D-glucosa a δ -gluconolactona¹⁵. El ciclo catalítico se puede dividir en dos semirreacciones, la semirreacción de reducción y la semirreacción de oxidación como se pueden ver en el Figura 3. En la semirreacción de reducción GOx cataliza la oxidación de la β -D-glucosa a δ -gluconolactona, la cual es hidrolizada a ácido glucónico (reacción no enzimática). Durante la semirreacción de reducción el anillo de flavina de GOx se reduce a FADH₂. En la semirreacción de oxidación dos protones y dos electrones se transfieren del enzima al oxígeno molecular (O₂) para formar peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y regenerar el estado oxidado del enzima¹⁶.

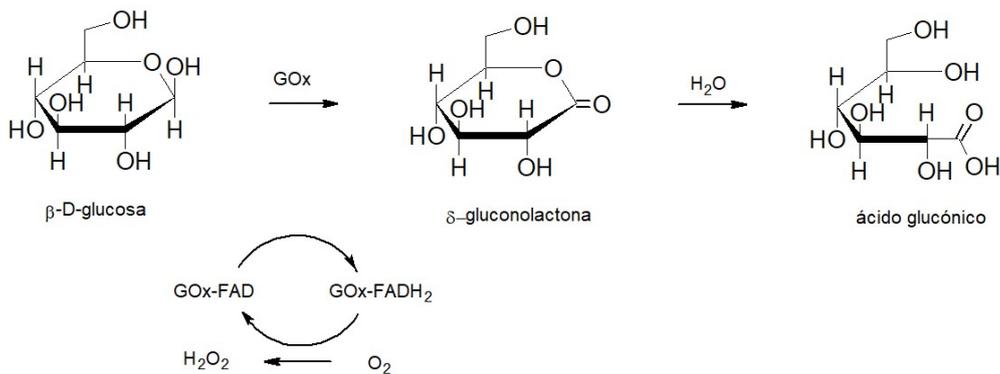


Figura 3. El producto de la reacción la δ -gluconolactona hidroliza de manera espontánea a ácido glucónico. El O₂ reoxida el FADH₂ a FAD, generándose de esta manera H₂O₂.

GOx se utiliza de manera muy extendida en la industria alimentaria para eliminar pequeñas cantidades de O₂ de los productos alimenticios o glucosa de las bebidas para diabéticos. También es utilizada para monitorear los niveles de glucosa en procesos de fermentación, así como la determinación de glucosa en suero o plasma. Además, se utiliza como marcador de antígenos y anticuerpos en inmuno-ensayos enzimáticos¹⁷. Finalmente, en los últimos años, están apareciendo multitud de estudios en los cuales se ha utilizado GOx como agente terapéutico y diagnóstico contra el cáncer¹⁸.

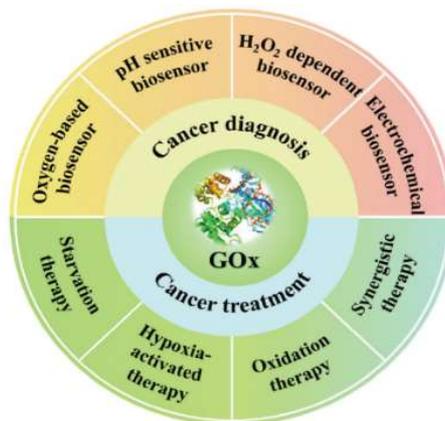


Figura 4. Principales aplicaciones de diagnóstico y tratamiento basadas en la utilización de GOx¹⁸.

Como describió Otto Warburg¹⁹ la glucosa juega un papel crucial en el crecimiento de los tumores ya que la proliferación de células tumorales depende principalmente de la glucólisis aeróbica¹⁴. La glucosa oxidasa puede catalizar la conversión de glucosa intracelular y O₂ para producir H₂O₂ y ácido glucónico, alterando el aporte de este nutriente a las células cancerosas e inhibiendo su proliferación. Por lo tanto, GOx se define como una oxidorreductasa endógena ideal para la terapia del cáncer por inanición²⁰.

1.1.2. GOx y el ambiente microtumoral

GOx también puede intervenir potencialmente en la regulación del microambiente tumoral (TME)²⁰. El TME es el entorno interno en el que proliferan las células tumorales. Comparado con los tejidos normales, las características básicas de este TME incluyen una presión de fluidos intersticiales más alta, hipoxia, un pH ligeramente ácido, mayor nivel de glutatión (GSH) y H₂O₂²¹. Por tanto, el consumo de O₂ a través del proceso GOx aumenta aún más el grado de hipoxia y la producción de ácido glucónico mejoraría la acidez del TME. Por otro lado, el H₂O₂ generado se puede convertir en radicales OH[•], útiles para matar las células cancerosas. De esta manera, GOx puede integrar otras estrategias terapéuticas como PTT, la quimioterapia, la terapia CDT, la inmunoterapia, y así sucesivamente para lograr una terapia multimodal cooperativa. En este sentido, GOx tiene un papel fundamental en el diseño y construcción de nanoplataformas multifuncionales para terapia tumoral²⁰.

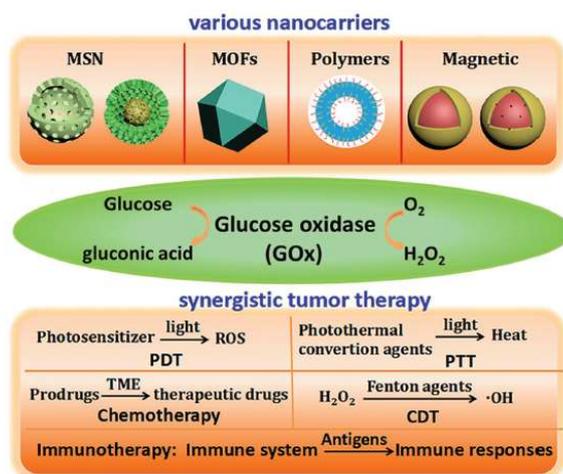


Figura 5. Diagrama esquemático de las estrategias de construcción de nanoplataformas basadas en GOx y sus aplicaciones en la terapia tumoral sinérgica²⁰.

En el siguiente ejemplo se puede observar cual podría ser el mecanismo de acción de GOx en el tratamiento contra el cáncer. El nanocatalizador GOx-Fe₃O₄@DMSNs fue

sintetizado encapsulando GOx y NPs ultrapequeñas de Fe_3O_4 en NPs de sílice dendrítica mesoporosa (DMSN). Como se muestra en la Figura 6 al ser absorbido por las células cancerosas, GOx podría agotar glucosa en las células tumorales, que no solo causaría la limitación en el acceso a nutrientes (fundamentalmente glucosa) para las células cancerosas, sino que también generaría una cantidad considerable de H_2O_2 . Posteriormente, este H_2O_2 sería catalizado *in situ* por las NPs de Fe_3O_4 mediante una reacción similar a la reacción de Fenton para producir OH^\bullet , el cual es tóxico y que a su vez induce la apoptosis de células tumorales²².

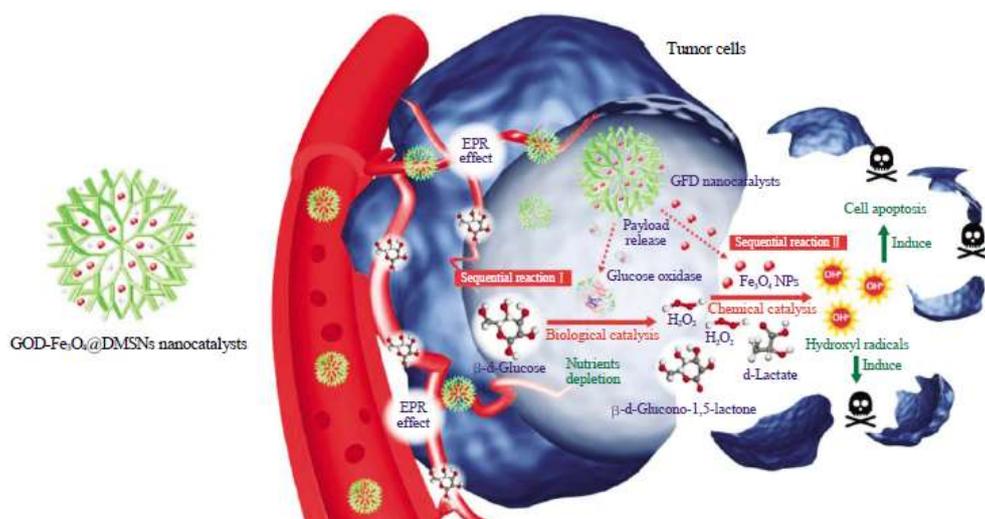


Figura 6. Estructura de los nanocatalizadores $\text{GOx-Fe}_3\text{O}_4$ @DMSNs; y esquema secuencial del mecanismo catalítico-terapéutico de nanocatalizadores $\text{GOx-Fe}_3\text{O}_4$ @DMSNs (GFD) en la generación de radicales OH^\bullet para la terapia contra el cáncer²².

1.2. Nanopartículas de TiO_2

El dióxido de titanio (TiO_2) es un compuesto que presenta cuatro fases cristalinas: rutilo (estructura tetragonal), anatasa (estructura octaédrica), brookita (estructura ortorrómbica) y una estructura de alta presión del tipo α - PbO_2 . El rutilo y la fase de alta presión son las formas más estables del TiO_2 , por ello muchos compuestos cristalizan presentando estos dos tipos de estructuras, mientras que se conocen muy pocos ejemplos con estructuras anatasa y brookita²³. En general, las superficies de TiO_2 son químicamente reactivas caracterizadas por la presencia de grupos hidroxilo terminales (Ti-OH) por lo que pueden sufrir modificaciones covalentes en la superficie como primer paso para la inmovilización de enzimas²⁴.

Las NPs de TiO_2 se fabrican en grandes cantidades para una amplia gama de aplicaciones, entre las que destacan su uso como sensores, formando parte en las baterías de iones de litio, supercondensadores y como soporte de catalizadores²⁵. Además, gracias a sus

propiedades fotocatalíticas se utiliza para la descomposición de contaminantes ambientales presentes en el agua²⁶.

Mientras que los metales poseen estados electrónicos continuos, los semiconductores tienen una región en donde no existen niveles de energía disponibles para los electrones. En los semiconductores esta región se conoce como banda prohibida, y se extiende desde el borde superior de la banda ocupada por los orbitales moleculares con los electrones de valencia conocida como banda de valencia (VB, del inglés *valence band*), hasta el borde inferior de la banda de conducción (CB, del inglés *conduction band*), que es la banda formada por los orbitales moleculares vacíos²⁷. La fase anatasa del TiO₂ tiene un ancho de banda prohibida de 3,2 eV, mientras que el de la fase rutilo es de 3,0 eV^{25, 26, 28}. El proceso general de fotocatalisis de un material semiconductor se muestra en la Figura 7, donde se puede observar el efecto de la radiación electromagnética incidente sobre los nanocristales de TiO₂. Un electrón perteneciente a la VB es excitado y se transfiere a la CB, lo que genera una vacante de carga positiva (o hueco) en la VB. Los electrones que se transfieren y los huecos que se han generado sobre la superficie de TiO₂ pueden actuar como centros activos para reacciones tipo redox. Por ejemplo, los electrones pueden reducir al O₂ y formar aniones de radical superóxido (O₂^{•-}), mientras que los huecos positivos, cuando reaccionan con el H₂O pueden generar OH[•] (vías 1 y 2)²⁸. Los pares electrón hueco de la superficie que no consiguen reaccionar con ninguna especie se recombinan. Esta recombinación puede ser con sus contrapartes de cargas opuestas que se encuentran en la superficie (vía 3), o la recombinación puede ocurrir en el interior del semiconductor (vía 4)²⁹.

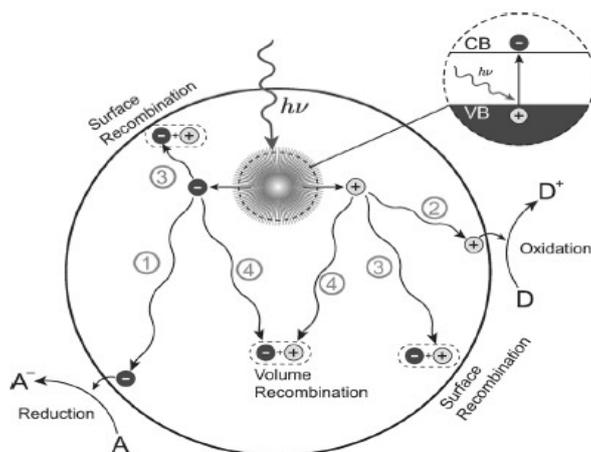


Figura 7. Esquema del mecanismo fotocatalítico del TiO₂ que incluye los fenómenos de separación y de recombinación de cargas inducidos en el interior y en la superficie por efecto de una radiación electromagnética incidente; **A** es una especie aceptora de electrones y **D** es una especie donadora de electrones²⁸.

Esta característica ha convertido al óxido de titanio en un candidato potencial para aplicaciones biomédicas, ya que las ROS que se generan en la superficie del TiO_2 durante su actividad fotocatalítica, pueden causar la peroxidación de los fosfolípidos que forman parte de la membrana celular²⁹. Asimismo, también se ha demostrado que las nanopartículas basadas en TiO_2 pueden presentar buena actividad y selectividad en la oxidación de azúcares, por lo que podría ser un buen candidato para utilizarlo en la terapia contra el cáncer, ya que el consumo de glucosa es relevante en los procesos metabólicos asociados al desarrollo de tumores³⁰. Un ejemplo, fue un nuevo sensor de glucosa basado en nanocables de TiO_2 desarrollado por Tang y col³¹, en donde GOx se encontraba funcionalizada sobre nanocables de TiO_2 . La característica clave de este sensor de glucosa es que los orificios fotogenerados sobre el ánodo de TiO_2 se utilizaban para formar O_2 , que sirve directamente como un eficiente mediador de transferencia de electrones entre el centro enzimático redox de GOx y la superficie del sensor, lo que conduce a un aumento de la fotocorriente. Como prueba, los nanocables de TiO_2 funcionalizados con GOx exhiben una alta sensibilidad de $\sim 0,9 \text{ nM}$ en la detección de glucosa en una disolución tampón y en suero de ratón³¹.

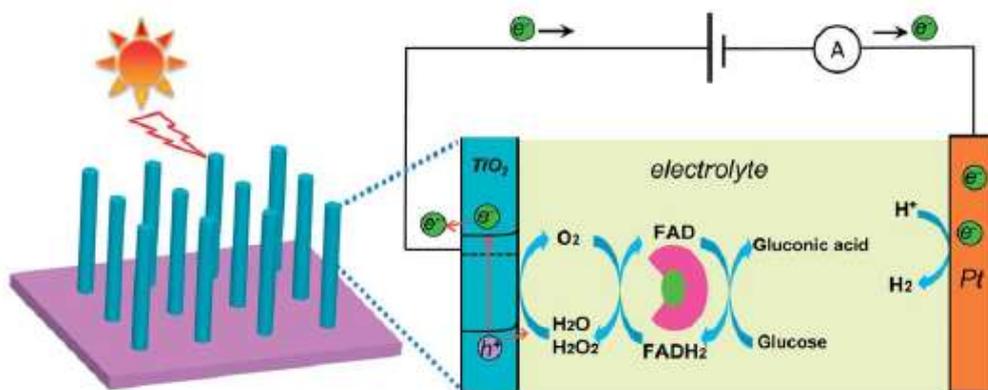


Figura 8. Esquema del sensor para la detección glucosa. Bajo la iluminación de la luz solar, los agujeros fotogenerados oxidan H_2O o H_2O_2 sobre el ánodo de nanocables de TiO_2 para formar O_2 , que sirve como aceptor de electrones de FAD/FADH_2 . La glucosa se oxida a ácido glucónico durante este ciclo. En el cátodo (Pt), los electrones fotogenerados reducen el agua para formar H_2 . La corriente que fluye a través del circuito se registra en forma de señal³¹.

Por otra parte, las NPs de TiO_2 solo responden a la luz ultravioleta, la cual desafortunadamente tiene una baja penetración en el tejido, y puede resultar dañina para los tejidos debido a su alta energía (capaz de romper enlaces), lo que limita sus aplicaciones biomédicas *in vivo*. No obstante, el desarrollo en los últimos años de la Nanomedicina ha favorecido la aparición de nuevas alternativas terapéuticas

especialmente orientadas al tratamiento del cáncer^{6, 8}. Estas modalidades terapéuticas utilizan las NPs de TiO₂ junto a NPs de otros materiales para expandir la fotoactividad de las NPs de TiO₂ más allá del UV. Entre estas modalidades nos encontramos la terapia PTT activada por infrarrojo cercano (NIR), la PDT activada por NIR, la PDT activada por rayos X/radiación de Cerenkov (CR) y la terapia sonodinámica (SDT) activada por ultrasonidos⁶. Un ejemplo, es el novedoso estudio terapéutico descrito recientemente por Zhang *y col.*⁶ que incluyó la utilización de ultrasonidos para activar NPs de TiO₂. En este estudio se utilizaron NPs de TiO₂ hidrolizadas (HTiO₂), que se acumularon preferentemente en el tejido tumoral, mejorando la respuesta inmune y destruyendo la microvasculatura del tumor tras la aplicación de ultrasonidos (Figura 9A). Este efecto se tradujo a su vez en una disminución gradual del volumen del tumor (Figura 9B) por el efecto SDT activado por ultrasonidos⁶.

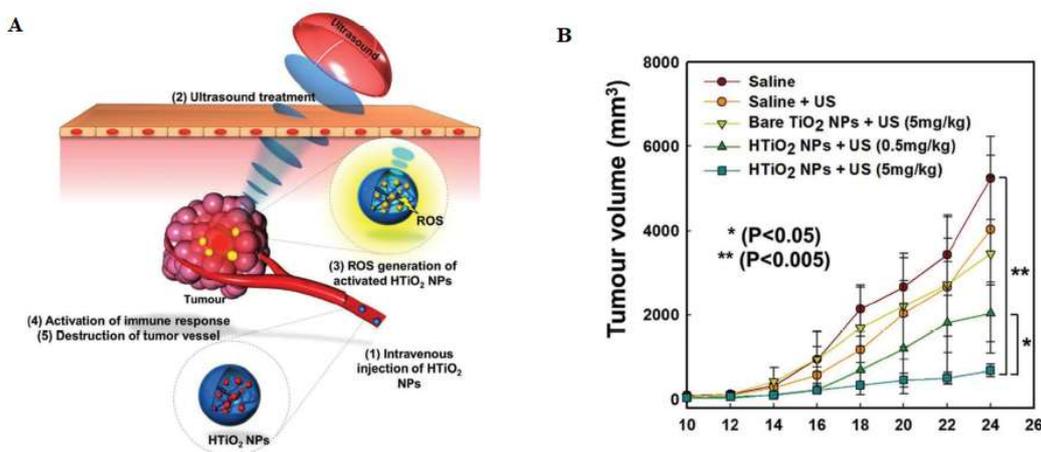


Figura 9. A) El esquema de SDT mejorado con nanopartículas HTiO₂. Producción de ROS para mejorar la respuesta inmune y destruir la microvasculatura del tumor. **B)** Los cambios en el volumen tumoral de los ratones portadores de tumores SCC7 en cada grupo de tratamiento⁶.

También hay que indicar que, debido a su naturaleza relativamente porosa, las NPs de TiO₂ han sido ampliamente investigadas como vehículo para la administración de fármacos. Recientemente, se han desarrollado nuevas NPs multifuncionales de TiO₂ modificadas con polietilenimina (PEI) para explorar su viabilidad fotocatalítica y lograr la liberación de fármacos asistida mediante luz ultravioleta (UV)⁸. Además, con el fin de lograr que la administración estuviera dirigida selectivamente hacia células cancerosas, se usó ácido fólico, el cual se conjugó químicamente sobre la superficie de las NPs de TiO₂ para conseguir la internalización específica vía endocitosis mediada por receptores. Además, se co-encapsuló un fármaco contra el cáncer poco soluble en agua, el paclitaxel⁸. El PEI presente en la superficie de las NPs de TiO₂ permitió bloquear eficazmente el canal

de liberación prematura del fármaco. Una vez que se irradiaba con luz UV, las moléculas de PEI fueron progresivamente degradadas por la acción oxidativa de los radicales libres (OH^\cdot y $\text{O}_2^{\cdot-}$) producidos por el TiO_2 , con lo cual el fármaco se pudo liberar rápidamente en el citoplasma. Es importante destacar que la cantidad de fármaco liberado por las NPs de TiO_2 podía regularse mediante el tiempo de exposición a la radiación UV para controlar aún más el efecto anticancerígeno. Esta nanopartícula porosa multifuncional de TiO_2 exhibe una combinación de liberación de fármacos activada por estímulos y focalización en células cancerosas⁸.

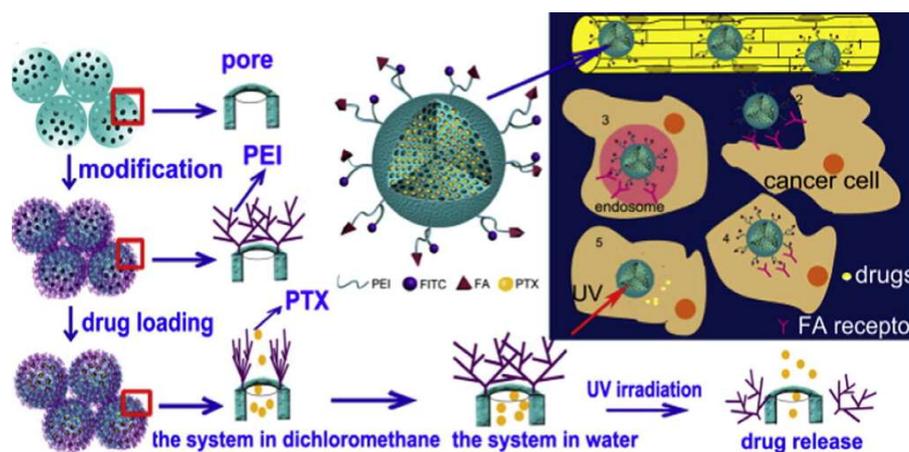


Figura 10. Representación esquemática de la carga y liberación del fármaco controlado por la radiación UV⁸.

2. Resultados y discusión

2.1. Caracterización de los híbridos GOx-P25

Para la caracterización de los híbridos GOx-P25 se han utilizado diferentes técnicas instrumentales como el microscopio electrónico de transmisión (TEM), la espectroscopía de IR y la espectroscopía de fotoemisión de rayos X (XPS).

2.1.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión nos permite observar cómo GOx se encuentra distribuida en la estructura del P25. La Figura 11, muestra imágenes de TEM correspondientes a la enzima libre sobre una base de P25. Se puede observar la formación de pequeños dominios orgánicos de naturaleza amorfa con tamaños inferiores a los 5 nm. Asimismo, cabe destacar la más que posible presencia de subdominios de tamaño inferior al nanómetro, que escapan a la resolución del microscopio y que rápidamente evolucionan por la irradiación del haz electrónico incidente.

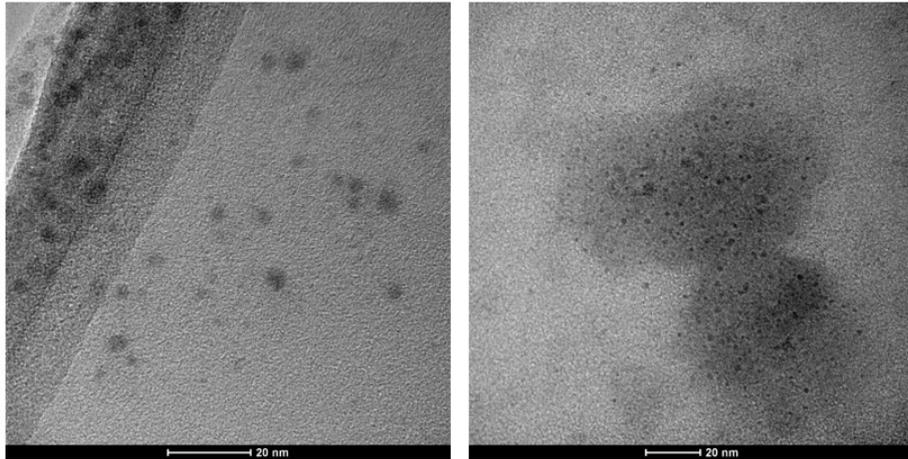


Figura 11. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión representativas de la enzima Glucosa Oxidasa.

Por otra parte, la Figura 12 muestra imágenes de TEM correspondientes a la muestra de P25 decorada con la enzima GOx (0,01 g/l). Se observan dominios de 4-6 nm homogéneamente distribuidos en la superficie de las NPs de P25, cuyos tamaños oscilan entre 25 y 40 nm. Además, parece apreciarse una fina capa de material orgánico amorfo que envuelve a todas las NPs de P25. La distribución es extremadamente homogénea y representativa en todas las muestras y zonas de la rejilla de TEM evaluadas.

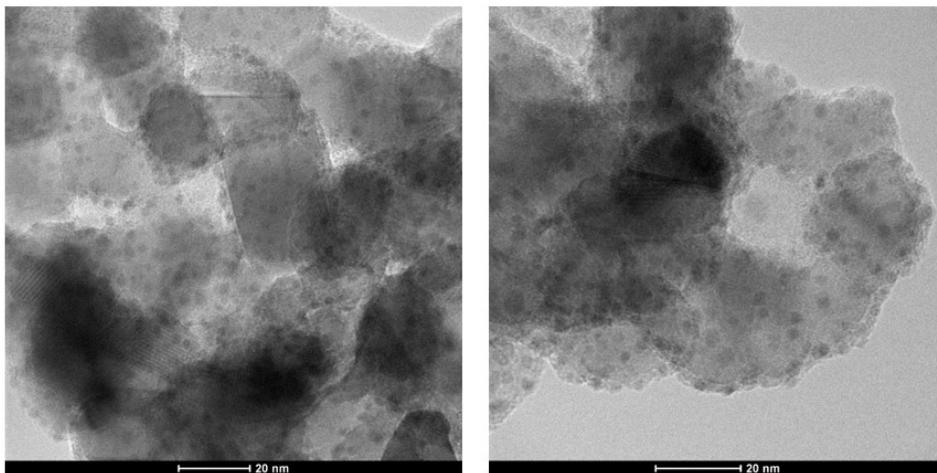


Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la muestra del híbrido 0,01GOx-25P25.

2.1.2. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

La estructura básica de los compuestos puede ser determinada a partir de la manera en que absorben sus enlaces la energía infrarroja a frecuencias específicas. Aunque el espectro IR caracteriza a cada compuesto, se encuentra que ciertas agrupaciones atómicas dan lugar siempre a bandas en un determinado intervalo de frecuencias, independiente de

la naturaleza del resto de la molécula. La existencia de estas bandas, características de grupos funcionales, permite la caracterización de multitud de compuestos³².

Tabla 1.

Bandas de absorción de GOx y de los híbridos GOx-P25 determinadas por FTIR.

GOx	GOx.P25	Asignación
3278 cm ⁻¹		Amida A
2961 cm ⁻¹	2057 cm ⁻¹	CH ₃ stretching asimétrico
2930 cm ⁻¹	2920 cm ⁻¹	CH ₂ stretching asimétrico
2876 cm ⁻¹	2850 cm ⁻¹	CH ₃ stretching simétrico
1640 cm ⁻¹		Amida I
1532 cm ⁻¹		Amida II
1100 cm ⁻¹	1120 cm ⁻¹	C-O stretching

Las bandas correspondientes a los enlaces CH₃ y CH₂ se observan en las muestras de P25 con enzima confirmando la presencia de GOx en la superficie del soporte. Están desplazadas a menores números de onda sugiriendo que hay interacción entre estos grupos de la enzima y el P25 (probablemente a través de los grupos OH del P25).

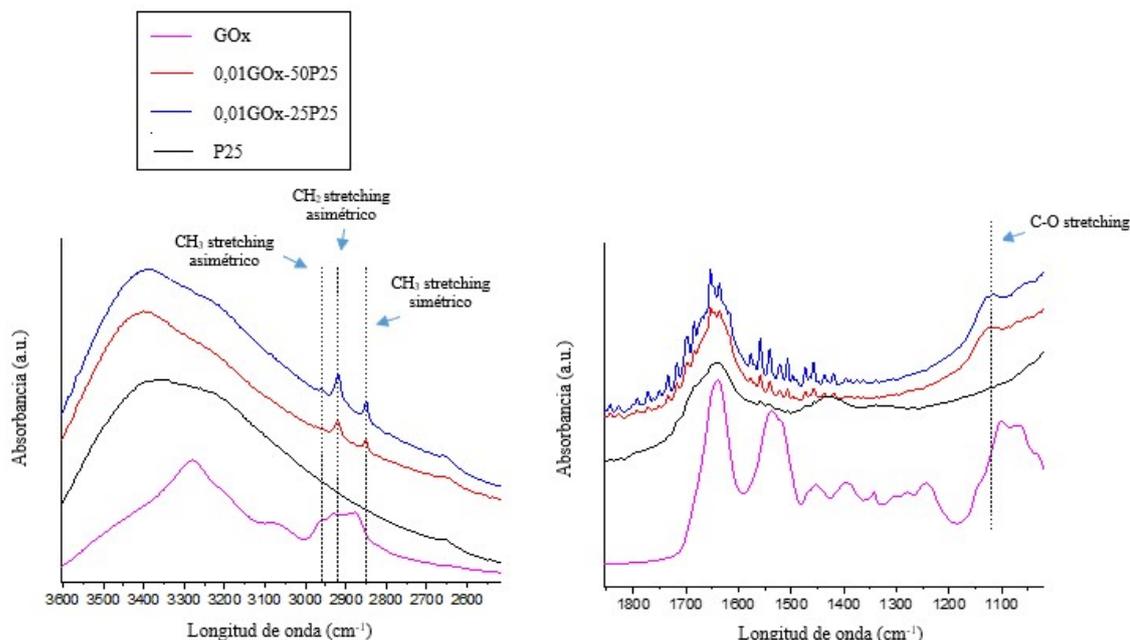


Figura 13. Espectros de absorción por FTIR de las muestras de enzima libre, P25 y de los híbridos GOx-P25 con la asignación de las bandas de absorción de GOx y de los híbridos GOx-P25.

La presencia de la enzima también se confirma en las muestras GOx-P25 con la aparición de banda relacionada al *stretching* del enlace C-O que aparece a mayores números de onda. La banda a 1640 cm⁻¹ en las muestras con P25 se debe al *bending* de los OH del agua adsorbida.

2.1.3. Espectroscopia de fotoemisión de rayos X (XPS)

El análisis de los catalizadores por Espectroscopía de Emisión de Rayos-X (XPS), ha permitido discernir la composición atómica en superficie, al tratarse de una técnica con sensibilidad en torno a los 10 nm. La Tabla 2 resume la composición detectada para todos los materiales de la memoria.

Tabla 2.

Porcentaje atómico en superficie determinado por XPS.

	E.E. (eV)			
	% Atómico			
	O 1s	Ti 2p	N 1s	C 1s
P25	529.4	458.2		284.5
	51.18%	22.30%		26.52%
Enzima	531.0		398.1	284.5
	28.08%		4.85%	67.06%
0,01GOx-25P25	529.4	458.3	399.6	284.5
	48.17%	22.25%	0.59%	23.08%
0,01GOx-50P25	529.6	458.3	399.7	284.5
	52.98%	22.36%	0.44%	24.22%

La Figura 14.B recoge un espectro de fotoemisión característico de la muestra 0,01GOx-25P25 y los correspondientes ajustes indicativos del tipo de enlaces observados en superficie. El detalle específico de las energías de enlaces asociadas a los distintos enlaces encontrados y las energías de enlace correspondientes aparecen reflejados en la Tabla 3.

Tabla 3.

Asignación de los distintos tipos de enlaces del C determinados por ajuste para las muestras de la memoria.

	E.E. (eV)			
	% Atómico			
C 1s	C no asignado	C-C/C=C/C-H	C-O/C-N	C=O
Enzima	283.0	284.5	285.3	
	12%	52%	36%	
0,01GOx-25P25		284.5	285.6	288.1
		73%	17%	10%
0,01GOx-50P25		284.5	285.5	288.1
		76%	16%	8%

Cabe destacar que ambas muestras soportadas revelan una composición similar, siendo la presencia de enlaces carboxílicos a mayores energías de enlace (288.2 eV) la señal más distintiva respecto a la enzima libre (ver Figura 14). Esta contribución en particular parece indicar una posible interacción entre el soporte y la enzima a través de un enlace carboxílico.

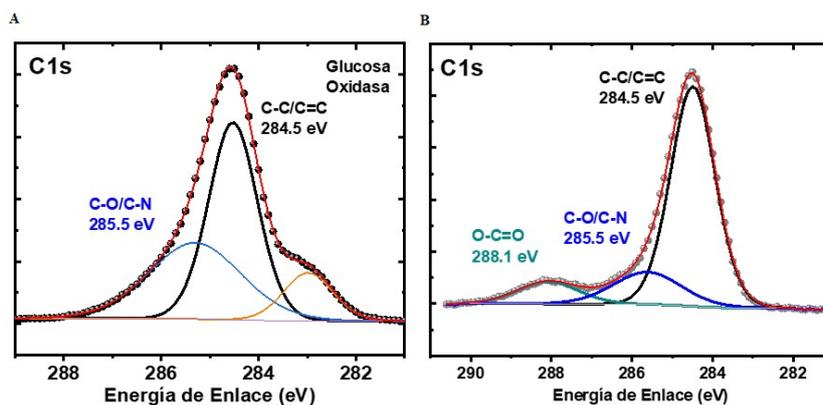


Figura 14. Espectro de fotoemisión y ajustes correspondientes a la región del C1s de A) la muestra de enzima libre y B) del híbrido 0,01GOx-25P25.

Asimismo, destaca el porcentaje de N detectado en la enzima no soportada que puede servir de guía para determinar qué fracción de enzima se ha depositado sobre la superficie del P25 (ver Tabla 15). De manera análoga, se procedió a evaluar la naturaleza del enlace del N. Se observó nuevamente un cambio en la naturaleza del enlace del N (Figura 15. B) respecto al enzima libre (Figura 15.A).

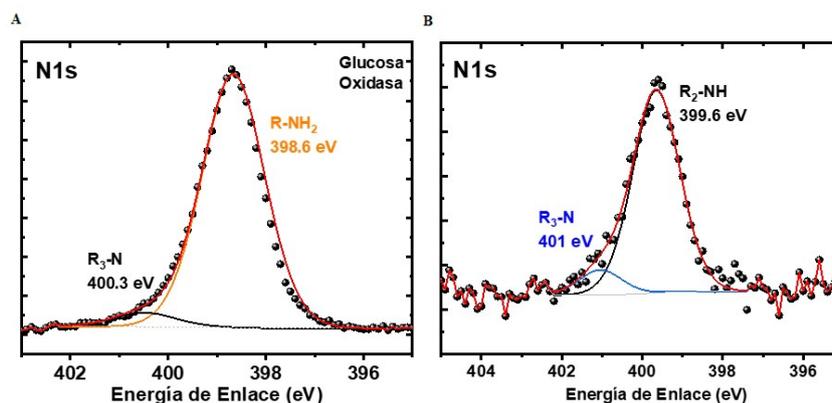


Figura 15. Espectro de fotoemisión y ajustes correspondientes a la región del N1s de A) la muestra de enzima libre y B) del híbrido 0,01GOx-25P25.

Las muestras soportadas contienen un porcentaje de N limitado y predomina la presencia de N totalmente sustituidos que se identifican a energías de enlace de 399.6 eV aproximadamente (ver Tabla 4). Por el contrario, la enzima libre presenta una presencia mayoritaria de enlaces amino terminales (identificados a energías de enlace cercanas a 398 eV).

Tabla 4.

Asignación de los distintos tipos de enlaces del N determinados por ajuste para las muestras de la memoria.

Nls	E.E. (eV)		
	% Atómico		
	R-NH ₂	R ₃ -N	R ₂ -NH
Enzima	398.1	399.9	
	94%	6%	
0,01GOx-25P25		399.6	401.0
		90%	10%
0,01GOx-50P25		399.7	401.2
		89%	11%

Como conclusiones parciales podemos establecer que la naturaleza de los enlaces asociados a la enzima varía cuando se encuentra soportada sobre las NPs de P25. También cabe destacar la posible formación de un enlace de unión de la enzima y el TiO₂ vía enlace carboxílico.

2.2. Determinación de la actividad catalítica de conversión de glucosa

Se realizaron ensayos enzimáticos a diferentes longitudes de onda. Las muestras ensayadas fueron: i) las dos concentraciones de enzima y ii) las dos cantidades de P25 utilizadas para la generación de los híbridos GOx-P25 (muestras control). Después se determinó la actividad enzimática de los 4 híbridos GOx-P25 desarrollados. Cada una de estas muestras se incubaron a 37 °C y fueron expuestas a 365 nm, 405 nm y a oscuridad. Para observar la actividad enzimática se representó el porcentaje de glucosa convertida a los 30 y a los 60 minutos.

A continuación, se representa el porcentaje de glucosa convertida a dos tiempos para las muestras control y para los cuatro híbridos GOx-P25 sin presencia de luz.

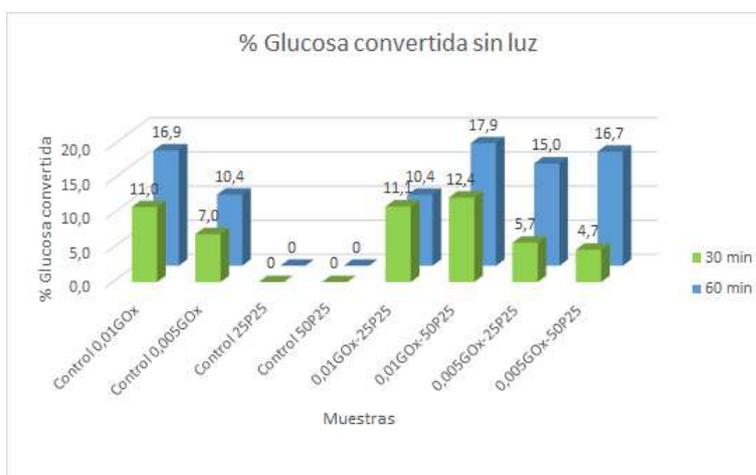


Figura 16. Representación de la actividad de GOx libre, P25 sin enzima y de los híbridos GOx-P25 sin la exposición a la luz.

Se puede observar, que exceptuando el híbrido 0,01GOx-25P25, los demás híbridos presentan a los 30 minutos una menor actividad catalítica que las muestras control de enzima libre. Por otra parte, la actividad catalítica de los híbridos y las muestras de control de enzima libre son muy parecidas a los 60 minutos. Hay que destacar que las muestras de P25 no han mostrado ningún tipo de actividad sin la presencia de luz.

En la Figura 17, se representa el porcentaje de glucosa convertida a dos tiempos para las muestras control y para los cuatro híbridos GOx-P25 irradiados a 365 nm. En esta, se observa cómo las muestras control con enzima libre no presentan ninguna actividad después de irradiar las muestras a 365 nm. Por otra parte, la actividad catalítica de los híbridos y de las dos muestras de control de P25 se ha visto incrementada considerablemente después de estar expuestos a la radiación.



Figura 17. Representación de la actividad de GOx libre, P25 sin enzima y de los híbridos GOx-P25 después de irradiar las muestras a 365 nm

Finalmente, el porcentaje de glucosa convertida a dos tiempos para las muestras control de enzima y P25 y para los cuatro híbridos GOx-P25 irradiadas con una longitud de onda de 405 nm se presentan en la Figura 18. En esta, se observa como las muestras control de enzima libre tampoco presentan ninguna actividad después de estar expuestas a una radiación de 405 nm. Por otro lado, los porcentajes de la glucosa convertida de las muestras control de P25 y de los híbridos GOx-P25 son mayores con respecto a los porcentajes de la glucosa convertida de los híbridos cuando no fueron expuestos a la luz, pero inferiores a los que presentan las mismas muestras expuestas a 365 nm. Con lo cual, evidencia una mayor capacidad fotocatalítica por parte del P25 al estar expuestas a longitudes de onda en la región del UV.



Figura 18. Representación de la actividad de GOx libre, P25 sin enzima y de los híbridos GOx-P25 después de irradiar las muestras a 405 nm..

Los resultados obtenidos en los tres supuestos nos indican que la actividad que presentan los híbridos GOx-P25 es consecuencia de la actividad fotocatalítica que presentan las NPs de P25. Estos resultados vienen respaldados por los expuestos en el Anexo 3, en donde se puede observar cómo no se aprecia formación alguna de δ -gluconolactona en ninguno de los híbridos ni tampoco en las muestras de control de P25. Esto nos lleva a pensar que la δ -gluconolactona formada haya podido evolucionar a otra especie oxidada como por ejemplo a ácido glucónico.

2.3. Capacidad de reutilización de los híbridos GOx-P25

A continuación, se representa la capacidad de reutilización del híbrido que presentaba un mayor porcentaje de conversión de la glucosa a 365 nm. Para ello, el mismo híbrido ha sido reutilizado dos veces más para observar cómo afecta la reutilización a su capacidad oxidativa. Cómo se puede observar en la Figura 19, la reutilización del híbrido no afecta a su capacidad catalítica, ya que es durante la segunda reutilización cuando el híbrido 0,005GOx-25P25 presenta un mayor grado de conversión de glucosa. Este aumento de la actividad catalítica podría ser debido a que, durante los ciclos de lavado, se eliminara enzima soportada sobre el P25, con lo cual la superficie disponible de P25 para oxidar a la glucosa sería mayor.

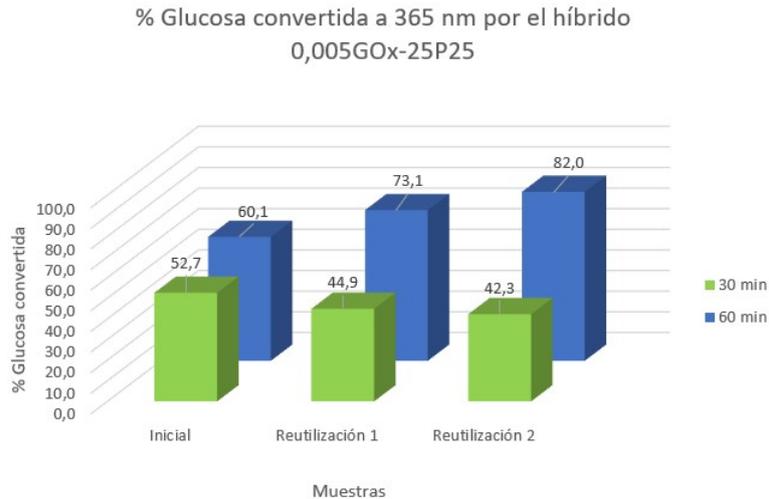


Figura 19. Representación del porcentaje de glucosa convertida en los dos ciclos de reutilización del híbrido 0,005GOx-25P25 expuesto a una radiación de 365 nm.

2.4. Desactivación catalítica

Finalmente, se adjuntan los resultados obtenidos al mantener durante 225 minutos, el enzima libre y el híbrido 0.01GOx-25P25 en ausencia de iluminación y el híbrido 0.01GOx-25P25 expuesto a una radiación de 365 nm. Se puede observar cómo el porcentaje de conversión de glucosa del híbrido 0,01GOx-25P25 a los 225 minutos es del 92%. Con lo cual nos confirma que el proceso fotocatalítico es el que gobierna el proceso de oxidación de la glucosa, ya sea por la interacción con los huecos positivos de la superficie del P25 o por los posibles radicales OH^{*} que se hayan podido generar.

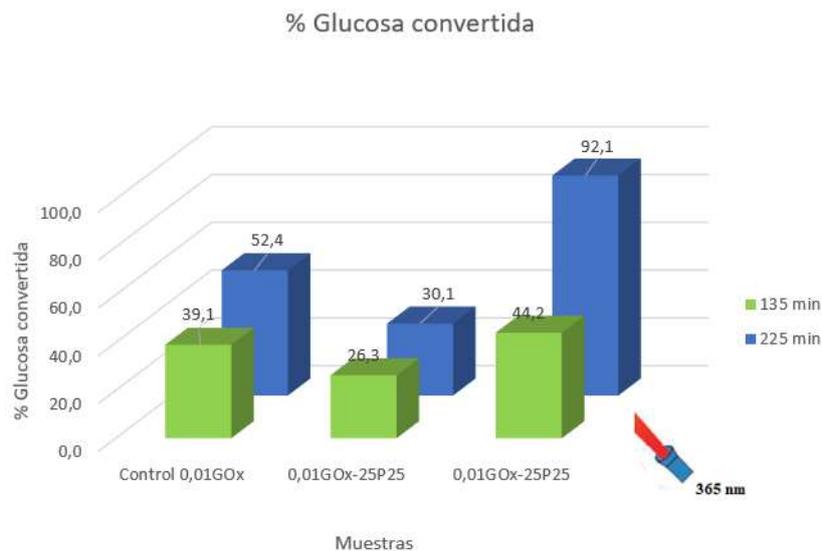


Figura 20. Representación de la actividad de catalítica del enzima libre y del híbrido 0,01GOx-25P25 sin irradiar y del híbrido 0,01GOx-25P25 después de estar expuesto a una radiación de 365 nm.

Por otro lado, las muestras sin irradiar revelan como el grado de conversión de la glucosa es mayor para el enzima libre que para el híbrido, habida cuenta de una posible lógica pérdida de actividad tras la interacción con P25, que pudiera afectar a la conformación nativa de la enzima.

3. Conclusiones

La caracterización de las muestras nos indica que se consigue inmovilizar el enzima sobre las NPs de P25, con lo cual es posible la obtención de híbridos funcionales que combinan GOx y P25. Los resultados obtenidos al comparar la actividad catalítica de las distintas muestras a diferentes longitudes de onda muestran que la capacidad catalítica que manifiestan los híbridos GOx-P25 a la hora de degradar la glucosa depende en gran medida de la respuesta fotocatalítica del P25, especialmente en presencia de los LEDs de luz UV.

También cabe destacar el papel inhibitor de los mismos LEDs en la actividad específica del GOx. La falta de producción de δ -gluconolactona pone de manifiesto que el P25 no simula el comportamiento enzimático de GOx. Sin embargo, las elevadas tasas de conversión de glucosa, incluso después de tratamientos prolongados o tras varios procesos de reutilización hacen pensar en el P25 como un fotocatalizador con gran potencial para el tratamiento del cáncer por la vía de la disrupción metabólica y abre el camino para seguir investigando alternativas con este soporte y a seguir explorando vías de inmovilización y de generación de materiales híbridos.

4. Bibliografía

- 1) Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 93, 52–79.
- 2) Charmsaz, S., Collins, D. M., Perry, A. S., & Prencipe, M. (2019). Novel Strategies for Cancer Treatment: Highlights from the 55th IACR Annual Conference. *Cancers*, 11(8), 1125.
- 3) Tang, M., Lei, L., Guo, S., & Huang, W. (2010). Recent progress in nanotechnology for cancer therapy. *Chin. J. Cancer* 29, 775–780.
- 4) Huo, M., Wang, L., Chen, Y., & Shi, J. (2017). Tumor-selective catalytic nanomedicine by nanocatalyst delivery. *Nature communications*, 8(1), 357.

- 5) Jin, S., Wu, C., Ye, Z., & Ying, Y. (2019). Designed inorganic nanomaterials for intrinsic peroxidase mimics: A review. *Sensors and Actuators B-chemical*, 283, 18-34.
- 6) Zhang, R., Yan, F., & Chen, Y. (2018). Exogenous Physical Irradiation on Titania Semiconductors: Materials Chemistry and Tumor-Specific Nanomedicine. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 5(12), 1801175.
- 7) Rehman, F. U., Zhao, C., Jiang, H., & Wang, X. (2016). Biomedical applications of nano-titania in theranostics and photodynamic therapy. *Biomaterials science*, 4(1), 40–54.
- 8) Wang, T., Jiang, H., Wan, L., Zhao, Q., Jiang, T., Wang, B., & Wang, S. (2015). Potential application of functional porous TiO₂ nanoparticles in light-controlled drug release and targeted drug delivery. *Acta biomaterialia*, 13, 354–363.
- 9) Taegy, K., Young G.K., Dokyoon K., & Taeghwan H. (2020). Inorganic nanoparticles with enzyme-mimetic activities for biomedical applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 403. [213092].
- 10) Golchin, J., Golchin, K., Alidadian, N., Ghaderi, S., Eslamkhah, S., Eslamkhah, M., & Akbarzadeh, A. (2017). Nanozyme applications in biology and medicine: an overview. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45, 1069 - 1076.
- 11) Wu, J., Wang, X., Wang, Q., Lou, Z., Li, S., Zhu, Y., Qin, L., & Wei, H. (2019). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II). *Chemical Society reviews*, 48(4), 1004–1076.
- 12) Attar F., Shahpar M.G., Rasti B., Sharifi M., Saboury A.A., Rezayat S.M. & Falahati M. (2019). Nanozymes with intrinsic peroxidase-like activities. *Journal of Molecular Liquids* 278, 130-144.
- 13) Zhao, S., Yu, X., Qian, Y., Chen, W., & Shen, J. (2020). Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: an advanced platform for cancer theranostics. *Theranostics*, 10(14), 6278–6309.
- 14) Herrera-González, N.E., & Martínez-García, F., & Mejía-Jiménez, E. (2015). El efecto Warburg: la mano derecha en el desarrollo del cáncer. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 20(2), 171-177.
- 15) Wohlfahrt, G., Trivic, S., Zeremski, J., Pericin, D., Leskovac, V. (2004). The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Molecular and cellular biochemistry*, 260. 69-83.

- 16) Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H. J., & Kalisz, H. M. (2000). Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of beta-D-glucose. *The Biochemical journal*, 347(Pt 2), 553–559.
- 17) Julio Raba & Horacio A. Mottola (1995). Glucose Oxidase as an Analytical Reagent. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 25:1, 1-42.
- 18) Fu, L. H., Qi, C., Lin, J., & Huang, P., (2018). Catalytic chemistry of glucose oxidase in cancer diagnosis and treatment. *Chemical Society reviews*, 47(17), 6454–6472.
- 19) WARBURG O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 123(3191), 309–314.
- 20) Wang, M., Wang, D., Chen, Q., Li, C., Li, Z., & Lin, J. (2019). Recent Advances in Glucose-Oxidase-Based Nanocomposites for Tumor Therapy. *Small* 15(51), e1903895.
- 21) Upreti, M., Jyoti, A., & Sethi, P. (2013). Tumor microenvironment and nanotherapeutics. *Translational cancer research*, 2(4), 309–319.
- 22) Huo, M., Wang, L., Chen, Y., & Shi, J. (2017). Tumor-selective catalytic nanomedicine by nanocatalyst delivery. *Nature Communications*, 8(1), 357.
- 23) Bessekhoud, Yassine & Robert, Didier & Weber, Jean. (2003). Synthesis of photocatalytic TiO₂ nanoparticles: Optimization of the preparation conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 157. 47-53.
- 24) Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(9), 14139–14194.
- 25) Betancur Henao, Claudia Patricia, Hernández Montes, Vanessa, & Buitrago Sierra, Robison. (2016). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(4), 387-402.
- 26) Ochoa, Yasser, Ortégón, Yamileth, & Rodríguez Páez, Jorge Enrique. (2010). Síntesis de TiO₂, fase anatasa, por el método solgel: estudio del efecto de la presencia de AcacH en el sistema. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. (52), 29-40.

- 27) Xiao, F. X., Miao, J., Tao, H. B., Hung, S. F., Wang, H. Y., Yang, H. B., Chen, J., Chen, R., & Liu, B. (2015). One-dimensional hybrid nanostructures for heterogeneous photocatalysis and photoelectrocatalysis. *Small*, 11(18), 2115–31.
- 28) Yan, X. and Chen, X. (2015). Titanium Dioxide Nanomaterials. In Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, R.A. Scott (Ed.).
- 29) Habisreutinger, S. N., Schmidt-Mende, L., & Stolarczyk, J. K. (2013). Photocatalytic reduction of CO₂ on TiO₂ and other semiconductors. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 52(29), 7372–7408.
- 30) Verdier, T., Coutand, M., Bertron, A., & Roques, C. (2014). Antibacterial Activity of TiO₂ Photocatalyst Alone or in Coatings on E. coli: The Influence of Methodological Aspects. *THE Coatings*, 4, 670-686.
- 31) Tang, J., Wang, Y., Li, J., Da, P., Geng, J. & Zheng, G. (2004). Sensitive enzymatic glucose detection by TiO₂ nanowire photoelectrochemical biosensors. *Journal of Materials Chemistry A*, 2, 6153–6157.
- 32) Delfino, I., Portaccio, M., Ventura, B.D., Mita, D.G., & Lepore, M. (2013). Enzyme distribution and secondary structure of sol-gel immobilized glucose oxidase by micro-attenuated total reflection FT-IR spectroscopy. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 33 1, 304-10.