

TESIS DOCTORAL

---

# Plataformas sensoras soportadas en hidrogeles para aplicación biomédica y medioambiental

---

**Yolanda Inmaculada Alacid Martínez**

Elche, 2023

Directora:

**Dra. María José Martínez Tomé**

Codirectora:

**Dra. Carmen Reyes Mateo Martínez**



Universidad Miguel Hernández de Elche

*Programa de Doctorado en Biotecnología Sanitaria*





La presente Tesis Doctoral, titulada “**Plataformas sensoras soportadas en hidrogeles para aplicación biomédica y medioambiental**”, se presenta bajo la modalidad de **Tesis por Compendio** de las siguientes Publicaciones incluidas en el *Journal Citation Report (JCR)* y recopiladas en el Anexo I:

- **Yolanda Alacid**, María José Martínez-Tomé, C. Reyes Mateo. *Reusable Fluorescent Nanobiosensor Integrated in a Multiwell Plate for Screening and Quantification of Antidiabetic Drugs*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(22), 25624-25634. doi: 10.1021/acsami.1c02505. Factor de impacto: 10.383.
- **Yolanda Alacid**, Rocío Esquembre, Francisco Montilla, María José Martínez-Tomé, C. Reyes Mateo. *Fluorescent Nanocomposite Hydrogels Based on Conjugated Polymer Nanoparticles as Platforms for Alkaline Phosphatase Detection*. *Biosensors*, 2023, 13(3), 408. doi: 10.3390/bios13030408. Factor de impacto: 5.4.
- **Yolanda Alacid**, María José Martínez-Tomé, Rocío Esquembre, M. Antonia Herrero, C. Reyes Mateo. *Portable Alkaline Phosphatase-Hydrogel Platform: From Enzyme Characterization to Phosphate Sensing*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3), 2672. doi: 10.3390/ijms24032672. Factor de impacto: 5.6.
- **Yolanda Alacid**, Andrés F. Quintero Jaime, María José Martínez-Tomé, C. Reyes Mateo, Francisco Montilla. *Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels*. *Biosensors*, 2022, 12(9), 698. doi: 10.3390/bios12090698. Factor de impacto: 5.4.





La Dra. Dña. María José Martínez Tomé, directora, y la Dra. Dña. Carmen Reyes Mateo Martínez, codirectora de la Tesis Doctoral titulada **“Plataformas sensoras soportadas en hidrogeles para aplicación biomédica y medioambiental”**

**INFORMAN:**

Que Dña. Yolanda Inmaculada Alacid Martínez ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Plataformas sensoras soportadas en hidrogeles para aplicación biomédica y medioambiental”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como Tesis Doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Elche a                    de                    de 2023.

**Dra. Dña. María José Martínez Tomé**  
Directora de la Tesis Doctoral

**Dra. Dña. C. Reyes Mateo Martínez**  
Codirectora de la Tesis Doctoral





La Dra. Dña. Asia Fernández Carvajal, Coordinadora del Programa de Doctorado en Biotecnología Sanitaria del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE)

**INFORMA:**

Que Dña. Yolanda Inmaculada Alacid Martínez ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“Plataformas sensoras soportadas en hidrogeles para aplicación biomédica y medioambiental”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como Tesis Doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Elche a            de            de 2023.

**Dra. Dña. Asia Fernández Carvajal**  
Coordinadora del Programa de Doctorado  
en Biotecnología Sanitaria







La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) y su realización ha sido posible gracias a los fondos del proyecto de I+D+i, identificado como MAT-2017-86805-R, dentro del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación concedido por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad y la Agencia Estatal de Investigación.

Asimismo, este trabajo también ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España (TED2021-129894B-I00). El estudio forma parte del programa de Materiales Avanzados y ha contado con el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN) con fondos de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y la Generalitat Valenciana (MFA/2022/058). La adquisición de los equipos DLS, FESEM y el espectrómetro de tiempo de vida de fluorescencia ha sido financiada por la Generalitat Valenciana - Conselleria d'Educació Investigació Cultura i Esport y EUFEDER "Una forma de hacer Europa" (GVA-IDIFEDER/2018/020 y GVA-IDIFEDER/2021/036).



*A mis padres*

*A mis abuelos*

*A mi hermana*

*A Fran*



*“Para un investigador,  
los momentos inolvidables de su vida  
son aquellos que se producen después de unos años de trabajo incansable,  
cuando, de repente, el velo que cubre los secretos de la naturaleza desaparece  
y la oscuridad y el caos dan paso a una claridad luminosa”*

Gerty Cori



# Índice

<b>Abreviaturas y acrónimos</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Introducción General</b> .....	<b>9</b>
1.1. Plataformas de detección.....	11
1.2. Sensores y biosensores.....	12
1.3. El elemento de reconocimiento .....	15
1.3.1. Biosensores enzimáticos .....	16
1.3.2. Biosensores de inhibición .....	17
1.4. El transductor.....	25
1.4.1. Biosensores enzimáticos ópticos.....	26
1.4.2. Biosensores enzimáticos electroquímicos .....	29
1.5. Inmovilización enzimática .....	31
1.5.1. Hidrogeles inorgánicos (matrices sol-gel).....	33
1.5.2. Hidrogeles orgánicos .....	36
1.5.3. Hidrogeles nanocompuestos.....	43
1.6. Nanopartículas fluorescentes .....	45
1.6.1. Polímeros conjugados .....	45
1.6.2. Nanopartículas basadas en polímeros conjugados.....	49
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>53</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	<b>57</b>
3.1. Materiales .....	59

3.1.1. Fosfolípidos y detergentes .....	59
3.1.2. Enzimas.....	59
3.1.3. Sustratos, productos e inhibidores enzimáticos.....	60
3.1.4. Polímeros conjugados .....	61
3.1.5. Precursores de sol-gel e hidrogeles orgánicos.....	61
3.1.6. Otros reactivos .....	62
3.2. Métodos de preparación.....	62
3.2.1. Preparación de CPNs .....	62
3.2.2. Métodos de inmovilización de nanopartículas y enzimas .....	64
3.2.2.1. Hidrogeles inorgánicos (matrices sol-gel).....	64
3.2.2.2. Hidrogeles orgánicos entrecruzados químicamente .....	66
3.2.3. Modificación de electrodos de carbono.....	68
3.3. Métodos de caracterización.....	69
3.3.1. Grado de hinchamiento de los hidrogeles .....	69
3.3.2. Métodos espectroscópicos.....	70
3.3.2.1. Métodos de absorción .....	70
3.3.2.2. Métodos de fluorescencia .....	71
3.3.3. Métodos de caracterización de tamaño, carga y morfología.....	76
3.3.3.1. Dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial zeta.....	76
3.3.3.2. Microscopía electrónica .....	78
3.3.3.3. Microscopía confocal fluorescente .....	79
3.3.4. Métodos electroquímicos.....	80
<b>4. Resultados y Discusión .....</b>	<b>83</b>
4.1. Caracterización de nanopartículas basadas en CPs.....	87
4.1.1. CPNs basadas en liposomas (L-CPNs).....	87
4.1.2. CPNs basadas en detergentes .....	87



4.2. Desarrollo de plataformas fluorescentes basadas en CPNs .....	89
4.2.1. Desarrollo de un biosensor fluorescente para el cribado de fármacos antidiabéticos .....	90
4.2.1.1. Estudio en disolución de los componentes del nanobiosensor.....	90
4.2.1.2. Inmovilización de los componentes del nanobiosensor .....	91
4.2.1.3. Aplicaciones del nanobiosensor multimuestra .....	94
4.2.2. Desarrollo de un sensor fluorescente para la detección de ALP .....	95
4.2.2.1. Inmovilización de CPNs en hidrogeles AETA .....	95
4.2.2.2. Grado de hinchamiento de hidrogeles nanocompuestos .....	96
4.2.2.3. Propiedades fluorescentes de hidrogeles PFO@AETA y F8BT@AETA .....	96
4.2.2.4. Almacenamiento de hidrogeles PFO@AETA .....	98
4.2.2.5. Aplicación: detección de fosfatasa alcalina.....	99
4.3. Desarrollo de plataformas biosensoras para la detección de fosfato .....	100
4.3.1. Desarrollo de un biosensor colorimétrico para la detección de fosfato.....	101
4.3.1.1. Inmovilización de ALP en hidrogeles de AETA .....	102
4.3.1.2. Estudios de hinchamiento de hidrogeles ALP@AETA .....	102
4.3.1.3. Actividad y estabilidad conformacional de la proteína en el hidrogel.....	103
4.3.1.4. Aplicación: detección de fosfato.....	106
4.3.2. Desarrollo de un biosensor electroquímico para la detección de fosfato .....	107
4.3.2.1. Caracterización electroquímica de electrodos modificados con hidrogel.....	107
4.3.2.2. Aplicación: detección de fosfato.....	109
<b>5. Conclusiones Generales.....</b>	<b>111</b>
<b>6. Referencias.....</b>	<b>115</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>139</b>
Artículo 7.1. ....	141
Artículo 7.2. ....	161

Artículo 7.3.....	183
Artículo 7.4.....	203
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>217</b>

# Abreviaturas y acrónimos

< $\tau$ >	Vida media promedio
< $\nu$ >	Energía promedio de emisión
<b>A</b>	Actividad enzimática
<b>AETA</b>	Cloruro de [2-(acrilóiloxi)etil]trimetilamonio
<b>AGI</b>	Inhibidor de $\alpha$ -glucosidasa
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>C<sub>i</sub></b>	Concentración de inhibidor
<b>CPEs</b>	Polielectrolitos conjugados
<b>CPNs</b>	Nanopartículas basadas en polímeros conjugados
<b>CPs</b>	Polímeros conjugados
<b>CV</b>	Voltamperometría cíclica
<b>d</b>	Diámetro hidrodinámico
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de la luz
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b><math>\epsilon</math></b>	Coefficiente de extinción
<b>E</b>	Potencial aplicado
<b>E<sub>lower</sub></b>	Potencial inferior
<b>E<sub>upper</sub></b>	Potencial superior
<b>F8BT</b>	Poli[9,9-dioctilfluoreno-alt-benzotiadiazol]
<b>FESEM</b>	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
<b>FRET</b>	Transferencia de energía por resonancia de Förster
<b>Hidrogel ALP@AETA</b>	Hidrogel con fosfatasa alcalina inmovilizada
<b>Hidrogel F8BT@AETA</b>	Hidrogel nanocompuesto con CPNs de F8BT
<b>Hidrogel IPN</b>	Hidrogel multinterpenetrante
<b>Hidrogel PFO@AETA</b>	Hidrogel nanocompuesto con CPNs de PFO
<b>HQ</b>	Hidroquinona
<b>HQ2P</b>	Difosfato hidroquinona

<b>HTMA-PFP</b>	Bromuro de poli {[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]fluoreno-fenileno}
<i>i</i>	Corriente
<b>I</b>	Intensidad de fluorescencia
<b>IC</b>	Corriente de inhibición
<i>i<sub>p</sub></i>	Intensidad de pico
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>K<sub>SV</sub></b>	Constante de Stern-Volmer
<b>L-CPNs</b>	Nanopartículas de polímeros conjugados basadas en liposomas
<b>LiTPO</b>	Fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio
<i>λ<sub>m</sub></i>	Longitud de onda de emisión
<b>LOC</b>	Límite de cuantificación
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOL</b>	Límite de linealidad
<b>LUVs</b>	Vesículas unilamelares grandes
<i>λ<sub>x</sub></i>	Longitud de onda de excitación
<b>MBA</b>	N-N'-metilen-bis(acrilamida)
<b>MLVs</b>	Vesículas multilamelares
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>PC</b>	L-α-fosfatidilcolina
<b>PET</b>	Transferencia de electrones fotoinducida
<b>PF</b>	Polifluoreno
<b>PFO</b>	Poli(9,9'-dioctilfluoreno)
<b>PG</b>	L-α-fosfatidilglicerol (sal de sodio)
<b>PIT</b>	Transferencia de carga inducida
<b>PNP</b>	<i>p</i> -nitrofenol
<b>PNPG</b>	<i>p</i> -nitrofenil-α-D-glucopiranosido
<b>PNPP</b>	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
<b>Q</b>	Desactivador o <i>quencher</i>
<b>QDs</b>	Puntos cuánticos o <i>quantum dots</i>

<b>S</b>	Sensibilidad
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido
<b>SPE</b>	Electrodo serigrafiado
<b>SW</b>	Grado de hinchamiento o <i>swelling</i>
<b>TEM</b>	Microscopio electrónico de transmisión
<b>TEOS</b>	Tetraetilo ortosilicato
<b>ZP</b>	Potencial zeta



# Resumen

En esta Tesis Doctoral, se lleva a cabo el desarrollo y caracterización de nuevas plataformas sensoras con aplicaciones en los campos biomédico y medioambiental. Estas plataformas se fundamentan en la integración de hidrogeles, tanto inorgánicos como orgánicos, que actúan como matrices de soporte y que incorporan enzimas y/o nanopartículas (NPs) fluorescentes basadas en polifluorenos en una única entidad, dando lugar a diversos dispositivos analíticos.

En primer lugar, se aborda el desarrollo de un biosensor fluorescente altamente estable y reutilizable diseñado para la detección y cuantificación de inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, una de las principales dianas en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Esta plataforma se logra mediante la inmovilización conjunta de dicha enzima y NPs basadas en polielectrolitos conjugados, combinadas con vesículas lipídicas, en matrices sol-gel.

En segundo lugar, se desarrolla un sensor portátil de uso sencillo para la detección de la enzima hidrolasa fosfatasa alcalina (ALP), utilizando hidrogeles orgánicos nanocompuestos con propiedades fluorescentes, sintetizados de manera sostenible. Tales hidrogeles se obtienen, por primera vez, mediante la incorporación de NPs basadas en polifluorenos neutros con diferentes bandas de emisión. Este material demuestra un gran potencial para cuantificar niveles fisiológicos de ALP, así como su actividad en muestras ambientales.

Por otro lado, se presenta un biosensor con un transductor colorimétrico, donde la enzima ALP se incorpora en los mismos hidrogeles orgánicos. Estos materiales transparentes modificados con ALP pueden almacenarse como xerogeles a temperatura ambiente, dando lugar así a una plataforma desechable para la rápida detección de inhibidores de ALP, en concreto, se utiliza para la detección de fosfato en agua.

Finalmente, se desarrolla un biosensor de inhibición portátil y de fácil uso basado en un transductor electroquímico que emplea la misma enzima, ALP, inmovilizada en hidrogeles orgánicos depositados en la superficie de electrodos serigrafiados de carbono desechables. Como prueba de concepto, el dispositivo se ha optimizado para permitir la detección *in situ* y en tiempo real de iones fosfato en medio acuoso.





# Abstract

In this Doctoral Thesis, the development and characterization of novel sensor platforms with applications in the biomedical and environmental fields are undertaken. These platforms are based on the integration of hydrogels, both inorganic and organic, serving as support matrices that incorporate enzymes and/or fluorescent nanoparticles (NPs) based on polyfluorenes into a single entity, giving rise to various analytical devices.

Firstly, the development of a highly stable and reusable fluorescent biosensor designed for the detection and quantification of  $\alpha$ -glucosidase enzyme inhibitors, a key target in the treatment of type 2 diabetes, is addressed. This platform is achieved through the simultaneous incorporation of this enzyme and conjugated polyelectrolyte-based NPs, combined with lipid vesicles, in sol-gel matrices.

Secondly, a user-friendly portable sensor is developed for the detection of the alkaline phosphatase (ALP) enzyme using sustainably synthesized organic nanocomposite hydrogels with fluorescent properties. These hydrogels are obtained, for the first time, by incorporating NPs based on neutral polyfluorenes with different emission bands. This material demonstrates great potential for quantifying physiological levels of ALP and assessing its activity in environmental samples.

Furthermore, a biosensor with a colorimetric transducer is introduced, where the ALP enzyme is incorporated into the same organic hydrogels. These transparent materials modified with ALP can be stored as xerogels at room temperature, thus creating a disposable platform for the rapid detection of ALP inhibitors, specifically used for phosphate detection in water.

Finally, a portable and easy-to-use inhibition biosensor is developed based on an electrochemical transducer that employs the same enzyme, ALP, immobilized in organic hydrogels deposited on the surface of disposable carbon screen-printed electrodes. As a proof of concept, the device has been optimized to allow for real-time, on-site detection of phosphate ions in aqueous media.



# 1. Introducción General



## 1.1. Plataformas de detección

La detección y el diagnóstico precisos desempeñan un papel fundamental en diversos campos, como la medicina, la industria, la defensa y la protección del medio ambiente. En los últimos años, los sensores y biosensores han experimentado un gran avance, convirtiéndose en herramientas analíticas y de diagnóstico ampliamente utilizados que han mejorado significativamente la vida diaria del ser humano.

Estos dispositivos se caracterizan por su simplicidad operativa, bajo coste y accesibilidad, lo que los hace adecuados para diversos usuarios sin requerir habilidades especializadas. Su impacto se ha extendido a través de una amplia gama de aplicaciones, gracias a la colaboración sinérgica entre diferentes disciplinas científicas. Esta convergencia ha revelado el gran potencial comercial de esta tecnología y ha demostrado cómo la nanotecnología y la biotecnología pueden estar estrechamente interconectadas, impulsando así su desarrollo y aplicaciones comerciales [1].

En particular, la reciente pandemia de COVID-19, una enfermedad infecciosa causada por el SARS-CoV-2 (Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2), ha resaltado la importancia de los biosensores en la detección diagnóstica de biomarcadores específicos de este virus [2]. Estos dispositivos permiten convertir la presencia o concentración de analitos en señales reconocibles, como corriente eléctrica, fluorescencia o cambios de color, facilitando la detección rápida y precisa de las dianas deseadas en diversos tipos de muestras, incluyendo muestras clínicas y ambientales [3].

El creciente aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas, como el cáncer, la diabetes o el asma, ha impulsado la investigación en biosensores, especialmente en el ámbito de la atención sanitaria individualizada y los diagnósticos en el punto de atención [4]. Estos dispositivos se han vuelto ubicuos en el campo de la salud, encontrándose dispersos en la investigación biomédica y la práctica clínica. La detección rápida y precisa de bioanalitos, como biomarcadores moleculares asociados a enfermedades, mediadores de inflamación, pequeños metabolitos, neurotransmisores, hormonas, enzimas, entre otros, no solo contribuye al conocimiento básico de la enfermedad, sino también a la prevención, diagnóstico y control de enfermedades

infecciosas, así como al diseño de fármacos efectivos, permitiendo brindar una atención óptima a los pacientes [4,5].

Además de su impacto en el ámbito de la salud, los biosensores han encontrado aplicaciones en otras áreas, como la industria alimentaria. Los biosensores *in situ* pueden controlar la calidad de los alimentos y prevenir una posible contaminación mediante la detección de microorganismos patógenos, toxinas de diferente origen, antioxidantes, conservantes y otros productos químicos potencialmente peligrosos [6]. Asimismo, estos dispositivos son valiosas herramientas para el seguimiento de contaminantes ambientales y moléculas tóxicas (que van desde pesticidas y herbicidas hasta compuestos aromáticos e iones metálicos) dispersos en el aire, el agua y el suelo [7,8].

## 1.2. Sensores y biosensores

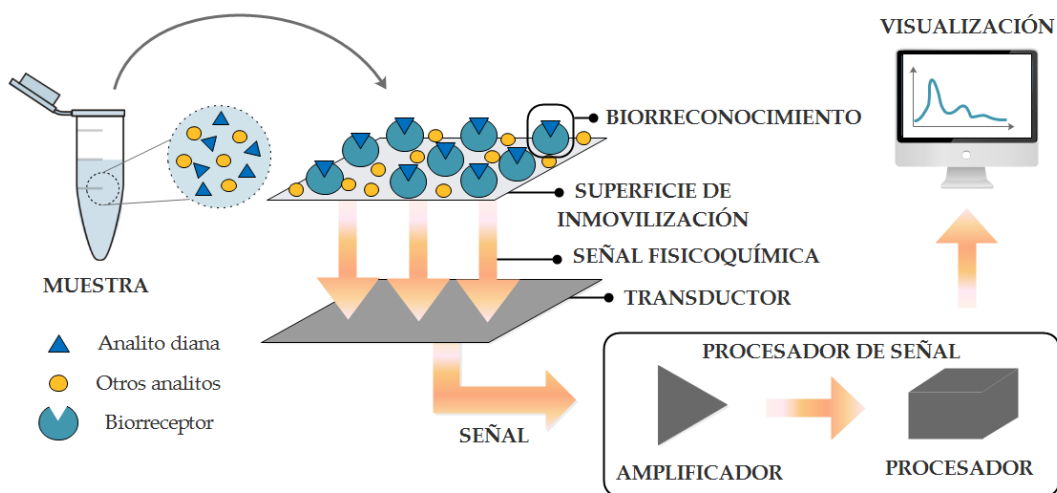
Un sensor se define como un dispositivo capaz de recibir una señal o estímulo físico, químico o biológico y convertirlo en una señal de salida funcionalmente relacionada, que puede ser detectada tanto por instrumentos electrónicos como por usuarios humanos [9].

Los sensores pueden clasificarse en dos categorías, en función del tipo de información que reciben: a) sensores físicos, que detectan y/o miden respuestas físicas tales como la distancia, campo magnético, presión, temperatura, fuerza, o índice de refracción, y b) sensores químicos que obtienen información a partir de un evento de reconocimiento específico entre un elemento químico y una especie, generalmente la especie (analito) a medir. Tal información es transformada en señales analíticas, como cambios de conductancia, luz, voltaje, corriente o sonido, proporcionales a la concentración del analito [10].

Dentro de los sensores químicos, se encuentra la subclase de biosensores, en los que el reconocimiento molecular lo lleva a cabo un elemento biológico [9,10]. Según la definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), “un biosensor es un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico, o biomimético, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico, que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la

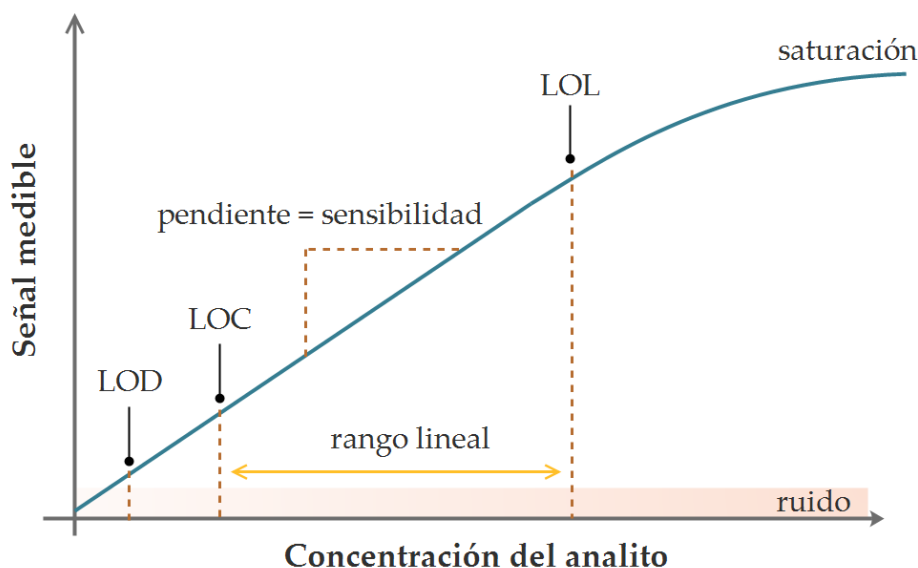
cantidad presente del mismo" [11]. Este dispositivo consta de al menos tres componentes (Figura 1.1):

- Un elemento biológico o biorreceptor, que generalmente es una biomolécula (enzima, anticuerpo, ácido nucleico, receptor celular, etc.), cuyas características estructurales y funcionales dan especificidad al reconocimiento. Este elemento debe estar inmovilizado para facilitar su acoplamiento con el transductor [9].
- Un transductor, cuya función es convertir el evento de biorreconocimiento en una señal eléctrica cuantificable, proporcional a la concentración del analito, y que determina la sensibilidad de la medida. Los transductores pueden ser de varios tipos, incluyendo ópticos, electroquímicos, mecánicos o térmicos, entre otros.
- Un sistema electrónico que comprende un amplificador, un procesador y una unidad de visualización, que procesa y visualiza la señal de manera fácil de usar.



**Figura 1.1.** Principales componentes de un biosensor y su principio básico de funcionamiento.

El uso de biosensores elimina en gran parte la necesidad de preparación de la muestra, lo que simplifica y agiliza el proceso de análisis. Para evaluar el rendimiento de estos dispositivos, se utilizan distintos parámetros como la sensibilidad, el límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOC), límite de linealidad (LOL) y el rango lineal [9,10]. Estos parámetros se pueden determinar experimentalmente a partir de la representación gráfica de la señal medida en función de la concentración del analito, como se muestra en la Figura 1.2.



**Figura 1.2.** Representación gráfica de los parámetros LOD, LOC, LOL, rango lineal y sensibilidad, empleados para determinar el rendimiento de una plataforma sensora.

El rango lineal se refiere al intervalo de concentraciones o cantidades del analito en el cual el biosensor proporciona una respuesta lineal y proporcional a la concentración, ajustándose a una recta definida por la Ecuación 1.1:

$$\text{Señal medida} = A + S \cdot C_A \quad (1.1)$$

donde A es la ordenada en el origen, S es la pendiente de la recta y  $C_A$  la concentración del analito. El valor de S es la sensibilidad del método e informa de la respuesta del sensor ante cambios en la concentración del analito. Una mayor sensibilidad implica que el sensor puede detectar cambios más pequeños y, por lo tanto, es más preciso.

El LOL es el nivel máximo de concentración o cantidad de analito en el cual el método o técnica de análisis mantiene una respuesta lineal.

El LOD se define como la concentración o cantidad mínima de analito que el sensor puede detectar de manera confiable por encima del nivel de incertidumbre del método utilizado, y se calcula a partir de S utilizando la Ecuación 1.2:

$$\text{LOD} = C_{bi} + k \cdot \sigma \cdot 1/S \quad (1.2)$$

donde  $C_{bi}$  es la concentración de analito de la muestra blanco (generalmente, cero),  $\sigma$  es la desviación estándar de las medidas de la muestra blanco, y k es un factor numérico



de acuerdo con el nivel de confianza deseado (su valor es 3 para un nivel de confianza del 90%).

A diferencia del LOD, el LOC implica no solo la detección de la sustancia, sino también la capacidad de realizar mediciones cuantitativas con una precisión y exactitud aceptables por encima del ruido de fondo. Su valor es entre 3 y 10 veces el LOD, dependiendo de las exigencias de incertidumbre.

Además de estos parámetros, también se consideran otros aspectos como la reproducibilidad o precisión de los resultados, la selectividad del dispositivo frente a interferencias, el tiempo de respuesta del sensor, la estabilidad operativa y de almacenamiento, la facilidad de uso y la portabilidad. Lo ideal es que el sistema de detección sea regenerable para poder realizar varias mediciones consecutivas [10]. En muchas aplicaciones clínicas, alimentarias, medioambientales y de defensa nacional, el sensor debe ser capaz de monitorizar continuamente el analito en línea. Sin embargo, los biosensores desechables y de un solo uso son satisfactorios para algunas aplicaciones, como el control personal de glucosa en sangre por parte de los diabéticos [12] o, en estos últimos años, la detección de COVID-19 mediante test de antígenos.

### 1.3. El elemento de reconocimiento

El biorreceptor representa el elemento clave del biosensor, respondiendo únicamente a un analito en particular y no a las interferencias eventualmente presentes en la muestra analizada [13]. Esto ocurre gracias al fenómeno de reconocimiento molecular mediante el cual un receptor reconoce e identifica una especie química a través de un conjunto de interacciones moleculares, no covalentes, estructuralmente muy bien definidas. La especificidad del proceso se basa en la complementariedad estructural y funcional entre ambos, receptor y especie química. Este fenómeno sucede de forma espontánea en la naturaleza y es el punto de partida de numerosos procesos biológicos, tales como los sistemas enzima-sustrato y antígeno-anticuerpo, las hormonas o los neurotransmisores [14].

Basándose en la naturaleza del reconocimiento molecular y en el papel que juega en la detección del analito, es posible clasificar a los biosensores en dos categorías [15]:

- **Biosensores catalíticos:** Incorporan enzimas, tejidos y células, con el fin de reconocer y transformar el analito, que inicialmente no puede medirse, en un producto que es detectado por un transductor. Por tanto, se utiliza el reconocimiento molecular para mediar en una reacción química. A esta categoría pertenecen los biosensores de glucosa, que históricamente fueron los primeros en desarrollarse y, actualmente, son los que más se comercializan [16].

- **Biosensores de afinidad:** Emplean anticuerpos, aptámeros, polímeros de impresión molecular, ácidos nucleicos o receptores de membrana como elementos de reconocimiento y se basan en la interacción de afinidad específica del analito con macromoléculas o estructuras moleculares complejas, sin que tenga lugar ninguna transformación química en la sustancia a determinar. El propio reconocimiento molecular induce un cambio en el sistema que puede ser detectado por el transductor. Dentro de esta categoría se encuentran los biosensores desarrollados actualmente para la detección de COVID-19.

Durante este trabajo de Tesis Doctoral se ha trabajado con biosensores de tipo catalítico, en concreto con biosensores enzimáticos, por lo que a continuación se explicará la base de los mismos y su funcionamiento en mayor detalle.

### 1.3.1. Biosensores enzimáticos

Las enzimas son macromoléculas biológicas que exhiben actividad catalítica, alta selectividad y son responsables de acelerar reacciones bioquímicas en condiciones suaves [17]. Estas macromoléculas se unen específicamente a ciertas moléculas (sustratos), garantizando así la selectividad del proceso. Su capacidad de biorreconocimiento excepcional y sus propiedades catalíticas extraordinarias, hacen que los biosensores basados en enzimas sean ideales para la monitorización rápida, precisa y continua de analitos [18]. Además, la acción catalítica puede verse influida por factores como la concentración de sustrato, la temperatura, el pH y la presencia de inhibidores, lo que extiende las capacidades de estos dispositivos a la detección de compuestos capaces de modular la actividad enzimática [19,20].

En los biosensores enzimáticos la enzima consume sustrato o analito junto con un co-sustrato (si lo hay) y genera producto(s). La respuesta del biosensor se obtiene midiendo el consumo de co-sustrato o la formación de productos. Esto se conoce como detección directa de analitos y es la forma más habitual de funcionamiento de los biosensores enzimáticos [21]. El ejemplo más conocido de este tipo de biosensores es el biosensor de glucosa, que utiliza la enzima glucosa oxidasa para detectar el metabolito en sangre, bien a partir del consumo de  $O_2$  o bien a partir de la formación de  $H_2O_2$  [16]. Por otro lado, la detección indirecta se refiere a la evaluación de sustancias que interactúan específicamente con la enzima y modifican sus propiedades biocatalíticas. Estos compuestos son generalmente inhibidores que se unen a la enzima o al complejo enzima-sustrato e interfieren con las reacciones enzimáticas. La detección indirecta aumenta la sensibilidad del biosensor, ya que la mayoría de las enzimas son susceptibles a una concentración muy baja de inhibidor [21]. La detección de pesticidas en aguas, basada en la inhibición de la actividad catalítica de la enzima acetilcolinesterasa, es una aplicación de este segundo tipo de biosensores. Esta enzima cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en el correspondiente ácido orgánico y alcohol. El acoplamiento de la enzima a un transductor óptico o electroquímico permite medir el cambio de pH resultante del proceso de hidrólisis, de forma que se puede detectar de forma sencilla la presencia de cualquier sustancia que inhiba este proceso [22].

En esta Tesis Doctoral los biosensores que se han desarrollado se han basado fundamentalmente en procesos de inhibición, siendo el inhibidor y no el sustrato, el analito a detectar. A este tipo de biosensores enzimáticos se le denomina biosensores de inhibición.

### 1.3.2. Biosensores de inhibición

Es ampliamente conocido que ciertos compuestos, entre los que se incluyen iones metálicos, pesticidas, medicamentos y productos farmacéuticos, pueden inhibir la actividad de diferentes enzimas. Algunos de estos compuestos son considerados tóxicos, mientras que otros juegan un papel fundamental en la regulación de la actividad enzimática en diversas rutas biológicas [23]. Dado el interés analítico que suscitan la mayoría de estos compuestos, es posible desarrollar biosensores que operan según el

principio de inhibición [23-27]. De hecho, se han diseñado diversos biosensores basados en inhibición enzimática, en su mayoría utilizando enzimas como la acetilcolinesterasa [28], la peroxidasa [29] o la tirosinasa [30].

La inhibición enzimática ocurre cuando una molécula inhibitoria específica interactúa con una enzima de manera que afecta a sus grupos funcionales y/o centros activos, suprimiendo o anulando su actividad catalítica normal.

Existen diferentes tipos de inhibición que pueden operar en los biosensores enzimáticos dependiendo de si la actividad catalítica de la enzima puede o no ser restaurada después de la exposición al inhibidor [31]. La inhibición irreversible implica la unión covalente del inhibidor al centro activo de la enzima, lo que impide que la actividad enzimática se recupere incluso después de eliminar el inhibidor. Estos biosensores se denominan “biosensores de inhibición de un solo uso”[21].

Por otro lado, la inhibición enzimática reversible se caracteriza por una alta tasa de asociación y disociación entre el inhibidor y la enzima diana. Esto significa que cuando se elimina el inhibidor, la enzima puede recuperar su actividad original, lo que permite la reutilización del dispositivo [31].

La inhibición reversible puede subdividirse en varios subtipos, como la competitiva, no competitiva, incompetitiva y mixta, que dependen de los mecanismos de unión de los inhibidores a las enzimas y los sustratos [23]. La Tabla 1.1 muestra un resumen del comportamiento característico de cada tipo de inhibidor [21].

**Tabla 1.1.** Comparación de los diferentes mecanismos de unión de inhibidores.

Tipo de inhibidor	<i>Sitio de unión</i>
<b>Competitivo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El inhibidor se une competitivamente al sitio de unión del sustrato de la enzima, es decir, al centro activo, debido a su gran similitud estructural con el sustrato.</li> </ul>
<b>No-competitivo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El inhibidor se une simultáneamente a un sitio en la enzima que es completamente diferente al centro activo, sin competir entre sí.</li> </ul>

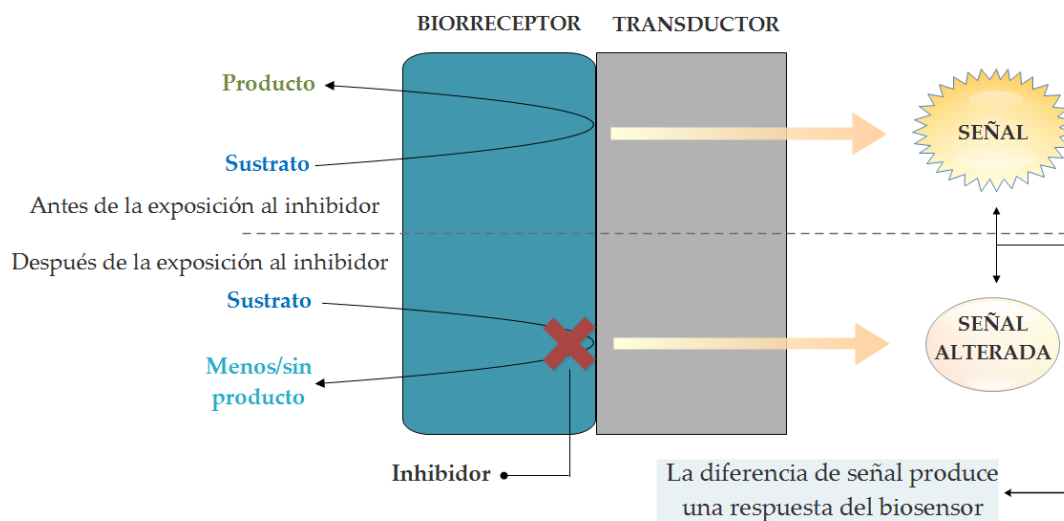
**Incompetitivo**

- El inhibidor no se une a la enzima libre ni afecta a la unión al sustrato, sino que lo hace con el complejo de enzima-sustrato (ES).

**Mixto**

- Inhibición no competitiva que ocurre simultáneamente con la inhibición competitiva o incompetitiva

El principio de funcionamiento de un biosensor enzimático de inhibición, representado de manera esquemática en la **Figura 1.3**, se basa en la detección de la actividad enzimática y cómo esta se ve afectada por la presencia de un inhibidor. La enzima, normalmente inmovilizada en el biosensor, cataliza la reacción en presencia del sustrato, en la que se genera un producto medible y una señal de salida proporcional a la actividad enzimática inicial. Sin embargo, cuando un inhibidor está presente, interactúa con la enzima y modifica su actividad, inhibiendo parcial o completamente la reacción enzimática. Esta inhibición se traduce en una disminución de la señal de salida del biosensor.



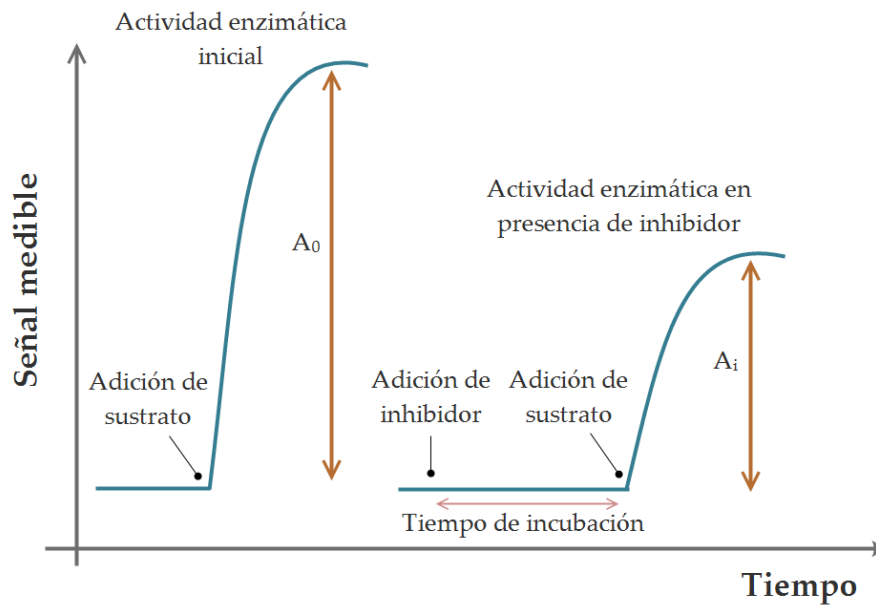
**Figura 1.3.** Representación esquemática del principio de funcionamiento de biosensores basados en inhibición.

El protocolo para determinar inhibición enzimática generalmente implica dos medidas diferentes, como se muestra en la **Figura 1.4**. En primer lugar, se realiza una medición en ausencia de inhibidor, donde se registra la actividad enzimática inicial ( $A_0$ ) en una solución de trabajo tras la adición del sustrato. Luego, se realiza otra medición en presencia de inhibidor en una nueva solución de trabajo. Antes de esta segunda medida,

se lleva a cabo un período de incubación en el cual ocurren las interacciones entre el inhibidor y la enzima. Después del periodo de incubación, se añade el sustrato y se registra nuevamente la actividad enzimática, lo que se considera como actividad residual ( $A_i$ ) [24,32].

El grado de inhibición se puede determinar a partir de los valores de  $A_0$  e  $A_i$ , de acuerdo con la Ecuación 1.3:

$$\% \text{ Inhibición} = (A_0 - A_i) / A_0 * 100 \quad (1.3)$$

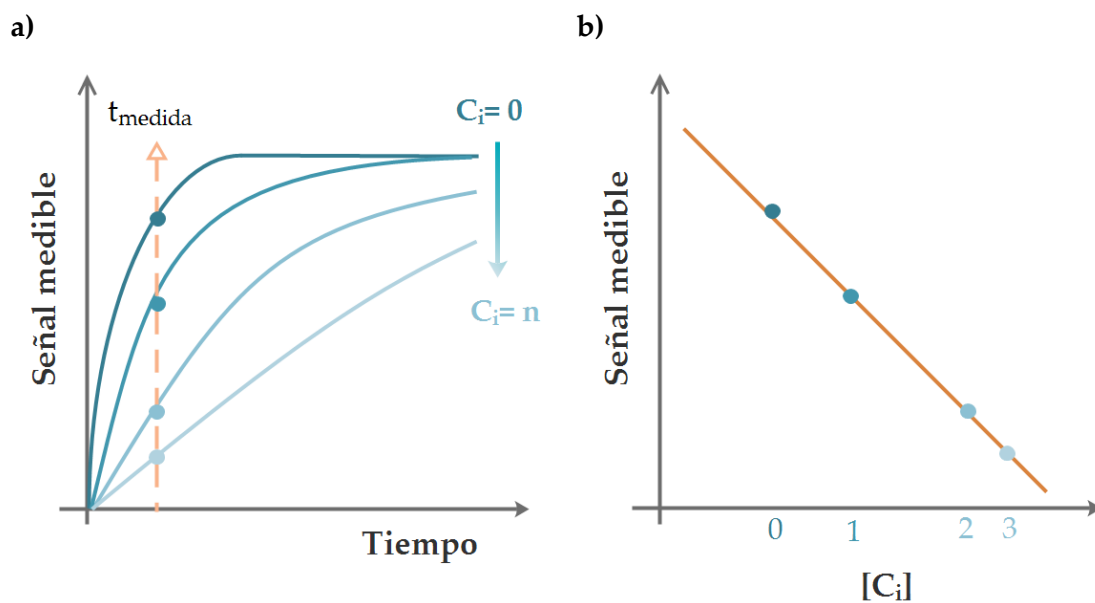


**Figura 1.4.** Protocolo de detección de inhibidores utilizando biosensores basados en la inhibición enzimática.

Los biosensores de inhibición utilizan este enfoque para determinar la concentración de inhibidor a partir de dos experimentos distintos, que permiten la construcción de una curva de calibrado. En una primera etapa, se realiza un experimento en el que se registra la cinética de actividad a una concentración fija de sustrato y concentraciones crecientes de inhibidor. Esto proporciona una gráfica que muestra cómo la concentración de inhibidor ( $C_i$ ) modula la actividad enzimática en función del tiempo (Figura 1.5a). A partir de esta representación, se selecciona el tiempo en el que se detecta el efecto de la concentración de inhibidor con mayor sensibilidad. Este tiempo es aquel

en que la señal de actividad enzimática muestra la mayor diferencia entre las diferentes concentraciones de inhibidor.

En una segunda etapa, se utilizan los datos de la gráfica anterior para construir la recta de calibrado del biosensor, representando la señal medible frente a distintas concentraciones conocidas de inhibidor (Figura 1.5b). Esto permite establecer una relación entre la señal medida y la concentración de inhibidor en la muestra, facilitando la determinación cuantitativa de la concentración de inhibidor en muestras desconocidas.



**Figura 1.5.** a) Evolución de la cinética enzimática en ausencia ( $C_i = 0$ ) y presencia de concentraciones crecientes de inhibidor ( $C_i = n$ ) a una concentración fija de sustrato. b) Curva de calibrado, obtenida a partir del gráfico a), para la determinación de un inhibidor.

Los biosensores de inhibición no solo se utilizan para determinar la concentración de inhibidores, sino que también tienen aplicaciones en la identificación de nuevos compuestos con capacidad inhibitoria. Este último aspecto es especialmente útil en la búsqueda de nuevos fármacos que puedan actuar sobre determinadas dianas enzimáticas que estén implicadas en diversas patologías [32-34]. En esta Tesis Doctoral se han desarrollado biosensores para ambos tipos de aplicaciones, trabajando con dos enzimas hidrolasas: la  $\alpha$ -glucosidasa y fosfatasa alcalina. A continuación, se describen las propiedades de estas enzimas.

-  *$\alpha$ -glucosidasa*

La enzima  $\alpha$ -glucosidasa (EC: 3.2.1.20) es una enzima digestiva que cataliza la hidrólisis de moléculas de  $\alpha$ -D-glucosa  $\alpha$ -(1,4)-enlazadas en el extremo terminal de los polisacáridos. Actúa específicamente sobre polisacáridos complejos y los descompone en unidades más pequeñas, como la glucosa, que puede ser absorbida y utilizada como fuente de energía metabólica en las células del organismo [35].

Esta proteína es una de las principales dianas terapéuticas para el tratamiento de la diabetes tipo 2, una enfermedad crónica que se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre. Aunque no existe una cura definitiva para la diabetes, se han desarrollado tratamientos que pueden ayudar a controlarla y reducir los riesgos asociados [36,37]. Uno de los enfoques terapéuticos más interesantes es la inhibición de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa. Como se ha mencionado, esta enzima desempeña un papel clave en la digestión de carbohidratos en el intestino, y al retrasar esta digestión se puede reducir la hiperglucemia que ocurre después de la ingesta de alimentos. Actualmente, en el mercado existen varios medicamentos clasificados como inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa (AGIs), como acarbosa, miglitol y voglibosa. Sin embargo, estos medicamentos, aunque eficientes, presentan un régimen de dosificación rigurosa e importantes efectos secundarios. Por lo tanto, hay un interés creciente en encontrar nuevos fármacos antidiabéticos con un mejor perfil farmacológico y menos incidencia de efectos secundarios [37-39].

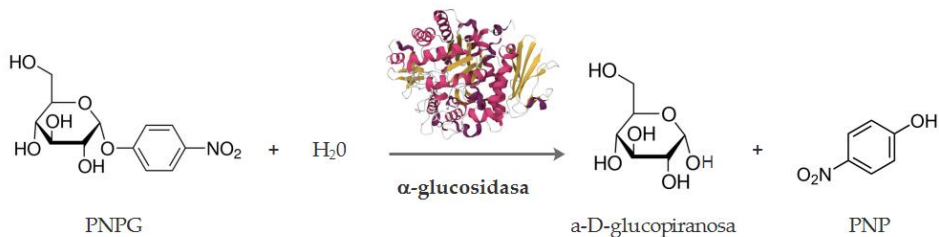
En los últimos años, se han diseñado varios biosensores basados en  $\alpha$ -glucosidasa para identificar posibles inhibidores. La mayoría de estos dispositivos utilizan transductores colorimétricos o electroquímicos [40-43]. Si bien se están explorando estrategias fluorescentes, muchos de los dispositivos actuales no son reutilizables y, además, no pueden evaluar simultáneamente varios compuestos, lo que implica un considerable coste económico y consumo de tiempo significativos [44-47].

Dentro de las  $\alpha$ -glucosidasas, la procedente de *Saccharomyces cerevisiae* es de las especies más comúnmente utilizadas para estudiar la inhibición in vitro de esta enzima por su disponibilidad comercial, de ahí que se haya seleccionada en esta Tesis Doctoral. Sin embargo, no hay una estructura tridimensional de proteína resuelta, por lo que



normalmente se utiliza un modelo homólogo basado en la estructura cristalina de la isomaltasa de *Saccharomyces cerevisiae* [35,48]. Contiene 589 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 68 kDa [49,50] y su punto isoeléctrico es 5.2, de manera que a pH fisiológico tendrá una carga neta negativa.

La actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa se puede seguir de forma sencilla utilizando sustratos que, al ser hidrolizados, se transforman en productos coloreados. Es el caso, por ejemplo, del *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (PNPG), cuya hidrólisis produce *p*-nitrofenol (PNP) (Figura 1.6), el cual presenta una banda de absorbanza específica a 405 nm a pH > 7.



**Figura 1.6.** Reacción en la que se basa el ensayo colorimétrico de actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa.

#### - Fosfatasa alcalina

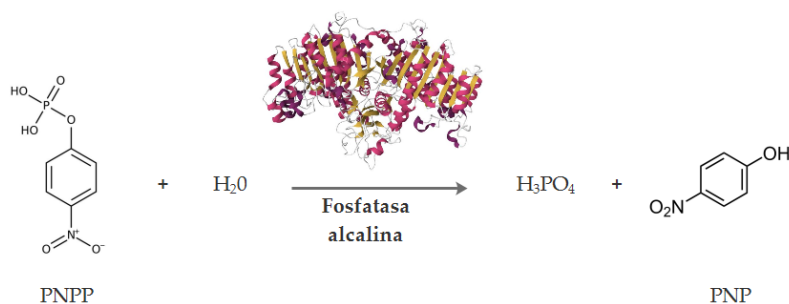
La fosfatasa alcalina (ALP) (EC: 3.1.3.1) pertenece a un amplio grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis no específica de monoésteres fosfato en medio alcalino, liberando el alcohol correspondiente y fosfato inorgánico. Su sitio activo es electrostáticamente flexible, presentando amplias superficies polares que cumplen con los requisitos necesarios para llevar a cabo la hidrólisis de una amplia variedad de sustratos. Esta flexibilidad se traduce, en consecuencia, en una baja selectividad biocatalítica [51]. Esto, sumado a su abundante presencia en la naturaleza, que se extiende desde bacterias hasta humanos, y su papel fisiológico en la desfosforilación de compuestos, ha convertido la evaluación de ALP en uno de los ensayos enzimáticos más ampliamente realizados en la actualidad [52].

Los cambios en la actividad catalítica de ALP pueden asociarse con numerosas patologías humanas, lo que hace que su detección cuantitativa sea vital desde una perspectiva clínica. En mamíferos, es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del fosfato y se encuentra en diversos tejidos y fluidos biológicos, como el hígado, el

hueso, el intestino y la placenta [53]. Además, se utiliza ampliamente en el diseño de inmunosensores y biosensores, tanto para una detección directa de analitos (sustratos) como para la detección indirecta de compuestos orgánicos e inorgánicos (por ejemplo, metales pesados, herbicidas, pesticidas, y diferentes metabolitos biológicamente activos) que actúan como inhibidores [54-58]. Este segundo enfoque es particularmente adecuado para el cribado de medicamentos o para aplicaciones ambientales cuando se necesita una evaluación rápida de la calidad del agua y una advertencia en tiempo real de la disminución de la calidad del agua.

La fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina es una metaloenzima homodimérica que consta de dos subunidades similares con 530 residuos de aminoácidos en cada cadena polipeptídica, con un peso molecular de aproximadamente 160 kDa. En la terminación, varias hélices y láminas crean un sitio activo ubicado en un bolsillo hidrofóbico que puede tener acceso al medio [59]. Cada subunidad contiene dos iones de zinc y un ion de magnesio, así como un residuo de serina fosforilable por sitio activo. Estos iones divalentes son necesarios para la catálisis y la estabilidad de la enzima [60]. Su punto isoeléctrico se encuentra en el rango de 4.8 a 5.3, de manera que a pH fisiológico tendrá una carga neta negativa.

La elección del sustrato depende principalmente del tipo de transductor utilizado. Entre los ejemplos de sustratos y estrategias de bioensayos para ALP, destacan diversas técnicas, tales como las basadas en colorimetría, fluorimetría, quimioluminiscencia y electroquímica, entre otras [61]. En el caso de los transductores ópticos, de manera similar a la  $\alpha$ -glucosidasa, la actividad de ALP puede seguirse mediante uso de sustratos como el *p*-nitrofenilfosfato (PNPP), cuya hidrólisis también conduce a la producción de PNP (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Reacción en la que se basa el ensayo colorimétrico de actividad de la ALP.

## 1.4. El transductor

Otro componente esencial de un biosensor es el transductor, que está acoplado al elemento de reconocimiento. Su función es detectar cambios en alguna de las propiedades fisicoquímicas de la muestra analizada, originados por la interacción analito-elemento de reconocimiento, y generar una señal eléctrica. En análisis cuantitativos esta señal es proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.

En función del tipo de transductor los biosensores se pueden clasificar en:

- **Biosensores electroquímicos:** Transforman la señal electroquímica que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito directamente en una señal eléctrica. Estas técnicas se pueden dividir en amperométricas, potenciométricas, conductimétricas e impedimétricas. Las técnicas electroquímicas tienen ventajas como fácil miniaturización, poco volumen de muestra (nanolitros), límites de detección entre  $10^{-9}$  y  $10^{-6}$  mol/l, son rápidas, de fácil manejo y bastante económicas [62]. Su sensibilidad y selectividad son limitadas con respecto a la detección óptica.

- **Biosensores ópticos:** Miden las variaciones que se producen en las propiedades de una radiación electromagnéticas, como consecuencia de la interacción entre el analito y el elemento biológico de reconocimiento. Dicha interacción puede inducir cambios en las características de absorción, emisión, dispersión, polarización, refracción o reflexión de la radiación, cuando ésta incide sobre la superficie donde se encuentra el elemento de reconocimiento [63]. La selección de las técnicas ópticas depende de las características del analito, la sensibilidad deseada y la aplicación del biosensor. Entre las técnicas más empleadas cabe destacar las colorimétricas, las de fluorescencia y las de resonancia de plasmón superficial [64]. Estos biosensores tienen la ventaja de que las medidas se pueden llevar a cabo en tiempo real, son rápidas, tienen alta selectividad y sensibilidad, proporcionan información de procesos cinéticos (asociación/disociación) y son fácilmente miniaturizables. En cuanto a los inconvenientes, salvo los colorimétricos, son más complejos que los electroquímicos y es necesaria la calibración de cada dispositivo.

- **Biosensores mecánicos:** Detectan pequeños cambios de masa cuando se produce la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento que está inmovilizado sobre la superficie del sensor. El método principal de análisis de cambios en la masa se basa en el uso de materiales piezoeléctricos que pueden vibrar a una frecuencia específica por medio de una señal eléctrica. Este tipo de detección es fácil de usar, de bajo coste, las medidas se realizan en tiempo real sin marcaje y proporciona un análisis con una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con otros métodos. Las limitaciones de esta tecnología son la falta de selectividad del transductor en sí mismo, tiempos de incubación relativamente largos, número de pasos de lavado y secado elevados e interferencias producidas cuando se usa en medio líquido. Los dos tipos principales de sensores de masa son la microbalanza de cristal de cuarzo y los sensores basados en micropalanca [64,65].

- **Biosensores térmicos:** Detectan el calor generado en el proceso de reconocimiento, normalmente reacciones enzimáticas exotérmicas, a través del aumento de temperatura. Entre sus ventajas destacan que pueden tener lugar varias reacciones en un único reactor fácilmente y que puede acoplarse a un inmunoensayo enzimático (biosensor de afinidad), y entre los inconvenientes se pueden citar su poco éxito comercial en comparación con otros biosensores y que pueden presentar pérdidas de calor por radiación, conducción y convección [66].

En esta Tesis Doctoral se desarrollarán los biosensores enzimáticos de tipo óptico (fluorescentes y colorimétricos) y electroquímico (voltamperométricos) ya que, además de la especificidad enzimática, presentan numerosas ventajas, como bajo coste de producción, fácil manejo, portabilidad, alta sensibilidad, respuesta rápida y la posibilidad de trabajar con volúmenes de muestra muy reducidos.

#### 1.4.1. Biosensores enzimáticos ópticos

Durante casi medio siglo se han desarrollado biosensores basados en enzimas que utilizan transductores ópticos [67]. Estos biosensores ópticos aprovechan los cambios en las propiedades ópticas producidas como resultado de la interacción de un biocatalizador con un analito objetivo [68].

Dentro de los biosensores enzimáticos ópticos, los colorimétricos son los más ampliamente utilizados. Estos biosensores detectan un cambio de color que ocurre como resultado de la interacción entre el biocatalizador y el analito. Aprovechan la respuesta cromática de ciertos compuestos o materiales ante la presencia de una sustancia específica, manifestándose en forma de cambio de intensidad, tonalidad o incluso aparición de un color completamente nuevo. Una de las ventajas clave de los biosensores colorimétricos radica en su simplicidad y facilidad de uso, ya que no requieren equipos de medición sofisticados, y la interpretación de los resultados es relativamente sencilla, basándose en la observación visual del cambio de color o en una simple medida con un colorímetro [69].

En un biosensor enzimático colorimétrico típico se utiliza una enzima específica que reacciona con el analito objetivo y produce un cambio en un sustrato o en un cromógeno generando un cambio de color observable. El cambio de color puede estar relacionado con la formación o el consumo de un producto coloreado, o con la modificación de la estructura molecular del sustrato o cromógeno, que puede ser cuantificado y relacionado con la concentración del analito. Estos biosensores son compatibles con una amplia gama de analitos y pueden adaptarse para detectar diferentes sustancias de interés, como metabolitos, enzimas, biomarcadores y contaminantes [70].

Además de los biosensores colorimétricos, los biosensores basados en cambios en la señal de fluorescencia también son ampliamente utilizados. Esta metodología combina la alta sensibilidad de la detección por fluorescencia, con la alta selectividad proporcionada por elementos de reconocimiento específicos como proteínas de unión a ligandos, anticuerpos, aptámeros, y/o mediante el uso de nanopartículas fluorescentes (puntos cuánticos, polímeros conjugados, etc.) [1].

La creciente disponibilidad de moléculas fluorescentes, incluyendo proteínas fluorescentes, colorantes de moléculas pequeñas y nanopartículas, ha ampliado las posibilidades de diseño de biosensores ópticos. Además, los avances en las plataformas analíticas, como espectroscopia de fluorescencia, lectores de microplacas, microscopía para la obtención de imágenes celulares, citometría de flujo y técnicas de obtención de

imágenes in vivo, han permitido el desarrollo de una variedad de sensores para el análisis tanto *in vitro* como *in vivo* [1].

La emisión de fluorescencia es altamente sensible al microentorno inmediato del fluoróforo, lo que ha sido aprovechado en varias aplicaciones de detección. Cualquier factor o parámetro que pueda influir a nivel molecular en el fluoróforo afectaría a su fluorescencia [71]. Un ejemplo muy común es el uso de la molécula fluoresceína para detectar el pH en una solución. La razón de la intensidad de emisión variable de la fluoresceína con el cambio de pH es la presencia de grupos funcionales ionizables en su estructura, debido a lo cual existe en un equilibrio iónico que consiste en diferentes formas, como dianión, monoanión, neutro, catión y lactona. Estas diferentes formas tienen diferentes propiedades de emisión de fluorescencia y, por lo tanto, la variación del equilibrio iónico debido al cambio de pH puede cambiar bruscamente la fluorescencia global de la solución [72].

Los biosensores enzimáticos basados en cambios en la intensidad de fluorescencia incluyen, generalmente, dos enfoques: desactivación de fluorescencia (*turn-off*) o aumento de fluorescencia (*turn-on*) [73,74]. Estos cambios de señal de fluorescencia pueden ser el resultado del consumo de una sustancia fluorescente, la formación de un producto fluorescente o un cambio de señal fluorescente secundario debido a la formación de un producto [75,76]. Otros mecanismos como fenómenos de filtro interno, transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) o transferencia de carga, también pueden modificar la señal de fluorescencia en biosensores fluorescentes [77,78].

En nuestro laboratorio se han desarrollado numerosos biosensores fluorescentes enzimáticos que utilizan tanto los enfoques *turn-on* como *turn-off*. Dentro del primer enfoque podemos citar los biosensores de ácido úrico o radical superóxido, que acoplan enzimas oxidoreductasas a un cromóforo no fluorescente (Amplex Red), cuyo producto de oxidación (resorufina) es altamente fluorescente [79,80]. Como ejemplo del segundo enfoque se encontraría el biosensor de actividad de ALP, que acopla nanopartículas fluorescentes a la enzima y detecta su actividad por la pérdida de fluorescencia que induce el producto de hidrólisis PNP [81].

### 1.4.2. Biosensores enzimáticos electroquímicos

En los biosensores electroquímicos, las enzimas desempeñan un papel fundamental como elementos de biorreconocimiento. Estos dispositivos acoplados a enzimas detectan una señal eléctrica producida por la generación de especies electroactivas o el consumo de un reactivo electroactivo, permitiendo la medición directa del analito o la oxidación/reducción de una molécula que puede ser monitorizada electroquímicamente [82].

Un diseño típico de un biosensor electroquímico consta de una superficie de biorreconocimiento unida a un electrodo de trabajo, que actúa como transductor. La superficie enzimática cataliza la producción o el consumo de una especie electroactiva, mientras que se aplica un voltaje al electrodo en los sensores amperométricos, induciendo la reacción redox y generando una señal eléctrica [12]. Esta señal eléctrica se correlaciona con la concentración de analito en la muestra. En los sensores potenciométricos, un cambio en el potencial del electrodo se utiliza como respuesta medible del transductor [12]. La detección electroquímica ofrece una selectividad adicional, ya que diferentes moléculas electroactivas pueden ser oxidadas/reducidas a diferentes potenciales, lo que permite la identificación específica de analitos. Además, esta técnica tiene requisitos mínimos de energía y es independiente de la turbidez o el color de la muestra. En términos de instrumentación, la mayoría de los biosensores electroquímicos basados en enzimas no requieren una gran cantidad de equipos sofisticados, lo que los hace relativamente económicos [83].

Dado que las reacciones suelen detectarse únicamente en las proximidades de la superficie del electrodo, los propios electrodos desempeñan un papel crucial en el rendimiento de los biosensores electroquímicos. Dependiendo de la función requerida para un electrodo específico, el material del electrodo, su modificación superficial o sus dimensiones influyen en gran medida en su capacidad de detección [62]. La detección electroquímica generalmente requiere el uso de un electrodo de referencia, un electrodo auxiliar o contraelectrodo y un electrodo de trabajo, también conocido como electrodo de detección o redox. El electrodo de referencia, comúnmente hecho de Ag/AgCl, se mantiene a cierta distancia del sitio de la reacción para mantener un potencial conocido

y estable. El electrodo de trabajo funciona como el elemento de transducción en la reacción bioquímica, mientras que el electrodo auxiliar establece una conexión con la solución electrolítica, lo que permite la aplicación de corriente al electrodo de trabajo. Estos electrodos deben ser conductores y químicamente estables. Por lo tanto, se utilizan comúnmente platino, oro, carbono (por ejemplo, grafito) y compuestos de silicio, dependiendo del analito [62].

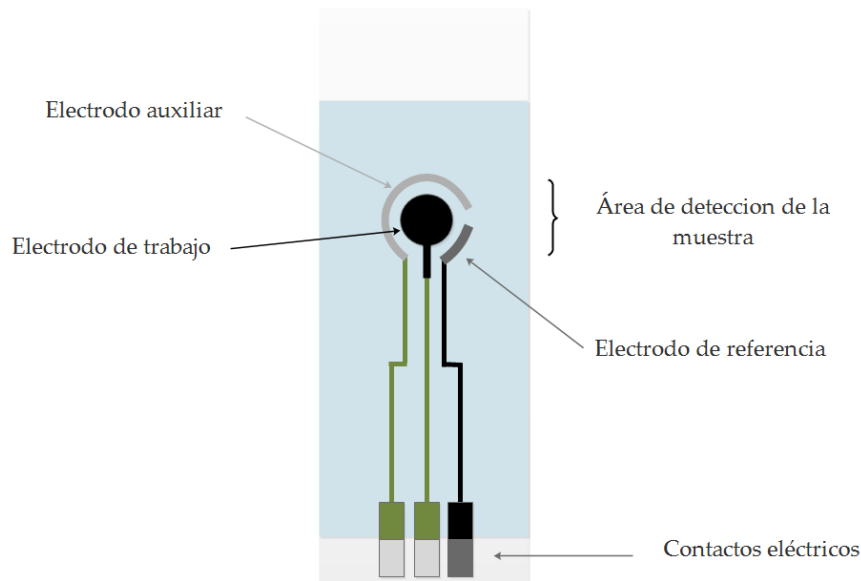
Estos electrodos pueden ser miniaturizados, lo que permite el uso de volúmenes de muestra muy pequeños, lo cual es beneficioso cuando se dispone de muestras limitadas. La miniaturización de los detectores electroquímicos y la instrumentación de control asociada se pueden lograr de manera fácil y económica mediante técnicas de micromecanizado, lo que facilita la fabricación de instrumentos portátiles para la detección biológica [12].

Los electrodos serigrafiados, conocidos como SPE (por sus siglas en inglés), han ganado popularidad dentro de los biosensores electroquímicos debido a su bajo coste, facilidad de producción en masa y tamaño compacto [12]. Estos electrodos son especialmente atractivos en sistemas microfluídicos y dispositivos de medición portátiles, ya que facilitan la toma de medidas *in situ* [84,85]. Por lo general, los SPEs consisten en una configuración de tres electrodos, como se muestra en la [Figura 1.8](#), y se fabrican normalmente cubriendo un soporte de plástico o cerámica con una capa de pasta conductora. Los SPEs de carbono son los más populares y reportados [86,87].

Para adaptar el electrodo de trabajo a un analito específico, se lleva a cabo una modificación (funcionalización) de su superficie, utilizando moléculas o biomoléculas con reactividad específica hacia el analito de interés para su unión. Para el análisis, se pueden emplear diversas técnicas de detección electroquímica, como la cronoamperometría o la voltametría cíclica. Ésta última permite no solo determinar el rango de estabilidad del biosensor, sino también identificar los procesos redox presentes en la superficie del electrodo modificado [62]. La versatilidad de los SPEs se refleja en su amplio rango de aplicaciones. En el campo biomédico, se utilizan para la detección de biomarcadores, fármacos y metabolitos [88,89], mientras que en el ámbito medioambiental, se emplean para la detección de contaminantes y monitorización de la



calidad del agua y suelos [90,91]. Además, en la industria alimentaria, se utilizan para la detección de toxinas y adulterantes en alimentos [92,93].



**Figura 1.8.** Esquema ilustrativo de un electrodo serigrafiado (SPE).

## 1.5. Inmovilización enzimática

La inmovilización desempeña un papel fundamental en el diseño de biosensores basados en enzimas. Se trata de un proceso en el que estas proteínas restringen sus grados de libertad al estar físicamente confinadas o localizadas en una región definida del espacio, conservando su actividad catalítica, y permitiendo su reutilización continua. Esta técnica, bien implementada, no solo facilita el manejo de las enzimas, sino que también simplifica significativamente la manipulación del biocatalizador y el control del proceso de reacción, al tiempo que mejora la estabilidad de la enzima tanto durante el almacenamiento como en condiciones operativas. Además, la inmovilización reduce considerablemente el coste tanto de la proteína como de los productos enzimáticos [67,73,94,95].

A pesar de los avances en la inmovilización de enzimas, todavía es un desafío lograr una inmovilización efectiva en un medio que permita un almacenamiento durante largos períodos de tiempo a temperatura ambiente y altas concentraciones de biomoléculas, manteniendo la actividad enzimática y siendo fácilmente transportable y

versátil para diversas aplicaciones. La inmovilización en una superficie 2D mediante interacciones químicas o físicas es la técnica predominante para la inmovilización de proteínas, pero tiene la limitación de una capacidad de carga insuficiente, entre otras. En este sentido, los materiales 3D pueden mejorar la inmovilización de enzimas. Estos materiales ofrecen una mayor capacidad de carga de biomoléculas, lo que mejora el rendimiento de las aplicaciones enzimáticas [96,97].

Entre las diferentes técnicas de inmovilización 3D, el método de atrapamiento es uno de los que ofrece más ventajas. Se trata de un método irreversible en el cual las enzimas quedan confinadas en un soporte o dentro de fibras, ya sea en la estructura de un material poroso o en membranas de polímero. Este enfoque permite el paso del sustrato y los productos a través del soporte mientras retiene la enzima. Al no interactuar químicamente con las paredes del poro, se evita la desnaturalización y consiguiente pérdida de actividad de la enzima. Además, el atrapamiento permite modificar el material encapsulante para crear un microambiente óptimo, como un pH o polaridad adecuados para su funcionamiento [98].

Entre los materiales 3D con mejores propiedades para la inmovilización de enzimas destacan los hidrogeles [99]. Estas redes tridimensionales y porosas están formadas por cadenas poliméricas capaces de retener en su interior una gran cantidad de agua. Es precisamente el alto contenido en agua lo que proporciona a las enzimas un entorno favorable y unas condiciones fisiológicas eficientes para el desempeño de su actividad [100].

Se pueden utilizar una amplia variedad de materiales para la preparación de los hidrogeles, tanto de naturaleza orgánica, como inorgánica o híbrida [101]. La elección de un material u otro, así como el protocolo de preparación, influyen en sus propiedades y aspecto final. Esta elección va a depender de la aplicación que se le quiera dar al material. En el presente trabajo, se han empleado dos tipos diferentes de hidrogeles para la inmovilización de enzimas: hidrogeles inorgánicos preparados por la metodología sol-gel e hidrogeles orgánicos químicamente reticulados.

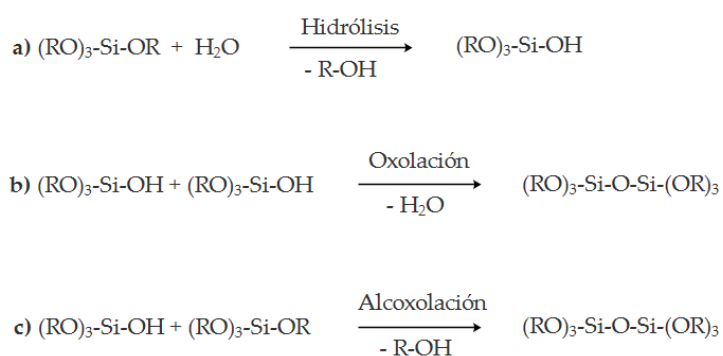
### 1.5.1. Hidrogeles inorgánicos (matrices sol-gel)

Durante muchos años, los hidrogeles preparados por el método sol-gel, más conocidos como matrices sol-gel, han sido una opción alternativa y ventajosa para la inmovilización de biomoléculas, especialmente en aplicaciones biotecnológicas [102]. Esta metodología permite la creación de plataformas con una serie de propiedades atractivas para el confinamiento de enzimas, ya que presentan porosidad ajustable, son químicamente inertes, tienen una estructura estable, resistencia mecánica y son resistentes al ataque microbiano. Otra ventaja es su capacidad para adquirir diferentes formas, como películas o monolitos, lo que facilita su aplicación en diferentes sistemas y dispositivos. La preparación de estas matrices es sencilla y se lleva a cabo en condiciones químicas suaves y a temperatura ambiente, donde las enzimas pueden mantener su actividad [103]. Dadas sus excelentes propiedades, esta estrategia de inmovilización ha sido utilizada ampliamente en nuestro laboratorio para la inmovilización de enzimas tales como la uricasa [79], superóxido dismutasa, peroxidasa [80], xantina oxidasa [75] y fosfatasa alcalina [81].

El proceso sol-gel se basa en la capacidad de formar óxidos sólidos de metales o semimetales mediante la hidrólisis de precursores que son fácilmente hidrolizables en un medio acuoso. Los precursores comúnmente utilizados incluyen óxidos metálicos de fórmula general  $M(OR)_n$ , donde M representa metales como Si, Al, Ti, entre otros, y R representa grupos alquilo como metilo, etilo, isopropilo, etc. Entre los metales, el silicio ha sido ampliamente investigado, y los alquiloxisilanos, como el tetrametil ortosilicato (TMOS;  $Si(OCH_3)_4$ ) y el tetraetil ortosilicato (TEOS;  $Si(OCH_2CH_3)_4$ ), son unos de los precursores moleculares más empleados en el proceso sol-gel [104].

El proceso sol-gel implica dos estados diferentes: solución coloidal (sol) y gel. En el estado sol, se presenta una suspensión coloidal de partículas sólidas. En el estado gel, estas partículas sólidas se organizan formando una red interconectada en una fase líquida adicional [102]. El proceso de transformación desde el estado molecular al estado de red se lleva a cabo mediante dos reacciones principales: hidrólisis y condensación. En el caso del silicio, el primer paso es la hidrólisis de los alcóxidos de silicio ( $Si-OR$ ), en presencia de agua, para formar silanoles ( $Si-OH$ ) (Figura 1.9a). A partir de la formación

del primer silanol, comienza la condensación, y ambas reacciones pueden ocurrir simultáneamente. Durante la etapa de condensación los grupos Si-OH reaccionan entre si formando unidades de siloxano (enlaces Si-O-Si) y liberando agua como subproducto. A esta reacción se le denomina oxolación (Figura 1.9b). Por otro lado, si la condensación comienza antes de completar la reacción de hidrólisis, tiene lugar la alcoxolación, donde un grupo Si-OH reacciona con un grupo Si-OR, generando alcohol como subproducto (Figura 1.9c). Condensaciones sucesivas dan lugar al crecimiento de la cadena polimérica, aumentando la viscosidad del sistema y formando un gel [101]. El gel resultante es una estructura porosa con dos fases: una fase sólida porosa y una fase líquida que consiste en agua atrapada en los poros. Es importante destacar que el proceso de gelificación no marca el final del proceso sol-gel. Después de la formación del gel, ocurre una etapa adicional llamada envejecimiento o maduración. Durante esta etapa, continúan las reacciones de condensación entre los grupos silanol restantes, lo que conduce a la formación de nuevos enlaces siloxano.

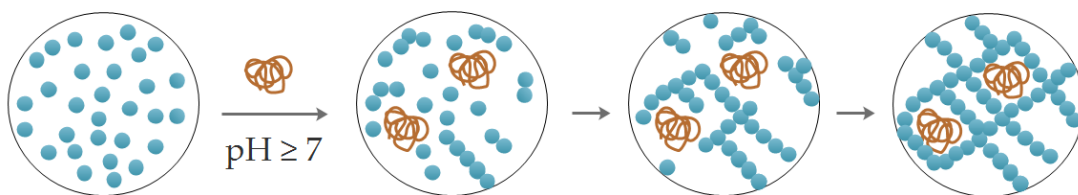


**Figura 1.9.** (a) Hidrólisis de un alquil silicato en silanol; (b) Condensación mediante oxolación; (c) Condensación mediante alcoxolación.

El tipo de alcóxido precursor, el pH, la relación agua/alcóxido y el tipo de catalizador son fundamentales en la obtención de matrices sol-gel ya que afectan a los procesos de polimerización [101,105]. Cuando se quiere inmovilizar enzimas en estos materiales, la alcoxolación debe reducirse al máximo para minimizar la producción de alcohol. Esto se puede conseguir controlando el pH y la relación H<sub>2</sub>O/Si, de forma que la condensación no se inicie hasta que se complete la hidrólisis. Para ello, la mejor estrategia es modificar el pH en las distintas etapas ya que ambas reacciones responden

de diferente manera a los cambios de pH, acelerándose o ralentizándose. Así, mientras que la hidrólisis se acelera en medio ácido, la de condensación se ralentiza enormemente, acelerándose al aumentar el pH. Por tanto, si la hidrólisis tiene lugar en presencia de un catalizador como el ácido clorhídrico, la reacción transcurrirá mucho más rápidamente que la de condensación y apenas se generará alcohol residual [106].

La inmovilización de enzimas en estas matrices se lleva a cabo siguiendo esta estrategia. Tras la hidrólisis en medio ácido del precursor, se elimina el posible alcohol generado durante esta etapa, mediante un proceso de rotoevaporación a vacío [106]. A continuación, se añade una disolución tamponada de la enzima, a un pH en el que presente su mayor actividad. El aumento de pH desencadena la reacción de polimerización entre los grupos alcóxido hidrolizados. Esto conduce al atrapamiento físico de la proteína, de manera uniforme, dentro de los poros de la matriz sol-gel [107]. La Figura 1.10 muestra la progresión de este proceso y cómo los poros se forman alrededor de la biomolécula.



**Figura 1.10.** Atrapamiento de proteínas en una matriz de sílice durante la polimerización sol-gel.

Para que las enzimas preserven su estabilidad y actividad, es fundamental que mantengan sus interacciones con las moléculas de agua, a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Los centros activos de las proteínas suelen encontrarse en regiones de su superficie hidrofílica, por lo que su eficiencia es máxima en el medio acuoso. El hecho de que las enzimas, una vez atrapadas en la matriz, no interaccionen covalentemente con las paredes del poro y que el poro contenga suficiente agua intersticial como para proporcionar un entorno esencialmente acuoso, contribuye a la preservación de su estructura y reactividad [94].

Como se ha visto, los materiales sol-gel ofrecen numerosas ventajas en términos de versatilidad, control de estructura y estabilidad, además de ser biocompatibles y no

tóxicos, siendo una muy buena opción para la fabricación de biosensores enzimáticos. Sin embargo, también presentan algunas limitaciones en términos de rigidez y fragilidad. Por ello, en esta Tesis Doctoral, se han explorado otras alternativas de inmovilización, como los hidrogeles orgánicos químicamente reticulados, que son más flexibles y elásticos.

### 1.5.2. Hidrogeles orgánicos

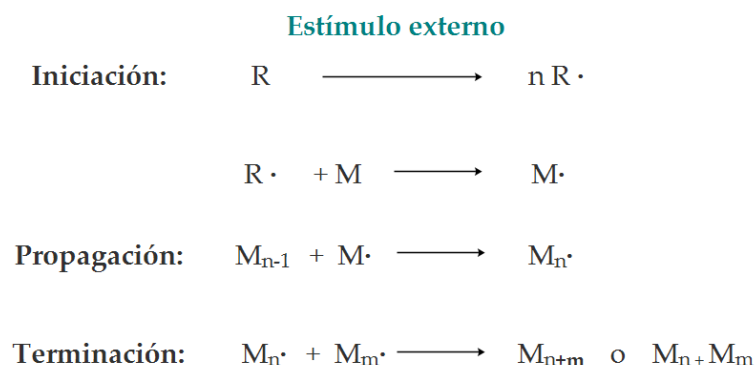
Los hidrogeles orgánicos son redes tridimensionales (3D) de polímeros hidrofílicos capaces hincharse y retener agua mientras mantienen su estructura debido al entrecruzamiento químico o físico de sus cadenas poliméricas individuales. La capacidad de los hidrogeles para absorber agua surge de grupos funcionales hidrofílicos (amida, carboxilo, hidroxilo, etc.) adheridos al esqueleto polimérico, mientras que su resistencia a la disolución surge de los enlaces cruzados entre las cadenas de la red polimérica [108].

Los hidrogeles orgánicos son ampliamente utilizados en diversos campos, como el transporte de fármacos, la ingeniería de tejidos, la inmovilización de proteínas y células, la agricultura, la horticultura y la industria alimentaria, debido a su buena biocompatibilidad y capacidad de proporcionar un microambiente adecuado [109-111].

La base de los hidrogeles orgánicos son los polímeros, macromoléculas formadas por la repetición de una o varias moléculas unidas mediante enlaces covalentes. Estas moléculas, conocidas como monómeros, se unen a través de reacciones de polimerización [112], siendo la polimerización por radicales libres el método más utilizado para su formación. En el caso de utilizar un único tipo de monómero como precursor, el proceso se conoce como homopolimerización y se obtiene un homopolímero. Sin embargo, cuando intervienen dos o más moléculas diferentes en la cadena, se denomina copolimerización, con sus correspondientes comonómeros y copolímeros. El conocimiento de los polímeros es esencial para comprender las propiedades y características de los hidrogeles [113].

Los hidrogeles se preparan generalmente bien a partir de polímeros con propiedades inherentes de hidrogel, como el quitosano o el colágeno, o bien por la

polimerización de monómeros hidrofílicos. Esta segunda estrategia implica, generalmente, la utilización de tres precursores principales: un monómero que sirve como unidad base para las cadenas poliméricas, un agente entrecruzante, que presenta grupos químicos reactivos capaces de formar enlaces covalentes (entrecruzamiento químico) y no covalentes (entrecruzamiento físico) entre cadenas poliméricas, y un agente iniciador. Este último, tras ser estimulado desencadena la polimerización que, en muchos casos, sucede vía radicales libres [112]. En una formulación típica de hidrogel, el precursor del gel reacciona con un agente entrecruzante para formar redes tridimensionales entrecruzadas. Ejemplos de algunos agentes entrecruzantes comúnmente utilizados incluyen el persulfato de potasio, persulfato de amonio o dimetilacrilato de etilenglicol. Como se muestra en la [Figura 1.11](#), la polimerización por radicales libres consta de tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación. En la etapa de iniciación, se generan radicales libres ( $R\bullet$ ) mediante la ruptura homolítica del agente iniciador inducida por calor o irradiación (UV o gamma). Los radicales  $R\bullet$  reaccionan con los dobles enlaces de los monómeros (o polímeros) ( $M$ ), formando los primeros intermedios radicalarios  $M\bullet$  que debido a su alta reactividad, reaccionan instantáneamente con otras moléculas de monómero (o polímero), lo que conduce al crecimiento de macroradicales (etapa de propagación). Los intermedios radicalarios también reaccionan con el agente entrecruzante, formando nuevos macroradicales, de forma que las cadenas van creciendo y entrecruzandose hasta obtener el hidrogel final [114].



**Figura 1.11.** Proceso de polimerización por radicales libres.

Los hidrogeles se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, como se muestra en la [Tabla 1.2](#) y se describe a continuación.

**Tabla 1.2.** Clasificación de los hidrogeles según diferentes criterios. Adaptado de Argenta et al. [115].

<b>Criterio</b>	<i>Tipos de hidrogel</i>
<b>Composición polimérica</b>	Homopolimérico, copolimérico e hidrogel polimérico interpenetrante de múltiples polímeros.
<b>Configuración</b>	Amorfo, semicristalino, cristalino.
<b>Tipo de entrecruzamiento</b>	Naturaleza química o física de las uniones de entrecruzamiento.
<b>Apariencia física</b>	Apariencia del hidrogel como matriz, película o microesfera.
<b>Carga eléctrica</b>	No iónico, iónico (aniónico o catiónico), electrolito anfótero, zwitteriónico.

Los materiales con los que se fabrican los hidrogeles pueden ser tanto naturales como sintéticos, o una mezcla de ambos. Entre los polímeros naturales utilizados se encuentran el colágeno, la fibrina, el ácido hialurónico, la elastina, el quitosano y el alginato. Por otro lado, los polímeros sintéticos más comunes son el polietilenglicol diacrilato (PEG), la poliacrilamida (PAM) y el alcohol de polivinilo (PVA) [116]. Aunque los hidrogeles naturales son más biocompatibles, presentan desventajas en términos de control reproducible de sus propiedades y microestructuras entre experimentos. Además, su degradación puede ser incontrolable y su composición puede variar de un lote a otro. Por otro lado, los hidrogeles sintéticos son más reproducibles y ofrecen flexibilidad para ajustar su composición y propiedades mecánicas. Sin embargo, la estructura final de los hidrogeles sintéticos también puede depender de las condiciones de polimerización, por lo que es crucial tener un control riguroso en el protocolo de preparación [117].

Los polímeros en los hidrogeles pueden ser homopolímeros, copolímeros y multi-interpenetrantes (IPN), lo cual depende de su composición. Los hidrogeles homopoliméricos se refieren a una red polimérica derivada de una sola especie de monómero, mientras que los copoliméricos se componen de dos o más especies de monómeros diferentes. Los hidrogeles IPN son una clase importante de hidrogeles que

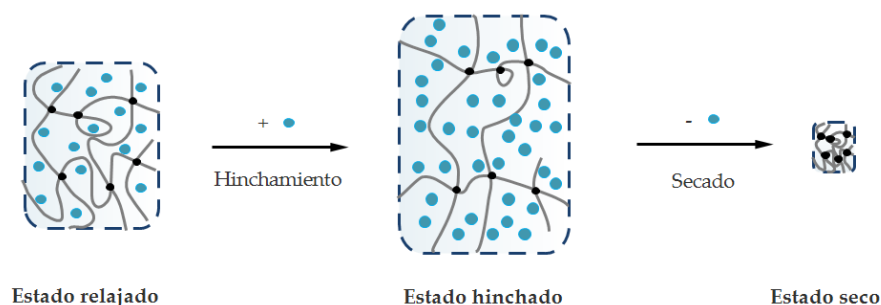


consisten en dos componentes poliméricos sintéticos y/o naturales independientes y entrecruzados, contenidos en una estructura de red [118].

Existen también dos categorías de hidrogeles basadas en la naturaleza de las uniones de entrecruzamiento: los hidrogeles químicos y los físicos. El desarrollo de hidrogeles químicos implica la formación de uniones permanentes a través de enlaces covalentes y los hidrogeles físicos son el resultado de uniones reversibles y transitorias que surgen de enredos entre las cadenas poliméricas o de interacciones físicas como interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas [112].

Gracias a los enlaces covalentes entre elementos de la red, los hidrogeles químicos, también denominados hidrogeles químicamente reticulados, presentan mejores propiedades mecánicas y una mayor estabilidad que los hidrogeles físicos. Son más robustos y tienen una mayor capacidad para hincharse sin que se rompan sus enlaces [119]. Esta capacidad de hinchamiento o *swelling* es una de las propiedades más importantes de los hidrogeles orgánicos, a diferencia de los inorgánicos, y está relacionada con su capacidad de absorber agua cuando se ponen en contacto con una disolución acuosa, aumentando por tanto su volumen [119].

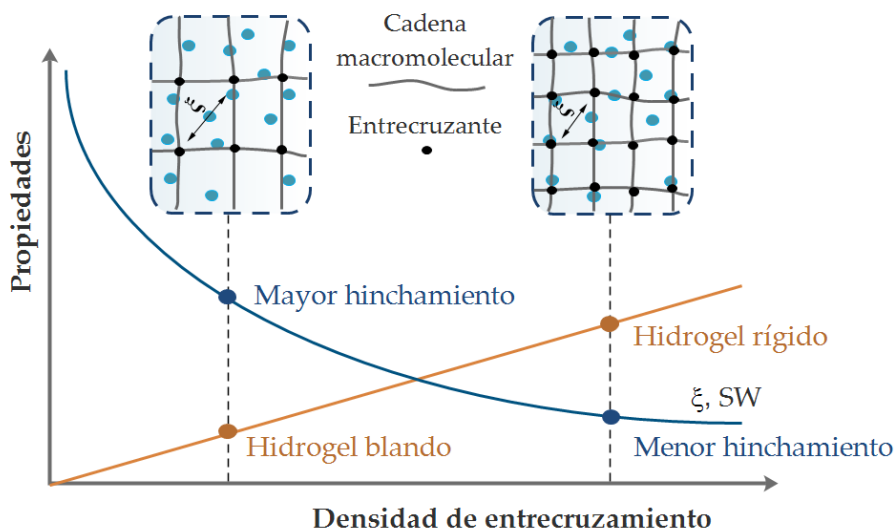
El *swelling* de un hidrogel se evalúa mediante la relación de hinchamiento en equilibrio, que indica la relación entre la masa de un hidrogel completamente hinchado (en equilibrio con un medio acuoso) y la masa de un hidrogel deshidratado (Figura 1.12) [120].



**Figura 1.12.** Proceso de hinchamiento en medio acuoso y secado de un hidrogel (los puntos azules representan las moléculas de agua y los negros las uniones reticulares).

El grado de *swelling* depende de las propiedades de absorción de agua, las cuales a su vez están relacionadas con la densidad de entrecruzamiento del hidrogel y el contenido de monómeros hidrofílicos [119]. La proporción de agente entrecruzante presente puede influir en la estructura del hidrogel, de forma que una mayor cantidad de entrecruzante conduce a la formación de una estructura más compacta, con mayor resistencia mecánica y menor capacidad de hinchamiento, mientras que en el caso contrario, permite desplazamientos entre las distintas cadenas poliméricas y conduce a altas elasticidades. La estructura y/o funcionalidad del monómero y/o el agente entrecruzante también pueden modificarse para alterar la estructura del hidrogel [112,117,121].

La densidad de entrecruzamiento se caracteriza por el número de enlaces cruzados en un volumen determinado. Esta densidad afecta a propiedades fundamentales del hidrogel (Figura 1.13), como el tamaño de malla ( $\xi$ ), que define la distancia promedio entre los puntos de entrecruzamiento, el coeficiente de difusión o el grado de hinchamiento [101].

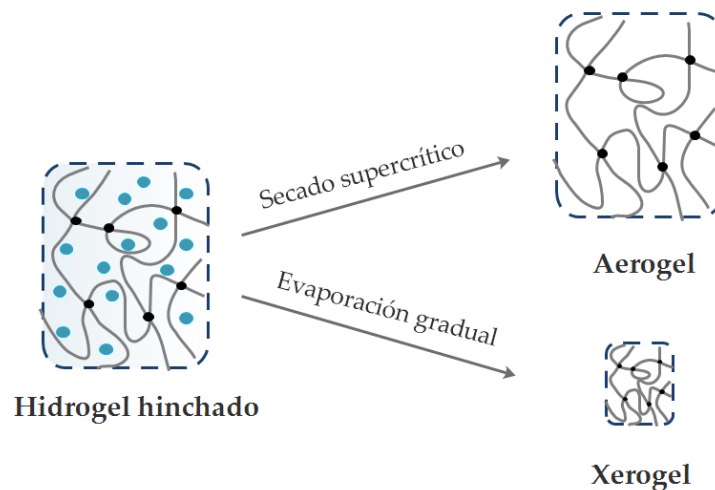


**Figura 1.13.** a) Representación esquemática de la relación entre la densidad de entrecruzamiento y las propiedades del hidrogel (SW: grado de hinchamiento;  $\xi$ : tamaño de malla).

Otra de las características de los hidrogeles químicamente reticulados es la posibilidad de experimentar ciclos de hinchamiento y secado sin perder sus propiedades [112]. La deshidratación del hidrogel implica la evaporación de su contenido acuoso,

obteniendo materiales sólidos que retienen, al menos en parte, su textura porosa después del secado (Figura 1.14).

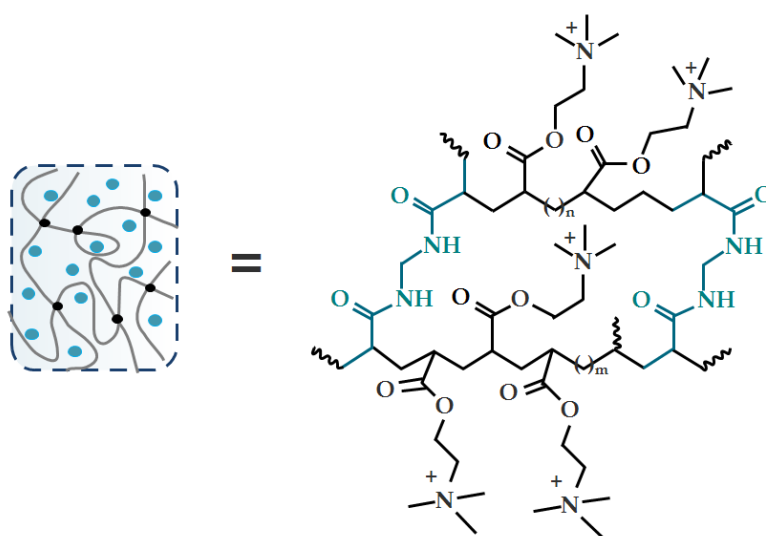
Cuando el proceso de secado se lleva a cabo en condiciones subcríticas, a temperatura ambiente mediante una evaporación lenta, se obtiene un xerogel. El agua presente en el hidrogel se evapora gradualmente, al mismo tiempo que se reduce el volumen de la red polimérica. Por otro lado, cuando se realiza en condiciones supercríticas, de alta temperatura o presión, se forma un aerogel. Tanto en forma de aerogel como de xerogel, al ser introducidas estas matrices en una disolución acuosa, vuelven a absorber el agua, recuperando, en la mayoría de los casos, su estado inicial de hidratación [120].



**Figura 1.14.** Ilustración esquemática de las etapas en la preparación de aerogeles y xerogeles.

Entre los hidrogeles químicos con gran capacidad de hinchamiento y posibilidad de experimentar ciclos de hinchamiento y secado destacan los basados en acrilatos y acrilamida. Estos hidrogeles son biocompatibles, no cancerígenos y no tóxicos, además de ser mecánicamente robustos y flexibles [122]. Sus propiedades pueden ser fácilmente modulables modificando las proporciones, el tipo, la funcionalidad o la carga de los agentes precursores. Estas características los hacen adecuados para aplicaciones como la mamoplastia inyectable o implantable, el relleno de tejidos blandos para el aumento de labios, la corrección facial, la robótica blanda, la administración de fármacos controlados o el desarrollo de sensores y biosensores [109,123-126].

Estos hidrogeles se sintetizan, generalmente, por polimerización radicalaria utilizando monómeros de bajo peso molecular, como la acrilamida, el ácido acrílico o derivados de estos, en combinación con un agente entrecruzante, generalmente el monómero bifuncional N,N'-metilenbisacrilamida (MBA), y un foto- o termo-iniciador. En la presente Tesis Doctoral se han sintetizado hidrogeles con esta tecnología, utilizando cloruro de [2-(acrililoxi)etil]trimetilamonio (AETA), un monómero catiónico hidrófilo con un grupo funcional cuaternario de cloruro de trimetilamonio cargado positivamente. Como agente entrecruzante se ha utilizado el MBA. La combinación de estos dos monómeros en presencia de un fotoiniciador, en solución acuosa, provoca una reacción de polimerización en cadena para formar el hidrogel AETA (Figura 1.15). El protocolo de síntesis, detallado en el capítulo de Materiales y Métodos, está basado en el desarrollado por el grupo de la Dra. Herrero Chamorro, en el Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA) [127].



**Figura 1.15.** Estructura química del hidrogel catiónico de AETA utilizado en esta Tesis Doctoral.

Existen diferentes estrategias para inmovilizar enzimas en este tipo de hidrogeles [110]. En esta Tesis Doctoral se han explorado dos de ellas. La primera es similar a la inmovilización en matrices sol-gel, de forma que la enzima se pone desde el principio en contacto con los monómeros, el agente entrecruzante y el fotoiniciador. Al irradiar con luz UV se inicia la polimerización y las proteínas quedan atrapadas en los poros de la red polimérica. La segunda estrategia consiste en preparar previamente un hidrogel y llevarlo a deshidratación. A continuación, se pone en contacto con una disolución

tamponada de la enzima, hasta que todo el líquido es absorbido, hinchándose el hidrogel y quedando la enzima incluida en sus poros. Entre la enzima y la red polimérica se pueden establecer interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, que mantienen retenida a la biomolécula en su interior. De estas dos estrategias, la primera, también conocida como metodología *in situ*, es más agresiva para la enzima, ya que hay más probabilidad de que durante la polimerización radicalaria se produzcan reacciones que induzcan su desnaturalización.

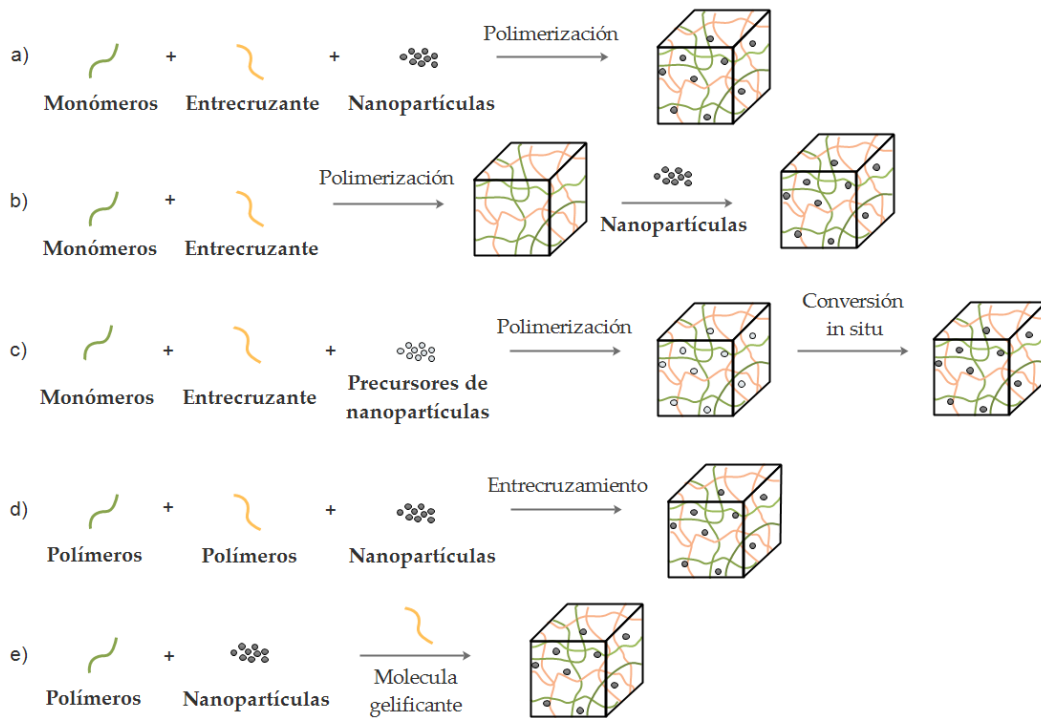
### 1.5.3. Hidrogeles nanocompuestos

Las propiedades de los hidrogeles pueden modularse y/o mejorarse incorporando nanomateriales en el interior de la red polimérica, tales como nanopartículas de sílice, oro o plata, nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas magnéticas, puntos cuánticos, etc. Estas nanopartículas (NPs) pueden ser elementos estructurales que promueven el autoensamblaje del hidrogel, o pueden únicamente quedar retenidas en sus poros, a través de algún tipo de interacción no covalente [128,129]. Esta innovadora estrategia da lugar a un efecto sinérgico que mejora las propiedades de ambos componentes y genera hidrogeles multifuncionales con características tales como una mayor elasticidad y resistencia en comparación con los hidrogeles fabricados tradicionalmente, mayor conductividad eléctrica y térmica, propiedades magnéticas, propiedades luminiscentes o capacidad de cambiar de color [130-132]. A este tipo de hidrogeles se les conoce como hidrogeles nanocompuestos.

Existen diferentes estrategias de preparación de hidrogeles nanocompuestos con una distribución uniforme de las NPs en la matriz del hidrogel. La [Figura 1.16](#) muestra una representación gráfica de las más comunes.

En la primera estrategia (polimerización *in situ*) los precursores del hidrogel son mezclados con las nanopartículas y el iniciador (si lo hay) antes de comenzar la polimerización. La segunda técnica consiste en la incorporación física de las NPs en la matriz de hidrogel después de la polimerización (método *ex situ*). En el tercer enfoque los precursores del hidrogel se ponen en contacto con los precursores de las NPs y estas se forman tras polimerizar el hidrogel, una vez estimulada la reacción. Los hidrogeles

nanocompuestos también se pueden formar mediante la incorporación de NPs que actúan como agentes entrecruzantes (enfoque 4) o, por último, utilizando nanopartículas, polímeros y moléculas gelantes distintas (enfoque 5) [133]. La selección del enfoque dependerá, en cierta medida, de la aplicación final del material nanocompuesto.



**Figura 1.16.** Estrategias de preparación de hidrogeles nanocompuestos: 1) formación de hidrogel en una suspensión de NPs, 2) incorporación física de NPs en la matriz de hidrogel después de la polimerización, 3) formación de NPs reactivas dentro de un gel preformado, 4) entrecruzamiento de cadenas poliméricas usando NPs, y 5) formación de gel utilizando nanopartículas, polímeros y moléculas gelificantes distintas.

En la presente Tesis Doctoral se han fabricado hidrogeles nanocompuestos fluorescentes utilizando las dos primeras estrategias descritas en la Figura 1.16. Para ello se han incorporado en los hidrogeles NPs fluorescentes basadas en polímeros conjugados, cuyas excelentes propiedades se describen en la siguiente sección.

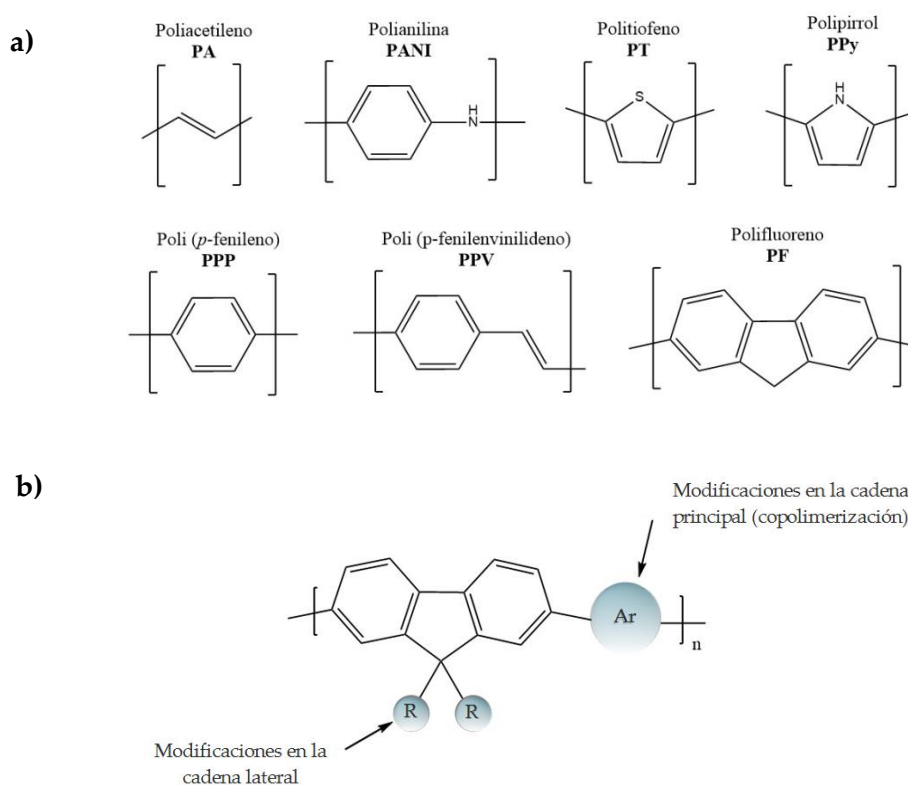
## 1.6. Nanopartículas fluorescentes

Las nanopartículas fluorescentes son fluoróforos de tamaño nanoscópico que poseen importantes ventajas con respecto a los fluoróforos convencionales y han sido ampliamente utilizadas en experimentos de bioimagen. Su incorporación en hidrogeles, tanto orgánicos como inorgánicos, confiere a estos materiales propiedades luminiscentes que pueden ser aprovechadas para el desarrollo de sensores y biosensores fluorescentes, entre otras aplicaciones [111,134]. Las más utilizados hasta la fecha son los puntos cuánticos (QDs) semiconductores que, como consecuencia del confinamiento cuántico, presentan una elevada eficiencia fotoluminiscente y la posibilidad de modular sus propiedades ópticas variando el tamaño y la composición [135]. Sin embargo, estos materiales se consideran tóxicos, debido a los elementos pesados que contienen (Cd, Pb) y a su protocolo de síntesis. Como alternativa, se han desarrollado nanopuntos de carbono y QDs de grafeno, mucho más biocompatibles, pero con menor eficiencia de fluorescencia y capacidad para modular su emisión [136,137]. Recientemente, está cobrando gran interés una nueva clase de nanopartículas fluorescentes, las basadas en polímeros conjugados, debido a la baja toxicidad de este tipo de polímeros, su alta eficiencia cuántica, así como al hecho de que su emisión de fluorescencia puede modularse mediante el diseño apropiado del esqueleto molecular del polímero [138-142].

### 1.6.1. Polímeros conjugados

Los polímeros conjugados (CPs) son macromoléculas orgánicas que contienen un esqueleto rígido compuesto por unidades monoméricas repetidas cuya estructura principal la conforman cadenas de carbono. La diferencia en cómo se produce la unión entre los átomos de carbono del esqueleto es lo que hace especiales a los CPs. A diferencia de los polímeros tradicionales, como el polietileno o el polipropileno, los CPs tienen una secuencia alternante de enlaces simples y dobles, un sistema  $\pi$ -conjugado en el que los electrones están deslocalizados a lo largo de la longitud de conjugación del polímero. Es precisamente esta secuencia alternante de enlaces la que permite a los CP mostrar unas propiedades ópticas y electrónicas únicas [143]. Cuando un CP se ilumina a una longitud de onda adecuada, puede producirse la excitación de un electrón a un

nivel de energía superior. Esto crea un par electrón-hueco en la cadena del polímero, denominado “excitón”. La deslocalización de electrones facilita la rápida migración de excitones intra o inter cadena, lo que confiere respuestas ópticas colectivas y señales amplificadas en comparación con los fluoróforos convencionales. Algunos ejemplos de polímeros conjugados se muestran en la **Figura 1.17a**. Entre ellos, los polifluorenos (PFs), como consecuencia de su estructura ofrecen la ventaja de altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, fotoestabilidad, excelente estabilidad térmica y alta estabilidad química frente a oxidantes, así como buena accesibilidad sintética y versatilidad [144].



**Figura 1.17.** **a)** Estructura de las familias de CPs más comunes. **b)** Estructura de un polifluoreno que muestra las estrategias para la obtención de derivados.

En la última década se han sintetizado una gran variedad de PFs que se pueden clasificar en homopolímeros y copolímeros de fluoreno, de acuerdo al tipo de monómeros que forman la cadena principal (**Figura 1.17b**). Los primeros están formados únicamente por unidades de fluoreno y emiten en la región violeta-azul del espectro, mientras que los segundos lo forman unidades de fluoreno unidas a otras unidades aromáticas “Ar”, desplazando el máximo de emisión hacia longitudes de onda más largas, y por tanto variando su color dependiendo de la unidad “Ar” utilizada. Además,



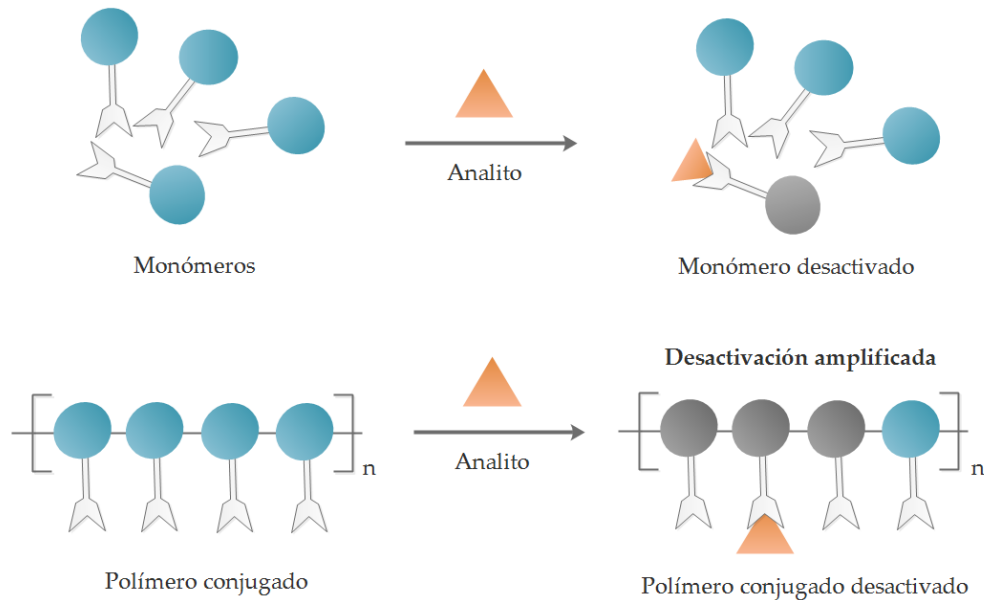
es relativamente sencillo introducir cadenas laterales en el carbono 9 del anillo de fluoreno, que permiten modular la solubilidad de PF en diferentes medios (Figura 1.17b). Así, al introducir cadenas alquílicas de más de 6 carbonos en esta posición se aumenta notablemente la solubilidad de estos polímeros en disolventes orgánicos, lo que mejora su procesabilidad. Otra de las funcionalizaciones más habituales es la introducción de grupos cargados (catiónicos o aniónicos) para obtener lo que se denominan polielectrolitos conjugados (CPEs). La adición de estos grupos cargados contribuye a mejorar la solubilidad de los PFs en medios acuosos, aunque debido al carácter hidrofóbico de los anillos de fluoreno, siguen teniendo tendencia a agregar e interactuar con sustratos hidrofóbicos. La agregación produce una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y el desplazamiento hacia el rojo de la emisión [145,146].

Entre las muchas aplicaciones de los PFs y en general de los CPs se encuentra su uso en la fabricación de sensores fluorescentes. Las estrategias más utilizadas para la fabricación de estos dispositivos se basan en la desactivación de la fluorescencia del polímero, más conocida por el término *quenching*. Para ello el CP tiene que interactuar con algún compuesto que reduzca su fluorescencia (desactivador o *quencher*) como consecuencia de procesos tales como la transferencia de electrones fotoinducida (PET), la transferencia de energía por resonancia de Förster o la agregación de polímeros intra o intercadena, entre otros [147,148]. La detección del compuesto a analizar se lleva a cabo en la mayoría de los casos de dos maneras: en la primera (apagado de fluorescencia o *turn-off*), el desactivador es el propio compuesto a analizar, mientras que en la segunda (encendido de fluorescencia o *turn-on*) el CP se encuentra previamente interactuando con el desactivador, y la adición del analito hace que se rompa esta unión, recuperando el polímero su fluorescencia inicial. En este último caso también es posible que el CP se encuentre inicialmente en estado agregado, con lo cual su fluorescencia inicial es baja, y la presencia del analito rompa dicha agregación o modifique la conformación, aumentando la señal de fluorescencia.

Es posible cuantificar el grado de desactivación de un fluoróforo por un *quencher* mediante la representación de un gráfico de Stern-Volmer. Si el cambio en la señal de fluorescencia es lineal, seguirá una ecuación de este tipo (Ecuación 1.4):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1.4)$$

donde  $I_0$  e  $I$  son las intensidades de fluorescencia observadas en ausencia o en presencia del desactivador respectivamente,  $[Q]$  es la concentración de desactivador y  $K_{SV}$  es una constante que nos da información sobre la sensibilidad del fluoróforo al desactivador en cuestión (a mayor  $K_{SV}$ , mayor eficiencia de desactivación) y cuyo significado depende del mecanismo responsable de la desactivación. Lo que diferencia a los CPs de los fluoróforos convencionales es precisamente su mayor eficiencia de desactivación, lo que se conoce como desactivación amplificada o *super-quenching* y que dota a los CPs de mucha mayor sensibilidad. Esto se debe a que un evento de unión en una molécula pequeña solo provoca que un cromóforo cambie su fluorescencia, mientras que un evento de unión en un CP afecta la fluorescencia de toda una cadena de cromóforos macromoleculares, como se muestra en la **Figura 1.18**, provocando un fuerte descenso en la fluorescencia. Esta amplificación de señal proporcionada por los CPs es importante para las aplicaciones de biodetección porque las moléculas analizadas suelen estar presentes en concentraciones extremadamente diluidas [147,149].



**Figura 1.18.** Ilustración que representa el efecto de *superquenching* exclusivo de los CPs.

### 1.6.2. Nanopartículas basadas en polímeros conjugados

La solubilidad de los CPs y en especial de los PFs en medio acuoso es uno de los principales problemas que limita su uso en aplicaciones biotecnológicas. Como se comentó anteriormente, la incorporación de cadenas laterales flexibles con grupos terminales cargados para obtener CPEs favorece esta solubilidad, pero el polímero sigue teniendo tendencia a agregar debido a las interacciones de apilamiento (“ $\pi$ - $\pi$  stacking”) entre los esqueletos hidrocarbonados, disminuyendo considerablemente su rendimiento cuántico de fluorescencia. Una de las estrategias más utilizadas para reducir la agregación y facilitar la solubilidad de los CPs y CPEs en agua es fabricar nanopartículas a partir de ellos. Dichas nanopartículas basadas en polímeros conjugados (CPNs) son biocompatibles, preservan las propiedades de los CPs y son coloidalmente estables, por lo que son cada vez más utilizadas en aplicaciones de bioimagen y biodetección [142,150-153]. Existen varias alternativas para la formación de estas nanopartículas que dan lugar a nanoestructuras de diferente tamaño, morfología y carga superficial, que pueden influir en su aplicación final [154]. En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos de ellas, que se describen a continuación.

#### - *Nanopartículas de polímeros conjugados basadas en liposomas (L-CPNs)*

Las vesículas lipídicas o liposomas han sido empleados como modelos de membrana y vehículos de una gran diversidad de moléculas, con propósitos bioquímicos, nanobiotecnológicos y biomédicos. Son vesículas preparadas artificialmente, de talla nanométrica (aunque algunas pueden alcanzar tamaños mayores) y forma aproximadamente esférica con una fase acuosa interna rodeada por una o más bicapas lipídicas. Estas vesículas se forman espontáneamente al poner en contacto lípidos con agua debido a la estructura anfipática de los mismos y tienen la capacidad de encapsular compuestos polares en su interior acuoso [155]. Además, pueden incorporar compuestos hidrofóbicos en la bicapa lipídica, permitiendo así su “solubilización” y transporte en medios acuosos.

El grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral puso a punto recientemente una metodología que ha permitido la incorporación de CPEs con

diferentes bandas de emisión en liposomas, obteniendo nanopartículas fluorescentes (L-CPNs) altamente estables, que mantienen las propiedades de los polímeros conjugados. La incorporación de las cadenas poliméricas en la bicapa rompe los agregados poliméricos que se organizan en el agua, de forma que aumenta enormemente su señal de fluorescencia. Estas nanopartículas se desarrollaron como herramientas para favorecer el transporte y liberación controlada de fármacos y como marcadores fluorescentes, con resultados muy prometedores [156]. La preparación de las L-CPNs es sencilla ya que, una vez preparado el liposoma, los CPEs se incorporan espontáneamente en ellos, a través de interacciones electrostáticas entre los grupos cargados de los CPEs y las cabezas polares de los lípidos.

- *Nanopartículas de polímeros conjugados basadas en detergentes*

La metodología descrita en el apartado anterior no es apropiada para preparar nanopartículas de PFs neutros, dado su alto grado de hidrofobicidad, siendo necesario recurrir a otras técnicas de preparación. Entre ellas destaca el método de mini-emulsión, uno de los más utilizados en la fabricación de nanopartículas poliméricas [138]. Este método hace uso de tensioactivos o detergentes que impiden la agregación de los PFs. Para ello, debe prepararse una disolución de polímero en un disolvente apolar y dispersarse en una disolución acuosa a la que se le han añadido tensioactivos por debajo de su concentración micelar crítica. A continuación, el disolvente orgánico se evapora y los tensioactivos tienden a adsorberse, de manera equitativa, directamente sobre el esqueleto polimérico de los PFs, quedando su región polar expuesta a la disolución [142]. En cuanto a la elección del tensioactivo, el dodecil sulfato sódico (SDS), cargado negativamente, es uno de los más utilizados en este tipo de preparaciones. Las CPNs formadas mediante este protocolo presentan una enorme estabilidad coloidal, manteniendo sus propiedades fluorescentes durante meses.

La inclusión de L-CPNs y CPNs en matrices sol-gel e hidrogeles químicamente reticulados genera materiales nanocompuestos porosos con propiedades luminiscentes, que aumentan su funcionalidad. El acoplamiento de estos nanocomposites con elementos de reconocimiento, como las enzimas, amplía aún más su potencial, convirtiéndolos en plataformas nanobiosensoras con capacidad de realizar análisis

cualitativos y cuantitativos. Esta clase de materiales apenas ha sido caracterizada, y sus aplicaciones han sido poco exploradas, a pesar de sus interesantes propiedades.

En base a lo previamente comentado, en la presente Tesis Doctoral hemos utilizado materiales de estas características para desarrollar plataformas de detección ópticas y electroquímicas con capacidad para monitorizar actividad enzimática, y buscar inhibidores con potenciales aplicaciones biomédicas y medioambientales.



## 2. Objetivos





El Objetivo General de esta Tesis Doctoral es desarrollar y caracterizar nuevas plataformas para el diseño de dispositivos analíticos, como sensores y biosensores, con aplicaciones en los campos biomédico y medioambiental. Para lograr este propósito, se han empleado tanto hidrogeles inorgánicos como orgánicos como matrices de soporte de los dispositivos, en las cuales se han incorporado enzimas y/o nanopartículas fluorescentes basadas en polímeros conjugados.

Este objetivo general de puede desglosar en los siguientes Objetivos Específicos:

### **1. Desarrollo de un biosensor fluorescente para la búsqueda de fármacos antidiabéticos:**

- 1.1. Diseño y caracterización de L-CPNs fluorescentes.
- 1.2. Inmovilización de L-CPNs y  $\alpha$ -glucosidasa en matrices sol-gel, seguido de la caracterización del material resultante.
- 1.3. Puesta a punto de un biosensor multimuestra reutilizable para el cribado de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa.

### **2. Desarrollo de un sensor fluorescente para la detección de ALP:**

- 2.1. Caracterización de CPNs basadas en detergentes con diferentes bandas de emisión.
- 2.2. Obtención y caracterización de materiales fluorescentes nanocompuestos mediante la incorporación de las CPNs desarrolladas en hidrogeles orgánicos químicamente entrecruzados.
- 2.3. Configuración de una plataforma sensora transportable y de fácil manejo para la detección y cuantificación de ALP.

### **3. Desarrollo de un biosensor colorimétrico para la detección de fosfato:**

- 3.1. Inmovilización y caracterización de ALP en hidrogeles orgánicos.
- 3.2. Puesta a punto de un biosensor colorimétrico desechable para la detección de inhibidores de ALP.

#### **4. Desarrollo de un biosensor voltamperométrico para la detección de contaminantes:**

- 4.1. Preparación y caracterización electroquímica de SPEs de carbono modificados con hidrogeles orgánicos que incorporan ALP.
- 4.2. Optimización del biosensor para la determinación de iones fosfato en medio acuoso.

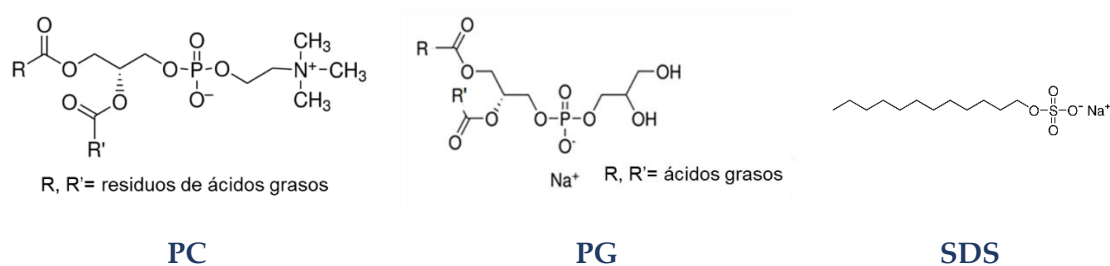
## 3. Materiales y Métodos



### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Fosfolípidos y detergentes

Los fosfolípidos sintéticos L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (PC) de yema de huevo, L- $\alpha$ -fosfatidilglicerol (sal de sodio) (PG) y el detergente iónico dodecil sulfato sódico (SDS) (Figura 3.1) se han obtenido de Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, España).



**Figura 3.1.** Estructura química de los fosfolípidos zwitteriónico (PC), aniónico (PG) y el detergente iónico (SDS).

#### 3.1.2. Enzimas

Las enzimas hidrolasas  $\alpha$ -glucosidasa (E.C. 3.2.1.20, de *Saccharomyces cerevisiae*, polvo liofilizado,  $M_w=67$  kDa) y fosfatasa alcalina (ALP) (EC 3.1.3.1; de mucosa intestinal bovina, polvo liofilizado,  $M_w=140$  kDa) (Figura 3.2) se han adquirido en Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, España). Las disoluciones stock de  $\alpha$ -glucosidasa y ALP se han preparado en tampón fosfato sódico (50 mM, 0.1 M NaCl, pH 7.4) y tampón Tris (55 mM, pH 9), respectivamente, a una concentración de 45.1  $\mu$ M.



**Figura 3.2.** Modelo que representa la estructura tridimensional cristalina de  $\alpha$ -glucosidasa y ALP. La imagen se ha generado utilizando el programa PyMOL.

### 3.1.3. Sustratos, productos e inhibidores enzimáticos

Los sustratos *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (PNPG) y *p*-nitrofenilfosfato (PNPP) (Figura 3.3a) se han obtenido de Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, España). El difosfato de hidroquinona (HQ2P) se ha adquirido de Metrohm DropSens.

Los productos de la hidrólisis enzimática comerciales *p*-nitrofenol (PNP) e hidroquinona (HQ,  $\geq 97\%$ ) (Figura 3.3b) se han obtenido de Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, España).

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa: acarbosa, miglitol y ácido gálico (Figura 3.3c) se han adquirido en Alfa Aesar (Thermo Fisher GmbH, Kandel, Alemania), Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. (Tokio, Japón) y Merck Life Science (Madrid, España), respectivamente. Como inhibidor de ALP, se ha utilizado fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) de Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, España).

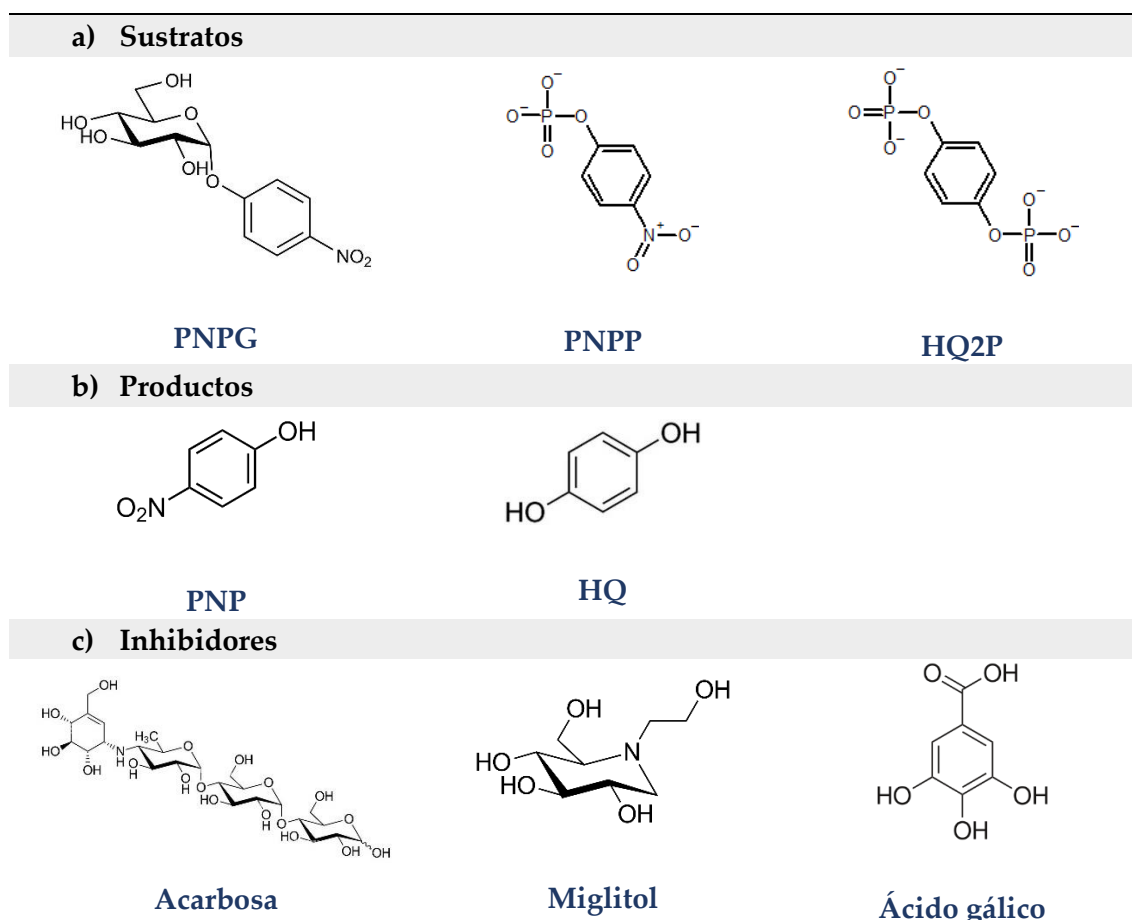


Figura 3.3. Estructuras químicas de los sustratos, productos e inhibidores enzimáticos utilizados.

### 3.1.4. Polímeros conjugados

El polifluoreno catiónico bromuro de poli[[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]fluoreno-fenileno] (HTMA-PFP) [ $M_n$  ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )= 4170;  $M_w$  ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) = 8340] ha sido sintetizado por el grupo del Dr. Ricardo Mallavia y, posteriormente, caracterizado en nuestro laboratorio en medio acuoso [157]. Se han preparado soluciones stock del polifluoreno en dimetil sulfóxido (DMSO) con concentraciones finales de  $3.65 \times 10^{-4}$  M (en unidades repetidas) y se han almacenado a  $-20$  °C antes de su uso. Los polímeros conjugados poli(9,9-dioctilfluoreno) (PFO) y poli[9,9-dioctilfluoreno-alt-benzotiadiazol] (F8BT) se han obtenido de American Dyes Source, Inc (Figura 3.4).

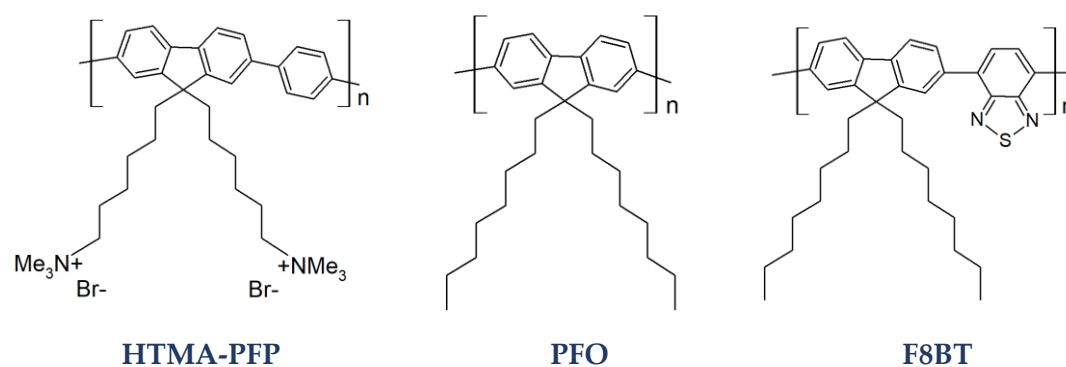


Figura 3.4. Estructuras químicas de HTMA-PFP, PFO y F8BT.

### 3.1.5. Precursores de sol-gel e hidrogeles orgánicos

El cloruro de [2-(acrililoxi)etil]trimetilamonio (AETA, 80% en peso, 600 ppm de hidroquinona monometil éter como estabilizador), la N-N'-metilen-bis(acrilamida) (MBA,  $\geq 99\%$ ), el fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LiTPO,  $\geq 95\%$ ) y el tetraetil ortosilicato (TEOS) (Figura 3.5) se han obtenido de Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, España).

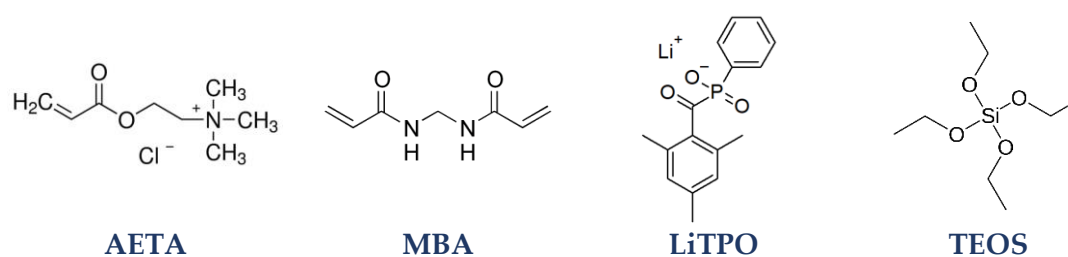


Figura 3.5. Estructuras químicas de AETA, MBA, LiTPO y TEOS.

### 3.1.6. Otros reactivos

Los tampones de fosfato sódico (50 mM, 0.1 M NaCl, pH 7.4) y Tris (55 mM, pH 9 o 0.1 M, pH 8.4) se han preparado con agua destilada y dos veces desionizada, utilizando un equipo Milli-Q (Merck Millipore, Madrid, España).

Todos los demás disolventes son de grado espectroscópico o de grado reactivo analítico (Uvasol, Merck).

## 3.2. Métodos de preparación

### 3.2.1. Preparación de CPNs

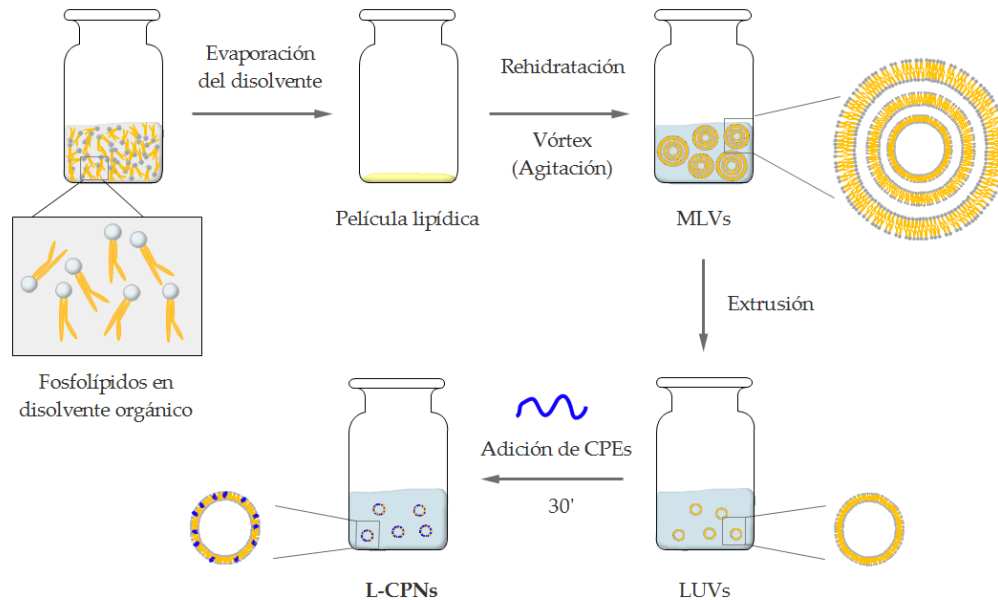
Las NPs fluorescentes desarrolladas en el marco de esta Tesis se fundamentan en la utilización de polímeros conjugados. Para su fabricación, se han empleado dos enfoques metodológicos distintos. El primero implica la utilización de liposomas en los que se ha incorporado el polielectrolito HTMA-PFP. En el segundo enfoque, se han empleado detergentes que han facilitado la solubilización de los polifluorenos PFO y F8BT. A continuación, se proporciona una descripción detallada de ambas técnicas.

- Para la preparación de nanopartículas fluorescentes liposomales (L-CPNs) se ha seguido una adaptación del protocolo descrito en Rubio-Camacho et al. [156]. Un esquema del mismo se representa en la [Figura 3.6](#).

Inicialmente, se evapora una solución de cloroformo que contiene 2 mg de lípido aniónico PG o lípido zwitteriónico PC durante 20 minutos bajo un flujo de gas argón. El lípido seco se resuspende en tampón fosfato sódico hasta alcanzar la concentración final deseada (1 mM para limitar la turbidez de la muestra, un posible artefacto en las mediciones de fluorescencia), y se agita varias veces utilizando un vórtex para obtener vesículas multilamelares (MLVs). Las vesículas unilamelares grandes (LUVs) se obtienen a partir de las MLVs por extrusión manual en jeringa (LiposoFast Basic, Avestin, Ottawa, Canada) a través de filtros de policarbonato de 0,1  $\mu\text{m}$  (Nucleopore, Cambridge, MA, EE.UU.). A continuación, se añaden alícuotas de la solución stock de polifluoreno HTMA-PFP en DMSO a la suspensión de LUVs (a una concentración final de 3  $\mu\text{M}$  en términos de unidades repetitivas) y se incuban durante al menos 30 minutos

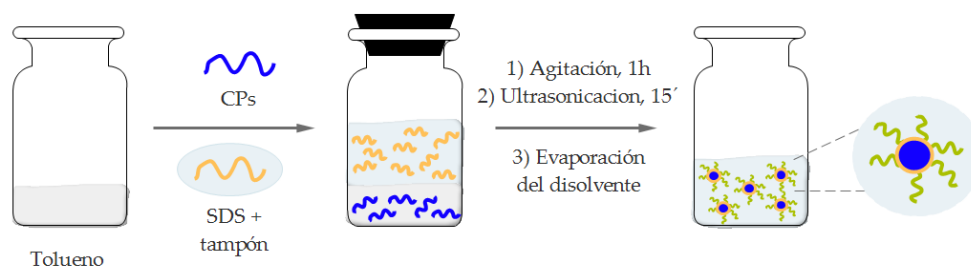


a temperatura ambiente. La concentración de HTMA-PFP es de  $3 \mu\text{M}$  para asegurar que todas las cadenas de polímero se incorporaran en las LUVs, teniendo en cuenta el coeficiente de partición entre la fase lipídica y acuosa previamente reportado por el grupo [158]. La proporción de DMSO en las muestras finales es inferior al 1% v/v en todos los casos.



**Figura 3.6.** Protocolo de preparación de L-CPNs de HTMA-PFP.

- Para la obtención de CPNs de PFO y F8BT basadas en detergentes se ha seguido una adaptación del protocolo ya descrito por Pecher et al. [138], representado en forma de esquema en la Figura 3.7. Para este propósito, se mezclan 5 mL de una solución de polímero en tolueno de 10 mg/mL con 10 mL de una solución tampón Tris de 55 mM y 4 mg/mL de SDS. Se agita durante 1 hora con un agitador magnético en un vial cerrado. La muestra se coloca en una sonda ultrasónica, con una potencia de 125W, utilizando un sonificador QSonica modelo Q125 (QSonica, Newtown, CT, USA) durante 15 minutos, con una amplitud del 90%. En esta etapa, se mantiene el vial con la solución sumergida en un baño de hielo para evitar el calentamiento y la producción de espuma. Luego se calienta a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  para evaporar el solvente orgánico. Finalmente, la solución se almacena a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dichas NPs han sido sintetizadas en el laboratorio del profesor F. Montilla.



**Figura 3.7.** Protocolo de preparación de CPNs de PFO y F8BT.

### 3.2.2. Métodos de inmovilización de nanopartículas y enzimas

En esta Tesis Doctoral tanto NPs como enzimas se han inmovilizado en diferentes tipos de matrices, cuya preparación se describe a continuación.

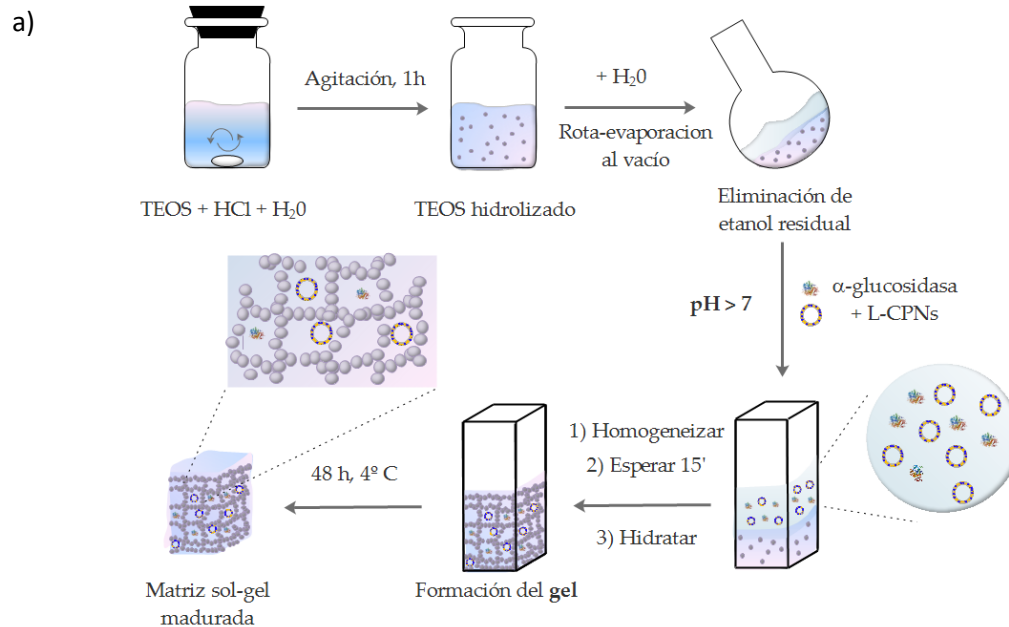
#### 3.2.2.1. Hidrogeles inorgánicos (matrices sol-gel)

El proceso sol-gel, descrito en la Introducción de esta Tesis, se lleva a cabo en dos etapas: la formación de un precursor soluble (sol) y la posterior gelificación del precursor para formar una matriz sólida (gel). El precursor se obtiene por la hidrólisis y la policondensación de precursores inorgánicos y/o orgánicos, y puede incluir enzimas, polímeros y otros aditivos. La gelificación se produce por la agregación de las partículas precursoras para formar una estructura tridimensional sólida.

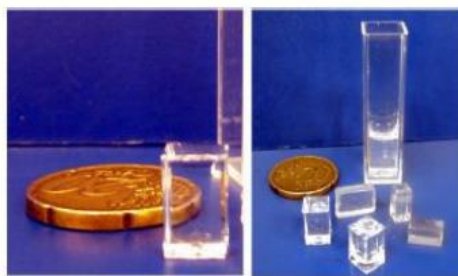
En esta Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo la coinmovilización de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y L-CPNs de HTMA-PFP utilizando dicha tecnología (Figura 3.8). El protocolo de preparación de estas matrices sol-gel se describe en detalle a continuación:

Inicialmente, se mezcla un volumen de 4.46 mL del precursor TEOS a temperatura ambiente con 1.44 mL de H<sub>2</sub>O y 0.06 mL de HCl (0.62 M). Tras agitar durante 1 hora, se mezcla 1 mL de esta solución con 1 mL de agua Milli-Q y se somete a rotaevaporación para eliminar el alcohol resultante de la hidrólisis del alcóxido. Posteriormente, en una cubeta desechable de 1 cm x 1 cm, se mezclan 0.7 mL de una disolución de tampón fosfato (pH>7) con 0.7 mL de la muestra de TEOS rotaevaporada. De manera rápida, se obtienen monolitos transparentes y porosos, como se observa en la Figura 3.8b. Estos monolitos se dejan madurar en presencia de ~1 mL de tampón durante 48 horas y, posteriormente, se almacenan a 4 °C en condiciones de oscuridad

antes de ser desmoldados para su utilización. La gelificación también se puede llevar a cabo directamente en los pocillos de una placa multipocillo, reduciendo en ese caso los volúmenes de mezcla añadidos.



b)



**Figura 3.8. a)** Esquema de la fabricación e inmovilización de L-CPNs y enzimas en matrices sol-gel. **b)** Imagen digital de monolitos de sol-gel madurados.

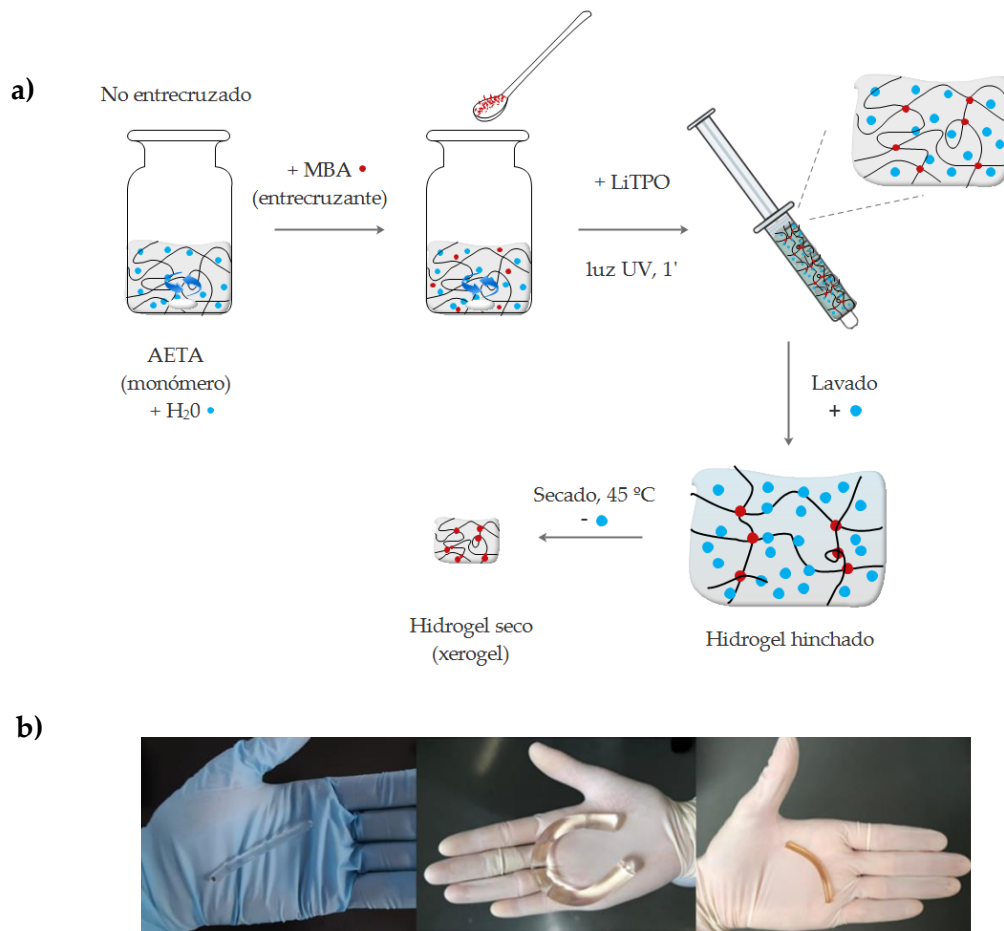
En el caso específico de la inmovilización de enzimas o nanopartículas, el protocolo de preparación es similar, con la excepción de sustituir la solución tamponada por una disolución, también tamponada, que contenga dichos componentes y añadirlo a un volumen equivalente de la muestra de TEOS hidrolizado y rotaevaporado.

### 3.2.2.2. Hidrogeles orgánicos entrecruzados químicamente

La síntesis de hidrogeles reticulados químicamente se puede realizar mediante la polimerización radicalaria de monómeros de bajo peso molecular y agentes entrecruzantes en presencia de iniciadores, como se describe en el apartado 1.5.2 de Introducción General. La concentración de los componentes, el tipo y la cantidad de agente entrecruzante, y las condiciones de reacción se pueden ajustar para controlar las propiedades del hidrogel, como su porosidad, capacidad de retención de agua y permeabilidad.

En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de hidrogeles mediante el proceso de fotopolimerización del monómero catiónico AETA, utilizando el agente de entrecruzamiento químico MBA y el fotoiniciador LiTPO (Figura 3.9a), siguiendo una adaptación del protocolo descrito por Naranjo et al. [127]. Este proceso se describe en detalle a continuación: En un experimento típico, se añaden 5.66 mL de AETA (26.4 mmol) y 0.01 g de MBA (0.06 mmol) a 5 mL de agua Milli-Q. A continuación, se añade LiTPO (0.02 g, 0.06 mmol) a la mezcla y se homogeneiza mediante agitación suave en condiciones de oscuridad. Luego, se extrae 1 mL de la mezcla con una jeringa desechable y se expone bajo luz UV ( $\lambda = 365$  nm) durante 1 minuto. Finalmente, se corta la punta de la jeringuilla y se retira el hidrogel formado, el cual presenta un aspecto cilíndrico (Figura 3.9b izda.). El material resultante (0.3 cm de diámetro, 5 cm de largo) se sumerge en agua Milli-Q durante 5 días, con el consiguiente aumento de volumen (Figura 3.9b centro), cambiando el agua todos los días para eliminar cualquier precursor no reaccionado. La red polimérica de hidrogel lavada se seca en una estufa a 45 °C durante 48 h, dando lugar a un xerogel (Figura 3.9b dcha.).

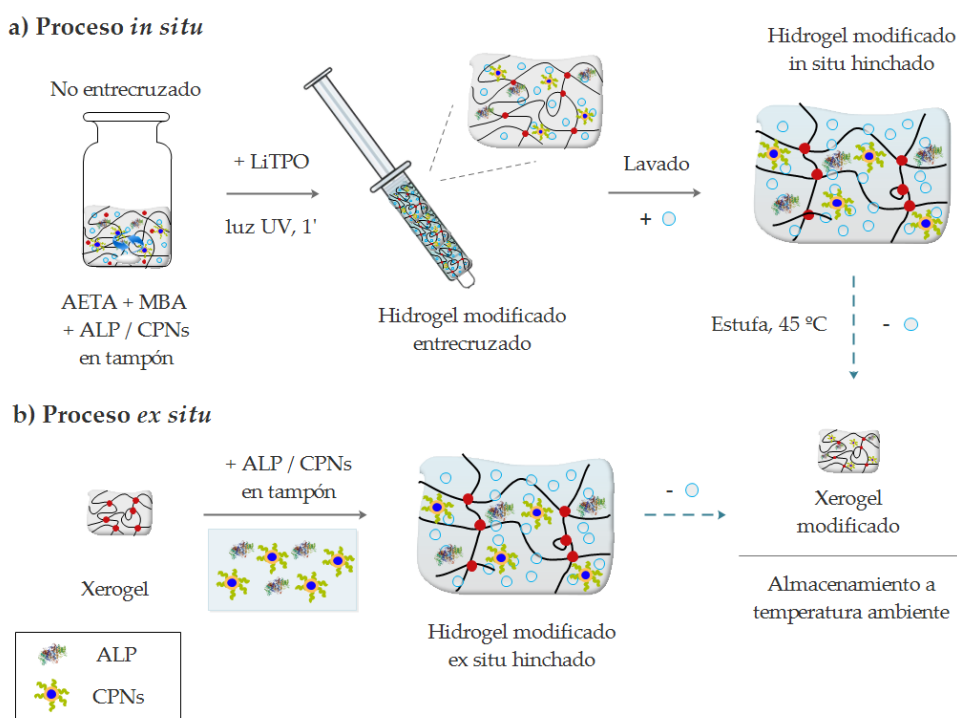
Para la inmovilización de enzimas y nanopartículas fluorescentes en estos hidrogeles se pueden emplear varias estrategias, entre las cuales destacan la incorporación durante la síntesis del hidrogel (método *in situ*) o una vez formado el hidrogel (método *ex situ*) (Figura 3.10). Estos métodos permiten la interacción entre las enzimas y las nanopartículas fluorescentes con el hidrogel, asegurando su retención dentro de la matriz y su estabilidad a lo largo del tiempo. A continuación, se describen detalladamente ambas estrategias utilizadas en el contexto de la presente Tesis Doctoral.



**Figura 3.9.** **a)** Esquema de la fabricación de hidrogeles de AETA. **b)** Imagen digital de un hidrogel recién preparado (izda.), hinchado (centro) y seco en estufa (xerogel) (dcha.).

- Método *in situ*: En este proceso, las enzimas o las NPs se incorporan durante la síntesis del hidrogel, formando parte de su estructura tridimensional. Durante la polimerización del hidrogel, se mezclan los precursores con las enzimas o las NPs, reemplazando el agua Milli-Q por 5 mL de una disolución tamponada de éstos. Las moléculas o partículas quedan atrapadas dentro de la matriz polimérica durante la formación del hidrogel.

- Método *ex situ*: En este enfoque, las enzimas o las NPs se añaden, posteriormente, a un hidrogel ya formado. El hidrogel, dada su alta capacidad de hinchamiento, absorbe la disolución en la que se encuentran estos componentes, incorporándolos en su interior. Para ello, el hidrogel se sumerge en una solución que contiene las enzimas o las NPs durante 24 horas y se almacena a 4 °C. Las fuerzas intermoleculares, como las interacciones electrostáticas, las fuerzas de Van der Waals o los enlaces de hidrógeno, permiten que las moléculas o partículas se adhieran a la red polimérica.



**Figura 3.10.** Esquema de inmovilización y almacenamiento de enzimas y CPNs en hidrogeles mediante metodología a) *in situ* y b) *ex situ*.

Por último, se procede a la preparación de xerogeles mediante la eliminación del contenido acuoso a través de un proceso de secado a 45 °C durante 48 horas. Este procedimiento permite la eliminación gradual del agua presente en el hidrogel, asegurando la formación de una matriz sólida y estable. Al realizar el secado a una temperatura controlada, se evita la deformación o el colapso estructural del xerogel, preservando sus propiedades físicas y químicas. Como resultado, se obtiene un material modificado que puede ser fácilmente manipulado, almacenado y transportado sin la necesidad de condiciones especiales de temperatura o humedad.

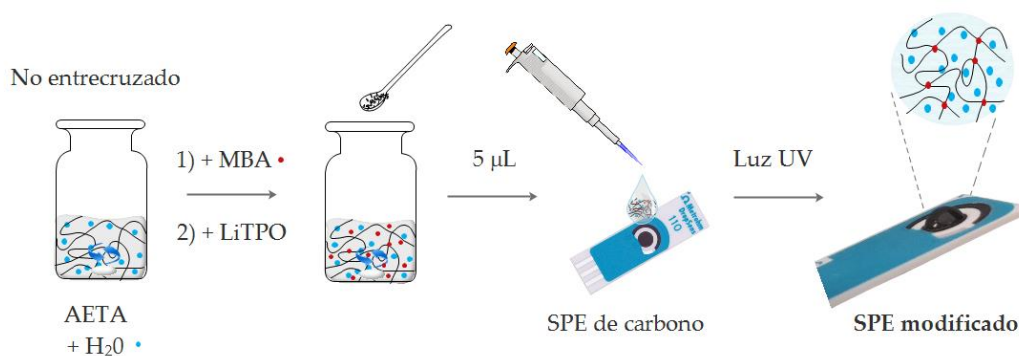
En esta Tesis Doctoral, la enzima ALP y las CPNs de PFO y F8BT han sido inmovilizadas y caracterizadas en este tipo de hidrogeles, utilizando tanto el método *ex situ* como el *in situ*.

### 3.2.3. Modificación de electrodos de carbono

La modificación de electrodos de carbono serigrafados (SPE), utilizados en esta Tesis Doctoral para la fabricación de un biosensor amperométrico, se ha llevado a cabo

mediante la síntesis directa de un hidrogel de AETA, sobre el electrodo de trabajo. El procedimiento utilizado se describe a continuación:

Se han sintetizado los hidrogeles de AETA siguiendo el protocolo mencionado anteriormente (3.2.2.2.), pero con una ligera modificación. En este caso, se aumenta la concentración del agente entrecruzante, MBA, en 10 veces para limitar/reducir el hinchamiento de la matriz en presencia de medio acuoso. Los demás reactivos se utilizan en las mismas proporciones. Previo a la modificación del SPE, este se somete a ultrasonidos en una mezcla de agua:etanol (proporción de volumen 1:1) durante 30 minutos y se deja secar. A continuación, se deposita una gota de 5  $\mu\text{L}$  de la solución precursora de hidrogel sobre el electrodo de trabajo del SPE. Después, se irradia el electrodo modificado durante 1 minuto ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) para iniciar la reacción de polimerización (Figura 3.11).



**Figura. 3.11.** Preparación de SPEs modificados con hidrogel.

En el caso de inmovilizar enzimas en el hidrogel, se mezcla una solución de tampón que contiene la enzima con la solución de precursores, en una relación de volumen de 1:1, antes de depositarla sobre el SPE e iniciar la polimerización con luz UV.

### 3.3. Métodos de caracterización

#### 3.3.1. Grado de hinchamiento de los hidrogeles

El grado de hinchamiento, también conocido como *swelling*, representa un parámetro fundamental en el estudio y desarrollo de hidrogeles. Se refiere a la capacidad de un hidrogel para absorber y retener agua en relación con su peso en seco. Su magnitud

depende de factores, como la densidad de entrecruzamiento y la composición química del hidrogel, incluyendo el grado de ionización de sus grupos funcionales, entre otros. Por lo tanto, tanto la hidrofobicidad de los monómeros como la cantidad de agente entrecruzante definen el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles.

En el marco de esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo mediciones en triplicado del grado de hinchamiento de xerogeles (aproximadamente 0,07 g, 0,3 cm de diámetro, 0,6 cm de largo) tanto en ausencia como en presencia de enzimas o nanopartículas, utilizando la metodología *ex situ* o *in situ*. Los xerogeles se sumergieron en exceso de agua Milli-Q a temperatura ambiente, y se registró el peso de las muestras a medida que se hinchaban con el tiempo hasta alcanzar un valor constante. El grado de hinchamiento (SW) se determinó aplicando la Ecuación 3.1:

$$SW = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad (3.1)$$

donde  $W_t$  es el peso del hidrogel en un cierto momento,  $t$ , y  $W_0$  es el peso inicial del xerogel ( $t=0$ ).

### 3.3.2. Métodos espectroscópicos

#### 3.3.2.1. Métodos de absorción

La espectroscopía de absorción es una técnica utilizada para medir la cantidad de luz absorbida por una muestra en función de la longitud de onda. En esta técnica, se irradia la muestra con una fuente de luz de amplio espectro y se mide la intensidad de la luz transmitida a través de ella. La muestra absorbe selectivamente ciertas longitudes de onda de luz, lo que resulta en la disminución de la intensidad de la luz transmitida en esas longitudes de onda específicas. Esta información se utiliza para determinar la concentración y/o la composición de la muestra, ya que diferentes compuestos tienen patrones de absorción característicos [159].

En el contexto de esta Tesis Doctoral, las medidas de absorción se llevaron a cabo en un espectrofotómetro ultravioleta-visible de doble haz UV-2700 (Shimadzu, Tokio, Japan) a temperatura ambiente, depositando las muestras en una cubeta de cuarzo de 1 cm x 1 cm.



Dentro del marco de esta investigación, se ha empleado esta metodología con el fin de llevar a cabo la caracterización del estado de enzimas y fluoróforos, la determinación de concentración de las muestras, así como las medidas de actividad enzimática de las enzimas hidrolasas  $\alpha$ -glucosidasa y fosfatasa alcalina (ALP).

En concreto, para medir la actividad de estas enzimas se requiere el uso de un espectrofotómetro ya que se van a utilizar sustratos incoloros, como el PNPG o PNPP, que al ser hidrolizados van a producir PNP. Las disoluciones de este compuesto a  $\text{pH} > 7$  tienen un color amarillento y poseen una banda de absorción característica en el rango del espectro ultravioleta-visible. Al medir la absorbancia de la muestra a una longitud de onda específica (405 nm), correspondiente al máximo de absorción del PNP ( $\epsilon = 18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), es posible cuantificar la cantidad de producto formado y, por lo tanto, evaluar la actividad enzimática. Además, mediante el registro continuo de la absorbancia a lo largo del tiempo, se puede obtener información sobre la velocidad de formación de PNP y la cinética de la reacción enzimática.

### *3.3.2.2. Métodos de fluorescencia*

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica que se utiliza para estudiar la emisión de luz fluorescente por parte de una muestra cuando es excitada con luz de cierta longitud de onda. Esta metodología proporciona, entre otros, información detallada sobre las propiedades estructurales, dinámicas y funcionales de las moléculas, así como de sus interacciones con otros compuestos. Además, se caracteriza por su alta sensibilidad y selectividad y su gran versatilidad, lo que la convierte en una herramienta valiosa para la detección y cuantificación de moléculas específicas en muestras complejas.

En esta técnica, se emplea un fluoróforo, una molécula que puede absorber energía y posteriormente emitirla como luz fluorescente. Al excitar el fluoróforo con luz de una longitud de onda apropiada, las moléculas pasan a un estado excitado y vuelven a su estado fundamental emitiendo fotones de luz de una longitud de onda superior (menor energía) [160]. Dependiendo de que la fuente de excitación sea continua o pulsada, se distinguen dos tipos de técnicas espectroscópicas, la espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario y la resuelta en el tiempo, respectivamente [161]. En

el marco de la presente Tesis Doctoral, se han utilizado ambas técnicas, en función de la información deseada sobre las propiedades y comportamientos de las moléculas de interés.

Para medidas de estado estacionario se ha empleado, por un lado, un espectrofluorímetro PTI-QuantaMaster (PTI, Birmingham, NJ, USA) interconectado a una celda Peltier para recoger los espectros de excitación y emisión y la intensidad de fluorescencia de muestras depositadas en cubetas de cuarzo de 1 cm x 1 cm. Por otro lado, las medidas de intensidad de fluorescencia en placas de 96 pocillos se han llevado a cabo en un lector de placas CytationTM3 (Biotek, Winooski, Vermont, USA).

En el caso de fluorescencia resuelta en el tiempo, los decaimientos de intensidad de fluorescencia se han recogido con un espectrómetro de vida útil de fluorescencia de alta eficiencia FluoTime 300 (PicoQuant, Berlín, Alemania), utilizando el conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC). El análisis de datos se realizó utilizando el software EasyTau (PicoQuant, Berlín, Alemania), ajustando el decaimiento de la intensidad de fluorescencia a una suma de exponenciales según la Ecuación 3.2 [162]:

$$I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (3.2)$$

donde  $\alpha_i$  y  $\tau_i$  son las amplitudes y vidas medias de las componentes individuales, respectivamente. La vida media promedio de fluorescencia,  $\langle \tau \rangle$ , se determinó mediante la Ecuación 3.3:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (3.3)$$

Gracias a la gran versatilidad de la espectroscopía de fluorescencia, su utilización en esta Tesis Doctoral ha permitido obtener amplia información sobre los sistemas estudiados. La instrumentación ha sido empleada, entre otros, para confirmar la formación y estabilidad de las CPNs y su inmovilización en hidrogeles. Además, ha servido para caracterizar la estabilidad conformacional y actividad de las enzimas y

como método de transducción para el desarrollo del biosensor y sensor de  $\alpha$ -glucosidasa y ALP, respectivamente.

Dado que ha sido la técnica más utilizada a lo largo de la Tesis Doctoral, a continuación se describen en detalle algunas de las aplicaciones anteriormente comentadas y los fundamentos en los que se basan.

### - *Estabilidad conformacional de enzimas*

La fluorescencia intrínseca de las proteínas procede de sus residuos aromáticos, principalmente del triptófano, cuyas propiedades espectroscópicas son altamente sensibles a la polaridad del microambiente local y, por tanto, a los cambios en el entorno implicados en el plegamiento/desplegamiento de proteínas [163]. En el estado nativo plegado, los residuos de triptófano se encuentran generalmente en el interior de la estructura de la proteína, mientras que, en un estado parcialmente plegado o desplegado, están expuestos al disolvente, lo que da lugar a modificaciones en los espectros de emisión [163,164]. Es por ello que la espectroscopía de fluorescencia se utiliza a menudo como herramienta para monitorizar alteraciones estructurales de las proteínas inducidos por factores externos tales como cambios de temperatura y pH, procesos de inmovilización, interacción con otros compuestos, etc.

Cuando se incrementa la temperatura, las enzimas pueden sufrir cambios en su estructura y conformación, llegando a perder su estructura tridimensional y, por tanto, su función. Estos cambios pueden afectar la interacción espacial de los residuos triptófano con el entorno, lo que a su vez puede influir en la fluorescencia intrínseca de la enzima [164]. En general, se observan dos tipos de cambios en las propiedades fluorescentes de las enzimas al aumentar la temperatura:

1. Cambios en la intensidad de fluorescencia: A medida que la temperatura aumenta, la intensidad de fluorescencia puede variar debido a modificaciones en la accesibilidad de los aminoácidos aromáticos a su entorno microscópico y a alteraciones en la movilidad de la estructura enzimática. Estos cambios pueden reflejar reorganizaciones estructurales o modificaciones en los microambientes locales de los aminoácidos aromáticos.

2. Cambios en la longitud de onda de emisión: Además de los cambios en la intensidad de fluorescencia, también pueden observarse variaciones en la longitud de onda de emisión en función de la temperatura (generalmente desplazamientos hacia el rojo). Estos desplazamientos pueden indicar alteraciones en la estructura tridimensional de la enzima, así como modificaciones en la interacción y entorno de los aminoácidos aromáticos.

El análisis de los cambios en la fluorescencia intrínseca enzimática en relación con la temperatura permite obtener información valiosa sobre la estabilidad y la conformación de la enzima. Estos datos pueden contribuir a la comprensión de los mecanismos de actividad enzimática y de cómo factores ambientales, como la temperatura, pueden afectar la función y la estructura de la enzima.

En este sentido, en esta Tesis Doctoral se ha caracterizado en detalle este fenómeno para la enzima ALP tanto en disolución como inmovilizada en hidrogeles orgánicos.

Los cambios en la fluorescencia intrínseca de ALP se analizaron a partir de los espectros de fluorescencia de la enzima, que fueron recogidos en función de la temperatura. Para cada espectro se determinó lo que se denomina la energía promedio de emisión (centro de masa espectral,  $\langle \nu \rangle$ ) calculado de acuerdo con la Ecuación 3.4:

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum_i I_i \nu_i}{\sum_i I_i} \quad (3.4)$$

donde  $I_i$  representa la fluorescencia emitida en el número de onda  $\nu_i$  [165]. La representación de este parámetro frente a la temperatura permite un buen seguimiento del proceso de desplegamiento térmico de la enzima. Además, es posible determinar la temperatura de desnaturalización térmica ( $T_m$ ) de la enzima a partir de la primera derivada de dicha representación.

#### - *Desactivación de fluorescencia como método de transducción en sensores y biosensores*

La intensidad de la fluorescencia de un compuesto fluorescente puede disminuir por una gran variedad de procesos. Estos cambios de intensidad o *quenching* de fluorescencia se producen, generalmente, como consecuencia de la interacción entre el

fluoróforo y un agente desactivante o *quencher* que, a través de diferentes mecanismos, da como resultado la pérdida de fluorescencia por parte del fluoróforo. Esta disminución en la intensidad de la fluorescencia también puede producirse por otros mecanismos triviales, es decir, no moleculares, como la atenuación de la luz incidente por el propio fluoróforo u otras especies absorbentes [160].

El grado de desactivación de la fluorescencia depende de la concentración de *quencher*, por lo que una medida experimental de la intensidad de un fluoróforo en presencia de un agente desactivante nos puede dar información sobre la concentración de este último. Como se ha comentado en la Introducción, este fenómeno de apagado de la fluorescencia se ha utilizado en numerosas ocasiones como método de transducción en el desarrollo de sensores y biosensores y ha sido el método empleado en esta Tesis Doctoral para la fabricación del biosensor y sensor de  $\alpha$ -glucosidasa y ALP, respectivamente.

El principio de funcionamiento se debe a la capacidad del producto de hidrólisis PNP de desactivar la fluorescencia de polifluorenos con emisión en el azul, siguiendo la Ecuación 3.5 de tipo Stern Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[PNP] \quad (3.5)$$

donde  $I_0$  e  $I$  son las intensidades de fluorescencia del polifluoreno observadas en ausencia o en presencia de PNP,  $[PNP]$  es la concentración de este último y  $K_{SV}$  es una constante que representa la capacidad del PNP para desactivar la fluorescencia del polímero conjugado.

Se cree que el mecanismo por el cual sucede este *quenching* de la fluorescencia es una combinación de procesos de transferencia entre ambos compuestos. Dado que el PNP absorbe donde emite el polifluoreno, el acercamiento entre ambos puede dar lugar a una transferencia de energía resonante o FRET desde el PF a PNP, que provoca la pérdida de fluorescencia del primero. Por otro lado, el PNP es un aceptor de electrones, mientras que los polifluorenos son ricos en electrones, lo que origina una transferencia de carga inducida (PIT) entre el PF y el PNP, que se traduce también en un decrecimiento de la señal fluorescente [46,166]. Además, debido al efecto de *quenching* amplificado

descrito en el apartado 1.6.1 de la Introducción, una cantidad muy pequeña de PNP va a ser capaz de producir un brusco apagamiento de la señal.

Como se ha comentado anteriormente, el PNP es el producto de la hidrólisis de sustratos como el PNPP y el PNPG, de forma que si acoplamos en un mismo dispositivo las enzimas con las CPNs y añadimos el sustrato, la intensidad de fluorescencia inicial de las nanopartículas comenzará a disminuir, como consecuencia de la formación del PNP, y la cinética de decrecimiento reflejará la cinética enzimática. Por otro lado, si en el medio de reacción se encuentra presente un inhibidor enzimático, no se formará el PNP, por lo que no se observará pérdida de fluorescencia.

### 3.3.3. Métodos de caracterización de tamaño, carga y morfología

#### 3.3.3.1. *Dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial zeta*

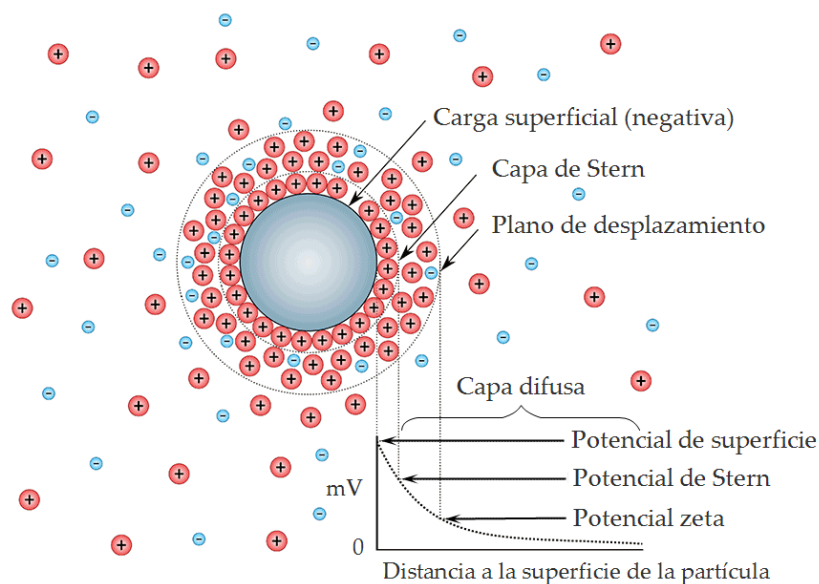
La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) se utiliza, entre otras aplicaciones, para determinar el tamaño o la polidispersidad de partículas en una muestra líquida. Se basa en el análisis de los cambios en la intensidad de la luz dispersada por las partículas en movimiento dentro del líquido.

En la técnica de DLS, un haz de luz láser se dirige hacia la muestra y las partículas presentes en ella dispersan la luz en diferentes direcciones. Un detector registra los cambios en la intensidad de la luz dispersada debido a los movimientos brownianos de las partículas. Estos movimientos son causados por las colisiones aleatorias de las partículas con las moléculas del solvente [167]. A partir de los datos de intensidad de luz dispersada, se realiza un análisis matemático para determinar la distribución de tamaños de partículas presentes en la muestra, lo cual se expresa comúnmente mediante el índice de polidispersidad (PDI). Esta técnica es especialmente útil para analizar partículas en la escala nanométrica, como proteínas, polímeros, liposomas y nanopartículas [168].

El potencial zeta (ZP) es un parámetro que cuantifica el equilibrio electroquímico en la interfaz partícula-líquido. Mide la magnitud de repulsión/atracción electrostática entre partículas en una suspensión o coloide, y puede utilizarse para predecir su estabilidad coloidal [169]. Una descripción más detallada de este concepto se presenta a continuación.

Cuando una partícula se encuentra suspendida en un medio líquido, se forma una estructura conocida como doble capa alrededor de su superficie, como se ilustra en la Figura 3.12. Esta doble capa consta de dos regiones principales: la capa de Stern, también conocida como “capa fija”, más cercana a la superficie de la partícula donde los iones (de signo contrario a la carga de la partícula) están fuertemente unidos, y la capa difusa, donde los iones están menos firmemente asociados y se dispersan más libremente en el medio. A medida que nos alejamos de la superficie de la partícula, la concentración de iones en la capa difusa disminuye gradualmente. La región más próxima a la superficie de la partícula en la capa difusa, que se desplaza conjuntamente con ella, se denomina plano de desplazamiento.

El potencial zeta es una medida del potencial eléctrico en el plano de desplazamiento respecto del medio circundante. Representa la diferencia de potencial entre la capa de Stern y el medio líquido circundante. Este potencial zeta se debe a la distribución de carga en la superficie de la partícula y la interacción electrostática con los iones presentes en la solución, por lo que depende de factores como el pH o la fuerza iónica de la solución [169].



**Figura 3.12.** Representación esquemática de la concentración iónica y la diferencia de potencial en función de la distancia desde la superficie cargada de una partícula suspendida en un medio dispersante. Basada en Glawdel et al. [169].

En general, un potencial zeta con un valor absoluto alto, es decir, lejos de cero, indica una mayor estabilidad coloidal, ya que las partículas tienen cargas eléctricas fuertemente repulsivas. El rango considerado como estable para el potencial zeta se sitúa a partir de +30 mV o -30 mV [170]. Dentro de este rango, tanto valores positivos como negativos, se espera que las fuerzas de repulsión electrostática sean lo suficientemente fuertes como para prevenir la agregación o floculación de las partículas coloidales.

Para explorar el tamaño y polidispersidad de las distintas nanoestructuras preparadas en esta Tesis Doctoral, así como el potencial zeta, se utilizó un instrumento Malvern Zetasizer Nano-ZS (Worcestershire, UK). La medición de tamaño se realizó en cubetas desechables a un ángulo de 173°, mientras que la medición de potencial zeta se realizó en células específicas para tal fin. Todas las mediciones se llevaron a cabo en triplicado, a temperatura ambiente y utilizando una fuente de luz láser de helio-neón monocromática coherente de 4 mW.

### *3.3.3.2. Microscopía electrónica*

La microscopía electrónica es una técnica de imagen que utiliza haces de electrones en lugar de luz visible para visualizar objetos a una escala muy pequeña. Se basa en la interacción de los electrones con la muestra, lo que permite la observación de objetos en alta resolución, incluso a nivel atómico, y proporciona información sobre la morfología, el tamaño y la distribución de partículas, así como sobre la estructura interna de los materiales [171,172].

En el contexto de esta Tesis Doctoral, se han empleado diferentes técnicas de microscopía electrónica para caracterizar la morfología y tamaño de las CPNs fabricadas.

Por un lado, se ha utilizado un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (JEM-1400 Plus, JEOL, Tokio, Japón) a 120 kV para obtener imágenes de LUVs y L-CPNs. Estas muestras se prepararon mediante la colocación de una gota de la suspensión correspondiente en una rejilla de cobre (300-mesh) cubiertos con película de carbono y teñidas con citrato de plomo. Antes de colocarlas bajo el microscopio, se dejan secar al aire. Las imágenes digitales se han capturado con una cámara Gatan ORIUS.



Por otro lado, se ha realizado microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando el modelo Sigma 300 VP (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania), un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) de tipo Schottky a baja kV sin revestimiento. Se han obtenido imágenes de CNPs de PFO y F8BT depositando una gota de la suspensión correspondiente sobre una oblea de silicio. Después del secado al aire, se colocan las muestras en el microscopio para su visualización.

### 3.3.3.3. *Microscopía confocal fluorescente*

La microscopía confocal fluorescente es una técnica de imagen que se basa en la fluorescencia de las moléculas para visualizar estructuras y procesos a nivel microscópico. Consiste en el uso de un láser para excitar fluoróforos específicos en la muestra, generando una señal fluorescente que se detecta mediante un sistema de detección sensible.

A diferencia de la microscopía convencional, la microscopía confocal fluorescente utiliza un sistema llamado “diafragma de detección confocal” o *pinhole*, que permite capturar solo la luz emitida por la muestra focalizada en un plano específico, eliminando el paso de aquella procedente de los planos de la muestra que no están enfocados [173]. Esto resulta en imágenes de mayor resolución y contraste, ya que se evita la dispersión de la luz en otras áreas de la muestra.

Esta técnica permite visualizar estructuras subcelulares, procesos dinámicos en tiempo real y la interacción entre biomoléculas marcadas con fluoróforos. Además, es útil para el estudio de muestras tridimensionales, ya que se pueden adquirir series de imágenes en diferentes planos focales y reconstruir una imagen tridimensional [173].

Se han adquirido imágenes de la fluorescencia de las L-CPNs sintetizadas en el marco de esta Tesis Doctoral utilizando un microscopio confocal de barrido láser (Zeiss LSM 900 con un detector Airyscan 2 de superresolución) y se han procesado utilizando el software Carl Zeiss ZEN blue. Para la adquisición de imágenes, se ha utilizado un objetivo de 63x/1.4 NA (inmersión en aceite) y se ha excitado a las L-CPNs a 405 nm.

Para obtener los histogramas correspondientes, se han analizado las imágenes con el programa ImageJ.

### 3.3.4. Métodos electroquímicos

Las técnicas electroquímicas se clasifican generalmente en tres categorías principales, dependiendo de si la reacción que se monitoriza electroquímicamente genera: una corriente medible (amperometría), una acumulación de carga o un potencial medible (potenciometría) o altera las propiedades conductivas del medio entre los electrodos (conductometría) [62].

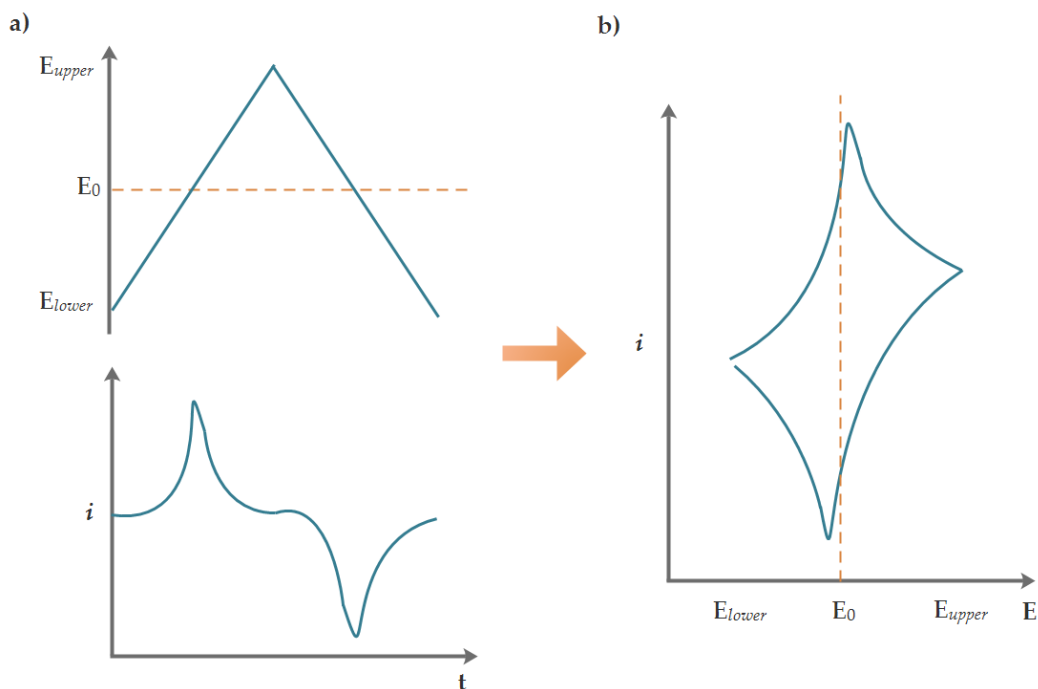
Las técnicas voltamétricas (o voltamperométricas) y cronoamperométricas son ampliamente utilizadas en los biosensores electroquímicos. Estas técnicas se basan en la aplicación de un potencial a un electrodo de trabajo frente a un electrodo de referencia, y la corriente medida es el resultado de la electrólisis mediante una reducción u oxidación electroquímica en el electrodo de trabajo. La voltametría explora el potencial en un rango establecido y la respuesta de corriente generalmente presenta un pico o una meseta proporcional a la concentración del analito. Dentro de las técnicas voltamétricas o voltamperométricas se incluyen la voltametría cíclica, la voltamperometría de onda cuadrada y la voltamperometría de pulso diferencial [12,174].

Debido a que el uso de técnicas electroquímicas, en concreto la voltamperometría cíclica (CV), supone una novedad dentro del grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, se va a describir con más detalle su funcionamiento.

La voltamperometría pertenece a una categoría de métodos electroanalíticos a través de los cuales se obtiene información sobre un analito al aplicar un potencial ( $E$ ) variable a una celda electroquímica y medir la corriente ( $i$ ) resultante. Por lo tanto, es una técnica amperométrica. La CV es una de las formas más ampliamente utilizadas, ya que proporciona información sobre procesos redox, la concentración de especies electroactivas, cinética de reacciones y estabilidad de los sistemas electroquímicos.

Inicialmente, el electrodo es inducido a un potencial inicial ( $E_0$ ). A continuación, el sistema se polariza entre dos límites de potencial, superior ( $E_{upper}$ ) e inferior ( $E_{lower}$ ), siguiendo una función de onda de tipo triangular (Figura 3.13a).

El voltaje se aplica entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, mientras que la corriente se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. Las mediciones obtenidas se representan como corriente frente a voltaje, también conocido como voltamperograma (Figura 3.13b). A medida que se incrementa gradualmente el voltaje hacia valores de potencial más positivos que el potencial redox estándar del analito, también aumentará la corriente que fluye a través del sistema. Sin embargo, cuando el voltaje supera este potencial redox y llega a  $E_{upper}$ , la corriente comienza a disminuir, formando un pico. Esta disminución se debe a que la concentración de la especie redox activa disminuye, hasta que su concentración en superficie se hace cero y el aporte de esta especie está controlado por el proceso de difusión desde el seno de la disolución. Cuando se invierte el sentido del barrido se producen los procesos al contrario al de barrido de ida, si la especie electroactiva puede ser reducida. El barrido inverso proporciona información valiosa sobre la reversibilidad de una reacción a una velocidad de barrido específica, lo cual indica la capacidad de la reacción para proceder en ambas direcciones [62,175].



**Figura 3.13. a)** Las curvas de voltaje ( $E$ ) y corriente ( $i$ ) en función del tiempo en un experimento voltamperométrico. **b)** Voltamperograma resultante (curva  $I$  frente a  $E$ ).

Siguiendo el criterio de la IUPAC las corrientes positivas corresponden a procesos anódicos (oxidaciones netas) mientras que las corrientes negativas corresponden a procesos catódicos (reducciones netas).

El patrón del voltamperograma de un compuesto determinado no solo está influenciado por la velocidad de barrido y la superficie del electrodo, que cambian después de cada etapa de adsorción, sino que también puede depender de la concentración del catalizador. Por ejemplo, al aumentar la concentración de enzimas específicas de la reacción a una velocidad de barrido dada, se obtendrá una corriente más alta en comparación con la reacción no catalizada. En otras palabras, la presencia de un catalizador aumenta la eficiencia de la reacción electroquímica, lo que se refleja en un aumento en la corriente registrada en el voltamperograma.

Durante una estancia llevada a cabo en el laboratorio del Dr. Francisco Montilla en la Universidad de Alicante, se han realizado medidas de voltamperometría cíclica utilizando un potenciostato eDAQ (modelo EA163) acoplado a un generador de ondas (modelo EG&G Parc 175) y la adquisición de datos se ha realizado con una unidad eDAQ e-corder 410 (software Chart y Scope de eDAQ, ES500, Denistone East, Australia). Los electrodos de carbono serigrafiados (SPE, Ref: DRP-C110, área geométrica del electrodo de trabajo 0.126 cm<sup>2</sup>), se han adquirido en Metrohm DropSens.

Esta técnica se ha empleado en el presente estudio para llevar a cabo la caracterización de la respuesta electroquímica de SPEs de carbono modificados con hidrogel, así como para determinar la actividad enzimática de ALP.

## 4. Resultados y Discusión



En la siguiente sección se exponen y discuten los resultados más destacados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

Dichos resultados se corresponden con los diferentes artículos que componen esta Tesis:

**Artículo 7.1** (Anexo I)

---

*Reusable Fluorescent Nanobiosensor Integrated in a Multiwell Plate for Screening and Quantification of Antidiabetic Drugs*

**Artículo 7.2** (Anexo I)

---

*Fluorescent Nanocomposite Hydrogels Based on Conjugated Polymer Nanoparticles as Platforms for Alkaline Phosphatase Detection*

**Artículo 7.3** (Anexo I)

---

*Portable Alkaline Phosphatase–Hydrogel Platform: From Enzyme Characterization to Phosphate Sensing*

**Artículo 7.4** (Anexo I)

---

*Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels*





## 4.1. Caracterización de nanopartículas basadas en CPs

A continuación, se presentan de forma resumida parte de los resultados correspondientes a las publicaciones 7.1 y 7.2, que forman parte del Anexo I de esta Tesis Doctoral, cuyo objetivo consiste en el desarrollo de nanopartículas fluorescentes estables en medio acuoso mediante la combinación de polímeros conjugados tanto con vesículas lipídicas como con detergentes. Las propiedades de estas nanoestructuras se han caracterizado en detalle en disolución, ya que posteriormente se pretende inmovilizarlas para utilizarlas como transductores en el desarrollo de plataformas sensoras fluorescentes.

### 4.1.1. CPNs basadas en liposomas (L-CPNs)

Por un lado, se han diseñado L-CPNs fluorescentes con emisión azul mediante la incorporación del polifluoreno catiónico HTMA-PFP en vesículas lipídicas de PC, tal y como se describe en el apartado 3.2.1 de la Tesis. Estudios previos del grupo han demostrado que esta estrategia permite estabilizar el polímero, evitando su tendencia a agregarse en medio acuoso [157]. Estas nanoestructuras se han caracterizado en detalle en tampón fosfato (50 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.4) utilizando técnicas de espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario, DLS, potencial zeta y TEM. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.1 y los espectros de emisión de fluorescencia normalizados en la Figura 4.1.

### 4.1.2. CPNs basadas en detergentes

Por otro lado, se han desarrollado nanopartículas basadas en los polifluorenos neutros PFO y F8BT, que emiten en el azul y amarillo, respectivamente, presentando diferentes bandas de emisión. Estos polímeros son totalmente inmiscibles en agua. El uso de nanopartículas basadas en ellos, como las fabricadas con detergentes según se describe en el apartado 3.2.1, permite superar esta limitación, permitiendo su caracterización en medio acuoso.

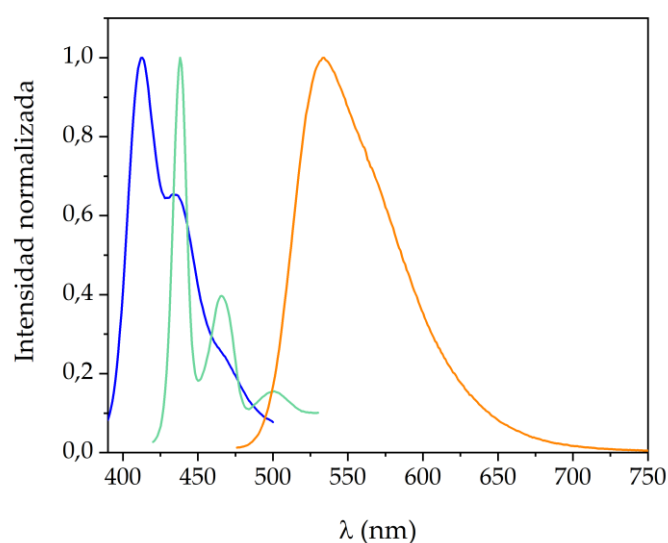
Ambas CPNs se han caracterizado en tampón Tris (55 mM, pH 9) y cloroformo utilizando técnicas de espectroscopía óptica. En el caso de las CPNs de F8BT los

espectros obtenidos son similares en ambos medios. Sin embargo, los resultados mostraron un desplazamiento hacia el rojo en el espectro de emisión de las CPNs de PFO en tampón en comparación con el obtenido en cloroformo, lo cual se atribuyó a la presencia de dos fases diferentes en el PFO. Este polifluoreno puede adoptar una fase “vítrea” desordenada (adoptada en buenos disolventes, como el cloroformo) y una fase  $\beta$  más cristalina. La fase  $\beta$ , presente en las nanopartículas, exhibe una mayor longitud de conjugación, que da lugar a un desplazamiento hacia el rojo, y una mejora de rendimiento óptico [176]. La presencia de fase  $\beta$  en CPNs de PFO se confirmó mediante espectroscopía de absorción (Figura 1a de la publicación 7.2). Utilizando la técnica de fluorescencia resuelta en el tiempo, se observaron tiempos de vida media  $\langle\tau\rangle$  más largos para CPNs de PFO en comparación con PFO en fase “vítrea”, lo cual respalda la hipótesis de que parte del polímero adopta la fase  $\beta$  dentro de las nanopartículas [177]. El tamaño, carga superficial y morfología de estas nanoestructuras se han caracterizado en detalle utilizando técnicas de DLS, potencial zeta y SEM. Los resultados obtenidos se recogen en la [Tabla 4.1](#) y los espectros de emisión de fluorescencia normalizados en la [Figura 4.1](#). La morfología elipsoidal de las CPNs de PFO (Figura 2a de la publicación 7.2) es otra característica que confirma la existencia de la fase  $\beta$  [178].

**Tabla 4.1.** Diámetro hidrodinámico (d), potencial zeta y parámetros fluorescentes (longitud de onda de excitación ( $\lambda_x$ ), máximo de emisión ( $\lambda_m$ ) y vida media promedio ( $\langle\tau\rangle$ ) de CPNs basadas en HTMA-PFP, PFO y F8BT.

CPNs	pH del medio	d $\pm$ SD (nm)	ZP $\pm$ SD (mV)	Morfología	Parámetros fluorescentes		
					$\lambda_x$ (nm)	$\lambda_m$ máx. (nm)	$\langle\tau\rangle^*$ (ps)
HTMA-PFP	7.4	164.1 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.3	Esférica	380	413	-
PFO	9	76.6 $\pm$ 0.5	-45 $\pm$ 1	Elipsoidal	396	438	122
F8BT	9	65.7 $\pm$ 0.9	-62 $\pm$ 6	Esférica	466	534	641

\*Calculada según la Ecuación 3.3



**Figura 4.1.** Espectros de emisión normalizados de CPNs de HTMA-PFP (azul), PFO (verde) y F8BT (naranja), en su correspondiente medio tamponado.

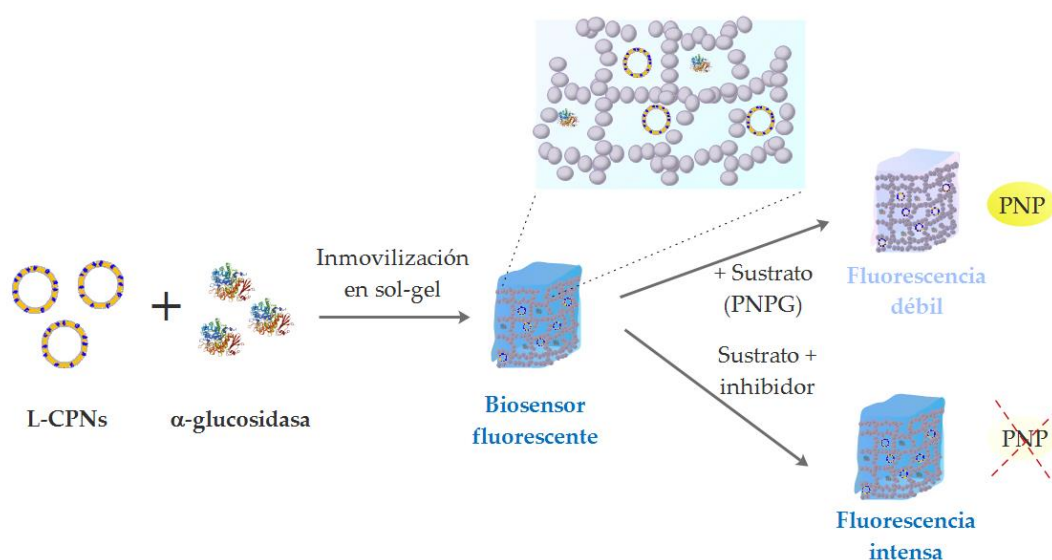
## 4.2. Desarrollo de plataformas fluorescentes basadas en CPNs

A partir de las CPNs desarrolladas y caracterizadas en esta Tesis Doctoral, se fabricaron dos plataformas sensoras fluorescentes. A continuación, se presentan de manera resumida los resultados relacionados con su diseño y aplicación.

Una de las plataformas tiene como objetivo la búsqueda y detección de inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, que podrían utilizarse como potenciales fármacos antidiabéticos. Por su parte, la segunda plataforma está diseñada para detectar la presencia de enzimas hidrolasas, en particular la fosfatasa alcalina (ALP). La diferencia fundamental entre ambas radica en que la primera es un biosensor, ya que incorpora enzimas en su diseño, mientras que la segunda es un sensor, en donde la enzima es el analito a ser detectado. Además, estas plataformas difieren tanto en el material empleado para la inmovilización como en el tipo de nanopartículas fluorescentes utilizadas. El nexo común es que en ambas plataformas la detección se lleva a cabo a partir del *quenching* de fluorescencia de las CPNs inducido por el producto de hidrólisis PNP.

#### 4.2.1. Desarrollo de un biosensor fluorescente para el cribado de fármacos antidiabéticos

Se ha desarrollado un nanobiosensor fluorescente para el cribado de fármacos antidiabéticos utilizando las L-CPNs mencionadas en el apartado 4.1.1 junto con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de los componentes en disolución y, después, inmovilizados en una matriz sol-gel. Los resultados obtenidos en este estudio están detallados en la publicación 7.1. La Figura 4.2 muestra una representación esquemática del funcionamiento del dispositivo.



**Figura 4.2.** Esquema del principio de funcionamiento del biosensor de  $\alpha$ -glucosidasa, donde el sustrato PNPG es hidrolizado a PNP siguiendo la reacción descrita en la Figura 1.6 de la Introducción General.

##### 4.2.1.1. Estudio en disolución de los componentes del nanobiosensor

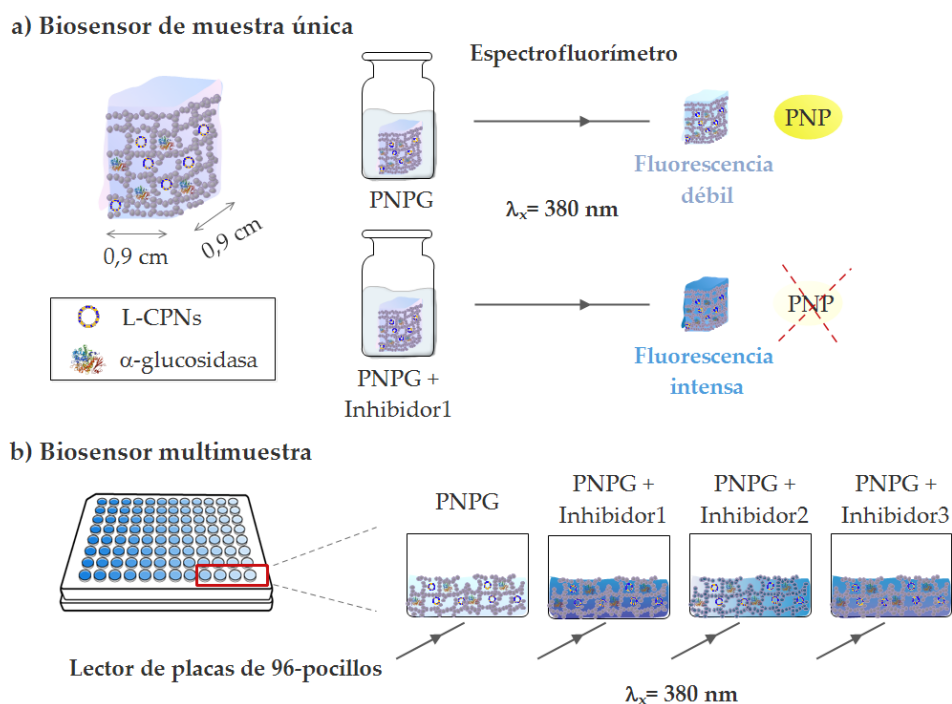
En primer lugar, se llevó a cabo una evaluación en disolución de la capacidad de las L-CPNs para ser desactivadas por PNP, un requisito indispensable para el correcto desarrollo del biosensor. Los resultados mostraron que, efectivamente, este compuesto es capaz de desactivar la fluorescencia de las L-CPNs de HTMA-PFP (Figura 1a de la publicación 7.1), siendo el valor de la constante de desactivación,  $K_{sv}$ , igual a  $5.4 \pm 0.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , obtenida ajustando los datos a la Ecuación 3.5.

Una vez verificado esto, se realizó un experimento para confirmar si el proceso de *quenching* también ocurre cuando se añade el sustrato PNPG a una suspensión de L-CPNs que contiene la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, considerando que el PNP es el producto final de hidrólisis catalizado por la enzima. Los resultados obtenidos revelan que el efecto generado en la señal de fluorescencia de las L-CPNs después de la adición de sustrato exhibe un patrón de desactivación muy similar al observado en el caso de PNP tras un período de incubación de 13 minutos. El valor de  $K_{sv}$  obtenido es de  $5.3 \pm 0.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , un valor bastante similar al encontrado para PNP. Este resultado demuestra que la fluorescencia de las L-CPNs es capaz de detectar actividad enzimática y, por ello, implica que podría ser usado como método para la detección de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa (AGIs).

La presencia de un inhibidor prevendría la hidrólisis del sustrato en PNP, lo que resultaría en una reducción del *quenching* de la fluorescencia después de un periodo de incubación, en comparación con la ausencia del inhibidor. Para evaluar la viabilidad de esta potencial aplicación, se monitorizó la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa en presencia del conocido AGI comercial acarbosa. Los resultados obtenidos mostraron que la intensidad de fluorescencia medida después de 13 minutos era más elevada que la obtenida en ausencia de inhibidor, demostrando la capacidad de los componentes del biosensor para detectar la presencia de AGIs (Figura 2 de la publicación 7.1).

#### 4.2.1.2. Inmovilización de los componentes del nanobiosensor

Con el objetivo de simplificar el manejo y permitir la reutilización de los componentes del nanobiosensor, tanto las L-CPNs como la enzima  $\alpha$ -glucosidasa se inmovilizaron utilizando el proceso sol-gel. Esto resultó en la obtención de matrices sólidas y transparentes cuya forma viene determinada por el molde utilizado durante la reacción de polimerización. Se han puesto a punto dos configuraciones del biosensor (Figura 4.3). En una primera aproximación, se ha diseñado un nanobiosensor de muestra única que ha sido utilizado para caracterizar y optimizar el dispositivo. En una segunda aproximación, el nanobiosensor se ha integrado en una placa de 96 pocillos que ha permitido investigar la posibilidad de reutilización y realizar múltiples mediciones de manera simultánea.



**Figura 4.3.** Representación esquemática y principio de funcionamiento del nanobiosensor **a)** de muestra única y **b)** multimuestra para la búsqueda de AGIs, basado en el *quenching* de las L-CPNs inmovilizadas por PNP, generado a través de la reacción catalítica del sustrato PNPG.

#### - Biosensor de muestra única

Para esta configuración, los componentes del biosensor se inmovilizaron en monolitos del sol-gel de  $\sim 9 \times 9 \times 15 \text{ mm}^3$ . En primer lugar, se llevó a cabo la inmovilización de cada componente por separado y sus propiedades fueron caracterizadas. Los resultados revelaron, por un lado, que las propiedades fluorescentes de las L-CPNs no solo se mantenían tras la inmovilización, si no que la señal fluorescente se estabilizaba (Figura S3a de la publicación 7.1). Además, se comprobó que las L-CPNs inmovilizadas experimentaban una reducción en su fluorescencia debido a la presencia de concentraciones crecientes de PNP (Figura S3b de la publicación 7.1), aunque este proceso de desactivación mostraba una cinética más lenta en comparación con la observada en disolución. Este comportamiento puede atribuirse a las restricciones de difusión impuestas por la matriz porosa, la cual limita la accesibilidad de pequeñas moléculas a las nanopartículas. Este fenómeno ha sido previamente reportado para PNP y otros analitos en matrices sol-gel [80,81]. Por otro lado, el estudio de la fluorescencia intrínseca de la enzima, debido a sus residuos de triptófano [179], confirmó que esta se

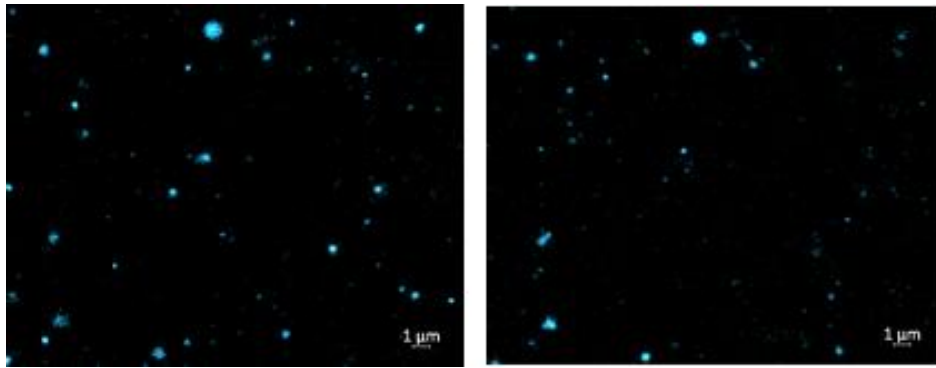
inmovilizó de manera exitosa, ya que no se observaron alteraciones en su conformación estructural (Figura S4 de la publicación 7.1).

Tras obtener resultados prometedores con los componentes por separado, se procedió a coinmovilizar las L-CPNs fluorescentes y  $\alpha$ -glucosidasa en una matriz única para obtener la forma final del nanobiosensor. La disminución de fluorescencia de las L-CPNs en presencia de PNPG validó la efectividad del proceso de coinmovilización y la capacidad del biosensor para detectar actividad enzimática. Posteriormente, se exploró la habilidad del biosensor para detectar la presencia de acarbosa. Los resultados mostraron que la disminución de fluorescencia es mucho menos eficiente en el monolito expuesto a acarbosa (Figura 3 de la publicación 7.1), lo que indica que el biosensor es capaz de detectar compuestos que actúan como AGIs.

#### - *Biosensor multimuestra*

Con el fin de desarrollar un método más eficiente y robusto que pueda analizar múltiples muestras en un solo ensayo, se adaptó el nanobiosensor de muestra única a una placa de 96 pocillos. Esta configuración permite realizar el cribado simultáneo de un gran número de muestras y ofrece la posibilidad de reutilización. Además, este nuevo formato presenta la ventaja de minimizar el volumen de muestra y los reactivos utilizados.

Los componentes del biosensor se coinmovilizaron directamente mediante la reacción sol-gel en los pocillos de la microplaca. La inmovilización posibilita observar la emisión azul característica de las L-CPNs de manera individual en el mismo campo después de cierto tiempo utilizando microscopía confocal. Esto nos ha permitido corroborar el funcionamiento del biosensor a nivel submicroscópico como se observa en la Figura 4.4.



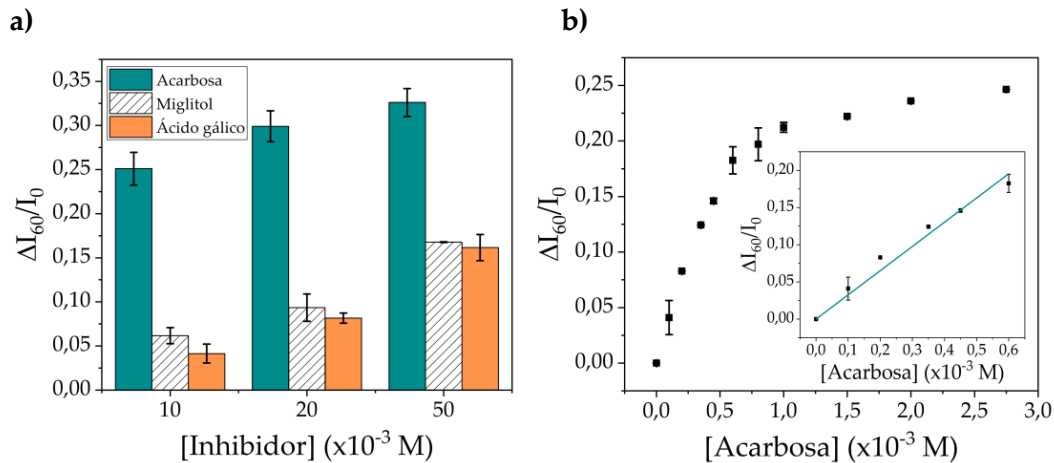
**Figura 4.4.** Microscopía de fluorescencia de superresolución de L-CPNs inmovilizadas en una matriz de sol-gel antes (izquierda) y después del tratamiento con PNPG durante 1 hora (derecha).

A continuación, se establecieron las condiciones de operación de esta nueva configuración y se llevó a cabo un estudio para evaluar la estabilidad y la posibilidad de reutilización del nanobiosensor. Los resultados indicaron que la intensidad de fluorescencia de las nanopartículas se mantuvo estable durante un período de al menos 40 semanas y que el biosensor pudo reutilizarse hasta 4 veces (Figura 5b de la publicación 7.1), después de ser lavado, sin perder sensibilidad. Además, se demostró que la respuesta del biosensor después de 10 meses de almacenamiento en refrigeración fue prácticamente equivalente a la del biosensor recién preparado, lo cual destaca la alta estabilidad del dispositivo. Por último, se llevó a cabo una prueba con acarbosa para evaluar la capacidad del nanobiosensor multimuestra para detectar AGIs. Los resultados revelaron que a medida que aumentaba la concentración del inhibidor, la eficiencia de la desactivación de la fluorescencia disminuía (Figura S8 de la publicación 7.1). Este estudio reafirma una vez más que el biosensor multimuestra es capaz de detectar AGIs.

#### *4.2.1.3. Aplicaciones del nanobiosensor multimuestra*

Una vez caracterizado el biosensor multimuestra y confirmada su capacidad de reutilización y de detectar la presencia de acarbosa, se utilizó para explorar la capacidad inhibitoria de otros compuestos, como el miglitol y ácido gálico, de manera simultánea (Figura 4.5a). Los resultados demostraron que el dispositivo no solo podía detectar los AGIs probados, sino que también podía estimar su concentración. Esta última potencial aplicación se llevó a cabo para acarbosa (Figura 4.5b), obteniendo un límite de detección (LOD) de 37.8  $\mu\text{M}$ .





**Figura 4.5.** a) Efecto de diferentes concentraciones de inhibidores en la desactivación de la fluorescencia del biosensor multimuestra, medida 60 minutos después de la adición de PNPG ( $\lambda_{\text{e}} = 380$  nm;  $\lambda_{\text{m}} = 413$  nm). Las barras representan la disminución de la intensidad de fluorescencia obtenida después de restar el control. b) Curva de calibración de acarbosa. Inserto: Ajuste de la parte lineal de la curva de calibración de acarbosa.

#### 4.2.2. Desarrollo de un sensor fluorescente para la detección de ALP

El segundo dispositivo desarrollado consiste en una plataforma sensora fluorescente para la detección de ALP, basada en las CPNs previamente mencionadas en el apartado 4.1.2. Los resultados obtenidos en el presente estudio están detallados en la publicación 7.2. A diferencia del dispositivo anterior, las CPNs están inmovilizadas en un hidrogel orgánico y no en una matriz sol-gel. Además, la enzima no se encuentra inmovilizada, ya que el objetivo es cuantificar su presencia.

##### 4.2.2.1. Inmovilización de CPNs en hidrogeles AETA

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización del proceso de fabricación de los hidrogeles orgánicos dado que el laboratorio carecía de experiencia previa con dicho material. En el caso específico del hidrogel AETA, cuya red polimérica tiene naturaleza catiónica, las CPNs de PFO y F8BT se incorporaron a la red mediante interacciones electrostáticas debido a que están cargadas negativamente (Tabla 4.1). Con el fin de obtener hidrogeles nanocompuestos fluorescentes se emplearon las dos estrategias de inmovilización, *ex situ* e *in situ*, detalladas en el apartado 3.2.2.2 de Materiales y Métodos. En el método *ex situ*, se rehidrató un hidrogel seco con una suspensión de CPNs hasta

su completa absorción. En el método *in situ*, la suspensión de CPNs se mezcló con AETA, MBA y el fotoiniciador de la reacción de polimerización, antes de ser irradiada con una lámpara UV hasta la formación del hidrogel nanocompuesto PFO@AETA o F8BT@AETA. Al lavar posteriormente los hidrogeles modificados, no se detectó fluorescencia en el agua de lavado, lo que confirmó que las nanopartículas permanecían dentro del hidrogel, probablemente debido a interacciones electrostáticas entre la red polimérica catiónica y la carga negativa de las CPNs.

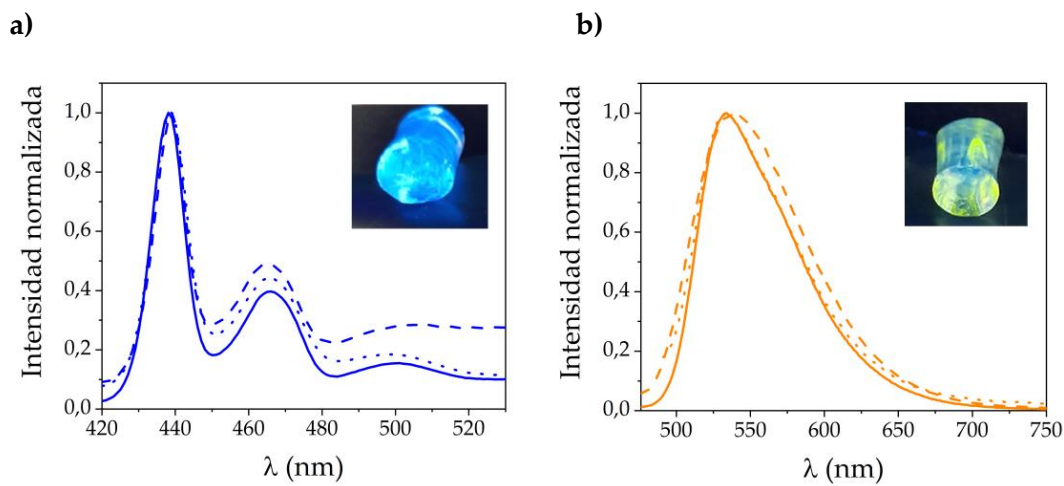
#### 4.2.2.2. Grado de hinchamiento de hidrogeles nanocompuestos

Una vez preparados los hidrogeles nanocompuestos, se procedió a su caracterización, explorando inicialmente su capacidad o grado de hinchamiento (SW). Para caracterizar esta propiedad se realizaron experimentos conforme se describe en el apartado 3.3.1. Tanto los hidrogeles nanocompuestos como el hidrogel libre de nanopartículas aumentaron considerablemente su volumen en comparación con el hidrogel seco, lo que demostró su alta capacidad de hinchamiento (Figura 3 de la publicación 7.2). El SW fue similar en ausencia y presencia de CPNs, para los hidrogeles nanocompuestos preparados por el método *ex situ*. La presencia de CPNs apenas afectó a la apariencia final de los hidrogeles (Inset en Figura 3b de la publicación 7.2). Estos resultados concuerdan con estudios anteriores con quantum dots de grafeno [180] y sugieren que las CPNs tienen un impacto mínimo en la estructura de la red polimérica, por lo menos cuando se incorporan de manera *ex situ*.

#### 4.2.2.3. Propiedades fluorescentes de hidrogeles PFO@AETA y F8BT@AETA

Una vez inmovilizadas las CPNs, se evaluaron las propiedades fluorescentes de los hidrogeles nanocompuestos PFO@AETA y F8BT@AETA, desarrollados tanto con la metodología *ex situ* como *in situ*, utilizando técnicas de espectroscopía de fluorescencia (Figura 4.6). Los resultados mostraron que los hidrogeles preparados con ambos métodos exhibían fluorescencia, confirmando la presencia de las CPNs en su interior. Sin embargo, la señal de intensidad de fluorescencia era menor en los hidrogeles que en nanopartículas en suspensión, lo que podría atribuirse a una combinación de diversos

fenómenos como efectos de filtro interno, dispersión en el hidrogel o *autoquenching* debido a afectos de concentración local impuestos por la inmovilización.



**Figura 4.6.** Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de las CPNs de **a)** PFO y **b)** F8BT en una solución de tampón Tris (línea sólida), inmovilizadas en hidrogeles *in situ* (línea discontinua) y *ex situ* (línea punteada). Inserto: Imagen digital de los hidrogeles de CPNs de PFO y F8BT tomada durante irradiación con luz UV ( $\lambda=365$  nm).

En cuanto a los espectros de emisión, se observó que los hidrogeles preparados mediante el método *ex situ*, presentaban formas muy similares a los de las CPNs en suspensión, lo que indicaba que las nanopartículas estaban bien preservadas dentro del hidrogel, a diferencia de los hidrogeles preparados mediante el método *in situ* que mostraron ciertas diferencias en los espectros de fluorescencia, sugiriendo una posible agregación de la CPNs en el caso de PFO y una distribución no homogénea en el caso de F8BT. Además, en el caso del espectro del PFO@AETA preparado por el método *ex situ*, se confirmó la presencia de la fase  $\beta$  lo que indicó que las NPs estaban preservadas dentro del hidrogel probablemente interactuando electrostáticamente con la red polimérica catiónica. Estos resultados llevaron a seleccionar el método *ex situ*, para siguientes experimentos, como el más adecuado para la preparación de los hidrogeles fluorescentes.

A continuación, se realizaron estudios de estabilidad de las propiedades fluorescentes de los hidrogeles PFO@AETA y F8BT@AETA a lo largo del tiempo. El hidrogel F8BT@AETA mostró una disminución significativa en la intensidad de

fluorescencia durante los primeros días, lo que indicaba una falta de interacción efectiva entre las CPNs de F8BT y la red polimérica del hidrogel (Figura 5b de la publicación 7.2). Esto también se pudo corroborar en la imagen digital en el inserto de la Figura 4.6 donde se observó una disminución de la fluorescencia del hidrogel F8BT@AETA comparado con el hidrogel PFO@AETA, ambos irradiados con luz UV. Por otro lado, el hidrogel PFO@AETA mantuvo una intensidad de fluorescencia estable durante más de un mes, aunque se observaron cambios en la forma del espectro que podrían indicar una ligera agregación de las CPNs con el tiempo.

A partir de los resultados de estabilidad y de los experimentos de barrido de temperatura y de decaimiento de fluorescencia, se seleccionaron los hidrogeles de PFO@AETA como los más adecuados para aplicaciones de detección de enzimas, en particular de la fosfatasa alcalina. Los hidrogeles de F8BT@AETA fueron descartados.

#### *4.2.2.4. Almacenamiento de hidrogeles PFO@AETA*

Como se ha comentado en el apartado anterior, aunque los hidrogeles de PFO@AETA son claramente más estables que los de F8BT@AETA, parece que cuando se almacenan en estado hidratado, tienden a agregar con el tiempo. Sin embargo, en esta Tesis Doctoral se ha demostrado que esta limitación puede superarse al ser secados en estufa y almacenados en forma de xerogeles. Los resultados mostraron que los xerogeles de PFO@AETA conservaron una forma y posición del espectro muy similar a los hidrogeles hidratados, lo que indica que son una opción viable para el almacenamiento a largo plazo de los hidrogeles fluorescentes. Además, el proceso de secado y posterior rehidratación redistribuye las CPNs de manera más homogénea, que resultó en una mayor intensidad de fluorescencia (Figura 6 de la publicación 7.2).

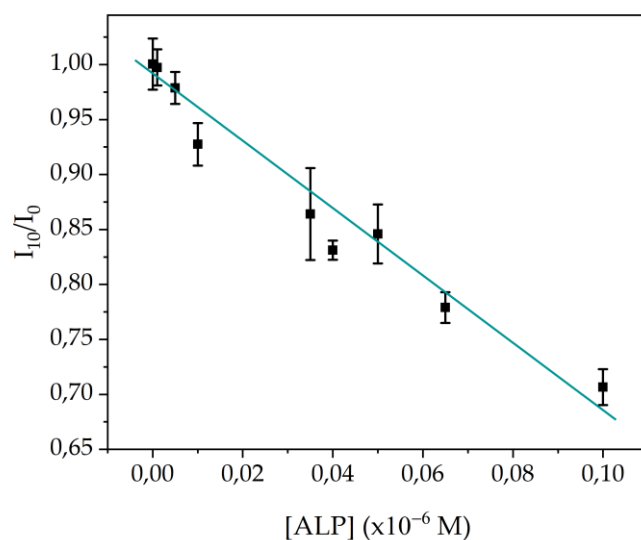
Estos resultados son especialmente relevantes en el contexto de las aplicaciones de detección, ya que el almacenamiento como xerogel no solo preserva las propiedades de fluorescencia de los hidrogeles, sino que se presenta como una opción práctica y efectiva que también facilita su transporte y conservación.

#### 4.2.2.5. Aplicación: detección de fosfatasa alcalina

En el apartado 4.2.1 (publicación 7.1), se describe cómo se aprovechó la capacidad del PNP para desactivar la fluorescencia de las L-CPNs con el fin de desarrollar un biosensor para el cribado de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa. Basándose en un mecanismo similar, y tras confirmar que los hidrogeles de PFO@AETA preparados por el método *ex situ* preservaban las propiedades fluorescentes, se exploró la posibilidad de que estos pudieran ser utilizados como una plataforma de detección enzimática, en concreto para detectar la enzima ALP.

En primer lugar, se comprobó que la fluorescencia de los hidrogeles de PFO@AETA disminuía en presencia de PNP (Figura 8 de la publicación 7.2). A continuación, se evaluó la capacidad de los hidrogeles de PFO@AETA para detectar la actividad de ALP, dado que esta enzima hidroliza el sustrato *p*-nitrofenilfosfato (PNPP) a PNP, como se describe en la Figura 1.7 de la Introducción General. Para ello, se fabricaron xerogeles con CPNs coinmovilizadas con el sustrato PNPP. Dichos xerogeles se hidrataron con disoluciones acuosas en ausencia y presencia de ALP, y se midió su respuesta fluorescente. Los resultados mostraron una disminución de fluorescencia en presencia de ALP, lo que indica que la hidrólisis del sustrato a PNP tiene lugar. Además, la pérdida de señal fue proporcional a la concentración de enzima, lo que permitió construir una recta de calibrado de ALP (Figura 4.7), obteniendo un límite de detección de 21 nM.

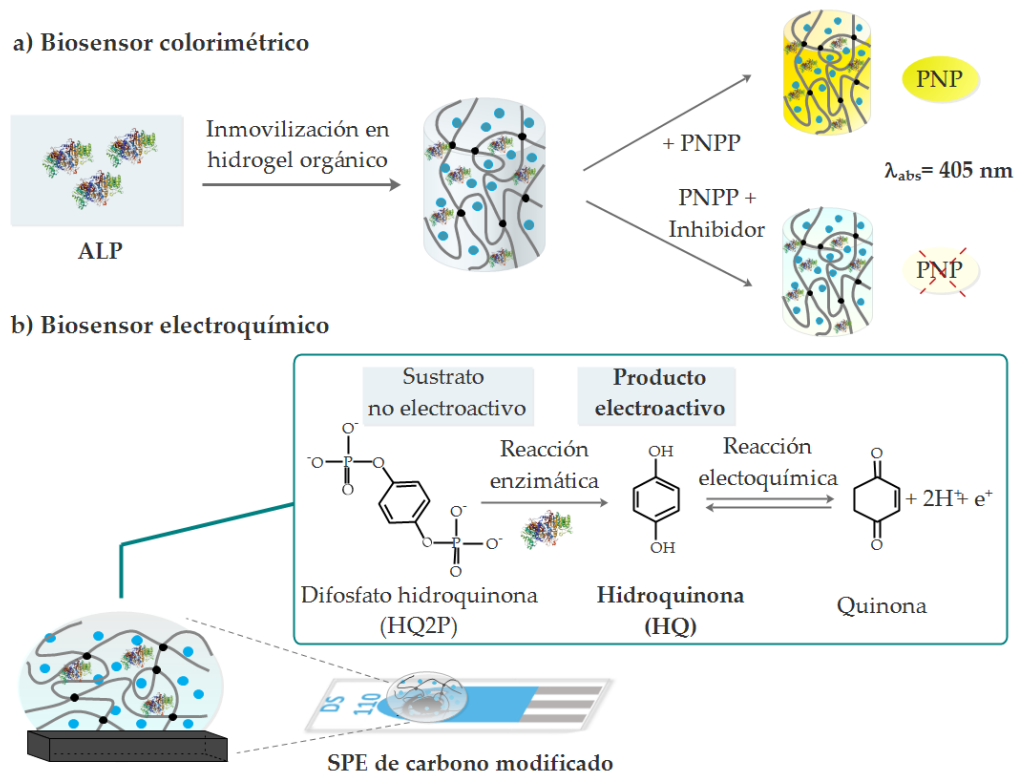
Finalmente, cabe destacar que, el diseño del dispositivo también podría permitir la detección de otras enzimas que generan PNP como producto final, simplemente modificando el sustrato apropiado para cada enzima.



**Figura 4.7.** Curva de calibración de ALP. Las intensidades de fluorescencia se midieron 10 minutos después de la adición de cada concentración de ALP. Las barras de error representan la desviación estándar de las tres réplicas.

### 4.3. Desarrollo de plataformas biosensoras para la detección de fosfato

En este apartado, se presentan los resultados correspondientes a las publicaciones 7.3 y 7.4 que forman parte del Anexo I. Ambos trabajos tienen en común desarrollar un dispositivo altamente sensible para la detección de fosfato en medio acuoso, un analito de gran interés desde el punto de vista clínico y medioambiental. Los dispositivos difieren en el método de transducción, siendo el primero colorimétrico y el segundo electroquímico. La Figura 4.8 presenta un esquema ilustrativo del funcionamiento de ambos biosensores.



**Figura 4.8.** Representación esquemática del funcionamiento de los biosensores desarrollados para la detección de fosfato. **a)** Enfoque colorimétrico, en el que el sustrato PNPP es hidrolizado a PNP mediante la reacción previamente descrita en la Figura 1.7 de la Introducción General. **b)** Enfoque electroquímico, donde el sustrato no electroactivo HQ2P es hidrolizado por la enzima ALP a HQ, un producto que presenta actividad electroquímica.

#### 4.3.1. Desarrollo de un biosensor colorimétrico para la detección de fosfato

A diferencia de los dispositivos anteriores, en los que se han inmovilizado CPNs que actúan como transductores fluorescentes, en la publicación 7.3 se ha desarrollado un biosensor con un transductor colorimétrico. Para ello, la enzima fosfatasa alcalina se ha incorporado en hidrogeles de AETA dando lugar a una plataforma biosensora con potencial aplicación para la detección de inhibidores de esta enzima, como el ion fosfato. Dado que es la primera vez que una enzima se inmoviliza en este tipo de hidrogel, se ha llevado a cabo también una detallada caracterización de sus propiedades.

#### 4.3.1.1. Inmovilización de ALP en hidrogeles de AETA

Para la incorporación de la enzima ALP en los hidrogeles de AETA, se han empleado dos métodos diferentes, según se describe en la sección 3.2.2.2. Como el hidrogel AETA tiene carga positiva, la enzima ALP puede ser inmovilizada mediante interacciones electrostáticas debido a su carga negativa ( $pI= 4.4-5.8$ ) a pH 9. En la primera estrategia de inmovilización (método *ex situ*), se rehidrató un hidrogel, previamente preparado y secado, con una disolución que contenía la enzima, asegurando su completa absorción y formando el denominado hidrogel ALP@AETA. Para la segunda estrategia (método *in situ*), se añadió ALP a la solución precursora del hidrogel antes de la polimerización, y se irradió la mezcla con luz UV hasta obtener el hidrogel ALP@AETA *in situ*. La incorporación de la proteína en el hidrogel mediante cualquiera de estos métodos no generó cambios visibles en el material, que mantuvo su transparencia en estado hidratado, lo que permitió su caracterización mediante técnicas ópticas.

#### 4.3.1.2. Estudios de hinchamiento de hidrogeles ALP@AETA

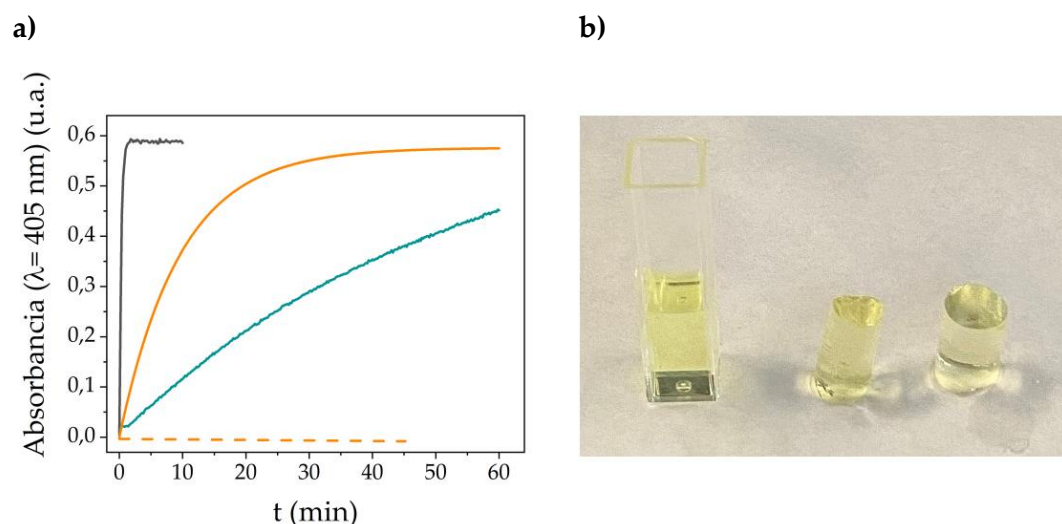
Una vez inmovilizada la enzima, se realizó un estudio del comportamiento de los hidrogeles durante el hinchamiento, tanto en ausencia como en presencia de ALP, utilizando las dos estrategias de inmovilización, *ex situ* e *in situ*, para examinar el impacto en sus propiedades mecánicas (Figura 1 de la publicación 7.3). Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en la sección 3.3.1. Los resultados indican que los tres hidrogeles exhibían una alta capacidad de hinchamiento en comparación con el hidrogel seco. No obstante, el hidrogel sin enzima mostró un SW superior, mientras que los otros dos mostraron un SW similar, independientemente del método de inmovilización. Así mismo, la cinética de hinchamiento fue más rápida en ausencia de ALP. Por otro lado, la presencia de ALP mejoró la resistencia del hidrogel, reduciendo la probabilidad de rotura. Estos resultados corroboraron la inmovilización de ALP en el hidrogel y resaltan la fuerte interacción de la enzima con la red polimérica catiónica, lo que modifica sus propiedades mecánicas [181].



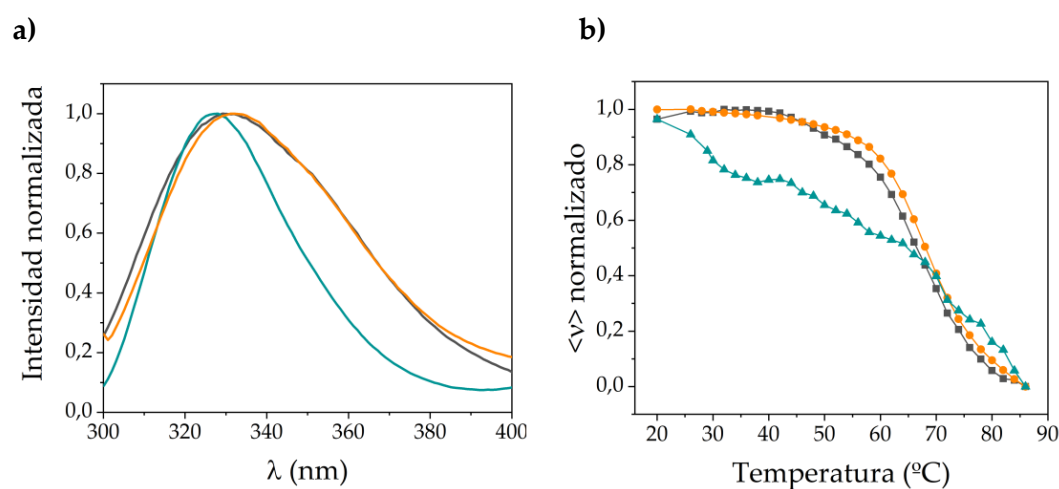
#### 4.3.1.3. Actividad y estabilidad conformacional de la proteína en el hidrogel

A continuación, se evaluó la actividad enzimática de ALP libre e inmovilizada en hidrogeles ALP@AETA *ex situ* e *in situ* utilizando espectroscopía de absorción (Figura 4.9). La formación de PNP tras la adición de PNPP, indicativo de la actividad enzimática, se observó en todos los casos, aunque las cinéticas de reacción fueron diferentes. En la solución de ALP, la reacción alcanzó su máximo en 1 minuto, mientras que en los hidrogeles *ex situ* se requirieron 40 minutos. Esta ralentización en la cinética era esperada y puede atribuirse a las restricciones de difusión impuestas por la red polimérica, las cuales limitan la accesibilidad del sustrato al centro activo de la enzima, más que a una pérdida de actividad. Un comportamiento similar se ha observado para la  $\alpha$ -glucosidasa inmovilizada en sol-gel, como se menciona en la sección 4.2.1.2. En el hidrogel *in situ*, la reacción no se completó después de 60 minutos, sugiriendo que el centro activo de la mayoría de las proteínas inmovilizadas de manera *in situ* no es accesible al sustrato y/o que cambios conformacionales durante la formación del hidrogel alteran la forma del centro activo, inactivando la enzima inmovilizada.

Por otro lado, se optimizaron las condiciones operativas de las plataformas ALP@AETA y se estudió la estabilidad conformacional de la enzima inmovilizada en el hidrogel. Para ello, se utilizó la fluorescencia intrínseca de la proteína, principalmente proveniente de los residuos de triptófano [182]. Los resultados mostraron que el espectro de emisión de fluorescencia de ALP inmovilizada *ex situ* era similar al de la enzima libre, mientras que el espectro de la enzima inmovilizada *in situ* mostraba una banda de emisión más estrecha, lo que sugiere una alteración en la conformación de la proteína debido a interacciones con los precursores o intermediarios involucrados en la formación del hidrogel (Figura 4.10a). Además, mediante estudios de desplegamiento térmico (Figura 4.10b) realizados como se describe en el apartado 3.3.2.2, se encontró que la inmovilización *in situ* alteraba completamente el patrón de desnaturalización de la enzima, mientras que la *ex situ* proporcionaba una ligera estabilización con respecto al tampón [183].



**Figura 4.9.** a) Cinética de formación de PNP, a partir de PNPP, en presencia de ALP en disolución (línea negra) y en hidrogeles ALP@AETA *ex situ* (línea naranja) e *in situ* (línea azul). La línea naranja discontinua representa un hidrogel que contiene ALP en ausencia de PNPP, al cual solo se le ha añadido tampón. b) Comparación de la apariencia visual de ALP en disolución y en hidrogeles ALP@AETA *ex situ* e *in situ* (de izquierda a derecha) después de la incubación con PNPP durante 10 minutos.



**Figura 4.10.** a) Espectros de emisión de fluorescencia normalizados registrados a temperatura ambiente y b) curva de desnaturalización térmica de ALP en disolución (negro), inmovilizada *in situ* (azul) y *ex situ* (naranja) en hidrogeles de AETA.  $\langle \nu \rangle$  representa el centro de masas espectral calculado según la Ecuación 3.4.

Teniendo en cuenta tanto la actividad enzimática como la estabilidad conformacional, se seleccionó el método *ex situ* como el más adecuado para inmovilizar ALP en el hidrogel de AETA. En consecuencia, en los experimentos siguientes del

estudio, se hace referencia al hidrogel que contiene la enzima como ALP@AETA, sin especificar el método utilizado para referirse al hidrogel con enzima *ex situ*.

A continuación, se evaluó la estabilidad y la actividad enzimática de los hidrogeles de ALP@AETA durante diferentes periodos de almacenamiento y bajo distintas condiciones. En primer lugar, se analizaron las propiedades fluorescentes y el comportamiento térmico de los hidrogeles hinchados con la enzima durante un mes de almacenamiento refrigerados a 4 °C. Tanto los espectros de fluorescencia como las curvas de desnaturalización térmica mostraron un comportamiento estable y cooperativo durante todo el periodo de almacenamiento (Figura S4 de la publicación 7.3), lo que indica que la enzima inmovilizada se mantuvo estable.

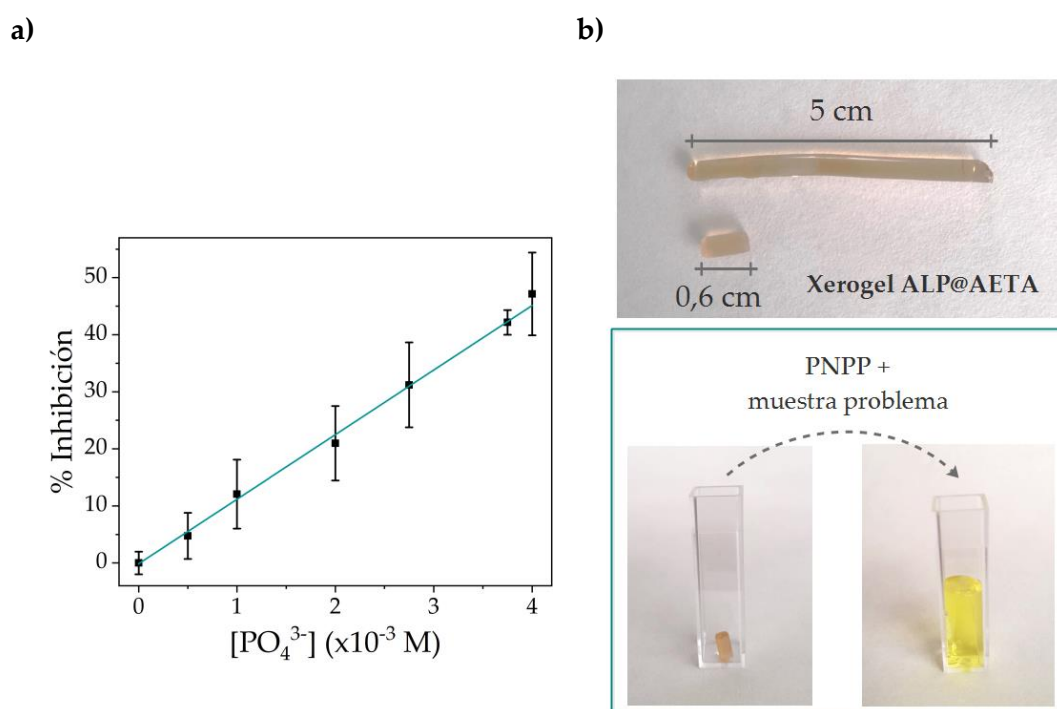
Seguidamente y con objeto de facilitar la manipulación y transporte de este nuevo material, se exploró la posibilidad de almacenarlo como un hidrogel seco. Se evaluaron dos métodos de eliminación del medio acuoso: secado lento en una estufa a 45 °C para obtener un xerogel y liofilización para obtener un aerogel. Los resultados mostraron que el xerogel ALP@AETA mantuvo la actividad enzimática y estabilidad térmica, mientras que el aerogel presentó cambios en la conformación y pérdida de actividad (Figuras 4 y 5 de la publicación 7.3). Estos resultados sugieren que el almacenamiento de ALP@AETA como xerogel es más favorable que como aerogel, ya que el proceso de secado en estufa preserva la estabilidad de la enzima.

Además, se demostró que el almacenamiento a largo plazo del xerogel de ALP@AETA a temperatura ambiente durante 18 meses aún mantenía una actividad enzimática considerable, aunque se observó una disminución del 30% en comparación con el material recién preparado (Figura 6a de la publicación 7.3).

Por lo tanto, se ha logrado desarrollar un material que puede almacenarse a temperatura ambiente y mantener la estabilidad y la actividad enzimática durante un periodo prolongado de tiempo. Esto tiene implicaciones importantes para la aplicación práctica del material no solo como posible biosensor, sino como metodología de almacenamiento de enzimas que facilita su manipulación y transporte.

#### 4.3.1.4. Aplicación: detección de fosfato

Finalmente, se evaluó el uso del xerogel ALP@AETA como un biosensor colorimétrico desechable para la detección de inhibidores de ALP. Se demostró que una pequeña porción de xerogel es capaz de detectar la presencia de iones fosfato, un conocido inhibidor de la enzima, mostrando una reducción en la formación de PNP y, en consecuencia, una menor señal de absorción (ver esquema en Figura 4.8a). El biosensor presentó un límite de detección de 511  $\mu\text{M}$  y su recta de calibrado se muestra en la Figura 4.11a. Aunque en la literatura existen biosensores enzimáticos con mayor sensibilidad a fosfato (por ejemplo, [184,185]), este sistema ofrece la ventaja de ser fácilmente manipulable y transportable, lo que lo convierte en una opción adecuada para mediciones rápidas y económicas tanto dentro como fuera del laboratorio (Figura 4.11b).



**Figura 4.11.** a) Curva de calibrado para fosfato. La gráfica representa el grado de inhibición calculado utilizando la Ecuación 1.3, a partir de los cambios en la señal de absorción obtenidos para el xerogel ALP@AETA, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de iones fosfato, después de 10 minutos de incubación. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. b) Aspecto del biosensor almacenado y de una porción del mismo antes (izquierda) y después (derecha) de hincharlo con una disolución de PNPP y la muestra problema.

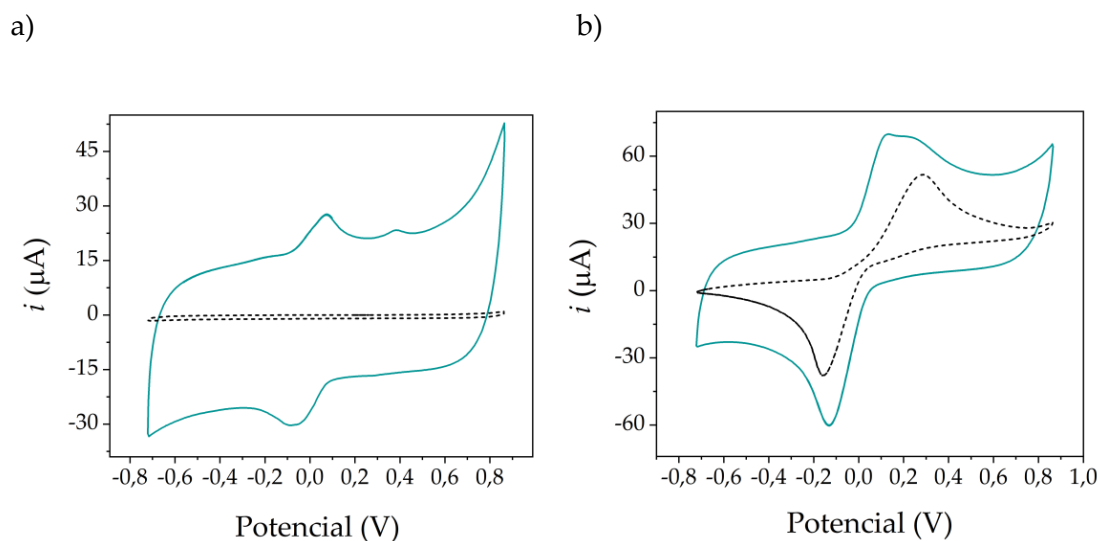
### 4.3.2. Desarrollo de un biosensor electroquímico para la detección de fosfato

Una vez realizado el biosensor colorimétrico para la detección de fosfato, y tras la estancia en la Universidad de Alicante en el laboratorio del Dr. Francisco Montilla, experto en electroquímica, se desarrolló un biosensor desechable de inhibición utilizando un transductor electroquímico. Para ello, se seleccionó la misma enzima, ALP, como elemento de reconocimiento, inmovilizada en hidrogeles de AETA. A diferencia del biosensor colorimétrico descrito en el apartado anterior, el hidrogel se sintetizó junto con la ALP y se depositó sobre electrodos de carbono serigrafados (Figura S1 de la publicación 7.4). Además, se añadió una mayor cantidad de agente entrecruzante MBA, para reducir el *swelling*. El esquema de funcionamiento se ha mostrado previamente en la Figura 4.8b. Como se puede observar, debido a que el PNP no es electroactivo, el sustrato PNPP se ha sustituido por hidroquinona difosfato (HQ2P), que al hidrolizarse, produce el compuesto electroactivo hidroquinona (HQ). En el artículo 7.4 del Anexo I se describe una prueba de concepto que demuestra el uso potencial del biosensor desarrollado para la detección en tiempo real de fosfato en agua.

#### 4.3.2.1. Caracterización electroquímica de electrodos modificados con hidrogel

En primer lugar, como paso previo a la inmovilización de la enzima, se caracterizó la respuesta electroquímica de un SPE desechable modificado con hidrogel de AETA en una disolución de tampón Tris pH 8.4. Para ello, se recogieron los voltamperogramas cíclicos, como se describe en la sección 3.3.4. de Materiales y Métodos. Los voltamperogramas estabilizados del electrodo modificado mostraron un aumento importante en la contribución de la carga de la doble capa y la presencia de un par redox indicativo de la presencia de especies electroactivas dentro del hidrogel (Figura 4.12a). Considerando que la ALP cataliza la hidrólisis del sustrato HQ2P en hidroquinona, se evaluó la respuesta electroquímica del SPE modificado en presencia del producto HQ. Los resultados mostraron picos de oxidación y reducción que indican que el área de superficie electroactiva es mayor y que su comportamiento es más

reversible en comparación con el SPE sin modificar (Figura 4.12b). Esto sugiere que la presencia del hidrogel mejora la conductividad iónica, facilitando el flujo de corriente y el proceso de transferencia electrónica [186].

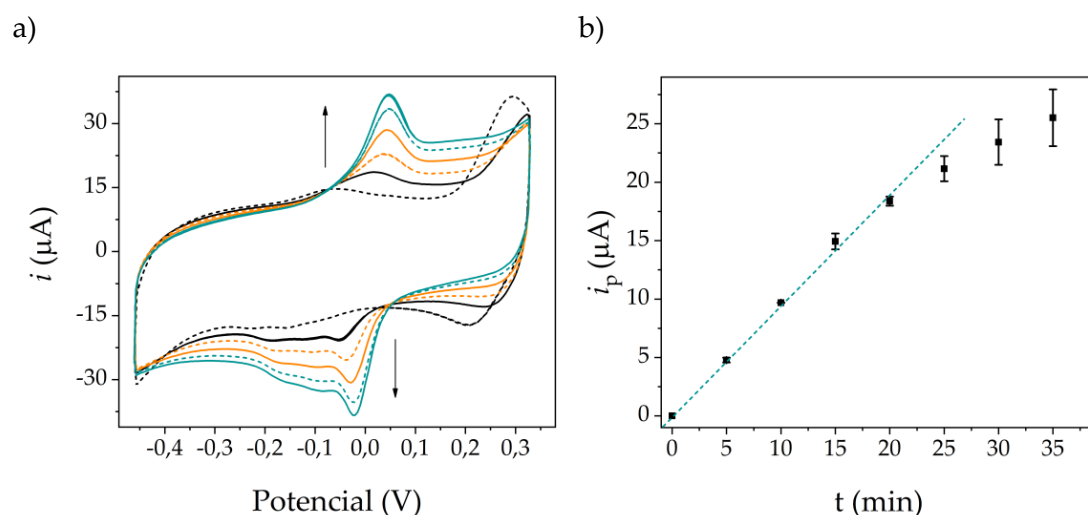


**Figura 4.12.** Voltamperograma cíclico estabilizado del electrodo de carbono SPE (líneas discontinuas negras) y del electrodo modificado con hidrogel de AETA (líneas azules) en una solución de tampón Tris 0.1 M (pH=8.4), en **a)** ausencia y **b)** presencia de HQ, a 100 mV/s y a temperatura ambiente. Los potenciales se refieren al electrodo de pseudoreferencia de Ag del SPE.

A continuación, se estudió la respuesta de un SPE modificado con el hidrogel conteniendo la enzima (ALP@AETA) en presencia del sustrato HQ2P en tampón Tris. Los voltamperogramas cíclicos mostraron que, inicialmente, no se observaron picos de oxidación o reducción relacionados con la presencia de HQ. Sin embargo, con ciclos potenciales sucesivos, se desarrollaron picos catódicos y anódicos bien definidos, característicos de la formación de especies de HQ, lo que confirmó la actividad de la enzima inmovilizada. Estos picos redox aumentan con la continuación de los ciclos, alcanzando un pico de corriente de 37.1  $\mu\text{A}$  para el proceso de oxidación después de 152 ciclos (Figura 4.13a).

Como puede observarse en la Figura 4.13b, la intensidad del pico de oxidación está directamente correlacionada con la concentración de producto generado por la reacción enzimática. Se estableció una correlación lineal entre la intensidad del pico de oxidación y el tiempo durante el periodo inicial (0-20 minutos). Esto indica que el

dispositivo puede utilizarse para monitorizar actividad de ALP en medio acuoso. Además, se realizaron experimentos adicionales para evaluar el efecto de diferentes interferentes (cloruros, nitratos y sulfatos 0,05 mM) y ninguno de los ensayos afectaron al rendimiento del biosensor (Figura S2 de la publicación 7.4).



**Figura 4.13.** **a)** Voltamperogramas cíclicos registrados a 100 mV/s con el electrodo modificado con hidrogel ALP@AETA en una solución de tampón que contiene HQ2P. Número de ciclos: 1 (línea discontinua negra), 19 (línea negra), 38 (línea discontinua naranja), 76 (línea naranja), 114 (línea discontinua azul), 152 (línea azul). **b)** Evolución de la intensidad de corriente del pico de oxidación ( $i_p$ ) registrada durante la voltamperometría cíclica con HQ2P en función del tiempo.

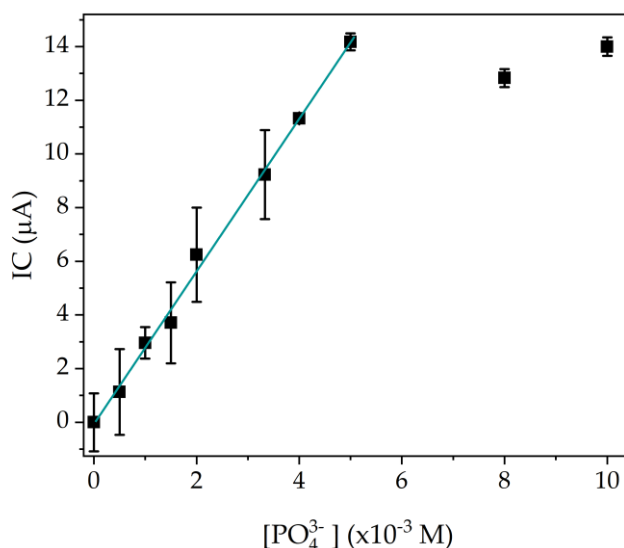
#### 4.3.2.2. Aplicación: detección de fosfato

Finalmente, se evaluó el rendimiento de SPEs modificados con hidrogel ALP@AETA como una plataforma biosensora para la detección de iones fosfato. Los resultados mostraron que la presencia de fosfato en la disolución actúa como inhibidor de la actividad enzimática, lo que resulta en una disminución de la corriente para los procesos redox asociados a la formación de HQ. Se observa además que a medida que aumenta la concentración de fosfato, la tasa de hidrólisis disminuye, lo que indica un mayor efecto inhibitorio (Figura 3 de la publicación 7.4).

El siguiente paso fue realizar un estudio cinético para optimizar las condiciones de operación en la detección de fosfato. Se introdujo un parámetro denominado corriente de inhibición (IC), que representa la diferencia entre la corriente pico detectada en una disolución sin fosfato tras un tiempo  $t$  y la corriente pico detectada en presencia del

inhibidor tras ese mismo tiempo. Los resultados mostraron que la IC aumentaba con el tiempo de reacción, alcanzando aproximadamente un tercio de la intensidad de corriente en ausencia del inhibidor después de 25 minutos de medición, considerado este como un tiempo aceptable para el uso del biosensor (Figura 4 de la publicación 7.4).

Una vez seleccionado el tiempo de medición, se determinó la IC a concentraciones crecientes de fosfato y se construyó la correspondiente curva de calibrado del biosensor (Figura 4.14). La respuesta fue lineal en un rango de concentración de 0-5.0 mM, con un LOD de 500  $\mu$ M. Este límite de detección es semejante al obtenido en el biosensor colorimétrico aunque, en ese caso en concreto, el rango lineal de concentración es de 0-4.0 mM y tiene un tiempo de incubación de 10 minutos. Estos resultados sugieren que el biosensor desarrollado podría ser adecuado para el análisis de fosfato en fluidos biológicos o muestras ambientales, con una alta sensibilidad tratándose de SPEs desechables [187]. Una ventaja destacada de este dispositivo es su capacidad de detección voltamétrica, que permite distinguir la presencia de otras especies electroactivas que podrían interferir en las mediciones, potenciando así la selectividad del biosensor.



**Figura 4.14.** Curva de calibración para la determinación de fosfato obtenida para el biosensor electroquímico modificado con hidrogel ALP@AETA, a partir de los cambios de corriente observados en la corriente de inhibición (IC). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.



## 5. Conclusiones Generales



A continuación, se exponen las Conclusiones Generales derivadas de los resultados anteriormente mostrados:

- Se ha conseguido desarrollar y caracterizar nanopartículas fluorescentes estables en medio acuoso, con emisión en distintas regiones del espectro visible, mediante la combinación de los CPs HTMA-PFP, PFO y F8BT tanto con vesículas lipídicas como con detergentes.
- Las nanoestructuras desarrolladas han demostrado ser útiles como transductores fluorescentes para su aplicación en el desarrollo de plataformas sensoras, ya que su intensidad de fluorescencia puede modularse en presencia de PNP, producto de la hidrólisis de enzimas hidrolasas como la  $\alpha$ -glucosidasa y la fosfatasa alcalina.
- Las L-CPNs se han inmovilizado de manera satisfactoria junto a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa en matrices sol-gel, dando lugar a un dispositivo capaz de no solo detectar la presencia de inhibidores de esta enzima, que potencialmente podrían utilizarse como fármacos antidiabéticos, sino también de cuantificarlos.
- Se han desarrollado hidrogeles nanocompuestos que incorporan CPNs de PFO dando lugar a un nuevo material fluorescente (PFO@AETA) con características distintivas y fácilmente manipulable, que se puede almacenar en forma de xerogel durante largos periodos de tiempo. Además, se ha demostrado su potencial uso como un sensor de ALP.
- La inmovilización satisfactoria de ALP en hidrogeles orgánicos químicamente reticulados ha permitido desarrollar una nueva plataforma (ALP@AETA) donde la enzima permanece activa manteniendo su estabilidad conformacional.
- La plataforma ALP@AETA puede almacenarse en forma de xerogel a temperatura ambiente y es fácilmente transportable. Se ha demostrado, como prueba de concepto, su habilidad para la detección colorimétrica de ion fosfato en muestras acuosas.
- Se han modificado de forma satisfactoria electrodos serigrafiados de carbono con hidrogeles que incorporan la enzima ALP, lo que han conducido al desarrollo de

un biosensor voltamperométrico portátil para medir *in situ* y a tiempo real la presencia de inhibidores de la enzima, como ion fosfato en agua.

- Las plataformas diseñadas en esta Tesis Doctoral podrían adaptarse para la fabricación de otras plataformas sensoras de interés, únicamente modificando el tipo de enzima hidrolasa.

## 6. Referencias



1. Camarca, A.; Varriale, A.; Capo, A.; Pennacchio, A.; Calabrese, A.; Giannattasio, C.; Murillo Almuzara, C.; D'Auria, S.; Staiano, M. Emergent Biosensing Technologies Based on Fluorescence Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance. *Sensors* **2021**, *21*, 906, doi:10.3390/s21030906.
2. Cui, F.; Zhou, H.S. Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *165*, 112349, doi:10.1016/j.bios.2020.112349.
3. Yoo, H.; Jo, H.; Oh, S.S. Detection and beyond: challenges and advances in aptamer-based biosensors. *Mater. Adv.* **2020**, *1*, 2663-2687, doi:10.1039/D0MA00639D.
4. Kirsch, J.; Siltanen, C.; Zhou, Q.; Revzin, A.; Simonian, A. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8733-8768, doi:10.1039/C3CS60141B.
5. Baryeh, K.; Takalkar, S.; Lund, M.; Liu, G. Introduction to medical biosensors for point of care applications. In *Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications*, Narayan, R.J.; Elsevier: 2017; pp. 3-25.
6. Terry, L.A.; White, S.F.; Tigwell, L.J. The Application of Biosensors to Fresh Produce and the Wider Food Industry. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1309-1316, doi:10.1021/jf040319t.
7. Mehrotra, P. Biosensors and their applications - A review. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* **2016**, *6*, 153-159, doi:10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
8. Kawamura, A.; Miyata, T. Biosensors. In *Biomaterials Nanoarchitectonics*, Ebara, M.; Elsevier: 2016; pp. 157-176.
9. Ensafi, A.A. An introduction to sensors and biosensors. In *Electrochemical Biosensors*, Ensafi, A.A.; Elsevier: 2019; pp. 1-10.
10. Eggins, B.R. *Chemical Sensors and Biosensors*; John Wiley & Sons: 2002.
11. Chircov, C.; Bîrcă, A.C.; Grumezescu, A.M.; Andronescu, E. Biosensors-on-Chip: An Up-to-Date Review. *Molecules* **2020**, *25*, 6013, doi:10.3390/molecules25246013.
12. Ronkainen, N.J.; Halsall, H.B.; Heineman, W.R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1747-1763, doi:10.1039/B714449K.

13. Curulli, A. Electrochemical Biosensors in Food Safety: Challenges and Perspectives. *Molecules* **2021**, *26*, 2940, doi:10.3390/molecules26102940.
14. Fernández-González, A.; Guardia, L. Reconocimiento molecular mediante materiales biomédicos: impresión molecular. *An. R. Soc. Esp. Quím.* **2007**, *103*, 14-22.
15. Nguyen, H.H.; Lee, S.H.; Lee, U.J.; Fermin, C.D.; Kim, M. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials* **2019**, *12*, 121, doi:10.3390/ma12010121.
16. Yoo, E.H.; Lee, S.Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors* **2010**, *10*, 4558-4576, doi:10.3390/s100504558.
17. Alvarado-Ramírez, L.; Rostro-Alanis, M.; Rodríguez-Rodríguez, J.; Sosa-Hernández, J.E.; Melchor-Martínez, E.M.; Iqbal, H.M.N.; Parra-Saldívar, R. Enzyme (Single and Multiple) and Nanozyme Biosensors: Recent Developments and Their Novel Applications in the Water-Food-Health Nexus. *Biosensors* **2021**, *11*, 410, doi:10.3390/bios11110410.
18. de Jesús Rostro-Alanis, M.; Mancera-Andrade, E.I.; Patiño, M.B.G.; Arrieta-Baez, D.; Cardenas, B.; Martinez-Chapa, S.O.; Saldívar, R.P. Nanobiocatalysis: Nanostructured materials – a minireview. *Biocatalysis* **2016**, *2*, 1-24, doi:10.1515/boca-2016-0001.
19. Perumal, V.; Hashim, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J. Appl. Biomed.* **2014**, *12*, 1-15, doi:10.1016/j.jab.2013.02.001.
20. Zhu, Y.-C.; Mei, L.-P.; Ruan, Y.-F.; Zhang, N.; Zhao, W.-W.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y. Enzyme-Based Biosensors and Their Applications. In *Advances in Enzyme Technology*, Singh, R.S., Singhanian, R.R., Pandey, A., Larroche, C.; Elsevier: 2019; pp. 201-223.
21. Bachan Upadhyay, L.S.; Verma, N. Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review. *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 225-241, doi:10.1080/00032719.2012.713069.
22. Gong, Z.; Huang, Y.; Hu, X.; Zhang, J.; Chen, Q.; Chen, H. Recent Progress in Electrochemical Nano-Biosensors for Detection of Pesticides and Mycotoxins in Foods. *Biosensors* **2023**, *13*, 140, doi:10.3390/bios13010140.



23. Amine, A.; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *76*, 180-194, doi:10.1016/j.bios.2015.07.010.
24. Arduini, F.; Amine, A. Biosensors Based on Enzyme Inhibition. In *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*, First ed.; Gu, M.B., Kim, H.-S., Eds.; Springer Berlin, Heidelberg: 2014; pp. 299-326.
25. Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I.; Palleschi, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1405-1423, doi:10.1016/j.bios.2005.07.012.
26. Turdean, G.L. Design and Development of Biosensors for the Detection of Heavy Metal Toxicity. *Int. J. Electrochem* **2011**, *2011*, 343125, doi:10.4061/2011/343125.
27. Li, J.; Chang, H.; Zhang, N.; He, Y.; Zhang, D.; Liu, B.; Fang, Y. Recent advances in enzyme inhibition based-electrochemical biosensors for pharmaceutical and environmental analysis. *Talanta* **2023**, *253*, 124092, doi:10.1016/j.talanta.2022.124092.
28. Pundir, C.S.; Chauhan, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Anal. Biochem.* **2012**, *429*, 19-31, doi:10.1016/j.ab.2012.06.025.
29. Krainer, F.W.; Glieder, A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 1611-1625, doi:10.1007/s00253-014-6346-7.
30. Liu, Z.; Liu, S. A novel fluorescent biosensor for adrenaline detection and tyrosinase inhibitor screening. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 4145-4152, doi:10.1007/s00216-018-1063-1.
31. Arduini, F.; Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, G. Reversible Enzyme Inhibition-Based Biosensors: Applications and Analytical Improvement Through Diagnostic Inhibition. *Anal. Lett.* **2009**, *42*, 1258-1293, doi:10.1080/00032710902901913.
32. El Harrad, L.; Bourais, I.; Mohammadi, H.; Amine, A. Recent Advances in Electrochemical Biosensors Based on Enzyme Inhibition for Clinical and Pharmaceutical Applications. *Sensors* **2018**, *18*, 164, doi:10.3390/s18010164.

33. Holdgate, G.A.; Meek, T.D.; Grimley, R.L. Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 115-132, doi:10.1038/nrd.2017.219.
34. Copeland, R.A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists*, Second ed.; John Wiley & Sons: 2013.
35. Turner, J.R.; Thomas, L.; Kennedy, S.A. Structural Analysis of a New *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -glucosidase Homology Model and Identification of Potential Inhibitor Enzyme Docking Sites. *J. Young Investig.* **2020**, *38*, 27-33, doi:10.22186/JYI.38.4.27-33.
36. Meneses, M.J.; Silva, B.M.; Sousa, M.; Sá, R.; Oliveira, P.F.; Alves, M.G. Antidiabetic Drugs: Mechanisms of Action and Potential Outcomes on Cellular Metabolism. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 3606-3620, doi:10.2174/1381612821666150710145753.
37. Kerru, N.; Singh-Pillay, A.; Awolade, P.; Singh, P. Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *152*, 436-488, doi:10.1016/j.ejmech.2018.04.061.
38. Dhameja, M.; Gupta, P. Synthetic heterocyclic candidates as promising  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *176*, 343-377, doi:10.1016/j.ejmech.2019.04.025.
39. Nolan, E.M.; Lippard, S.J. A "Turn-On" Fluorescent Sensor for the Selective Detection of Mercuric Ion in Aqueous Media. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14270-14271, doi:10.1021/ja037995g.
40. Zhong, Y.; Yu, L.; He, Q.; Zhu, Q.; Zhang, C.; Cui, X.; Zheng, J.; Zhao, S. Bifunctional Hybrid Enzyme-Catalytic Metal Organic Framework Reactors for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Screening. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 32769-32777, doi:10.1021/acsami.9b11754.
41. Li, J.; He, G.; Wang, B.; Shi, L.; Gao, T.; Li, G. Fabrication of reusable electrochemical biosensor and its application for the assay of  $\alpha$ -glucosidase activity. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1026*, 140-146, doi:10.1016/j.aca.2018.04.015.

42. Chen, H.; Zhang, J.; Wu, H.; Koh, K.; Yin, Y. Sensitive colorimetric assays for  $\alpha$ -glucosidase activity and inhibitor screening based on unmodified gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *875*, 92-98, doi:10.1016/j.aca.2015.02.022.
43. Mohiuddin, M.; Arbain, D.; Islam, A.K.M.S.; Ahmad, M.S.; Ahmad, M.N. Alpha-Glucosidase Enzyme Biosensor for the Electrochemical Measurement of Antidiabetic Potential of Medicinal Plants. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11*, 95, doi:10.1186/s11671-016-1292-1.
44. Zhang, X.; Li, G.; Wu, D.; Yu, Y.; Hu, N.; Wang, H.; Li, X.; Wu, Y. Emerging strategies for the activity assay and inhibitor screening of alpha-glucosidase. *Food Funct.* **2020**, *11*, 66-82, doi:10.1039/C9FO01590F.
45. Li, G.; Kong, W.; Zhao, M.; Lu, S.; Gong, P.; Chen, G.; Xia, L.; Wang, H.; You, J.; Wu, Y. A fluorescence resonance energy transfer (FRET) based "Turn-On" nanofluorescence sensor using a nitrogen-doped carbon dot-hexagonal cobalt oxyhydroxide nanosheet architecture and application to  $\alpha$ -glucosidase inhibitor screening. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 728-735, doi:10.1016/j.bios.2015.12.094.
46. Cao, A.; Tang, Y.; Liu, Y. Novel Fluorescent Biosensor for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Screening Based on Cationic Conjugated Polymers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 3773-3778, doi:10.1021/am3010913.
47. Liu, J.; Duan, X.; Wang, M.; Su, X. A label-free fluorescent sensor based on silicon quantum dots-MnO<sub>2</sub> nanosheets for the detection of  $\alpha$ -glucosidase and its inhibitor. *Analyst* **2019**, *144*, 7398-7405, doi:10.1039/C9AN01680E.
48. Liu, M.; Zhang, W.; Wei, J.; Lin, X. Synthesis and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory mechanisms of bis(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether, a potential marine bromophenol  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1554-1565, doi:10.3390/md9091554.
49. Dai, T.; Li, T.; He, X.; Li, X.; Liu, C.; Chen, J.; McClements, D.J. Analysis of inhibitory interaction between epigallocatechin gallate and alpha-glucosidase: A spectroscopy and molecular simulation study. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *230*, 118023, doi:10.1016/j.saa.2019.118023.
50. Shen, H.; Wang, J.; Ao, J.; Cai, Y.; Xi, M.; Hou, Y.; Li, M.; Luo, A. Inhibitory kinetics and mechanism of active compounds in green walnut husk against  $\alpha$ -

- glucosidase: Spectroscopy and molecular docking analyses. *LWT* **2022**, *172*, 114179, doi:10.1016/j.lwt.2022.114179.
51. Pabis, A.; Kamerlin, S.C.L. Promiscuity and electrostatic flexibility in the alkaline phosphatase superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *37*, 14-21, doi:doi.org/10.1016/j.sbi.2015.11.008.
  52. Le-Vinh, B.; Akkuş-Dağdeviren, Z.B.; Le, N.-M.N.; Nazir, I.; Bernkop-Schnürch, A. Alkaline Phosphatase: A Reliable Endogenous Partner for Drug Delivery and Diagnostics. *Adv. Ther.* **2022**, *5*, 2100219, doi:10.1002/adtp.202100219.
  53. Zaher, D.M.; El-Gamal, M.I.; Omar, H.A.; Aljareh, S.N.; Al-Shamma, S.A.; Ali, A.J.; Zaib, S.; Iqbal, J. Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors. *Arch. Pharm.* **2020**, *353*, e2000011, doi:10.1002/ardp.202000011.
  54. Nsabimana, A.; Lan, Y.; Du, F.; Wang, C.; Zhang, W.; Xu, G. Alkaline phosphatase-based electrochemical sensors for health applications. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 1996-2006, doi:10.1039/C8AY02793E.
  55. Mazzei, F.; Botrè, F.; Montilla, S.; Pilloton, R.; Podestà, E.; Botrè, C. Alkaline phosphatase inhibition based electrochemical sensors for the detection of pesticides. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *574*, 95-100, doi:10.1016/j.jelechem.2004.08.004.
  56. Dong, J.; Yang, H.; Li, Y.; Liu, A.; Wei, W.; Liu, S. Fluorescence sensor for organophosphorus pesticide detection based on the alkaline phosphatase-triggered reaction. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1131*, 102-108, doi:10.1016/j.aca.2020.07.048.
  57. Islam, M.S.; Sazawa, K.; Hata, N.; Sugawara, K.; Kuramitz, H. Determination of heavy metal toxicity by using a micro-droplet hydrodynamic voltammetry for microalgal bioassay based on alkaline phosphatase. *Chemosphere* **2017**, *188*, 337-344, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.09.008.
  58. al-Rashida, M.; Iqbal, J. Inhibition of alkaline phosphatase: an emerging new drug target. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 41-51, doi:10.2174/1389557515666150219113205.

59. Kim, E.E.; Wyckoff, H.W. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 449-464, doi:10.1016/0022-2836(91)90724-k.
60. Zalatan, J.G.; Fenn, T.D.; Herschlag, D. Comparative enzymology in the alkaline phosphatase superfamily to determine the catalytic role of an active-site metal ion. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 1174-1189, doi:10.1016/j.jmb.2008.09.059.
61. Shaban, S.M.; Byeok Jo, S.; Hafez, E.; Ho Cho, J.; Kim, D.-H. A comprehensive overview on alkaline phosphatase targeting and reporting assays. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *465*, 214567, doi:10.1016/j.ccr.2022.214567.
62. Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, *8*, 1400-1458, doi:10.3390/s80314000.
63. Apodaca, F.O.O.d. Biosensores y Biochips, herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia, 2006.
64. Mendoza Madrigal, A.; Chanona-Pérez, J.; Hernandez, H.; Palacios-González, E.; Calderón-Domínguez, G.; Méndez-Méndez, J.; Blasco, J.; Villa-Vargas, L.A. Biosensores mecánicos en el área biológica y alimentaria: Una revisión. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **2013**, *12*, 205-225.
65. Kumar, P.; Dash, S.K.; Ray, S.; Parween, S. *Biomaterials-Based Sensors: Recent Advances and Applications*, First ed.; Springer Singapore: 2023.
66. González-Rumayor, V.G.-I., E.; Ruiz-Galán, O.; Gago-Cabezas, L. *Aplicaciones de biosensores en la industria alimentaria.*; CEIM/Dirección General de Universidades e Investigación: 2005.
67. Choi, M.M.F. Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers. *Microchim. Acta* **2004**, *148*, 107-132, doi:10.1007/s00604-004-0273-8.
68. Sadani, K.; Nag, P.; Thian, X.Y.; Mukherji, S. Enzymatic optical biosensors for healthcare applications. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *12*, 100278, doi:10.1016/j.biosx.2022.100278.
69. Shaban, S.M.; Kim, D.H. Recent Advances in Aptamer Sensors. *Sensors* **2021**, *21*, 979, doi:10.3390/s21030979.

70. Qian, S.; Lin, H. Colorimetric Sensor Array for Detection and Identification of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5395-5400, doi:10.1021/acs.analchem.5b00738.
71. Valeur, B.B.-S., M.N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Second ed.; Wiley-VCH: 2012.
72. Leonhardt, H.; Gordon, L.; Livingston, R. Acid-base equilibriums of fluorescein and 2',7'-dichlorofluorescein in their ground and fluorescent states. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 245-249, doi:10.1021/j100672a011.
73. Naresh, V.; Lee, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors* **2021**, *21*, 1109, doi:10.3390/s21041109.
74. Sargazi, S.; Fatima, I.; Hassan Kiani, M.; Mohammadzadeh, V.; Arshad, R.; Bilal, M.; Rahdar, A.; Díez-Pascual, A.M.; Behzadmehr, R. Fluorescent-based nanosensors for selective detection of a wide range of biological macromolecules: A comprehensive review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *206*, 115-147, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.02.137.
75. Salinas-Castillo, A.; Pastor, I.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Immobilization of a trienzymatic system in a sol-gel matrix: a new fluorescent biosensor for xanthine. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 1059-1062, doi:10.1016/j.bios.2008.07.052.
76. Park, S.-A.; Jang, E.; Koh, W.-G.; Kim, B. Fabrication and characterization of optical biosensors using polymer hydrogel microparticles and enzyme–quantum dot conjugates. *Sens. Actuators B Chem.* **2010**, *150*, 120-125, doi:10.1016/j.snb.2010.07.032.
77. Verma, A.K.; Noumani, A.; Yadav, A.K.; Solanki, P.R. FRET Based Biosensor: Principle Applications Recent Advances and Challenges. *Diagnostics* **2023**, *13*, 1375, doi:10.3390/diagnostics13081375.
78. Gaviria, M.I.; Barrientos, K.; Arango, J.P.; Cano, J.B.; Peñuela, G.A. Highly Sensitive Fluorescent Biosensor Based on Acetylcholinesterase and Carbon Dots–Graphene Oxide Quenching Test for Analytical and Commercial Organophosphate Pesticide Detection. *Front. Environ. Sci.* **2022**, *10*, 825112, doi:10.3389/fenvs.2022.825112.

79. Martínez-Pérez, D.; Ferrer, M.L.; Mateo, C.R. A reagent less fluorescent sol-gel biosensor for uric acid detection in biological fluids. *Anal. Biochem.* **2003**, *322*, 238-242, doi:10.1016/j.ab.2003.08.018.
80. Pastor, I.; Esquembre, R.; Micol, V.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. A ready-to-use fluorimetric biosensor for superoxide radical using superoxide dismutase and peroxidase immobilized in sol-gel glasses. *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 335-343, doi:10.1016/j.ab.2004.08.012.
81. Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M.J.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Fluorescent Biosensor for Phosphate Determination Based on Immobilized Polyfluorene-Liposomal Nanoparticles Coupled with Alkaline Phosphatase. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 136-144, doi:10.1021/acsami.6b12434.
82. Eggins, B.R. *Biosensors: an Introduction*, First ed.; Wiley-Teubner: 1996.
83. Putzbach, W.; Ronkainen, N.J. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review. *Sensors* **2013**, *13*, 4811-4840, doi:10.3390/s130404811.
84. Hughes, G.; Westmacott, K.; Honeychurch, K.C.; Crew, A.; Pemberton, R.M.; Hart, J.P. Recent Advances in the Fabrication and Application of Screen-Printed Electrochemical (Bio)Sensors Based on Carbon Materials for Biomedical, Agri-Food and Environmental Analyses. *Biosensors* **2016**, *6*, 50, doi:10.3390/bios6040050.
85. Ahmed, M.U.; Hossain, M.M.; Safavieh, M.; Wong, Y.L.; Abd Rahman, I.; Zourob, M.; Tamiya, E. Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *36*, 495-505, doi:10.3109/07388551.2014.992387.
86. González-Sánchez, M.I.; Gómez-Monedero, B.; Agrisuelas, J.; Iniesta, J.; Valero, E. Highly activated screen-printed carbon electrodes by electrochemical treatment with hydrogen peroxide. *Electrochem. commun.* **2018**, *91*, 36-40, doi:10.1016/j.elecom.2018.05.002.
87. Tudorache, M.; Bala, C. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 565-578, doi:10.1007/s00216-007-1293-0.

88. Jo, H.; Her, J.; Lee, H.; Shim, Y.-B.; Ban, C. Highly sensitive amperometric detection of cardiac troponin I using sandwich aptamers and screen-printed carbon electrodes. *Talanta* **2017**, *165*, 442-448, doi:doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.091.
89. Chin, S.F.; Lim, L.S.; Pang, S.C.; Sum, M.S.H.; Perera, D. Carbon nanoparticle modified screen printed carbon electrode as a disposable electrochemical immunosensor strip for the detection of Japanese encephalitis virus. *Mikrochim. Acta* **2017**, *184*, 491-497, doi:10.1007/s00604-016-2029-7.
90. Palanisamy, S.; Ramaraj, S.K.; Chen, S.-M.; Yang, T.C.K.; Yi-Fan, P.; Chen, T.-W.; Velusamy, V.; Selvam, S. A novel Laccase Biosensor based on Laccase immobilized Graphene-Cellulose Microfiber Composite modified Screen-Printed Carbon Electrode for Sensitive Determination of Catechol. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41214, doi:10.1038/srep41214.
91. Shim, K.; Kim, J.; Shahabuddin, M.; Yamauchi, Y.; Hossain, M.S.A.; Kim, J.H. Efficient wide range electrochemical bisphenol-A sensor by self-supported dendritic platinum nanoparticles on screen-printed carbon electrode. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *255*, 2800-2808, doi:10.1016/j.snb.2017.09.096.
92. Nicholas, P.; Pittson, R.; Hart, J.P. Development of a simple, low cost chronoamperometric assay for fructose based on a commercial graphite-nanoparticle modified screen-printed carbon electrode. *Food Chem.* **2018**, *241*, 122-126, doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.077.
93. Zhao, X.; Zuo, J.; Qiu, S.; Hu, W.; Wang, Y.; Zhang, J. Reduced Graphene Oxide-Modified Screen-Printed Carbon (rGO-SPCE)-Based Disposable Electrochemical Sensor for Sensitive and Selective Determination of Ethyl Carbamate. *Food Anal. Methods* **2017**, *10*, 3329-3337, doi:10.1007/s12161-017-0886-2.
94. Mohamad, N.R.; Marzuki, N.H.; Buang, N.A.; Huyop, F.; Wahab, R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29*, 205-220, doi:10.1080/13102818.2015.1008192.



95. Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489-511, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
96. Datta, S.; Christena, L.R.; Rajaram, Y.R. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **2013**, *3*, 1-9, doi:10.1007/s13205-012-0071-7.
97. Baruch-Shpigler, Y.; Avnir, D. Enzymes in a golden cage. *Chem. Sci. J.* **2020**, *11*, 3965-3977, doi:10.1039/c9sc05419g.
98. Maghraby, Y.R.; El-Shabasy, R.M.; Ibrahim, A.H.; Azzazy, H.M.E.-S. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega* **2023**, *8*, 5184-5196, doi:10.1021/acsomega.2c07560.
99. Maldonado, N.; Amo-Ochoa, P. Advances and Novel Perspectives on Colloids, Hydrogels, and Aerogels Based on Coordination Bonds with Biological Interest Ligands. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1865, doi:10.3390/nano11071865.
100. Thang, N.H.; Chien, T.B.; Cuong, D.X. Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview. *Gels* **2023**, *9*, 523, doi:10.3390/gels9070523.
101. Montheil, T.; Echaliér, C.; Martínez, J.; Subra, G.; Mehdi, A. Inorganic polymerization: an attractive route to biocompatible hybrid hydrogels. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 3434-3448, doi:10.1039/C8TB00456K.
102. Owens, G.J.; Singh, R.K.; Foroutan, F.; Alqaysi, M.; Han, C.-M.; Mahapatra, C.; Kim, H.-W.; Knowles, J.C. Sol-gel based materials for biomedical applications. *Prog. Mater. Sci.* **2016**, *77*, 1-79, doi:10.1016/j.pmatsci.2015.12.001.
103. Dragomirescu, M.; Vintila, T.; Dudás, Z.; Vlad-Oros, B.; Gabriela, P. Biocatalysts entrapped in silica gels. *J. Biotechnol.* **2007**, *131*, S112, doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.193.
104. Rao, V.; Kalesh, R. Comparative studies of the physical and hydrophobic properties of TEOS based silica aerogels using different co-precursors. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2003**, *4*, 509-515, doi:10.1016/j.stam.2003.12.010.
105. David, A.E.; Yang, A.J.; Wang, N.S. Enzyme stabilization and immobilization by sol-gel entrapment. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *679*, 49-66, doi:10.1007/978-1-60761-895-9\_6.

106. Ferrer, M.L.; del Monte, F.; Levy, D. A Novel and Simple Alcohol-Free Sol-Gel Route for Encapsulation of Labile Proteins. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 3619-3621, doi:10.1021/cm025562r.
107. Dave, B.C.; Dunn, B.; Valentine, J.S.; Zink, J.I. Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1120A-1127A, doi:10.1021/ac00094a001.
108. Morteza, B.; Naimeh, M.; Mehdi, M. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. In *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*, Sutapa Biswas, M.; IntechOpen: 2016; pp. 9-39.
109. Yavari Maroufi, L.; Rashidi, M.; Tabibiazar, M.; Mohammadi, M.; Pezeshki, A.; Ghorbani, M. Recent Advances of Macromolecular Hydrogels for Enzyme Immobilization in the Food Products. *Adv. Pharm. Bull.* **2022**, *12*, 309-318, doi:10.34172/apb.2022.043.
110. Meyer, J.; Meyer, L.E.; Kara, S. Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. *Eng. Life. Sci.* **2022**, *22*, 165-177, doi:10.1002/elsc.202100087.
111. Herrmann, A.; Haag, R.; Schedler, U. Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, e2100062, doi:10.1002/adhm.202100062.
112. Bustamante-Torres, M.; Romero-Fierro, D.; Arcentales-Vera, B.; Palomino, K.; Magaña, H.; Bucio, E. Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials. *Gels* **2021**, *7*, 182, doi:10.3390/gels7040182.
113. El Sayed, M.M. Production of Polymer Hydrogel Composites and Their Applications. *J Polym. Environ.* **2023**, *31*, 2855-2879, doi:10.1007/s10924-023-02796-z.
114. Du, H.; Shi, S.; Liu, W.; Teng, H.; Piao, M. Processing and modification of hydrogel and its application in emerging contaminant adsorption and in catalyst immobilization: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 12967-12994, doi:10.1007/s11356-020-08096-6.
115. Argenta, D.F.; dos Santos, T.C.; Campos, A.M.; Caon, T. Hydrogel Nanocomposite Systems: Physico-Chemical Characterization and Application

- for Drug-Delivery Systems. In *Nanocarriers for Drug Delivery*, Mohapatra, S.S., Ranjan, S., Dasgupta, N., Mishra, R.K., Thomas, S.; Elsevier: 2019; pp. 81-131.
116. Bashir, S.; Hina, M.; Iqbal, J.; Rajpar, A.H.; Mujtaba, M.A.; Alghamdi, N.A.; Wageh, S.; Ramesh, K.; Ramesh, S. Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers* **2020**, *12*, 2702, doi:10.3390/polym12112702.
117. Yahia, L.H.; Chirani, N.; Gritsch, L.; Motta, F.L.; SoumiaChirani; Fare', S. History and Applications of Hydrogels. **2015**, *4*, 1-23, doi:10.4172/2254-609X.100013.
118. Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 105-121, doi:10.1016/j.jare.2013.07.006.
119. Buenger, D.; Topuz, F.; Groll, J. Hydrogels in sensing applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1678-1719, doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.09.001.
120. Holback, H.; Yeo, Y.; Park, K. Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications. In *Biomedical Hydrogels*, Rimmer, S.; Woodhead Publishing: 2011; pp. 3-24.
121. Chafran, L.; Carfagno, A.; Altalhi, A.; Bishop, B. Green Hydrogel Synthesis: Emphasis on Proteomics and Polymer Particle-Protein Interaction. *Polymers* **2022**, *14*, 4755, doi:10.3390/polym14214755.
122. Sennakesavan, G.; Mostakhdemin, M.; Dkhar, L.K.; Seyfoddin, A.; Fatihhi, S.J. Acrylic acid/acrylamide based hydrogels and its properties - A review. *Polym. Degrad. Stab.* **2020**, *180*, 109308, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2020.109308.
123. Sharifzadeh, G.; Hezaveh, H.; Muhamad, I.I.; Hashim, S.; Khairuddin, N. Montmorillonite-based polyacrylamide hydrogel rings for controlled vaginal drug delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *110*, 110609, doi:10.1016/j.msec.2019.110609.
124. Ovalle Rodas, C.; Zaïri, F.; Naït-Abdelaziz, M. A finite strain thermo-viscoelastic constitutive model to describe the self-heating in elastomeric materials during low-cycle fatigue. *J. Mech. Phys. Solids* **2014**, *64*, 396-410, doi:10.1016/j.jmps.2013.10.010.

125. Öztop, H.N.; Akyildiz, F.; Saraydin, D. Poly(acrylamide/vinylsulfonic acid) hydrogel for invertase immobilization. *Microsc. Res. Tech.* **2020**, *83*, 1487-1498, doi:10.1002/jemt.23542.
126. Mulko, L.; Pereyra, J.Y.; Rivarola, C.R.; Barbero, C.A.; Acevedo, D.F. Improving the retention and reusability of Alpha-amylase by immobilization in nanoporous polyacrylamide-graphene oxide nanocomposites. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *122*, 1253-1261, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.078.
127. Naranjo, A.; Martín, C.; López-Díaz, A.; Martín-Pacheco, A.; Rodríguez, A.M.; Patiño, F.J.; Herrero, M.A.; Vázquez, A.S.; Vázquez, E. Autonomous self-healing hydrogel with anti-drying properties and applications in soft robotics. *Appl. Mater. Today* **2020**, *21*, 100806, doi:10.1016/j.apmt.2020.100806.
128. Azady, M.A.R.; Ahmed, S.; Islam, M.S. A review on polymer nanocomposite hydrogel preparation, characterization, and applications. *Eur. J. Chem.* **2021**, *12*, 11, doi:10.5155/eurjchem.12.3.329-339.2100.
129. Rafieian, S.; Mirzadeh, H.; Mahdavi, H.; Masoumi, M.E. A review on nanocomposite hydrogels and their biomedical applications. *Sci. Eng. Compos. Mater.* **2019**, *26*, 154-174, doi:10.1515/secm-2017-0161.
130. Haraguchi, K.; Takehisa, T. Nanocomposite Hydrogels: A Unique Organic-Inorganic Network Structure with Extraordinary Mechanical, Optical, and Swelling/De-swelling Properties. *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1120-1124, doi:10.1002/1521-4095(20020816)14:16<1120::AID-ADMA1120>3.0.CO;2-9.
131. Li, Y.; Young, D.J.; Loh, X.J. Fluorescent gels: a review of synthesis, properties, applications and challenges. *Mater. Chem. Front.* **2019**, *3*, 1489-1502, doi:10.1039/C9QM00127A.
132. Barbero, C.A.; Martínez, M.V.; Acevedo, D.F.; Molina, M.A.; Rivarola, C.R. Cross-Linked Polymeric Gels and Nanocomposites: New Materials and Phenomena Enabling Technological Applications. *Macromol* **2022**, *2*, 440-475, doi:10.3390/macromol2030028.
133. Thoniyot, P.; Tan, M.J.; Karim, A.A.; Young, D.J.; Loh, X.J. Nanoparticle-Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising,

- Multi-Functional Materials. *Adv. Sci.* **2015**, *2*, 1400010, doi:10.1002/advs.201400010.
134. Wei, S.; Li, Z.; Lu, W.; Liu, H.; Zhang, J.; Chen, T.; Tang, B.Z. Multicolor Fluorescent Polymeric Hydrogels. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 8608-8624, doi:10.1002/anie.202007506.
135. Chang, C.; Peng, J.; Zhang, L.; Pang, D.-W. Strongly fluorescent hydrogels with quantum dots embedded in cellulose matrices. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 7771-7776, doi:10.1039/B908835K.
136. Martín, C.; Martín-Pacheco, A.; Naranjo, A.; Criado, A.; Merino, S.; Díez-Barra, E.; Herrero, M.A.; Vázquez, E. Graphene hybrid materials? The role of graphene materials in the final structure of hydrogels. *Nanoscale* **2019**, *11*, 4822-4830, doi:10.1039/C8NR09728C.
137. Yan, X.; Rahman, S.; Rostami, M.; Tabasi, Z.A.; Khan, F.; Alodhayb, A.; Zhang, Y. Carbon Quantum Dot-Incorporated Chitosan Hydrogel for Selective Sensing of Hg<sup>2+</sup> Ions: Synthesis, Characterization, and Density Functional Theory Calculation. *ACS Omega* **2021**, *6*, 23504-23514, doi:10.1021/acsomega.1c03557.
138. Pecher, J.; Mecking, S. Nanoparticles of Conjugated Polymers. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6260-6279, doi:10.1021/cr100132y.
139. Gao, D.; Hu, D.; Liu, X.; Zhang, X.; Yuan, Z.; Sheng, Z.; Zheng, H. Recent Advances in Conjugated Polymer Nanoparticles for NIR-II Imaging and Therapy. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2*, 4241-4257, doi:10.1021/acsapm.0c00679.
140. MacFarlane, L.R.; Shaikh, H.; Garcia-Hernandez, J.D.; Vespa, M.; Fukui, T.; Manners, I. Functional nanoparticles through  $\pi$ -conjugated polymer self-assembly. *Nat. Rev. Mater.* **2021**, *6*, 7-26, doi:10.1038/s41578-020-00233-4.
141. Koralli, P.; Nega, A.; Vagiaki, L.; Pavlou, A.; Siskos, M.; Dimitrakopoulou-Strauss, A.; Gregoriou, V.; Chochos, C. New Conjugated Polymer Nanoparticles with High Photoluminescence Quantum Yields for Far-red and Near Infrared Fluorescence Bioimaging. *Mater. Chem. Front.* **2020**, *4*, 2357-2369, doi:10.1039/D0QM00195C.

142. Chen, X.; Hussain, S.; Abbas, A.; Hao, Y.; Malik, A.H.; Tian, X.; Song, H.; Gao, R. Conjugated polymer nanoparticles and their nanohybrids as smart photoluminescent and photoresponsive material for biosensing, imaging, and theranostics. *Mikrochim. Acta* **2022**, *189*, 83, doi:10.1007/s00604-021-05153-w.
143. Malik, A.H.; Habib, F.; Qazi, M.J.; Ganayee, M.A.; Ahmad, Z.; Yatoo, M.A. A short review article on conjugated polymers. *J. Polym. Res.* **2023**, *30*, 115, doi:10.1007/s10965-023-03451-w.
144. Cheng, Y.-J.; Yang, S.-H.; Hsu, C.-S. Synthesis of Conjugated Polymers for Organic Solar Cell Applications. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 5868-5923, doi:10.1021/cr900182s.
145. Kahveci, Z.; Vázquez-Guilló, R.; Martínez-Tomé, M.J.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. New Red-Emitting Conjugated Polyelectrolyte: Stabilization by Interaction with Biomolecules and Potential Use as Drug Carriers and Bioimaging Probes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 1958-1969, doi:10.1021/acsami.5b10167.
146. Pu, K.-Y.; Liu, B. Fluorescent Conjugated Polyelectrolytes for Bioimaging. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 3408-3423, doi:10.1002/adfm.201101153.
147. Lee, K.; Povlich, L.K.; Kim, J. Recent advances in fluorescent and colorimetric conjugated polymer-based biosensors. *Analyst* **2010**, *135*, 2179-2189, doi:10.1039/C0AN00239A.
148. Chen, X.; Hussain, S.; Hao, Y.; Tian, X.; Gao, R. Review—Recent Advances of Signal Amplified Smart Conjugated Polymers for Optical Detection on Solid Support. *ECS J. Solid State Sci. Technol.* **2021**, *10*, 037006, doi:10.1149/2162-8777/abed1.
149. Thomas, S.W.; Joly, G.D.; Swager, T.M. Chemical Sensors Based on Amplifying Fluorescent Conjugated Polymers. *Chemical Reviews* **2007**, *107*, 1339-1386, doi:10.1021/cr0501339.
150. Kim, S.; Lim, C.-K.; Na, J.; Lee, Y.-D.; Kim, K.; Choi, K.; Leary, J.F.; Kwon, I.C. Conjugated polymer nanoparticles for biomedical in vivo imaging. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1617-1619, doi:10.1039/B923309A.

151. Feng, G.; Liu, J.; Liu, R.; Mao, D.; Tomczak, N.; Liu, B. Ultrasmall Conjugated Polymer Nanoparticles with High Specificity for Targeted Cancer Cell Imaging. *Adv. Sci.* **2017**, *4*, 1600407, doi:10.1002/advs.201600407.
152. Wang, Y.; Li, S.; Zhang, P.; Bai, H.; Feng, L.; Lv, F.; Liu, L.; Wang, S. Photothermal-Responsive Conjugated Polymer Nanoparticles for Remote Control of Gene Expression in Living Cells. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1705418, doi:10.1002/adma.201705418.
153. Wang, L.; Zhao, Q.; Zhang, Z.; Lu, Z.; Zhao, Y.; Tang, Y. Fluorescent Conjugated Polymer/Quarternary Ammonium Salt Co-assembly Nanoparticles: Applications in Highly Effective Antibacteria and Bioimaging. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1*, 1478-1486, doi:10.1021/acsabm.8b00422.
154. Wu, C.; Chiu, D.T. Highly Fluorescent Semiconducting Polymer Dots for Biology and Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3086-3109, doi:10.1002/anie.201205133.
155. Lanio, M.; Luzardo, M.; Laborde, R.; Sanchez Ferras, O.; Cruz Leal, Y.; Pazos Santos, I.F.; Tejuca, M.; Valle Garay, A.; Alonso, M.; Fernandez, L.; et al. Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev. Cub. Física* **2009**, *2626*, 23-30.
156. Rubio-Camacho, M.; Alacid, Y.; Mallavia, R.; Martínez-Tomé, M.J.; Mateo, C.R. Polyfluorene-Based Multicolor Fluorescent Nanoparticles Activated by Temperature for Bioimaging and Drug Delivery. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1485, doi:10.3390/nano9101485.
157. Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M.J.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Use of the Conjugated Polyelectrolyte Poly{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimethylammonium)hexyl]fluorene-phenylene} Bromide (HTMA-PFP) as a Fluorescent Membrane Marker. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1990-1998, doi:10.1021/bm400348n.
158. Kahveci, Z.; Vázquez-Guilló, R.; Mira, A.; Martinez, L.; Falcó, A.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Selective recognition and imaging of bacterial model membranes over mammalian ones by using cationic conjugated polyelectrolytes. *Analyst* **2016**, *141*, 6287-6296, doi:10.1039/C6AN01427E.

159. Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Principles of instrumental analysis*, Sixth ed.; Thomson Brooks/Cole 2007.
160. Lakowicz, J.R. Introduction to Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third ed.; Springer US: 2006; pp. 1-26.
161. Berezin, M.Y.; Achilefu, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641-2684, doi:10.1021/cr900343z.
162. Lakowicz, J.R. Time-Domain Lifetime Measurements. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third ed.; Springer US: 2006; pp. 97-155.
163. Royer, C.A. Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence. *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 1769-1784, doi:10.1021/cr0404390.
164. Lakowicz, J.R. Protein Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third ed.; Springer US: 2006; pp. 529-575.
165. Esquembre, R.; Sanz, J.M.; Wall, J.G.; del Monte, F.; Mateo, C.R.; Ferrer, M.L. Thermal unfolding and refolding of lysozyme in deep eutectic solvents and their aqueous dilutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 11248-11256, doi:10.1039/C3CP44299C.
166. Naeem, A.; Khan, I.M.; Ahmad, A. Spectral investigations of multiple charge transfer complex of p-nitrophenol as an electron acceptor with donor p-dimethylaminobenzaldehyde. *Russ. J. Phys. Chem. A* **2011**, *85*, 1840-1843, doi:10.1134/S0036024411100128.
167. Falke, S.; Betzel, C. Dynamic Light Scattering (DLS): Principles, Perspectives, Applications to Biological Samples. *Radiation in Bioanalysis* **2019**, *8*, 173-193, doi:10.1007/978-3-030-28247-9\_6.
168. Brar, S.K.; Verma, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 4-17, doi:10.1016/j.trac.2010.08.008.
169. Glawdel, T.; Ren, C.L. Zeta Potential Measurement. In *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, Second ed.; Li, D.; Springer New York: 2015; pp. 3513-3522.



170. Zeta potential - An introduction in 30 minutes.; Malvern, Zetasizer Nano series Technical Note (available on Malvern's site, required registration to access to this note), 2015.
171. Akhtar, K.; Khan, S.A.; Khan, S.B.; Asiri, A.M. Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. In *Handbook of Materials Characterization*, First ed.; Sharma, S.K.; Springer International Publishing: 2018; pp. 113-145.
172. Javed, Y.; Ali, K.; Akhtar, K.; Jawaria; Hussain, M.I.; Ahmad, G.; Arif, T. TEM for Atomic-Scale Study: Fundamental, Instrumentation, and Applications in Nanotechnology. In *Handbook of Materials Characterization*, First ed.; Sharma, S.K.; Springer International Publishing: 2018; pp. 147-216.
173. Elliott, A.D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr. Protoc. Cytom.* **2020**, *92*, e68, doi:10.1002/cpcy.68.
174. Malecka-Baturo, K. Advances in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Coatings* **2022**, *12*, 1052, doi:10.3390/coatings12081052.
175. Elgrishi, N.; Rountree, K.J.; McCarthy, B.D.; Rountree, E.S.; Eisenhart, T.T.; Dempsey, J.L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **2018**, *95*, 197-206, doi:10.1021/acs.jchemed.7b00361.
176. Eggimann, H.J.; Le Roux, F.; Herz, L.M. How  $\beta$ -Phase Content Moderates Chain Conjugation and Energy Transfer in Polyfluorene Films. *J. Phys. Chem.* **2019**, *10*, 1729-1736, doi:10.1021/acs.jpcclett.9b00483.
177. Wu, C.; McNeill, J. Swelling-Controlled Polymer Phase and Fluorescence Properties of Polyfluorene Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, *24*, 5855-5861, doi:10.1021/la8000762.
178. Zhao, X.; Li, R.; Jia, Y. Tuning the formation of  $\beta$ -phase poly(9,9-di-n-octylfluorenyl-2,7-diyl) via nano-confinement and polystyrene blending for improved photocatalysis. *Chem. Phys. Mater.* **2022**, *1*, 219-226, doi:10.1016/j.chphma.2022.03.003.
179. Wu, X.Q.; Wang, J.; Lü, Z.R.; Tang, H.M.; Park, D.; Oh, S.H.; Bhak, J.; Shi, L.; Park, Y.D.; Zou, F. Alpha-glucosidase folding during urea denaturation: enzyme

- kinetics and computational prediction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160*, 1341-1355, doi:10.1007/s12010-009-8636-6.
180. Martín-Pacheco, A.; Del Río Castillo, A.E.; Martín, C.; Herrero, M.A.; Merino, S.; García Fierro, J.L.; Díez-Barra, E.; Vázquez, E. Graphene Quantum Dot–Aerogel: From Nanoscopic to Macroscopic Fluorescent Materials. Sensing Polyaromatic Compounds in Water. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 18192-18201, doi:10.1021/acsami.8b02162.
181. Abd El-Wahab, H.; Ibrahim, A.G.; Hai, F.; Mahmoud, H. Synthesis, Characterization, Swelling Studies and Dye Removal of Chemically Crosslinked Acrylic Acid/Acrylamide/N,N-Dimethyl Acrylamide Hydrogels. *Am. J. Appl. Chem.* **2016**, *4*, 221-234, doi:10.11648/j.ajac.20160406.12.
182. Bortolato, M.; Besson, F.; Roux, B. Role of metal ions on the secondary and quaternary structure of alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa. *Proteins* **1999**, *37*, 310 - 318, doi:10.1002/(SICI)1097-0134(19991101)37:2<310::AID-PROT16>3.0.CO;2-B.
183. Dumitrașcu, L.; Stănciuc, N.; Aprodu, I.; Ciuciu, A.M.; Alexe, P.; Bahrim, G.E. Monitoring the heat-induced structural changes of alkaline phosphatase by molecular modeling, fluorescence spectroscopy and inactivation kinetics investigations. *J Food Sci Technol* **2015**, *52*, 6290-6300, doi:10.1007/s13197-015-1719-1.
184. Cui, J.; Ogabiela, E.E.; Hui, J.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Tong, L.; Zhang, J.; Adeloju, S.B.; Zhang, X.; Wu, Y. Electrochemical Biosensor based on Pt/Au Alloy Nanowire Arrays for Phosphate Detection. *J. Electrochem. Soc.* **2015**, *162*, B62, doi:10.1149/2.0701503jes.
185. Karthikeyan, R.; Berchmans, S. Inorganic-Organic Composite Matrix for the Enzymatic Detection of Phosphate in Food Samples. *J. Electrochem. Soc.* **2013**, *160*, B73, doi:10.1149/2.111306jes.
186. Gamero-Quijano, A.; Huerta, F.; Salinas-Torres, D.; Morallón, E.; Montilla, F. Electrocatalytic Performance of SiO<sub>2</sub>-SWCNT Nanocomposites Prepared by Electroassisted Deposition. *Electrocatalysis* **2013**, *4*, 259-266, doi:10.1007/s12678-013-0144-3.

187. Upadhyay, L.S.B.; Verma, N. Alkaline phosphatase inhibition based conductometric biosensor for phosphate estimation in biological fluids. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 611-616, doi:10.1016/j.bios.2015.01.064.



# Anexo I



# Artículo 7.1.

## Reusable Fluorescent Nanobiosensor Integrated in a Multiwell Plate for Screening and Quantification of Antidiabetic Drugs

Yolanda Alacid<sup>1</sup>, María José Martínez-Tomé<sup>1</sup>, C. Reyes Mateo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche,  
Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain.

*ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(22), 25624-25634

doi: 10.1021/acsami.1c02505

Factor de impacto: 10.383





# Reusable Fluorescent Nanobiosensor Integrated in a Multiwell Plate for Screening and Quantification of Antidiabetic Drugs

Yolanda Alacid, María José Martínez-Tomé, and C. Reyes Mateo\*

Cite This: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2021, 13, 25624–25634

Read Online

ACCESS |



Metrics &amp; More



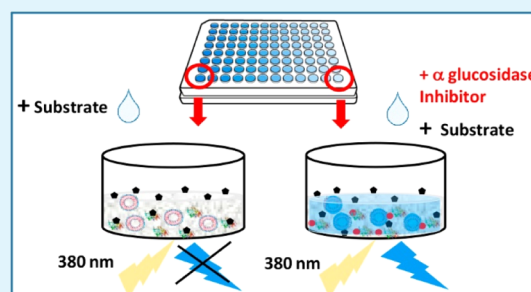
Article Recommendations



Supporting Information

**ABSTRACT:** A highly stable and reusable fluorescent multisample nanobiosensor for the detection of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors has been developed by coupling fluorescent liposomal nanoparticles based on conjugated polymers (L-CPNs) to the enzyme  $\alpha$ -glucosidase, one of the main target enzymes in the treatment of type 2 diabetes. The mechanism of sensing is based on the fluorescence “turn-on” of L-CPNs by *p*-nitrophenol (PNP), the end product of the enzymatic hydrolysis of *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside. L-CPNs, composed of lipid vesicles coated with a blue-emitting cationic polyfluorene, were designed and characterized to obtain a good response to PNP. Two nanobiosensor configurations were developed in this study. In the first step, a single-sample nanobiosensor composed of L-CPNs and  $\alpha$ -glucosidase entrapped in a sol–gel glass was developed in order to characterize and optimize the device. In the second part, the nanobiosensor was integrated and adapted to a multiwell microplate and the possibility of reusing it and performing multiple measurements simultaneously with samples containing different  $\alpha$ -glucosidase inhibitors was investigated. Using super-resolution confocal microscopy, L-CPNs could be visualized within the sol–gel matrix, and the quenching of their fluorescence, induced by the substrate, was directly observed *in situ*. The device was also shown to be useful not only as a platform for screening of antidiabetic drugs but also for quantifying their presence. The latter application was successfully tested with the currently available drug, acarbose.

**KEYWORDS:**  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, nanobiosensor, fluorescent conjugated polymers, liposomal nanoparticles, acarbose, multiwell plate, antidiabetic drugs



## INTRODUCTION

Nowadays, medicine is becoming a molecular science in which most drugs are directly targeted toward specific macromolecular sites, whose bioactivity is pathogenic or, at least, associated with the pathology being treated.<sup>1–3</sup> Among the specific macromolecules that can act as therapeutic targets, enzymes occupy a prominent position, given that their catalytic role is essential in many physiological processes. Drugs can act on the enzyme by activating or inhibiting it, the latter being the most common. The use of suitable inhibitors can produce accumulation of the enzyme substrate or a reduction in the products generated. Both effects are interesting from a therapeutic or diagnostic point of view. Therefore, the study of drug-induced enzyme inhibition, the screening of inhibitors, and the monitoring of their toxicity are of great interest in the prevention and treatment of many diseases.<sup>4–6</sup>

One of the most prevalent chronic diseases in the world is diabetes, which is characterized by an abnormal increase in the concentration of glucose in blood. Its complications lead to kidney disorders, blindness, and a marked increase in the risk of heart disease. Type 2 diabetes, or noninsulin-dependent diabetes, is the most common and accounts for 90% of all cases of diabetes. Although there is currently no drug capable of

curing this disease, there are treatments that can control it, thus reducing the risks involved.<sup>7,8</sup> One of the most interesting therapeutic approaches for type 2 diabetes is to inhibit the activity of the enzyme  $\alpha$ -glucosidase, which converts polysaccharides into absorbable sugars in the intestinal environment. In this way, the digestion of carbohydrates is delayed, reducing the hyperglycemia that occurs after the ingestion of food. Nowadays there are three major drugs in the market belonging to the category of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors (AGIs): acarbose (the most commonly used AGI), miglitol, and voglibose, although the latter has been discontinued from the US market.<sup>9</sup> These drugs, although efficient, have a very severe dosage regimen and important side effects, mainly gastrointestinal and hepatic, so they are infrequently prescribed in the US and European countries. For this reason, there is increasing interest in finding new antidiabetic agents with

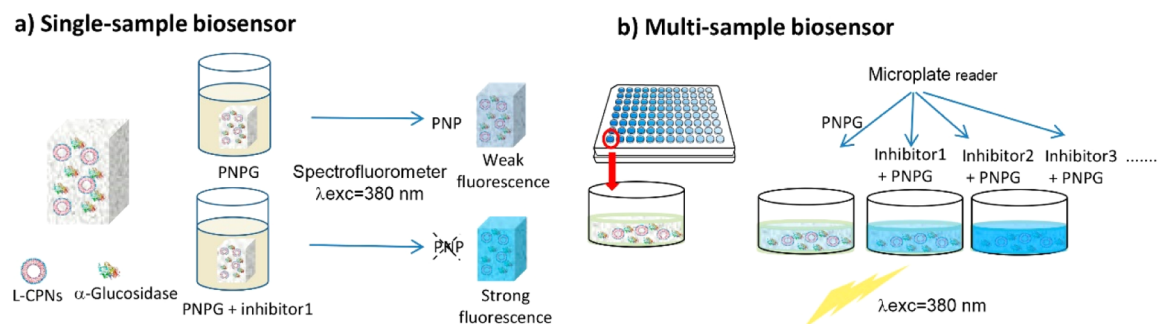
Received: February 5, 2021

Accepted: May 17, 2021

Published: May 27, 2021



**Scheme 1. Schematic Representation and Working Principle of the Single-Sample Nanobiosensor (a) and Multisample Nanobiosensor (b) for Screening of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors, Based on the Quenching (Turn-On) of the Immobilized L-CPNs by PNP, the Enzyme Catalytic Product of PNPG<sup>a</sup>**



<sup>a</sup>Presence of inhibitors prevents the quenching to a degree that depends on their ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase.

better pharmacological profile, capable of inhibiting  $\alpha$ -glucosidase, reducing the side effects of current drugs.<sup>8,10,11</sup> However, to date, there has been no significant progress in this field, despite the fact that acarbose and miglitol were introduced in the market in the early 1990s.<sup>12,13</sup>

The identification of new enzyme inhibitors can be carried out, among others, using virtual screening methods, especially if the structure of the enzyme and its active center is known. In this way, a set of compounds that potentially have high affinity and specificity for the active center are selected to behave as competitive inhibitors.<sup>14,15</sup> The screening of inhibitors from traditional Chinese medicines is also a prominent approach of drug discovery. In this sense, many natural products have proved to be a source of compounds that have a high ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase.<sup>16</sup> In addition, the synthesis of compounds with a monosaccharide or sugar-mimic frameworks, designed on the basis of the common structure of commercial AGIs, is another strategy in the search for new antidiabetic agents.<sup>11,17</sup> Regardless of the strategy used to identify these new compounds, the next step is to assess their inhibitory activity against  $\alpha$ -glucosidase. A recent review summarizes many of the methods developed to date for this purpose.<sup>18</sup> Hyperglycemic animal model for *in vivo* screening and enzyme inhibitor model for *in vitro* screening, using *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG) as the substrate, are the two most commonly used approaches. However, these tests usually represent a high economic and time cost since they include several stages and the use of enzymes and reactants, which can sometimes be very expensive.<sup>19,20</sup> Specifically, the most commonly used *in vitro* screening approach is based on a 96-well plate assay using UV-vis spectrophotometry as the detection method. However, numerous sources of error can contribute in affecting the accuracy and reproducibility of these measurements, such as plate edge effects (temperature and evaporation deviations), turbidity, air bubbles during mixing, and so forth, as has been reported in a very recent study.<sup>21</sup> An alternative to conventional methods is the use of enzyme biosensors. These devices are simple, specific, and effective tools for analytical investigations which incorporate an enzyme coupled to a suitable physicochemical transducer, generally optical or electrochemical. In addition, they directly monitor the target enzymes without a complicated pretreatment. In the fabrication of biosensors, the enzyme must be confined/immobilized in an appropriate matrix that does not affect its activity and allows the access of the substrate to the active site, as well as that of possible inhibitors. In past years, various  $\alpha$ -

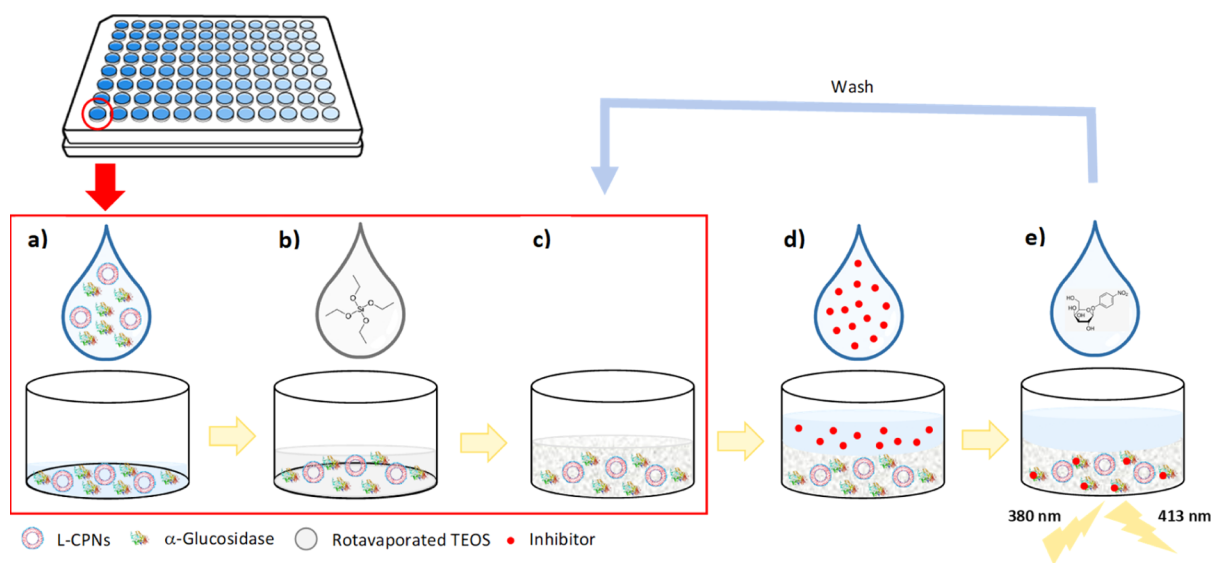
glucosidase-based biosensors have been developed to be applied in the screening of potential enzyme inhibitors, the majority of which use colorimetric or electrochemical transducers.<sup>19,20,22,23</sup> New fluorescent strategies are also currently being developed for this purpose, although most of the devices reported are either not reusable because the enzyme and fluorophores are not immobilized or do not allow the simultaneous screening of many compounds, with the consequent economic and time cost.<sup>18,24–26</sup> Therefore, it still remains a challenge to obtain a simple, inexpensive, and reusable platform for  $\alpha$ -glucosidase inhibitor screening.

Fluorescent nanoparticles based on conjugated polymers (CPNs) have attracted extensive research interest in recent years because of their low cytotoxicity, excellent photostability, good biocompatibility, and water stability. These excellent properties allow their use as fluorescent probes in biomedical applications such as bioimaging, diagnosis, and drug delivery, without risking the cellular viability.<sup>27–35</sup> In addition, CPNs have received great attention as novel materials in sensing applications, acting as fluorescent transducers for detecting chemical and biological species.<sup>36–38</sup>

Recently, we have developed a “turn-on” fluorescent nanobiosensor for the detection of phosphate ions, an inhibitor of the enzyme alkaline phosphatase (ALP), based on CPNs. For the construction of the device, ALP was coimmobilized in a sol-gel matrix with blue-emitting nanoparticles composed of the cationic polyfluorene, poly{(9,9-bis(6'-*N,N,N*-trimethylammonium)hexyl]fluorene-phenylene} bromide (HTMA-PFP), incorporated in anionic lipid vesicles.<sup>39</sup> The operating principle of the biosensor is based on the quenching of the fluorescent nanoparticles by *p*-nitrophenol (PNP), the ALP hydrolysis product of the substrate *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP). PNP is an electron acceptor that in its anionic form ( $pK_a = 7.15$ ) quenches the fluorescence of HTMA-PFP, probably through a combination of electron transfer and Förster resonance energy transfer.<sup>25,40</sup> This compound is also the end product of hydrolysis of PNPG, catalyzed by  $\alpha$ -glucosidase. Therefore, a fluorescent nanobiosensor for the screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors could be developed by coupling polyfluorene nanoparticles to this enzyme and properly immobilizing the components for easy handling and possible reuse.

In the present work, we have developed a low-cost fluorescent multisample nanobiosensor for the detection of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, which potentially could be used as antidiabetic drugs. The device is composed of  $\alpha$ -glucosidase

**Scheme 2. Scheme of the Fabrication Process (in the Red Box) and Application Procedure of the Multiwell Plate Nanobiosensor for Screening of Antidiabetic drugs; (a): Introduction of the Mixture Composed of L-CPNs and  $\alpha$ -Glucosidase in Each Well; (b): Addition of Rotaevaporated Hydrolyzed TEOS; (c): Gelification and Immobilization of the Components; (d): Addition of the Inhibitor; (e): Addition of the Substrate and Measured of Fluorescence from the Bottom of the Wells and Regeneration of the Nanobiosensor after Washing**



and polyfluorene-liposomal nanoparticles (L-CPNs) immobilized in a sol–gel matrix. In contrast to the previously developed phosphate ion biosensor, which only allows the analysis of one sample per experiment and is therefore not particularly suitable for screening a large number of samples, two different configurations have been developed for the present biosensor (Scheme 1): initially, a single-sample nanobiosensor was tested in a fluorescence cuvette in order to characterize and optimize the device, first with the components in solution and then immobilized in the sol–gel matrix. In the second part, the nanobiosensor was adapted to a 96-well microplate and the ability to be reused and to perform multiple measurements simultaneously, with different inhibitors, was investigated. In addition, using a super-resolution confocal microscope, the immobilized L-CPNs could be individually visualized in the wells and the fluorescence quenching of their fluorescence, induced by the hydrolysis of PNPG, was directly observed *in situ*. Compared to traditional PNPG colorimetric assays, this device has fewer measurement steps and minimizes many of the associated concerns cited above because measurements are made in the solid phase of the wells and not in solution.

## MATERIALS AND METHODS

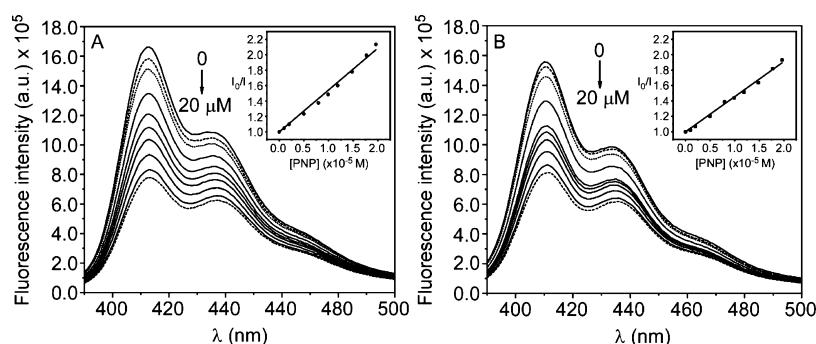
**Materials and Reagents.** The synthetic phospholipids egg yolk L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC) and L- $\alpha$ -phosphatidylglycerol sodium salt (PG), enzyme  $\alpha$ -glucosidase (E.C. 3.2.1.20, from *Saccharomyces cerevisiae*,  $\geq 10$  unit/mg), substrate *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG) and *p*-nitrophenol (PNP) were obtained from Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, Spain). Stock solutions of  $\alpha$ -glucosidase, PNPG, and PNP were dissolved in sodium phosphate buffer (50 mM, 0.1 M NaCl, pH 7.4) at 45.1  $\mu$ M, 2 mM, and 1 mM, respectively. The polyfluorene HTMA-PFP [ $M_n$  (g·mol<sup>-1</sup>) = 4170;  $M_w$  (g·mol<sup>-1</sup>) = 8340] was synthesized and subsequently characterized in our laboratory.<sup>41–43</sup> Stock solutions of the polyfluorene were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) with final concentrations of  $3.65 \times 10^{-4}$  M (in repeat units) and stored at  $-20$  °C before use. Tetraethyl orthosilicate (TEOS) was obtained from Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, Spain). Sodium phosphate buffer (50 mM, 0.1 M

NaCl, pH 7.4) was prepared with twice distilled and deionized water, utilizing Milli-Q equipment (Millipore, Madrid, Spain). Enzyme inhibitors, acarbose, miglitol, and gallic acid were purchased from Alfa Aesar (Thermo Fisher GmbH, Kandel, Germany), Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., (Tokyo, Japan) and Merck Life Science (Madrid, Spain), respectively. Stock solution of inhibitors were prepared with sodium phosphate buffer (50 mM, 0.1 M NaCl, pH 7.4) at 100 mM. All other solvents were of spectroscopic or analytical reagent grade (Uvasol, Merck).

**Preparation of the Fluorescent Nanoparticles (L-CPNs).** Solutions of chloroform containing 2 mg of anionic PG or zwitterionic PC lipids were left to dry under argon gas flow for 20 min. The dried lipid was resuspended in sodium phosphate buffer to the required final concentration (1 mM to limit sample turbidity, a potential artifact in fluorescence measurements) and vortexed several times in order to obtain multilamellar vesicles (MLVs). Large unilamellar vesicles (LUVs) were obtained from MLVs by pressure extrusion through 0.1  $\mu$ m polycarbonate filters (Nucleopore, Cambridge, MA, USA). Straight away, aliquots of the polyfluorene HTMA-PFP from the stock solution in DMSO were added to the LUVs suspension (final concentration of 3  $\mu$ M in terms of repeat units) and incubated for at least 30 min at room temperature. The concentration of HTMA-PFP was 3  $\mu$ M to ensure that all the polymer chains were incorporated into the LUVs, considering the partition coefficient between the lipid and aqueous phase reported previously by our group.<sup>44</sup> The proportion of DMSO in final samples was lower than 1% v/v in all the cases.

**Fluorescent Assay of  $\alpha$ -Glucosidase in Solution.** The functioning of the nanobiosensor was first checked with the components in solution by adding the enzyme to a suspension of L-CPNs and measuring the fluorescence signal after the addition of the substrate. The  $\alpha$ -glucosidase concentration in the sample was tested from 0.4 to 1.2  $\mu$ M (Figure S1). For 0.8  $\mu$ M, the time necessary to hydrolyze the substrate PNPG (15  $\mu$ M) and to quench the fluorescence of L-CPNs was  $\sim 13$  min, which was considered a good response time for the development of the biosensor in solution. The hydrolysis effect did not improve remarkably when the  $\alpha$ -glucosidase concentration was increased to 1.2  $\mu$ M.

**Immobilization of  $\alpha$ -Glucosidase and L-CPNs in a Sol–Gel Matrix.** Fluorescent L-CPNs and  $\alpha$ -glucosidase were first immobilized separately to facilitate their characterization within the sol–gel



**Figure 1.** (A) Fluorescence emission spectra of PC and (B) PG L-CPNs at increasing concentrations of PNP (0–20  $\mu\text{M}$ ). Inset: Stern–Volmer plot for quenching of HTMA-PFP in LUVs of (A) PC and (B) PG by PNP in sodium phosphate buffer, pH 7.4 ( $\lambda_x = 380 \text{ nm}$ ).

matrix.  $\alpha$ -Glucosidase was immobilized by the sol–gel process, as was previously described.<sup>39</sup> In brief, a volume of 4.46 mL of the precursor TEOS was mixed at room temperature with 1.44 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  and 0.04 mL of HCl (0.62 M). After stirring for 1 h, 1 mL of this solution was mixed with 1 mL of distilled water and subjected to rotaevaporation to eliminate the alcohol resulting from alkoxide hydrolysis. Immobilized  $\alpha$ -glucosidase was prepared by adding 0.7 mL of buffered enzyme (12  $\mu\text{M}$ ) solution to 0.7 mL of the rotaevaporated sample. Transparent monoliths containing the  $\alpha$ -glucosidase (6  $\mu\text{M}$ ) within their pores were rapidly obtained, aged in 1 mL of sodium phosphate buffer during 48 h and stored at 4  $^\circ\text{C}$  in the dark before use. The concentration of enzyme was increased to 6  $\mu\text{M}$  in order to obtain a good-quality fluorescence emission spectrum of the protein inside the monolith. In the case of the L-CPNs, the immobilization protocol was similar to that of the enzyme other than adding 0.7 mL of the fluorescent nanoparticle solution (PC/HTMA-PFP, 2 mM:6  $\mu\text{M}$ ) to 0.7 mL of the rotaevaporated sample.

**Preparation of the  $\alpha$ -Glucosidase Nanobiosensor.** Two configurations of the nanobiosensor were developed in this work (Scheme 1). For the single-sample nanobiosensor, 0.7 mL of a solution containing L-CPNs (PC/HTMA-PFP, 2 mM:6  $\mu\text{M}$ ) and  $\alpha$ -glucosidase (12  $\mu\text{M}$ ) in sodium phosphate buffer were mixed with 0.7 mL of the rotaevaporated solution in a disposable cuvette. Gelation occurred readily after mixing. The freshly formed monoliths, having a size of  $\sim 9 \times 9 \times 15 \text{ mm}^3$ , were aged during 48 h, washed with sodium phosphate buffer, sealed with parafilm and stored in dark at 4  $^\circ\text{C}$ . For the multisample device, 75  $\mu\text{L}$  of the buffered nanobiosensor components and 75  $\mu\text{L}$  of the rotaevaporated sample were mixed in the wells of a 96-well microplate. The sol–gel reaction was made directly in the microplate, obtaining solid transparent monoliths of  $\sim 150 \mu\text{L}$  of volume that were fixed at the bottom of the well (Scheme 2). The microplate was sealed with parafilm and stored at 4  $^\circ\text{C}$  in the dark before use.

**Fluorescence Measurements.** For the assays in solution and for the single-sample nanobiosensor, the fluorescence measurements were performed on a PTI-QuantaMaster spectrofluorometer (Birmingham, AL, USA) at 25  $^\circ\text{C}$ . Samples were placed in 1 cm-path-length quartz cuvettes and excited at 380 nm. The emission spectra were recorded between 390 and 500 nm (integration time = 0.5 s) using excitation and emission slits of 1 and 1.4 nm, respectively. Background intensities, corresponding to intensities due to the excitation of blanks, were checked and subtracted from the samples. For the biosensor in solution, blanks correspond to suspensions of lipid vesicles (without HTMA-PFP), while for the immobilized biosensor, blanks correspond to sol–gel matrices containing lipid vesicles (without HTMA-PFP). For the multisample nanobiosensor, fluorescence measurements were carried out at 25  $^\circ\text{C}$  on a CytationTM3 96-well plate reader (BioTek, Winooski, Vermont, USA). All samples were excited at 380 nm. All measurements in the microplate were made in triplicate. The assessment for statistically significant differences between groups was addressed by performing two-tailed *t*- and ANOVA tests, for two and more groups respectively,

at the 95% confidence interval after assessing for normality with the Shapiro–Wilk test.

**Fluorescence Quenching Experiments.** Fluorescence emissions of the L-CPNs in sodium phosphate buffer were studied in the presence and absence of different PNP and PNPG concentrations. PNP acts as a quencher of the cationic polyfluorene HTMA-PFP through charge or energy transfer process.<sup>39</sup> Stern–Volmer analysis was applied to the obtained fluorescence quenching values according to eq 1

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

where, *I* and *I*<sub>0</sub> correspond with the steady-state fluorescence intensities in the presence and absence of PNP, respectively, *Q* represents the quencher concentration, and *K*<sub>SV</sub>, the Stern–Volmer constant, whose value gives information on the efficiency of the quenching process and reflects the sensitivity of the fluorophore to the quencher or the accessibility of the fluorophores to a quencher. In the current study, this would describe how easily accessible the polyfluorene (within the L-CPN) is to the PNP compound.

**Particle Size and Zeta Potential.** The size and zeta potential of L-CPNs were explored by the dynamic light scattering (DLS) technique, with a Malvern Zetasizer Nano-ZS instrument (Worcestershire, UK) equipped with a monochromatic coherent 4 mW helium neon laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) light source, where size measurements were performed at angles of 173 $^\circ$ . Size was measured in disposable cuvettes, while zeta potential measurements were performed in specific zeta potential cells. All measurements were carried out in triplicate at room temperature.

**Transmission Electron Microscopy.** Transmission electron microscopy (TEM) was performed by using a TEM (JEM-1400 Plus, JEOL, Tokyo, Japan), working at 120 kV. Images of LUVs and L-CPNs were obtained by placing a drop of the corresponding suspension on to 300-mesh copper grids coated with carbon film and then stained with lead citrate. These samples were left to air-dry before being placed under the microscope. Digital images were recorded with a Gatan ORIUS camera.

**Fluorescence Microscopy.** Images of the blue fluorescence of the nanoparticles were acquired with a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 900 with a super-resolution Airyscan 2 detector) and processed using Carl Zeiss ZEN blue software. L-CPNs were excited at 405 nm and imaged with a 63 $\times$ /1.4 NA objective (oil-immersion). The image in Figure S2B was taken at Carl Zeiss AG (Oberkochen), and images in Figure 4A,B were acquired at our Institute. Images were analyzed with ImageJ to obtain the corresponding histograms.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Design and Characterization of Fluorescent L-CPNs.** Fluorescent L-CPNs were prepared by incorporation of the cationic polyfluorene HTMA-PFP in lipid vesicles (LUVs) composed of zwitterionic (PC) or anionic (PG) lipids, as is described in Materials and Methods. This strategy stabilizes

the polymer, avoiding its high tendency to aggregate in an aqueous environment, which results in a drastic loss of fluorescence intensity.<sup>45</sup> L-CPNs were suspended in buffer at pH 7.4, which is an optimum value for  $\alpha$ -glucosidase activity. The choice of the most suitable lipid for the preparation of L-CPNs was made after exploring their ability to be quenched by PNP, the end product of hydrolysis of PNPG. Figure 1A,B shows the fluorescence emission spectra of L-CPNs composed of either PC or PG lipids, respectively, in the absence and in presence of increasing concentrations of PNP (0–20  $\mu$ M). As expected, a decrease in the fluorescence intensity was observed as the PNP concentration was increased. Two pathways can in principle be responsible for this quenching, and it is difficult to separate them, as described in a previous paper.<sup>39</sup> On the one hand, polyfluorenes are electron donors, while PNP is an electron acceptor, so the fluorescence of HTMA-PFP incorporated in the nanoparticles can be quenched by PNP through a photoinduced electron transfer mechanism. On the other hand, the absorption of PNP, in its anionic form, overlaps with the emission spectrum of HTMA-PFP. Therefore, quenching can take place by a resonance energy transfer process (FRET), from HTMA-PFP to PNP. In any case, although the exact contribution of each mechanism is not known, it was possible to analyze the results by means of Stern–Volmer analysis, as described in Materials and Methods. The corresponding Stern–Volmer plots were linear in the concentration range studied with values of  $K_{SV} = 5.4 \pm 0.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and  $K_{SV} = 4.6 \pm 0.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  for PC and PG nanoparticles, respectively (inset in Figure 1A,B). These results indicate that both L-CPNs show a fairly similar response to the presence of PNP, although it is slightly higher in the case of the zwitterionic system. The small difference observed may be due to the location of HTMA-PFP in zwitterionic vesicles, which at difference of anionic ones, remains near or at the surface of the bilayer and not in the hydrophobic core.<sup>43,44</sup> This location facilitates the accessibility of PNP to the polymer. Based on these results and considering that a PC lipid, from the point of view of the economic feasibility, is less expensive and more readily available, we selected this phospholipid to make the fluorescent nanoparticles.

The formed nanoparticles were further characterized by DLS and zeta potential measurements to estimate the size and surface charge density (Table 1). The results obtained show

**Table 1. Hydrodynamic Diameter (*d*) and Zeta Potential (ZP) of PC LUVs and L-CPNs**

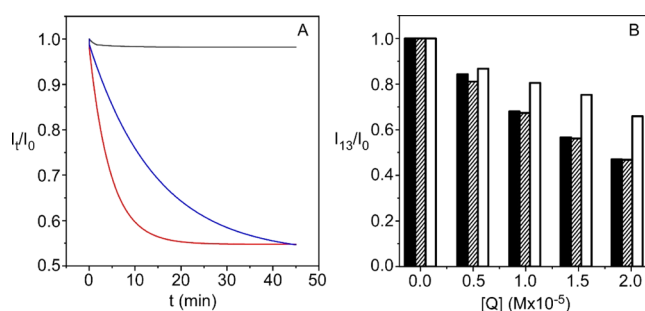
sample	<i>d</i> (nm)	ZP (mV)
PC LUVs	161.5 $\pm$ 1.6	6.3 $\pm$ 0.7
L-CPNs	164.1 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.3

that the hydrodynamic diameter of the L-CPNs is slightly higher than that corresponding to PC LUVs before HTMA-PFP addition, probably because the polymer coats the lipid vesicles. With regard to zeta potential, the polymer helps to stabilize the nanoparticles, although it is still below the optimum value of 30 mV that prevents aggregation over time and promotes colloidal stability.

The size and morphology of the L-CPNs were also explored by TEM experiments. The images of these nanoparticles are shown in Figure S2A. Results indicate that nanoparticles are rather spherical having a size in agreement with those obtained from DLS experiments, taking into account that each

technique measures different properties of the sample under different conditions (in DLS, the nanoparticles are suspended in buffer, making them completely hydrated, while for TEM measurements, the samples must be dried and fixed on appropriate media for viewing). Finally, the nanoparticles and their fluorescence emission were viewed individually under the confocal microscopy. L-CPNs were imaged with a 63 $\times$ /1.4 NA objective (oil-immersion), and their diameters were estimated, obtaining values in the expected range of size (Figure S2B).

**Study in Solution of the Nanobiosensor Components.** Once the quenching of the fluorescent L-CPNs by PNP was confirmed, it was investigated whether the quenching process was also triggered by the addition of the substrate (PNPG) to a nanoparticle suspension containing the enzyme  $\alpha$ -glucosidase. In order to select the incubation time of the assay, a first experiment was performed, in which the fluorescence intensity of the sample was recorded as a function of time upon addition of PNPG 15  $\mu$ M, in the presence and absence of the enzyme (0.8  $\mu$ M), as is described in Materials and Methods. The results, displayed in Figure 2A, show that



**Figure 2.** (A) Quenching kinetics of L-CPNs in the absence (black line) and presence of  $\alpha$ -glucosidase (0.8  $\mu$ M) without (red line) and with acarbose (1 mM) (blue line), recorded after addition of PNPG (15  $\mu$ M). (B) Fluorescence quenching of L-CPNs at increasing concentrations of PNP (black bars) or PNPG in the presence of  $\alpha$ -glucosidase (0.8  $\mu$ M) without (striped bars) and with acarbose 1 mM (white bars), measured before ( $I_0$ ) and after 13 min of incubation ( $I_{13}$ ).

the fluorescence quenching, measured as  $I_t/I_0$ , where  $I_t$  and  $I_0$  are the intensities at time  $t$  and 0, respectively, occurs only in the presence of the enzyme and reaches its minimum value around ~12–15 min, evidencing that the fluorescence of the L-CPNs is able to detect the activity of  $\alpha$ -glucosidase. To further confirm this result, increasing concentrations of PNPG (0–20  $\mu$ M) were added to a sample containing L-CPNs and  $\alpha$ -glucosidase, and the corresponding fluorescence spectra were recorded after 13 min of incubation. Figure 2B compares the effect induced on the fluorescence signal of L-CPNs after each addition of the substrate (striped bars), with that obtained by adding the same concentration of PNP (black bars). A similar quenching pattern was observed for both compounds. When the Stern–Volmer analysis was applied to these results, a  $K_{SV}$  value of  $5.3 \pm 0.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  was obtained for PNPG, which similar to that found for PNP.

As described in Introduction, the purpose of this biosensor is to be used as a tool for the screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors (AGIs). The presence of a possible inhibitor in a sample containing L-CPNs and enzyme would prevent the transformation of the substrate into PNP, so that the fluorescence quenching, after the incubation time, would be

less than that observed in its absence. The validity of this potential application was tested using the compound acarbose, which is the first  $\alpha$ -glucosidase inhibitor available for treatment of type 2 diabetes. This molecule binds to the active site of the enzyme preventing the hydrolysis of PNPG to PNP. The compound was added to a sample containing L-CPNs and  $\alpha$ -glucosidase, and the fluorescence intensity of the nanoparticles was monitored for 45 min upon addition of PNPG 15  $\mu$ M (blue line in Figure 2A). The results show that the presence of acarbose slowed down the quenching kinetics, obtaining a fluorescence signal, which was clearly higher than that obtained in its absence, especially in the range of 5–20 min incubation time. A similar result was observed at different substrate concentrations. The intensity of fluorescence recorded after 13 min of incubation was higher than that obtained in the absence of the drug (white bars in Figure 2B), evidencing the ability of the nanobiosensor components to detect the presence of AGIs.

**Development of the Nanobiosensor: Immobilization of Components.** To facilitate the handling and possible reuse of the nanobiosensor components, L-CPNs and  $\alpha$ -glucosidase were immobilized in a sol–gel matrix, obtaining solid and transparent glasses whose shape is determined by the container in which the polymerization reaction proceeds. As was mentioned in Introduction, two configurations of the device were developed and tested in this work (Scheme 1): in the first stage, a single-sample nanobiosensor was performed in order to characterize and optimize the device. In the second part, the nanobiosensor was integrated in a multiwell plate and the ability to be reused and to perform multiple measurements simultaneously was investigated.

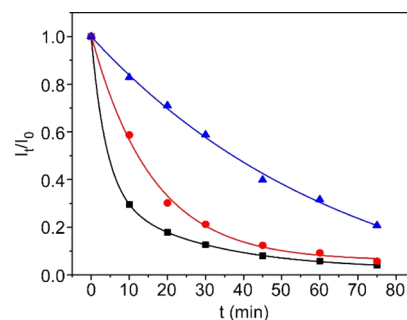
**Single-Sample Nanobiosensor.** For this configuration, the biosensor components were immobilized in a sol–gel monolith of  $\sim 9 \times 9 \times 15$  mm<sup>3</sup>. First, L-CPNs and  $\alpha$ -glucosidase were immobilized separately, as is described in Materials and Methods, to check that all the components work properly. In a previous work, our group immobilized L-CPNs prepared with anionic lipids at pH 9.2, reporting that the sol–gel process did not alter the fluorescence properties of the nanoparticles and that they are physically and chemically stable during months.<sup>39</sup> In the present work, the lipid nature of the L-CPNs is different because they are prepared with zwitterionic lipids instead of anionic ones at pH 7.4. For this reason, a similar study was performed, comparing the properties of the immobilized and free L-CPNs. Figure S3A shows the fluorescence spectrum of the immobilized L-CPNs, directly measured from the monolith in the spectrofluorometer. The shape and spectral position of the spectrum was rather similar to that obtained in the buffer. In addition, the intensity of the emission maximum was practically preserved during at least 72 days, reducing their signal by only around 15% (inset in Figure S3A). These results confirm that the immobilization in sol–gel matrices does not only not affect the fluorescent properties of the zwitterionic L-CPNs but also stabilizes the fluorescence signal, probably because it prevents lipid vesicle aggregation.

The next step was to explore if the immobilized L-CPNs are still quenched by PNP. For this experiment, one monolith was immersed in a 5 mL solution containing PNP 20  $\mu$ M and its fluorescence spectrum was recorded at different incubation times. The intensity of the monolith decreased with time, but the fluorescence signal did not reach a plateau even after 50 min of incubation (Figure S3B). When the PNP concentration was increased, the quenching of fluorescence was much faster, reaching its minimum value around 50 and 30 min for

concentrations of 500 and 1000  $\mu$ M, respectively. This behavior was attributed to the diffusion restrictions imposed by the porous matrix that limit the accessibility of small molecules to the nanoparticles and has been previously reported for PNP and other analytes in sol–gel glasses.<sup>39,46</sup> These results show that the immobilized L-CPNs can be quenched by PNP, although with slower kinetics than that observed in solution and therefore confirm their possible use in the detection of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors.

Despite the relevance of  $\alpha$ -glucosidase, there are hardly any studies in which this enzyme has been immobilized and characterized in sol–gel matrices. In this work, immobilization was confirmed from the intrinsic fluorescence of the protein, mainly due to its tryptophan residues. The fluorescence of these residues occurs at  $\sim 334$  nm, and is highly sensitive to the polarity of their environment, shifting to 347 nm during urea denaturation.<sup>47</sup> Figure S4 shows the fluorescence spectra of the enzyme in buffer and entrapped in the monolith. The peak observed at  $\sim 334$  nm and the shape of the spectrum were preserved after sol–gel immobilization, suggesting that the enzyme has been successfully immobilized without altering its structural conformation.

After L-CPNs and  $\alpha$ -glucosidase were successfully encapsulated separately, both components were coimmobilized in the same monolith, as is described in Materials and Methods, to obtain the final form of the nanobiosensor. In order to check its functioning, the monolith was incubated in a solution containing PNPG 500  $\mu$ M and its fluorescence spectra were recorded at different times and compared with those obtained after incubation in a PNP 500  $\mu$ M solution. The emission maximum intensity for each time is drawn in Figure 3 (red



**Figure 3.** Fluorescence quenching kinetics ( $I_t/I_0$ ) of immobilized L-CPNs measured in the monolith after its immersion in a solution containing 500  $\mu$ M PNP (black squares) or PNPG without (red circles) and with acarbose 10 mM (blue triangles) ( $\lambda_x = 380$  nm;  $\lambda_m = 413$  nm).

circles and black squares for PNPG and PNP, respectively). The decrease of fluorescence indicates that the hydrolysis of PNPG is taking place, confirming the suitability of the coimmobilization process and the ability of the biosensor to detect  $\alpha$ -glucosidase activity. It is of interest to note that the quenching kinetics was slower than that observed when the monolith was directly incubated in the presence of PNP 500  $\mu$ M. This result was expected because PNPG has to diffuse through the sol–gel matrix to reach the enzyme molecules and produce PNP.

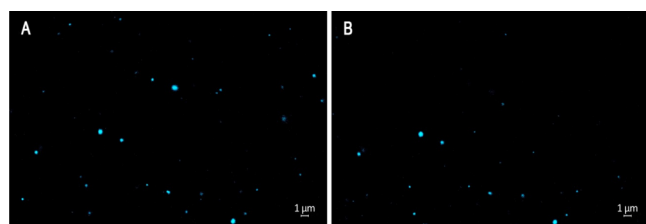
Finally, we explored the ability of the biosensor to detect the presence of AGIs. With this end, the monolith was previously incubated in a solution of acarbose 10 mM for at least 3 h to guarantee the access of the inhibitor to the enzyme and

subsequently immersed in a solution containing PNPG 500  $\mu\text{M}$ . Fluorescence spectra were recorded at different incubation times, and the fluorescence intensity in the emission maximum was compared to that obtained in the absence of acarbose. Blue triangles in Figure 3 show that the fluorescence quenching is much less efficient for the monolith exposed to acarbose. Incubation times of 10–20 min are sufficient to detect its presence. This result indicates that the biosensor is able to detect whether a given compound is an inhibitor of  $\alpha$ -glucosidase and can therefore be used as a tool for the screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors.

**Multisample Nanobiosensor.** The above device allows testing only one sample per experiment, thus increasing the time and cost of the assay when more than one compound is to be tested. In addition, the device is fragile because for each test, it is necessary to immerse the biosensor previously in the sample and then, after the incubation time, remove it to measure its fluorescence signal. This procedure can produce small breaks in the sol–gel matrix that affect the measured intensity. In order to develop a more effective and robust method able to analyze multiple samples in one only assay, the single nanobiosensor was adapted to a 96-well microplate that allows the simultaneous screening of a large number of samples and can be reused. The new format also has the advantage of minimizing the sample volume and the reagents used (Scheme 2).

With this end, the nanobiosensor components, L-CPNs and  $\alpha$ -glucosidase, were coimmobilized, directly leading to the sol–gel reaction in the wells of the microplate, as is described in Materials and Methods and illustrated in Scheme 2. In the first experiment, we explored the fluorescence intensity and stability of the monoliths as a function of storage time. The analysis of the fluorescence emitted was carried out simultaneously for all the wells containing the immobilized L-CPNs and the measurements were taken in the plate reader from the bottom of the wells. The microplate was stored in darkness in the fridge (4  $^{\circ}\text{C}$ ), and the intensity of these wells was recorded for 40 weeks (Figure S5). The results show that the signal is preserved during, at least, this period of time, suggesting that their stability is even greater than that observed for the largest monoliths.

In order to better characterize the multisample nanobiosensor, one of the monoliths was directly observed under the confocal microscope described in Materials and Methods (Figure 4A). The immobilized blue-emitting L-CPNs could be viewed individually, and their size was comparable to that determined in solution (Figure S2B). This result suggests that the nanoparticles do not aggregate during the sol–gel process and remain confined in each pore, which could explain their high stability over time.<sup>48</sup> The advantage of having the L-CPNs



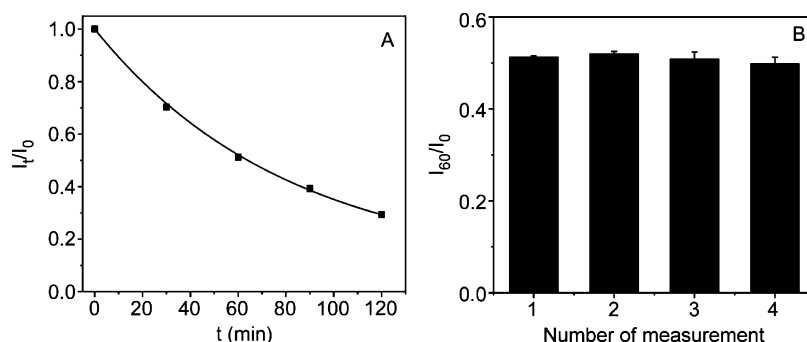
**Figure 4.** (A) Confocal fluorescence microscopy images of L-CPNs immobilized in a sol–gel matrix before and (B) after 1 h PNPG (500  $\mu\text{M}$ ) treatment. Both images correspond to the same field.

immobilized is that it allows to visualize the same nanoparticles after a certain time. This allowed us to check the functioning of the biosensor at a submicroscopic level. Figure 4B shows the image of the same field captured after 1 h PNPG (500  $\mu\text{M}$ ) treatment. Histograms and 2.5D plots corresponding to these images are shown in the Supporting Information (Figure S6). The results show that some of the fluorescent L-CPNs visualized in Figure 4A are still visible after the addition of PNPG, but many of them are totally quenched, therefore evidencing the adequate activity of the immobilized enzyme. The fact that some L-CPNs are only partially quenched (as deduced from 2.5D plots) could be due to the different accessibility of the PNP molecules to the pore in which the nanoparticle is entrapped and the fact that each nanoparticle contains more than one fluorophore group (fluorescent polymer chain). Probably, not all the pores are equally accessible to the PNP molecules nor are they exactly the same size, so in some of them the PNP will arrive earlier and its concentration will be higher, being able to completely quench the fluorescence of the nanoparticle, while in the less accessible ones, the concentration will be lower, and it will only be able to quench some of the fluorescent chains present in the nanoparticle. If more PNPG was added and the incubation time increased, all nanoparticles would be fully quenched, as deduced from Figure S3B.

To select the operating conditions of the nanobiosensor, a solution of 150  $\mu\text{L}$  of PNPG (500  $\mu\text{M}$ ) was added to the wells of the microplate and their fluorescence intensity was measured at different incubation times in the plate reader (Figure 5A). The decrease of the fluorescence signal confirmed the suitability of the device to detect the activity of  $\alpha$ -glucosidase, as previously observed by fluorescence microscopy. It should be noted that the time response to PNPG is slower than that observed in the single-sample device. This result was to be expected because, unlike the single-sample biosensor, in which the monolith is completely immersed in a PNPG solution, in the new device, the monoliths are attached to the wells so that only their surface is in contact with the substrate solution, and the PNPG molecules have more difficulty reaching the active site of the enzyme. Figure 5A shows that for a concentration of the substrate of 500  $\mu\text{M}$ ,  $\sim 50\%$  of fluorescence quenching is obtained after 1 h of incubation, a response time that we consider acceptable for the use of the nanobiosensor.

To prove that the device could be reused on more than one occasion, the same microplate of the above experiment was used in three additional assays. In each assay, 500  $\mu\text{M}$  PNPG was added to the wells and the fluorescence intensity was measured after 1 h of incubation. The signal was compared to that of the first assay (Figure 5B). After each assay, the microplate was washed with phosphate buffer for 3 h, changing the buffer every hour to remove the residual PNP. The fact that the quenching efficiency does not differ significantly in all four assays shows that the device can be used at least four times without loss of sensitivity.

In addition to exploring the reuse of the device, we also tested whether the nanobiosensor response was maintained after a long period of storage. For this purpose, a microplate was stored for 10 months in the refrigerator, and after this period of time, the fluorescence signal was measured before and 1 h after the addition of PNPG (500  $\mu\text{M}$ ). The intensity recovered was practically similar to that obtained when the



**Figure 5.** (A) Fluorescence quenching as a function of time ( $I_t/I_0$ ) recorded from the wells of the multisample biosensor ( $\lambda_x = 380$  nm;  $\lambda_{em} = 413$  nm) after addition of  $150 \mu\text{L}$  of PNPG ( $500 \mu\text{M}$ ). (B) Reusability of the multisample biosensor tested using the same microplate for three additional assays, measuring the fluorescence decrease percentage after 60 min of incubation ( $I_{60}/I_0$ ). Each column represents three replicates and error bar stands for standard deviation (SD) of the mean.

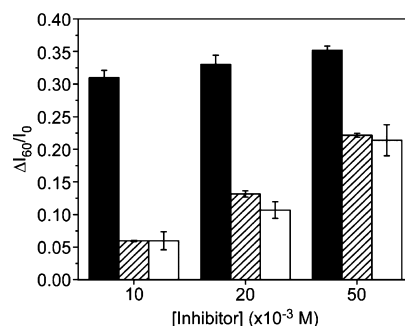
nanobiosensor was recently prepared (Figure S7), evidencing the large stability of the device.

Finally, the ability of the multisample nanobiosensor to detect AGIs was checked using acarbose. First, the wells were previously incubated for at least 3 h with  $150 \mu\text{L}$  of a solution containing increasing concentrations of the drug (from 0 to 10 mM). Then, the solution was removed and an equivalent volume of PNPG ( $500 \mu\text{M}$ ) was added to each well and its fluorescence intensity was recorded before and after 1 h of incubation (Figure S8). The results show that as the concentration of acarbose increases, the quenching efficiency decreases, evidencing that the device is able to detect the effect of the inhibitor. To confirm that the biosensor, after washing, did not lose sensitivity to the inhibitor, the assay was repeated with the same concentrations of acarbose. The results were not significantly different from those of the first test (Figure S8), which again demonstrates the capacity of the nanobiosensor to be reused.

#### Applications of the Multisample Nanobiosensor.

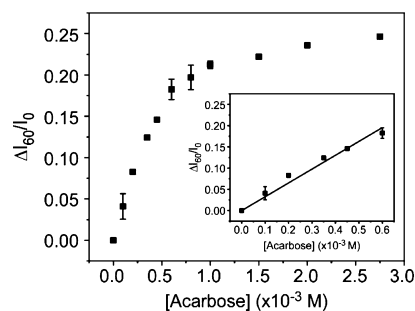
Once the multisample nanobiosensor was characterized and its capacity to be reused and to detect the presence of acarbose was confirmed, it was used to explore the inhibitory capacity of several compounds simultaneously. With this end, four series of wells were previously incubated with  $150 \mu\text{L}$  of buffer, acarbose, miglitol, and gallic acid at different concentrations (10, 20, and 50 mM) and the fluorescence decrease percentage was measured 60 min after addition of  $500 \mu\text{M}$  PNPG (Figure 6). The fluorescence of the control (without inhibitor) was subtracted to better show the ability of the compounds to inactivate the enzyme. Results show that all three compounds are inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase, but acarbose has the highest effectiveness. Miglitol is the second  $\alpha$ -glucosidase inhibitor approved for the treatment of type 2 diabetes. Previous works have reported that its inhibitory capacity is lower than that of acarbose,<sup>49</sup> which agrees with our results. The third compound, gallic acid, has recently been proposed as a potential inhibitor of this enzyme, alone or combined with acarbose.<sup>50,51</sup> The results displayed in Figure 6 support this finding and show that its inhibitory activity does not significantly differ from that of miglitol.

In addition to detecting the presence of AGIs, results shown in Figures S8 and 6 suggest that the nanobiosensor could also be used to estimate their concentration. This potential application was checked for acarbose. Few analytical methods have been reported for the estimation of this compound in pharmaceutical formulation. This information is of interest



**Figure 6.** Effect of different inhibitor concentrations (acarbose, black bar; miglitol, striped bar; and gallic acid, white bar) on the fluorescence quenching of the multisample nanobiosensor measured 60 min after addition of  $150 \mu\text{L}$  of PNPG ( $500 \mu\text{M}$ ) ( $\lambda_x = 380$  nm;  $\lambda_{em} = 413$  nm). The fluorescence of the control (without inhibitor) was subtracted to better show the effect of the inhibitor ( $\Delta I_{60} = I_{60}^{+inhibitor} - I_{60}^{-inhibitor}$ ). Note: the  $x$ -axis is not to scale.

among others for the good manufacturing practice of pharmaceuticals products and is currently performed by HPLC.<sup>52</sup> To carry out this study, the wells of the multisample biosensor were previously incubated with  $150 \mu\text{L}$  of buffer and increasing concentrations of acarbose (up to 3 mM). Once the solution was removed, the same concentration of PNPG ( $500 \mu\text{M}$ ) was added to all the wells and their fluorescence intensity was measured before and after 60 min of incubation. Figure 7 shows the calibration curve corresponding to this inhibitor. At



**Figure 7.** Acarbose calibration curve. The fluorescence intensities were measured at the bottom of the wells 60 min after the addition of PNPG ( $500 \mu\text{M}$ ). Inset: linear section of the acarbose calibration curve. The intensity values in the  $y$  axis are the final values obtained after subtraction of the fluorescence corresponding to the wells in the absence of the inhibitor  $\Delta I_{60}/I_0$ .



low concentrations, the response is rather linear up to  $\sim 500 \mu\text{M}$  (inset in Figure 7) with a limit of detection (LOD) of  $37.8 \mu\text{M}$ , calculated from the following equation:  $\text{LOD} = 3\sigma/S$ , where  $S$  is the slope of the calibration curve and  $\sigma$  is the standard deviation of the blank (sol–gel matrix in the absence of fluorophores). This value is 4 times lower than that recently determined for the colorimetric 96-well plate assay, once optimized and validated.<sup>53</sup> These parameters suggest that the developed nanobiosensor could be a simpler, more cost-effective, and faster alternative to the current methods used for the determination and stability test of acarbose in bulk or pharmaceutical dosage forms.<sup>52</sup>

## CONCLUSIONS

In the present work, we have developed a highly stable fluorescent nanobiosensor for the detection of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, which is based on the quenching of polyfluorene-liposomal nanoparticles (L-CPNs) by PNP, the enzyme catalytic product of PNPG. The presence of inhibitors prevents the quenching to a degree that depends on their ability to inhibit the enzyme  $\alpha$ -glucosidase, which is coimmobilized together with the L-CPNs within a sol–gel matrix. The substrate-induced fluorescence quenching of individual L-CPNs can be observed directly *in situ* under confocal fluorescence microscopy. The strength of this device is based on the adaptation of the nanobiosensor to a 96-well microplate that allows the simultaneous screening of a large number of compounds that potentially could be used as antidiabetic drugs. Compared to the traditional colorimetric assay with PNPG, this device has fewer measurement steps, is easy to handle, and minimizes potential sources of error that occur when measurements are made in solution. With this nanobiosensor, since the sol–gel matrices are transparent and have a porosity that does not allow leaching of the nanoparticles or enzyme but does allow diffusion of the substrate/inhibitor, the measurement can be performed directly in the solid phase. Moreover, since the change in fluorescence signal is reversible, the plate can be reused after washing and stored for at least 10 months.

The ability of the nanobiosensor to determine the concentration of a specific inhibitor has also been demonstrated. The device was successfully applied for the determination of acarbose in an aqueous sample, with a LOD of  $37.8 \mu\text{M}$ , which suggests that it could be used not only as a platform for screening of antidiabetic drugs but also as a simple, cost-effective, and fast tool for routine quality control of acarbose tablets.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.1c02505>.

Effect of enzyme concentration on quenching kinetics; TEM and fluorescence microscopy of LCPNs in solution; characterization/stability of L-CPNs and  $\alpha$ -glucosidase in sol–gel matrix; histograms and 2.5D plots of fluorescence microscopy images; and capacity of the nanobiosensor to detect acarbose and to be reused (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

C. Reyes Mateo – Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche 03202, Alicante, Spain;  
orcid.org/0000-0002-2085-1676; Email: [rmateo@umh.es](mailto:rmateo@umh.es)

### Authors

Yolanda Alacid – Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche 03202, Alicante, Spain

María José Martínez-Tomé – Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche 03202, Alicante, Spain

Complete contact information is available at:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.1c02505>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by project MAT-2017-86805-R from the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness. C.R.M. and M.J.M. received funding for equipment from the Generalitat Valenciana - Conselleria d'Educació Investigació Cultura i Esport and EU-FEDER "Una forma de hacer Europa" (GVA-IDIFEDER 2018/020) and Ministry of Science and Innovation and EU-FEDER through the project EQC2019-005842-P. The authors thank Dr. Frank Vogler at Carl Zeiss AG (Oberkochen) for confocal fluorescence microscopy measurements.

## REFERENCES

- (1) Copeland, R. A.; Harpel, M. R.; Tummino, P. J. Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 967–978.
- (2) Na, I.; Choi, S.; Son, S. H.; Uversky, V. N.; Kim, C. G. Drug Discovery Targeting the Disorder-To-Order Transition Regions through the Conformational Diversity Mimicking and Statistical Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5248.
- (3) Chan, H. C. S.; Shan, H.; Dahoun, T.; Vogel, H.; Yuan, S. Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence. *Trends Pharmacol. Sci.* **2019**, *40*, 592–604.
- (4) Holdgate, G. A.; Meek, T. D.; Grimley, R. L. Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 115–132.
- (5) Copeland, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods Biochem. Anal.* **2005**, *46*, 1–265.
- (6) El Harrad, L.; Bourais, I.; Mohammadi, H.; Amine, A. Recent Advances in Electrochemical Biosensors Based on Enzyme Inhibition for Clinical and Pharmaceutical Applications. *Sensors* **2018**, *18*, 164.
- (7) Meneses, M.; Silva, B.; Sousa, M.; Sá, R.; Oliveira, P.; Alves, M. Antidiabetic Drugs: Mechanisms of Action and Potential Outcomes on Cellular Metabolism. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 3606–3620.
- (8) Kerru, N.; Singh-Pillay, A.; Awolade, P.; Singh, P. Current antidiabetic agents and their molecular targets: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *152*, 436–488.
- (9) Hedrington, M. S.; Davis, S. N. Considerations when using alpha-glucosidase inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin. Pharmacother.* **2019**, *20*, 2229–2235.

- (10) Dhameja, M.; Gupta, P. Synthetic heterocyclic candidates as promising  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *176*, 343–377.
- (11) Liu, H.; Li, M.; Xia, Y.; Ren, X. A Turn-On Fluorescent Sensor for Selective and Sensitive Detection of Alkaline Phosphatase Activity with Gold Nanoclusters Based on Inner Filter Effect. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 120–126.
- (12) Ghani, U. Re-exploring promising alpha-glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 133–162.
- (13) Barakat, A.; Islam, M. S.; Al-Majid, A. M.; Soliman, S. M.; Ghabbour, H. A.; Yousuf, S.; Choudhary, M. I.; Ul-Haq, Z. Synthesis, molecular structure, spectral analysis, and biological activity of new malonamide derivatives as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1134*, 253–264.
- (14) Rahman, N.; Muhammad, I.; Gul-E-Nayab, H.; Khan, M.; Aschner, R.; Filosa, M.; Daglia, M. Molecular Docking of Isolated Alkaloids for Possible  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition. *Biomolecules* **2019**, *9*, 544.
- (15) Zhu, J.; Zhang, B.; Tan, C.; Huang, Q.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors: consistency of in silico docking data with in vitro inhibitory data and inhibitory effect prediction of quercetin derivatives. *Food Funct.* **2019**, *10*, 6312–6321.
- (16) Xiong, Y.; Liu, Q.; Yin, X. Synthesis of  $\alpha$ -glucosidase-immobilized nanoparticles and their application in screening for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, *1022*, 75–80.
- (17) Knudsen, I. M. B.; Hedberg, C.; Ladefoged, L. K.; Ide, D.; Brinkø, A.; Eikeland, E. Z.; Kato, A.; Jensen, H. H. Divergent synthesis of new  $\alpha$ -glucosidase inhibitors obtained through a vinyl Grignard-mediated carbocyclisation. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 6250–6261.
- (18) Zhang, X.; Li, G.; Wu, D.; Yu, Y.; Hu, N.; Wang, H.; Li, X.; Wu, Y. Emerging strategies for the activity assay and inhibitor screening of alpha-glucosidase. *Food Funct.* **2020**, *11*, 66–82.
- (19) Zhong, Y.; Yu, L.; He, Q.; Zhu, Q.; Zhang, C.; Cui, X.; Zheng, J.; Zhao, S. Bifunctional Hybrid Enzyme-Catalytic Metal Organic Framework Reactors for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Screening. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 32769–32777.
- (20) Li, J.; He, G.; Wang, B.; Shi, L.; Gao, T.; Li, G. Fabrication of reusable electrochemical biosensor and its application for the assay of  $\alpha$ -glucosidase activity. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1026*, 140–146.
- (21) Lankatillake, C.; Luo, S.; Flavel, M.; Lenon, G. B.; Gill, H.; Huynh, T.; Dias, D. A. Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods* **2021**, *17*, 3.
- (22) Chen, H.; Zhang, J.; Wu, H.; Koh, K.; Yin, Y. Sensitive colorimetric assays for  $\alpha$ -glucosidase activity and inhibitor screening based on unmodified gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *875*, 92–98.
- (23) Mohiuddin, M.; Arbain, D.; Islam, A. K.; Ahmad, M. S.; Ahmad, M. N. Alpha-Glucosidase Enzyme Biosensor for the Electrochemical Measurement of Antidiabetic Potential of Medicinal Plants. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11*, 95.
- (24) Li, G.; Kong, W.; Zhao, M.; Lu, S.; Gong, P.; Chen, G.; Xia, L.; Wang, H.; You, J.; Wu, Y. A fluorescence resonance energy transfer (FRET) based "Turn-On" nanofluorescence sensor using a nitrogen-doped carbon dot-hexagonal cobalt oxyhydroxide nanosheet architecture and application to  $\alpha$ -glucosidase inhibitor screening. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 728–735.
- (25) Cao, A.; Tang, Y.; Liu, Y. Novel fluorescent biosensor for  $\alpha$ -glucosidase inhibitor screening based on cationic conjugated polymers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 3773–3778.
- (26) Liu, J.; Duan, X.; Wang, M.; Su, X. A label-free fluorescent sensor based on silicon quantum dots-MnO(2) nanosheets for the detection of  $\alpha$ -glucosidase and its inhibitor. *Analyst* **2019**, *144*, 7398–7405.
- (27) MacFarlane, L. R.; Shaikh, H.; Garcia-Hernandez, J. D.; Vespa, M.; Fukui, T.; Manners, I. Functional nanoparticles through  $\pi$ -conjugated polymer self-assembly. *Nat. Rev. Mater.* **2021**, *6*, 7–26.
- (28) Lu, Z.; Zhang, Z.; Tang, Y. Conjugated Polymers-Based Thermal-Responsive Nanoparticles for Controlled Drug Delivery, Tracking and Synergistic Photodynamic Therapy/Chemotherapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 4485–4492.
- (29) Kim, S.; Lim, C.-K.; Na, J.; Lee, Y.-D.; Kim, K.; Choi, K.; Leary, J. F.; Kwon, I. C. Conjugated polymer nanoparticles for biomedical in vivo imaging. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1617–1619.
- (30) Feng, L.; Zhu, C.; Yuan, H.; Liu, L.; Lv, F.; Wang, S. Conjugated polymer nanoparticles: preparation, properties, functionalization and biological applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6620–6633.
- (31) Feng, G.; Liu, J.; Liu, R.; Mao, D.; Tomczak, N.; Liu, B. Ultrasmall Conjugated Polymer Nanoparticles with High Specificity for Targeted Cancer Cell Imaging. *Adv. Sci.* **2017**, *4*, 1600407.
- (32) Liu, J.; Li, K.; Liu, B. Far-Red/Near-Infrared Conjugated Polymer Nanoparticles for Long-Term In Situ Monitoring of Liver Tumor Growth. *Adv. Sci.* **2015**, *2*, 1500008.
- (33) Wang, Y.; Li, S.; Zhang, P.; Bai, H.; Feng, L.; Lv, F.; Liu, L.; Wang, S. Photothermal-Responsive Conjugated Polymer Nanoparticles for Remote Control of Gene Expression in Living Cells. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1705418.
- (34) Wang, L.; Zhao, Q.; Zhang, Z.; Lu, Z.; Zhao, Y.; Tang, Y. Fluorescent Conjugated Polymer/Quaternary Ammonium Salt Co-assembly Nanoparticles: Applications in Highly Effective Antibacteria and Bioimaging. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1*, 1478–1486.
- (35) Rubio-Camacho, M.; Alacid, Y.; Mallavia, R.; Martínez-Tomé, M. J.; Mateo, C. R. Polyfluorene-Based Multicolor Fluorescent Nanoparticles Activated by Temperature for Bioimaging and Drug Delivery. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1485.
- (36) Liu, Y.; Wang, Y.-M.; Zhu, W.-Y.; Zhang, C.-H.; Tang, H.; Jiang, J.-H. Conjugated polymer nanoparticles-based fluorescent biosensor for ultrasensitive detection of hydroquinone. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1012*, 60–65.
- (37) Childress, E. S.; Roberts, C. A.; Sherwood, D. Y.; LeGuyader, C. L. M.; Harbron, E. J. Ratiometric fluorescence detection of mercury ions in water by conjugated polymer nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *84*, 1235–1239.
- (38) Roy, S.; Gunukula, A.; Ghosh, B.; Chakraborty, C. A folic acid-sensitive polyfluorene based "turn-off" fluorescence nanoprobe for folate receptor overexpressed cancer cell imaging. *Sens. Actuators, B* **2019**, *291*, 337–344.
- (39) Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M. J.; Mallavia, R.; Mateo, C. R. Fluorescent Biosensor for Phosphate Determination Based on Immobilized Polyfluorene-Liposomal Nanoparticles Coupled with Alkaline Phosphatase. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 136–144.
- (40) Naem, A.; Khan, I. M.; Ahmad, A. Spectral investigations of multiple charge transfer complex of p-nitrophenol as an electron acceptor with donor p-dimethylaminobenzaldehyde. *Russ. J. Phys. Chem. A* **2011**, *85*, 1840–1843.
- (41) Molina, R.; Gómez-Ruiz, S.; Montilla, F.; Salinas-Castillo, A.; Fernández-Arroyo, S.; Ramos, M. d. M.; Micol, V.; Mallavia, R. Progress in the Synthesis of Poly(2,7-Fluorene-alt-1,4-Phenylene), PFP, via Suzuki Coupling. *Macromolecules* **2009**, *42*, 5471–5477.
- (42) Mallavia, R.; Martínez-Pérez, D.; Chmelka, B. F.; Bazan, G. C. Películas fluorescentes azules basadas en derivados de poli-2,7-fluoreno-fenilideno. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidrio* **2011**, *43*, 327–330.
- (43) Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M.; Esquembre, R.; Mallavia, R.; Mateo, C. Selective Interaction of a Cationic Polyfluorene with Model Lipid Membranes: Anionic versus Zwitterionic Lipids. *Materials* **2014**, *7*, 2120–2140.
- (44) Kahveci, Z.; Vázquez-Guilló, R.; Mira, A.; Martínez, L.; Falcó, A.; Mallavia, R.; Mateo, C. R. Selective recognition and imaging of bacterial model membranes over mammalian ones by using cationic conjugated polyelectrolytes. *Analyst* **2016**, *141*, 6287–6296.
- (45) Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M. J.; Mallavia, R.; Mateo, C. R. Use of the Conjugated Polyelectrolyte Poly{[9,9-bis(6'-N,N,N-

trimethylammonium)hexyl]fluorene-phenylene} Bromide (HTMA-PPF) as a Fluorescent Membrane Marker. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1990–1998.

(46) Pastor, I.; Esquembre, R.; Micol, V.; Mallavia, R.; Mateo, C. R. A ready-to-use fluorimetric biosensor for superoxide radical using superoxide dismutase and peroxidase immobilized in sol-gel glasses. *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 335–343.

(47) Wu, X.-Q.; Wang, J.; Lü, Z.-R.; Tang, H.-M.; Park, D.; Oh, S.-H.; Bhak, J.; Shi, L.; Park, Y.-D.; Zou, F. Alpha-glucosidase folding during urea denaturation: enzyme kinetics and computational prediction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160*, 1341–1355.

(48) Esquembre, R.; Pinto, S. N.; Poveda, J. A.; Prieto, M.; Mateo, C. R. Immobilization and characterization of giant unilamellar vesicles (GUVs) within porous silica glasses. *Soft Matter* **2012**, *8*, 408–417.

(49) Kasturi, S.; Surarapu, S.; Uppalanchi, S.; Anireddy, J. S.; Dwivedi, S.; Anantaraju, H. S.; Perumal, Y.; Sigalapalli, D. K.; Babu, B. N.; Ethiraj, K. S. Synthesis and  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity of dihydroxy pyrrolidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2818–2823.

(50) Oboh, G.; Ogunsuyi, O. B.; Ogunbadejo, M. D.; Adefegha, S. A. Influence of gallic acid on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties of acarbose. *J. Food Drug Anal.* **2016**, *24*, 627–634.

(51) Xue, N.; Jia, Y.; Li, C.; He, B.; Yang, C.; Wang, J. Characterizations and Assays of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Activity on Gallic Acid Cocrystals: Can the Cocrystals be Defined as a New Chemical Entity During Binding with the  $\alpha$ -Glucosidase? *Molecules* **2020**, *25*, 1163.

(52) Montazeri, A. S.; Mohammadi, A.; Adib, N.; Naeemy, A. Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Acarbose in Pharmaceutical Dosage Forms. *J. Anal. Chem.* **2018**, *73*, 910–916.

(53) Granados-Guzmán, G.; Castro-Ríos, R.; de Torres, N. W.; Salazar-Aranda, R. Optimization and Validation of a Microscale In vitro Method to Assess  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Activity. *Curr. Anal. Chem.* **2018**, *14*, 458–464.



## SUPPORTING INFORMATION

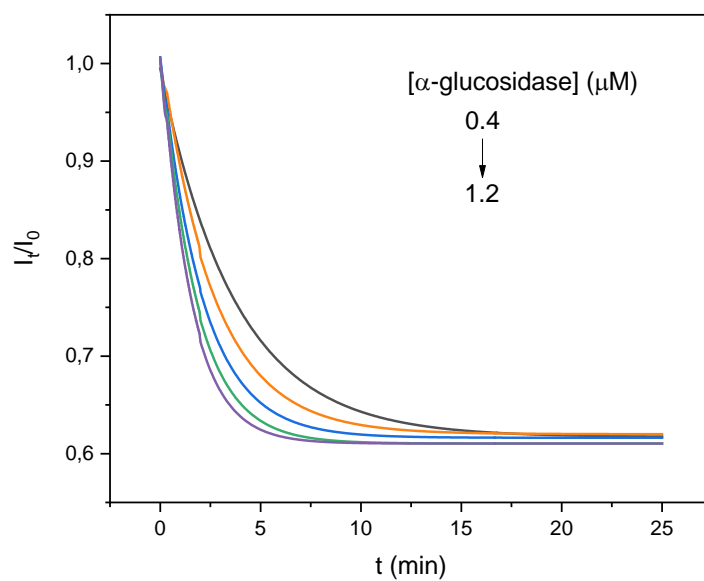
# Reusable Fluorescent Nanobiosensor Integrated in a Multiwell Plate for Screening and Quantification of Antidiabetic Drugs

*Yolanda Alacid, María José Martínez-Tomé, C. Reyes Mateo\**

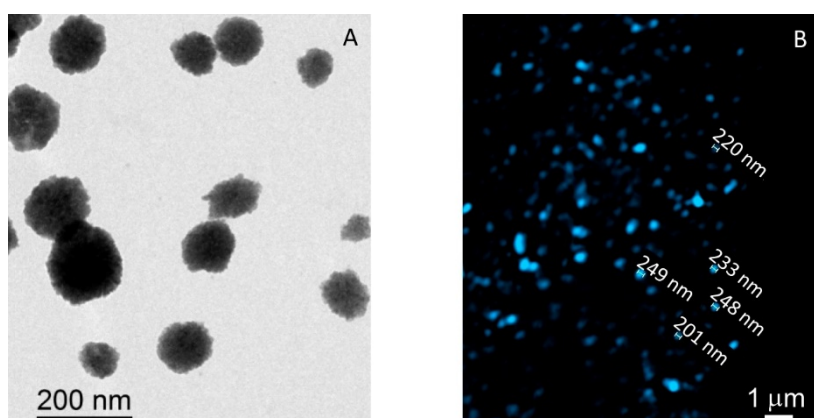
Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche,  
Universidad Miguel Hernández, 03202, Elche, Alicante, Spain

**KEYWORDS:**  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, nanobiosensor, fluorescent conjugated polymers, liposomal nanoparticles, acarbose, multiwell plate, anti-diabetic drugs

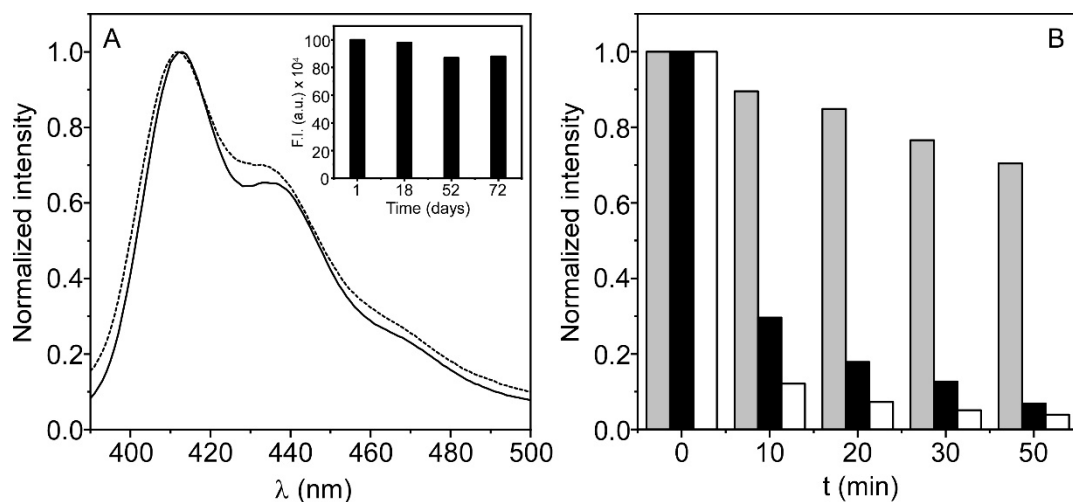
\*Email: [rmateo@umh.es](mailto:rmateo@umh.es)



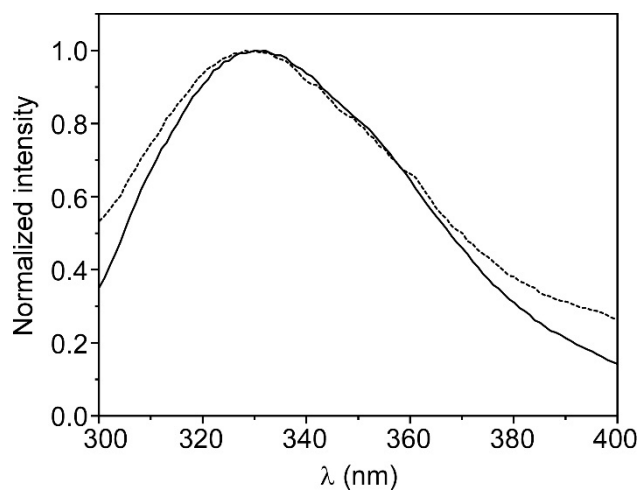
**Figure S1.** Quenching kinetics of L-CPNs in presence of increasing concentrations of  $\alpha$ -glucosidase (0.4 (black line), 0.6 (orange line), 0.8 (blue line), 1.0 (green line), 1.2 (purple line)  $\mu\text{M}$ ), recorded after addition of PNPG (15  $\mu\text{M}$ ).



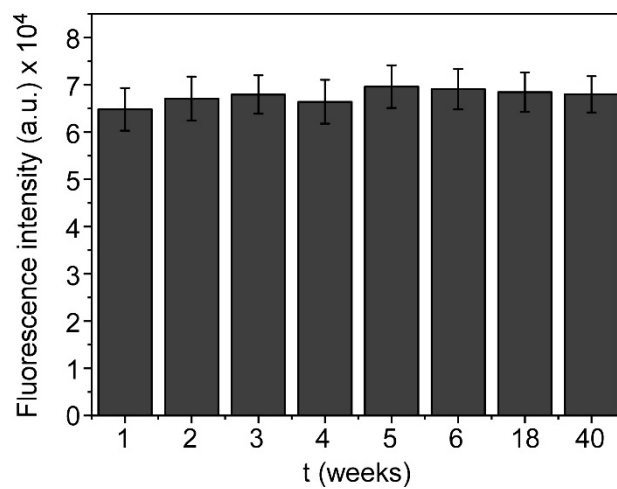
**Figure S2.** A) Representative images of transmission electron microscopy (TEM) and B) super-resolution fluorescence microscopy of L-CPNs.



**Figure S3.** A) Normalized fluorescence emission spectra of L-CPNs in solution (black line) and immobilized in a sol-gel matrix (dotted line). Inset: Effect of storage time on the stability of immobilized L-CPNs ( $\lambda_x = 380$  nm). B) Fluorescence quenching kinetics of immobilized L-CPNs after addition of 20 (gray bars), 500 (black bars) and 1000  $\mu$ M (white bars) of PNP ( $\lambda_x = 380$  nm).

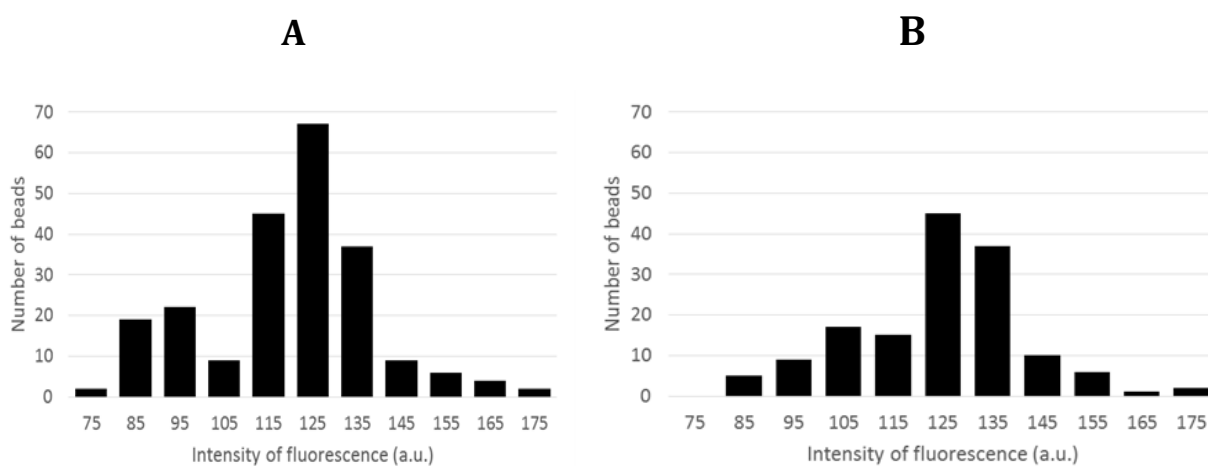
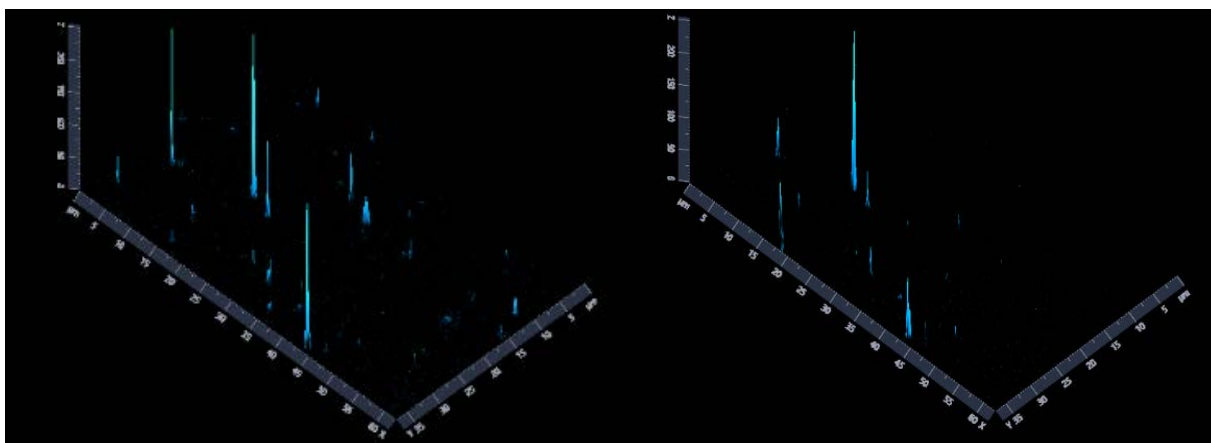


**Figure S4.** Normalized fluorescence emission spectra of  $\alpha$ -glucosidase in solution (black line) and immobilized in a sol-gel matrix (dotted line) ( $\lambda_x = 290$  nm).

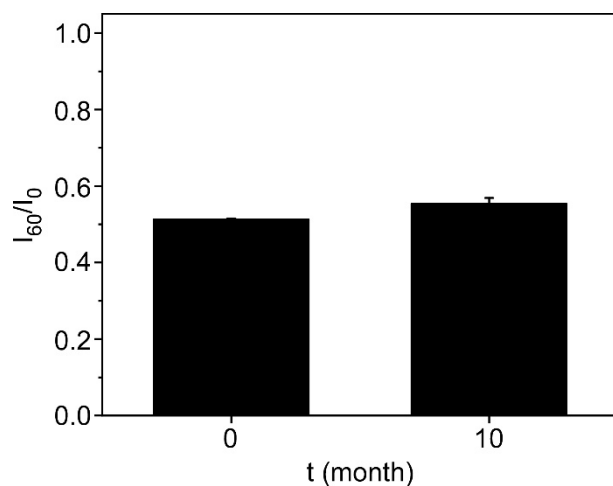


**Figure S5.** Fluorescence intensity recorded at 413 nm ( $\lambda_x= 380$  nm) from the wells of the microplate containing the immobilized biosensor components, as a function of storage time. Each column represents three replicates, and error bar stands for SD (standard deviation) of the mean. Note: the x-axis is not to scale.

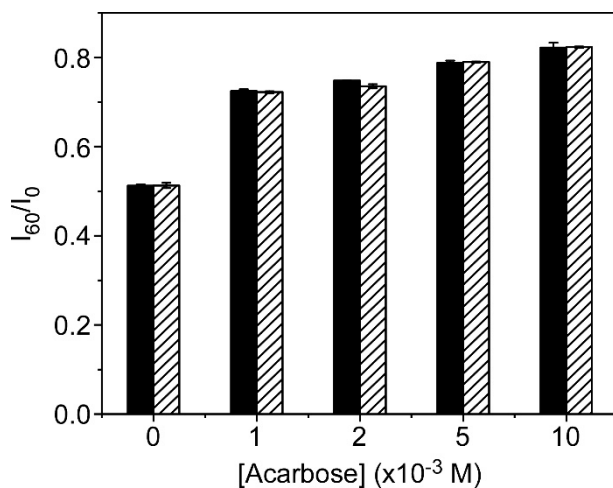




**Figure S6.** Histograms (bottom panel) and 2.5D plots (top panel) associated to fluorescence microscopy images of L-CPNs immobilized in a sol-gel matrix A) before and B) after 1 h PNPG (500  $\mu$ M) treatment.



**Figure S7.** Stability study of the multi-sample nanobiosensor performed using the same microplate after 10 months of storage in the refrigerator. The fluorescence signal was measured after 1h of incubation with PNPG (500  $\mu$ M).



**Figure S8.** Effect of increasing concentrations of acarbose on the fluorescence quenching of the multisample nanobiosensor measured 60 minutes after addition of 150  $\mu$ L of PNPG (500  $\mu$ M) ( $\lambda_x = 380$  nm;  $\lambda_{em} = 413$  nm). Black and striped bars correspond to two consecutive assays using the same microplate after washing with phosphate buffer for 3 hours. Each column represents three replicates, and error bar stands for SD (standard deviation) of the mean. Note: the x-axis is not to scale.

## Artículo 7.2.

# Fluorescent Nanocomposite Hydrogels Based on Conjugated Polymer Nanoparticles as Platforms for Alkaline Phosphatase Detection

Yolanda Alacid <sup>1</sup>, Rocío Esquembre <sup>1</sup>, Francisco Montilla <sup>2</sup>, María José Martínez-Tomé <sup>1\*</sup>, C. Reyes Mateo <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain.

<sup>2</sup> Departamento de Química Física and Instituto Universitario de Materiales de Alicante (IUMA), Universidad de Alicante, 03690 Alicante, Spain

**Biosensors, 2023, 13(3), 408**




**doi:** 10.3390/bios13030408

Factor de impacto: **5.4**



## Article

# Fluorescent Nanocomposite Hydrogels Based on Conjugated Polymer Nanoparticles as Platforms for Alkaline Phosphatase Detection

Yolanda Alacid <sup>1,2</sup>, Rocío Esquembre <sup>1</sup>, Francisco Montilla <sup>2</sup>, María José Martínez-Tomé <sup>1,\*</sup> and C. Reyes Mateo <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, 03202 Elche, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Química Física and Instituto Universitario de Materiales de Alicante (IUMA), Universidad de Alicante, 03690 Alicante, Spain

\* Correspondence: mj.martinez@umh.es (M.J.M.-T.); rmateo@umh.es (C.R.M.)

**Abstract:** This work describes the development and characterization of fluorescent nanocomposite hydrogels, with high swelling and absorption capacity, and prepared using a green protocol. These fluorescent materials are obtained by incorporating, for the first time, polyfluorenes-based nanoparticles with different emission bands—poly[9,9-dioctylfluorenyl-2,7-diyl] (PFO) and poly[(9,9-di-n-octylfluorenyl-2,7-diyl)-alt-(1,4-benzo-{2,1,3}-thiadiazole)] (F8BT)—into a three-dimensional polymeric network based on polyacrylamide. To this end, two strategies were explored: incorporation of the nanoparticles during the polymerization process (in situ) and embedment after the hydrogel formation (ex situ). The results show that the combination of PFO nanoparticles introduced by the ex situ method provided materials with good storage stability, homogeneity and reproducibility properties, allowing their preservation in the form of xerogel. The fluorescent nanocomposite hydrogels have been tested as a transportable and user-friendly sensing platform. In particular, the ability of these materials to specifically detect the enzyme alkaline phosphatase (ALP) has been evaluated as a proof-of-concept. The sensor was able to quantify the presence of the enzyme in an aqueous sample with a response time of 10 min and LOD of 21 nM. Given these results, we consider that this device shows great potential for quantifying physiological ALP levels as well as enzyme activity in environmental samples.

**Keywords:** nanocomposite hydrogel; polyfluorene; fluorescent sensor; alkaline phosphatase; immobilization; portable device; enzyme



**Citation:** Alacid, Y.; Esquembre, R.; Montilla, F.; Martínez-Tomé, M.J.; Mateo, C.R. Fluorescent

Nanocomposite Hydrogels Based on Conjugated Polymer Nanoparticles as Platforms for Alkaline

Phosphatase Detection. *Biosensors*

2023, 13, 408. [https://doi.org/](https://doi.org/10.3390/bios13030408)

10.3390/bios13030408

Received: 17 February 2023

Revised: 15 March 2023

Accepted: 20 March 2023

Published: 21 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Polymeric hydrogels are materials composed of an aqueous phase and one or more solid continuous phases. The continuous phase generates a cross-linked network, inside which are the water molecules, through covalent or non-covalent bonds that provide structural stability and prevent the dissolution of the polymer in the aqueous medium. The result is a viscoelastic material, similar to a solid, but highly deformable [1]. Among the family of hydrogels, those based on acrylamide and related polymers form lightly cross-linked tridimensional networks which swell strongly in water, showing good biocompatibility and optical transparency [2,3].

Hydrogel properties can be easily modulated and/or improved. This is the case of nanocomposite hydrogels (NCHs), which are manufactured by incorporating nanomaterials inside polymeric materials, such as nanoparticles of silica, gold or silver, carbon nanotubes, graphene, magnetic nanoparticles or quantum dots [4,5]. This innovative strategy results in a synergistic effect that improves the properties of both components and generates multifunctional hydrogels with varied characteristics, such as greater elasticity

and resistance (compared to traditionally manufactured hydrogels), higher electrical and thermal conductivity, magnetic properties, color change or luminescence [6,7].

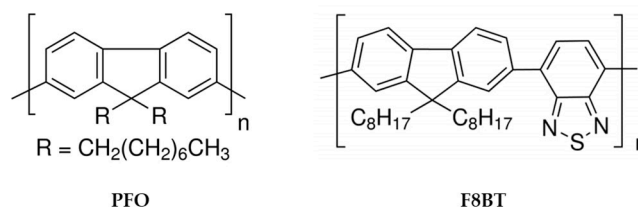
The incorporation of fluorescent nanoparticles in hydrogels gives these materials luminescent properties that can be exploited, besides other applications, for the development of optical sensing devices [8,9]. Among the fluorescent nanomaterials incorporated in hydrogels, the most commonly used are semiconductor quantum dots (QDs); this is due to their high quantum yield, and their ease of modulating optical properties based on size and composition [10]. Recent works have developed fluorescent sensors incorporating QDs in hydrogels for the detection of glucose and progesterone [11,12]; however, these fluorescent NCHs present the limitation of the QDs toxicity due to the heavy elements they contain. Carbon-based nanomaterials, such as carbon quantum dots (CDs) and graphene quantum dots (GQDs), have grown quickly in recent years as new fluorescent nanomaterials, which show much larger biocompatibility than QDs and lower toxicity; however, they also show lower fluorescence efficiency [13,14]. Embedded in hydrogels, they have been mainly used for rapid heavy metal ion and polyaromatic compound detection [15,16]. The nano-structuring of hydrogels with fluorescent liposomes has also been described, though these materials have been intended for drug delivery applications rather than sensor development [17].

Recently, conjugated polymer-based nanoparticles (CNPs) have emerged as a new class of fluorescent nanoparticle with interesting properties, such as good biocompatibility, excellent photostability and high quantum efficiency; CNPs also offer the possibility of tunable fluorescence emission by appropriate design of the polymer molecular backbone [18–21]. In addition, conjugated polymers, especially those involving fluorene-based systems (known as polyfluorenes), are excellent electron and energy donors; this means that the fluorescence of CNPs can be quenched with suitable acceptors, which gives them great versatility as sensing elements [22,23]. In this regard, micellar nanoparticles based on novel polyfluorene polyelectrolytes have been developed in recent work, as promising materials for the detection of pollutants through photoinduced electron transfer and inner filter effect mechanisms [24]. In that work, fluorescent hydrogels were also developed by incorporating the synthesized polyelectrolytes, but not the micellar nanoparticles, into the hydrogels. Conjugated polymers have also been successfully used as precursors to build fluorescent supramolecular cross-linked polymer networks for sensing purposes [25]. However, fluorescent materials obtained by incorporating CNPs into hydrogels, to obtain fluorescent NCHs, have hardly been reported. Recently, CNPs emitting red, green and blue fluorescence were covalently embedded in poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) hydrogel to obtain a thermosensitive nanocomposite [26]. Our group also successfully incorporated multicolor fluorescent conjugated polyelectrolytes in pH-sensitive nanogels of poly (methyl vinyl ether-*alt*-maleic acid) monoethyl ester (PMVEMA), which were applied for drug transport and bioimaging [27]. However, to our knowledge, no studies have been published in which these fluorescent nanocomposites have been used as sensing platforms for trace detection and quantification of compounds of clinical and environmental interest.

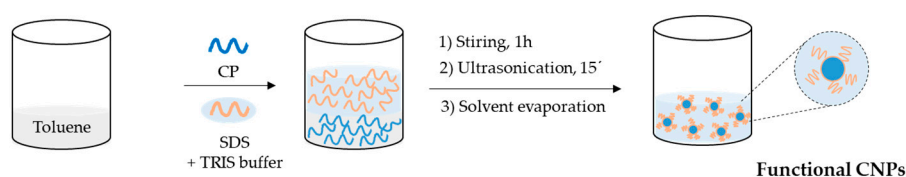
This work describes the design and characterization of fluorescent NCHs prepared through a green route, which can be swollen and dried without degradation. These fluorescent materials are obtained by embedding polyfluorenes-based CNPs into the polymer matrix, which endows the hydrogels with favorable fluorescence and potential applications in sensing and biosensing. In particular, we have taken advantage of the optical transparency and swelling properties of acrylamide hydrogels to incorporate CNPs made from two polyfluorene derivatives with different emission bands: poly[9,9-dioctylfluorenyl-2,7-diyl] (PFO), and poly[(9,9-di-*n*-octylfluorenyl-2,7-diyl)-*alt*-(1,4-benzo-[2,1,3]-thiadiazole)] (F8BT), an alternating copolymer of fluorene and benzothiadiazole (Scheme 1). Hydrogels were synthesized via a simple and rapid protocol through UV light-induced radical polymerization of the cationic monomer [2-(acryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride (AETA), and *N,N'*-methylenebis(acrylamide) (MBA) as a cross-linker. This type of hydrogel, described by Martin Pacheco et al. [16], is cationic in nature and was recently used by

our group to immobilize enzymes for the development of colorimetric and amperometric biosensors [28,29].

**a** Chemical structure of CPs



**b** CNPs preparation method



**Scheme 1.** (a) Chemical structure of the conjugated polymers (CPs): PFO and F8BT. (b) Preparation procedure of fluorescent nanoparticles from PFO and F8BT.

As a sensing application, the ability of the hydrogel incorporating PFO nanoparticles (PFO@AETA) to detect alkaline phosphatase (ALP) was explored. This enzyme is associated with many human diseases, making its quantitative detection vital from a clinical perspective [30]. In addition, accurate detection of the amount of ALP in water is also of great importance for ecological environments and human production activities, and its concentration provides an indicator of water quality [31]. Recent work has described the detection of ALP in aqueous media through a ratiometric sensing system, using fluorescent nanohybrids based on polyfluorenes [32]. In our work, the sensing mechanism is based on the potential quenching of PFO@AETA by *p*-nitrophenol (PNP), the end product of hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP) catalyzed by ALP. PNP is an electron acceptor that absorbs at 405 nm in its anionic form, and has been described by our laboratory to quench the fluorescence intensity of cationic polyfluorenes. This process is presumed to take place via a combination of photoinduced electron transfer, fluorescence resonance energy transfer and inner filter mechanisms [22,33].

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials and Reagents

Hydrogels were synthesized by radical polymerization of [2-(acryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride (AETA) in the presence of *N,N'*-methylenebis(acrylamide) (MBA), which acted as the crosslinking agent, and 2,4,6-lithium trimethylbenzoylphenyl phosphinate (LiTPO), which acted as the photoinitiator; all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, Spain). The conjugated polymers poly[9,9-dioctylfluorenyl-2,7-diyl] (PFO) and poly[(9,9-dioctylfluorenyl-2,7-diyl)-alt-co-(1,4-benzothiazole)] (F8BT) were obtained from American Dyes Source, Inc. The enzyme alkaline phosphatase (ALP) (EC 3.1.3.1; from bovine intestinal mucosa; lyophilized powder;  $M_w = 140,000$  Da), the substrate *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP), the fluorescence quencher *p*-nitrophenol (PNP) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, Spain). Stock solutions of ALP, PNPP and PNP were prepared in TRIS buffer (55 mM, pH 9) and stored at 4 °C at 45.1 μM, 2 mM and 1 mM, respectively. TRIS buffer (55 mM, pH 9) was prepared by mixing TRIS base and hydrochloric acid with Milli-Q water using Milli-Q equipment (Millipore, Madrid,

Spain). All other solvents were of spectroscopic or analytical reagent grade (Uvasol; Merck, Madrid, Spain).

### 2.2. Obtention of AETA Hydrogels

The protocol previously described by Alacid et al. [28] was followed to synthesize AETA hydrogels. In this experiment, 5.66 mL of AETA (26.4 mmol) and 0.01 g of MBA (0.06 mmol) were combined with 5 mL of Milli-Q water, and then LiTPO (0.02 g, 0.06 mmol) was added to the mixture. The solution was homogenized by stirring under dark conditions, and then drawn through a disposable syringe and exposed to UV light ( $\lambda = 365$  nm) for 1 min. The resulting hydrogel was removed from the container and further treated by immersion in distilled water for 5 days to remove any residual monomer or initiator. Finally, the hydrogel was dried by heating it in an oven at 45 °C for 2 days.

### 2.3. Preparation of Fluorescent Nanoparticles: PFO\_CNPs and F8BT\_CNPs

Fluorescent nanoparticles were prepared in aqueous medium from the conjugated polymers PFO and F8BT, respectively, following the protocol already described by Pecher et al. [34] and summarized in Scheme 1b. For this purpose, 5 mL of a 10 mg/mL solution of polymer in toluene was mixed with 10 mL of a 55 mM TRIS buffer solution and 4 mg/mL SDS. It was shaken for 1 h with a magnetic stirrer in a closed vial. The sample was placed in an ultrasound probe, power 125W, using a QSonica model Q125 sonicator (QSonica, Newtown, CT, USA) for 15 min, with 90% amplitude; at this stage, we kept the vial with the solution submerged in ice water to avoid heating and foam production. It was then heated to 60 °C to evaporate the organic solvent. Finally, the solution was stored at 4 °C.

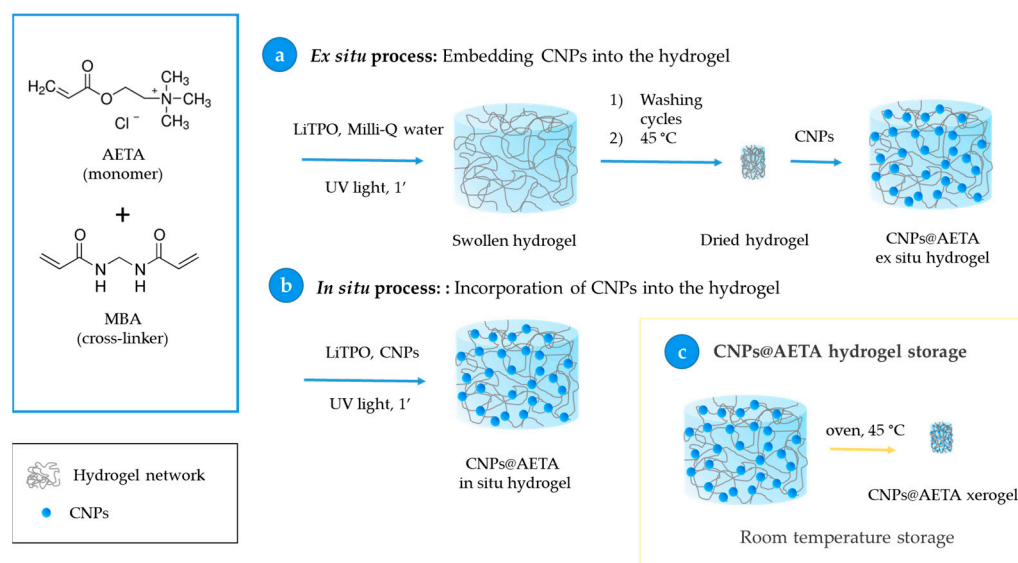
### 2.4. Obtention of PFO@AETA and F8BT@AETA Hydrogels

To obtain fluorescent nanocomposite hydrogels, the developed CNPs were incorporated in AETA hydrogels using two adaptations of the same procedure, as shown in Scheme 2 and described in this list:

- Ex situ process: Embedment of the CNPs into the hydrogel. In this process, 0.07 g of hydrogel prepared by the above method was immersed in 1.8 mL of a 6  $\mu$ M solution of already prepared CNPs for 24 h, to ensure that all the solution was completely absorbed, and then stored at 4 °C. This step allows the total loading of the fluorescent nanoparticles from the CNPs solution into the hydrogel network (Scheme 2a).
- In situ process: Incorporation of CNPs into the hydrogel. Nanoparticles of PFO and F8BT were incorporated before the polymerization process by adding 5 mL of a solution of CNPs 6  $\mu$ M to the AETA-MBA-LiTPO mixture. After the irradiation with UV light, fluorescent nanocomposite hydrogels were obtained (Scheme 2b).

To ensure convenient storage of the hydrogels, a process of dehydration was carried out by heating in an oven (45 °C, 48 h). This resulted in the transformation of the hydrogels into xerogels (Scheme 2c).





**Scheme 2.** Fabrication of fluorescent hydrogels based on the incorporation of CNPs ex situ (a) and in situ (b). (c) Fabrication of CNPs@AETA xerogels for hydrogel storage.

### 2.5. Absorbance Measurements

Absorbance measurements of CNPs were carried out at room temperature using a model UV-2700 spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan). Quartz cuvettes of 10 × 10 mm were used. Absorbance spectra were collected between wavelengths of 250 and 600 nm.

### 2.6. Steady-State Fluorescence Measurements

Steady-state fluorescence measurements, both in solution and in hydrogels, were performed in 10 × 10 mm quartz cuvettes using a PTI-QuantaMaster spectrofluorometer (PTI, Birmingham, NJ, USA) interfaced with a Peltier cell. Fluorescence emission spectra were collected by exciting the samples at 396 or 466 nm for PFO and F8BT CNPs, respectively. The fluorescence intensity of the blanks (hydrogel without CNPs) was checked and subtracted from the samples. For the thermal stability study, heating rates of 5 °C min<sup>-1</sup> and stabilization times of 30 s at each temperature, were selected.

### 2.7. Time-Resolved Fluorescence Measurements

The time-resolved fluorescence measurements of PFO and F8BT were carried out by a high-performance fluorescence lifetime spectrometer FluoTime 300 (PicoQuant, Berlin, Germany), with time-correlated single-photon counting (TCSPC). For PFO CNPs and PFO@AETA, a 372 nm picosecond pulsed diode laser (LDH-P-C-375) was used as the excitation source, while the fluorescence decays were collected at 465 nm. For F8BT CNPs and F8BT@AETA samples, a 450 nm picosecond pulsed diode laser (LDH-P-C450) and a detection wavelength of 533 nm were used. Data analysis was performed using the EasyTau software (PicoQuant, Berlin, Germany) and applying a tri-exponential decay model. From the fitting of recovered parameters, the intensity-weighted mean lifetimes were calculated according to:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum a_i \cdot \tau_i^2}{\sum a_i \cdot \tau_i} \quad (1)$$

where  $a_i$  and  $\tau_i$  are the amplitudes and lifetimes, respectively, of the individual components.

### 2.8. Swelling Measurements

Swelling measurements of the xerogels were carried out in the absence or presence of PFO or F8BT CNPs, utilizing either ex situ or in situ methodology. The dried hydrogels, weighing approximately 0.07 g and measuring 0.3 cm in diameter and 0.6 cm in size, were

placed in an excess of Milli-Q water and stored at room temperature. The initial weight of each sample was recorded, and subsequent measurements were taken periodically as the hydrogels swelled and until a stable weight was reached. The swelling degree (SW) was calculated using the following formula:

$$SW = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad (2)$$

where  $W_t$  represents the weight of the hydrogel at time  $t$ , and  $W_0$  represents the initial weight of the dry hydrogel.

### 2.9. Particle Size and Zeta Potential

The size and zeta potential of PFO and F8BT CNPs were analyzed by the dynamic light scattering (DLS) technique, using a Malvern Zetasizer Nano-ZS instrument (Worcestershire, UK) equipped with a monochromatic coherent 4 mW helium neon laser ( $\lambda = 633$  nm) light source; size measurements were performed at angles of  $173^\circ$ . Size was measured in disposable cuvettes, while zeta potential measurements were performed in specific zeta potential cells. All measurements were carried out in triplicate at room temperature.

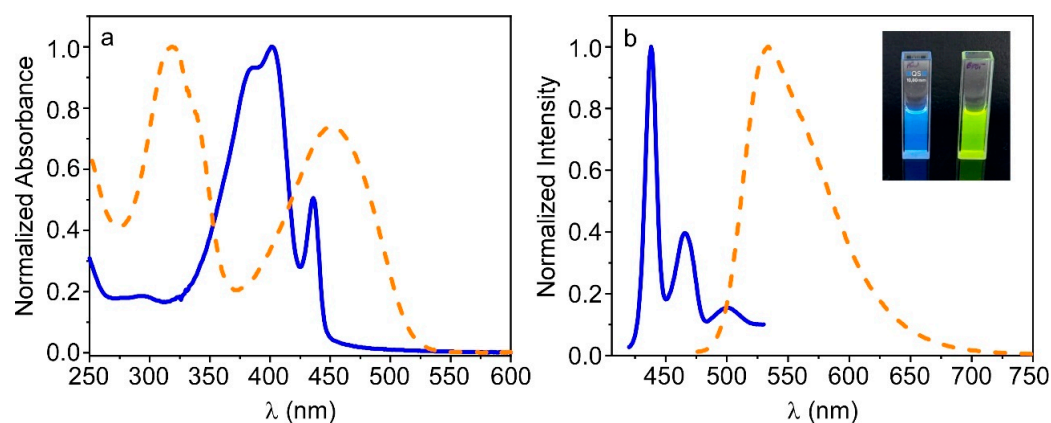
### 2.10. Scanning Electron Microscope

Scanning electron microscopy (SEM) was performed by using the Sigma 300 VP model (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany) Schottky-type field emission-scanning electron microscope (FESEM) at low kV without coating. Images of PFO and F8BT CNPs were obtained by placing a drop of the corresponding suspension onto a silicon wafer. These samples were air-dried before being placed in the microscope.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Preparation and Characterization of PFO\_CNPs and F8BT\_CNPs

PFO and F8BT (Scheme 1a) are well-known neutral polyfluorenes that are completely immiscible in water, which greatly limits their potential biological and environmental applications. The use of nanoparticles based on these compounds, such as those prepared in this work (Scheme 1b), has made it possible to overcome this limitation, allowing for their extensive characterization in aqueous media. These polymers were selected because they emit in different spectral regions, allowing this study to obtain fluorescent hydrogels with different emission bands. Figure 1 shows the absorption and fluorescence emission spectra of both PFO and F8BT CNPs in TRIS buffer, while Figure S1 also displays the emission spectra of the polymers in chloroform. As expected, both nanoparticles emit at different wavelengths, showing fluorescence in the blue (PFO) and yellow (F8BT) regions. The spectra corresponding to F8BT are similar in both buffer and chloroform media and similar to those reported in the bibliography [35]. However, the emission spectrum of the PFO\_CNPs was different from that obtained for the polymer in chloroform, with a clear red shift. This behavior has been described previously and is due to the fact that PFO can adopt two different phases—the disordered “glassy” phase and the more crystalline  $\beta$ -phase—which differ in the angles adopted between neighboring fluorene units. The “glassy” phase is adopted in good solvents, such as chloroform, and here these angles vary randomly. In contrast, in  $\beta$ -phase they adopt a fixed value of  $180^\circ$  corresponding to a well-defined planar chain conformation; this results in extended conjugation length, leading to red-shifted emission and improved optical performance [36]. The presence of  $\beta$ -phase in the PFO\_CNPs can be confirmed from Figure 1 by the absorption peaks at 403 nm and 436 nm, as well as by the pronounced emission peaks at 440, 466 and 501 nm. Similar spectra have been obtained for PFO confined in different nanoparticles [37,38].



**Figure 1.** Normalized UV-Vis absorption (a) and fluorescent emission spectra (b) of PFO\_CNPs (blue solid line) ( $\lambda_x = 396$  nm) and F8BT\_CNPs (orange dashed line) ( $\lambda_x = 466$  nm) in buffer. Inset in (b) shows a picture of the PFO (left) and F8BT (right) fluorescent CNPs.

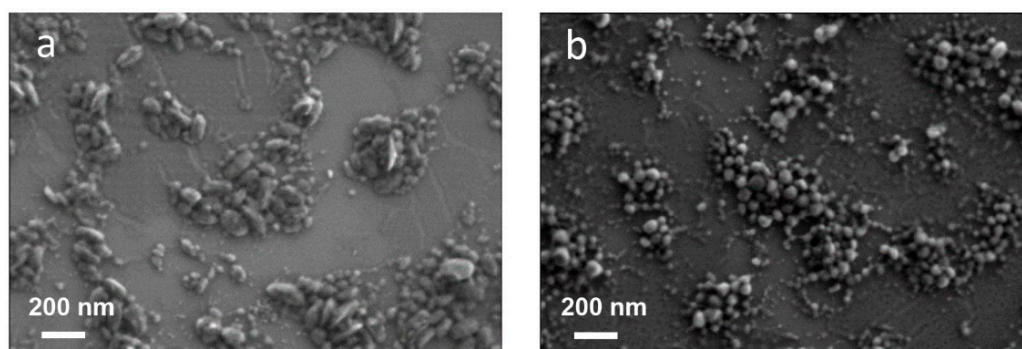
Time-resolved fluorescence spectroscopy was used to record the fluorescence decays of both PFO and F8BT CNPs in TRIS buffer. The fluorescence profiles were fitted to a three exponential decay model, and the mean fluorescence lifetime  $\langle\tau\rangle$  was calculated from this fit using Equation (1) (Figure S2). Values of 122 ps and 641 ps were calculated for PFO and P8BT\_CNPs nanoparticles, respectively. The fact that the  $\langle\tau\rangle$  determined for the PFO\_CNPs is longer than that reported for PFO in the “glassy” phase (97 ps), supports the suggestion that part of the polymer is adopting the  $\beta$ -phase inside the nanoparticle, which is characterized by a longer lifetime [37].

The size, polydispersity and surface charge of the prepared CNPs were determined using DLS and zeta potential (ZP) measurements (Table 1). As for ZP, high negative values were obtained which guarantees appropriate suspension stability for both nanoparticles. Furthermore, the fact that these nanoparticles were negatively charged suggests that they could be incorporated into hydrogels through electrostatic interactions, given the cationic nature of the polymeric network. Moreover, the size and shape of the CNPs were determined by SEM (Figure 2). The results indicate that PFO\_CNPs presented an elongated or ellipsoidal shape, in according with the  $\beta$ -phase presence in the nanoparticles [38]. In contrast, F8BT\_CNPs were rather spherical and both had a size in agreement with those obtained in the DLS experiments.

**Table 1.** Hydrodynamic diameter (d), polydispersity (PDI) and Zeta Potential (ZP) of PFO and F8BT CNPs.

Sample	d $\pm$ SD (nm)	PDI $\pm$ SD	ZP $\pm$ SD (mV)
PFO_CNPs	76.6 $\pm$ 0.5	0.203 $\pm$ 0.005	−45 $\pm$ 1
F8BT_CNPs	65.7 $\pm$ 0.9	0.155 $\pm$ 0.010	−62 $\pm$ 6

To determine the most appropriate concentration of CNPs for the preparation of fluorescent hydrogels, increasing quantities of CNPs were added to a TRIS buffer solution, and emission spectra were collected after each addition. Figure S3 shows the rise in the fluorescence signal as the concentration of nanoparticles increased. As can be seen, the enhancement was initially linear and started to curve until reaching a maximum; it then began to decrease. This behavior was probably due to inner filter effects and mutual reabsorption between nanoparticles, leading to self-quenching. From these results, we selected 6  $\mu$ M as the optimal concentration of CNPs to be incorporated into the hydrogels.

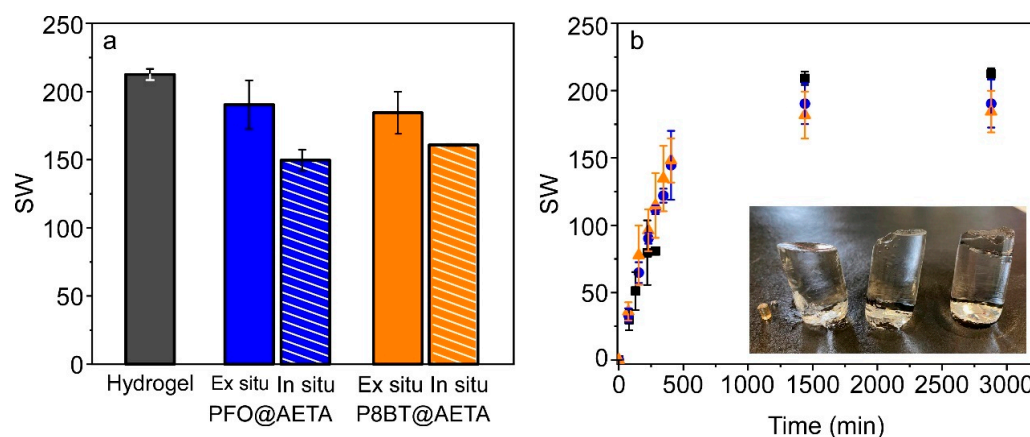


**Figure 2.** Representative images of scanning electron microscopy (SEM) of PFO\_CNPs (a) and F8BT\_CNPs (b).

### 3.2. Preparation and Swelling Behavior of PFO@AETA and F8BT@AETA Hydrogels

Fluorescent hydrogels of PFO (PFO@AETA) and F8BT (F8BT@AETA) were prepared as described in Materials and Methods. As a first immobilization strategy, the *ex situ* method (Scheme 2a) was used. For this, a previously prepared hydrogel was dehydrated and swollen with a 6  $\mu$ M suspension of CNPs until complete absorption, whereby it can be assumed that nearly 100% of the nanoparticles were entrapped. For the second strategy (*in situ* method in Scheme 2b), the CNPs suspension was mixed with AETA, MBA and photoinitiator before being irradiated under a UV lamp until the nanocomposite hydrogel was formed. On subsequent washing of the hydrogel, no fluorescence was detected in the wash water, confirming that the nanoparticles remain inside the hydrogel, probably through electrostatic interactions.

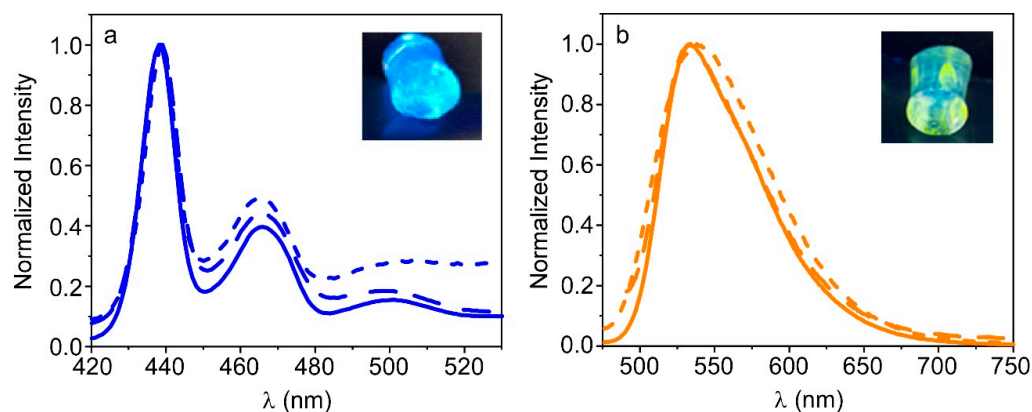
The swelling degree of PFO@AETA and F8BT@AETA hydrogels prepared by both *in situ* and *ex situ* methods was explored and compared to that of the hydrogel in absence of CNPs. Experiments were performed at room temperature, as described in Materials and Methods, by placing the five dried hydrogels in an excess of Milli-Q water and allowing them to swell. As the water was absorbed by the hydrogels, their weight increased until the equilibrium swelling weight was reached (Figure 3). The results show that all five hydrogels greatly increased in volume, with respect to the dry hydrogel, demonstrating a high swelling capacity. The hydrogel that reached the highest degree of swelling, as determined from Equation (2), was the hydrogel in the absence of nanoparticles. In contrast, the nanocomposite hydrogels prepared by the *in situ* method, with either PFO or F8BT, showed the lowest degree of swelling, though swelling was also very noticeable. The swelling rate was also similar in the absence and presence of nanoparticles, as shown in Figure 3b for *ex situ* PFO@AETA and F8BT@AETA hydrogels. The inset in Figure 3b shows that the presence of CNPs inside the hydrogels hardly changed their final appearance. The results are in agreement with those obtained by Martin-Pacheco et al. [16] when they anchored negatively charged graphene QDs in a similar hydrogel and observed no significant changes in swelling behavior. These results show that CNPs hardly modify the structure of the polymeric network, at least using the *ex situ* method.



**Figure 3.** Maximum swelling degree of AETA hydrogel, PFO@AETA ex situ and situ, and F8BT@AETA ex situ and in situ (a). The corresponding swelling evolution of AETA hydrogel (black) and ex situ PFO@AETA (blue) and F8BT@AETA (orange) (b). Inset: Digital image of the dried hydrogel and the fully swollen hydrogel, ex situ PFO@AETA, and F8BT@AETA (from left to right). Error bars represent the standard deviation of three replicates.

### 3.3. Fluorescence Properties of PFO@AETA and F8BT@AETA Hydrogels

The above experiment allows characterization of the swelling properties of the hydrogels formed, but does not ensure that they exhibit fluorescent properties. To verify this, fluorescence spectra were recorded by placing cylindrical portions (~0.75 cm diameter) of each hydrogel in the fluorescence cuvette, and comparing them with those of the CNPs in buffer. All nanocomposite hydrogels exhibited a good fluorescence signal, confirming that nanoparticles were present inside them, though the signal intensity was lower than that observed in the buffer. Specifically, immobilized PFO\_CNPs showed about four times less fluorescence intensity, while for F8BT\_CNPs the reduction was one and a half times compared to solution. These differences could be attributed to the combination of different phenomena, such as inner filter effects, scattering from hydrogel, or self-quenching due to local concentration effects imposed by encapsulation. Figure 4 shows the normalized emission spectra of these hydrogels, as well as that of the CNPs in buffer, to clarify the differences between them. It can be seen that the hydrogels prepared by the ex situ method show spectra very similar to those of the nanoparticles in solution. In the case of PFO@AETA, the presence of  $\beta$ -phase is confirmed from the spectrum, evidencing that the PFO\_CNPs are preserved inside the hydrogel, probably electrostatically interacting with the cationic polymeric network. A major difference was observed in the fluorescence spectra of the nanocomposite hydrogels prepared by the in situ method. The bands were slightly wider and, in the case of PFO, showed a tail towards longer wavelengths that could suggest aggregation of the nanoparticles. In addition, when observing the fluorescence of the hydrogels under the UV lamp (inset in Figure 4), we noticed that, in the case of F8BT@AETA, the emission was not homogeneous, as if the F8BT\_CNPs were not equally distributed throughout the hydrogel. Furthermore, we observed that, after a few days, most of the fluorescence came from the bottom of the hydrogel, whether the hydrogel was prepared in situ or ex situ (Figure S4). This result suggests that either the nanoparticles do not interact effectively with the polymeric network, or the F8BT is released from the SDS, with the latter remaining bound to the network.

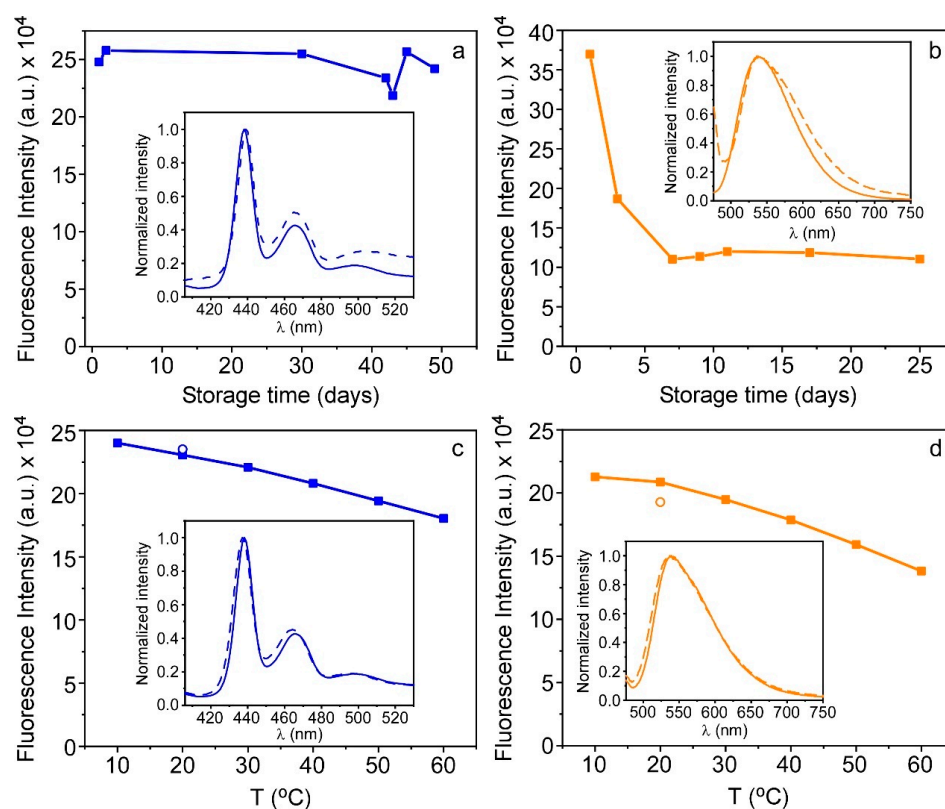


**Figure 4.** Normalized fluorescence emission spectra of PFO (a) and F8BT (b) CNPs in a solution of TRIS buffer (solid line), immobilized in hydrogels in situ (dotted line) and ex situ (dashed line). Insets: Digital image of PFO@AETA (a) and F8BT@AETA (b) hydrogels taken under irradiation with UV light (365 nm).

In view of these results, we selected the ex situ method as the most suitable for the preparation of the fluorescent hydrogels; we then explored the fluorescence properties of PFO@AETA and F8BT@AETA hydrogels as a function of time, to better understand the above results. To this end, freshly prepared fluorescent hydrogels were stored at 4 °C and their emission spectra were recorded on different days. Figure 5a shows that the fluorescence intensity of PFO@AETA, measured at the emission maximum, remained stable for more than one month. However, the shape of the spectrum changed in a similar way to that observed for the in situ method, showing an increase in the second peak as well as a tail towards longer wavelengths; this could suggest a slight aggregation of the nanoparticles inside the hydrogel. Regarding F8BT@AETA, the fluorescence intensity strongly decreased during the first few days, broadening the spectrum; this supported the previous hypothesis that F8BT does not interact effectively with the polymeric network (Figure 5b). The temperature effect was also explored by recording the fluorescence spectra of freshly prepared hydrogels from 10 to 60 °C. For PFO@AETA, the decrease in fluorescence intensity observed with temperature increase was attributed to the increased probability of non-radiative transitions previously reported in polyfluorenes [27], since the initial fluorescence intensity was recovered after cooling (Figure 5c). In contrast, for F8BT@AETA, the effect of temperature was stronger and the initial intensity was not recovered, which supports the instability of F8BT\_CNPs inside the hydrogel (Figure 5d).

Fluorescence decays were recorded in both PFO@AETA and F8BT@AETA hydrogels; however, due to the instability of the latter, it was not possible to obtain a good fit of the curves, so fluorescence lifetimes could only be determined for PFO@AETA hydrogels (Figure S2). Results show that the mean fluorescence lifetime  $\langle\tau\rangle$  for PFO entrapped in the hydrogel (PFO@AETA  $\langle\tau\rangle = 222$  ns), is slightly higher than that calculated for the nanoparticles in solution. This increase in the mean lifetime within the hydrogel could be attributed to a higher presence of the  $\beta$ -phase [37], which could be correlated with the slight increase observed in the 466 nm fluorescent band (Figure 4a).

Taking into account these results, we concluded that F8BT@AETA hydrogels are not stable, at least under the preparation condition used in this work, so these materials were discarded for use in sensing applications. In contrast, PFO@AETA hydrogels could be good candidates for this kind of application, as long as their storage stability is improved.

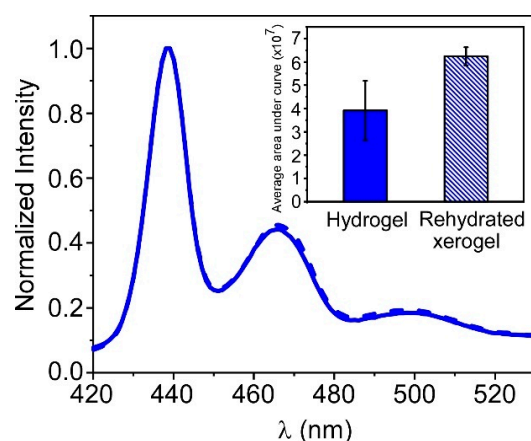


**Figure 5.** Effect of storage time and temperature on the stability of freshly prepared PFO@AETA (a,c) and F8BT@AETA (b,d) hydrogels measured at the fluorescence intensity maximum. The empty circles in (c,d) indicate the fluorescence intensity recovered after the heat treatment. Insets: Normalized fluorescence emission spectra at the first day (solid line) and the last day (dashed line) (a,b), and at 10 °C (solid line) and 60 °C (dashed line) (c,d).

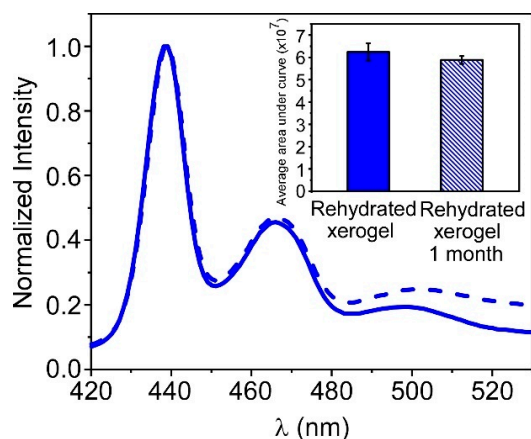
### 3.4. Storage of PFO@AETA as Xerogels

In recent work, we demonstrated the ability of AETA hydrogels to encapsulate enzymes and keep them stored in xerogel form, retaining their conformation and activity once rehydrated [28]. With this in mind, a series of PFO@AETA hydrogels were prepared and their fluorescence spectra recorded before and after being oven-dried and rehydrated to the initial volume (Figure 6). The shape and position of the spectrum were preserved after rehydration, and a higher signal and less variability in the fluorescence intensity were found (inset in Figure 6). The same behavior was recurrently observed in this study, suggesting that drying and subsequent swelling redistribute the nanoparticles more homogeneously; this maximizes their fluorescence emission, probably because they are more spread apart.

The above result suggests that the material can be stored as a nanocomposite xerogel, improving its properties. To confirm this assumption, we tested if long-term storage as xerogel altered the fluorescence properties of PFO@AETA. For this purpose, portions of PFO@AETA xerogels were rehydrated after being stored at room temperature for thirty days; the fluorescence spectra were compared with hydrogels, stored as xerogels for only one day (Figure 7). The results show that both the shape of the spectrum, at least in the first 2 peaks, and the overall signal intensity were practically maintained. This indicates that xerogel is a good way to store fluorescent hydrogels at room temperature; moreover xerogel takes up little space, making fluorescent hydrogels easy to transport. The results suggest, therefore, that these materials could have potential applications in the field of detection.



**Figure 6.** Normalized fluorescence emission spectra of PFO@AETA hydrogels (solid line) and rehydrated xerogels (dashed line). Inset: Average area under the (non-normalized) spectrum of different portions ( $n = 3$ ) of hydrogels and rehydrated xerogels ( $\lambda_x = 396$  nm). Error bars represent the standard deviation of the three replicates.



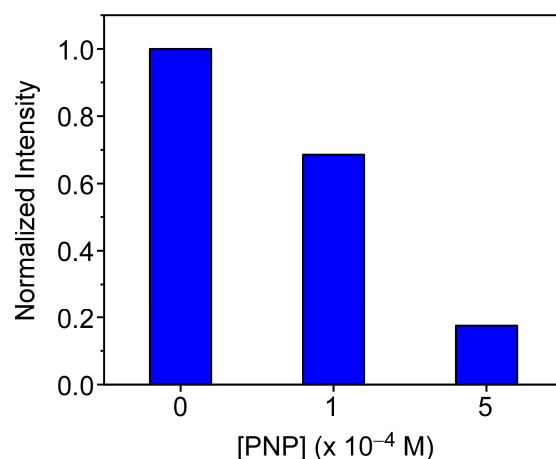
**Figure 7.** Normalized fluorescence emission spectra of rehydrated PFO@AETA xerogels stored at room temperature for one day (solid line) and one month (dashed line). Inset: average area under the (non-normalized) emission spectra of different portions ( $n = 3$ ) of rehydrated xerogels stored for one day and one month ( $\lambda_x = 396$  nm). Error bars represent the standard deviation of the three replicates.

### 3.5. PFO@AETA as a Sensing Platform

In previous works, researchers have exploited the ability of *p*-nitrophenol (PNP) to quench the fluorescence intensity of blue-emitter cationic polyfluorenes, to develop biosensors for phosphate detection or the screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors [29,39].

To study whether the developed material fluorescence is also quenched in the presence of PNP, PFO@AETA xerogels slices ( $\sim 0.07$  g) were incubated with solutions containing different PNP concentrations (0, 100 and 500  $\mu$ M), until total absorption of the solution. The fluorescence spectra of the three hydrogels were then recorded, and their intensities at the emission maximum were compared. Figure 8 shows that PNP is able to largely quench the fluorescence of PFO@AETA, especially at concentrations of 500  $\mu$ M, where more than 80% of the initial signal is lost. These results, therefore, suggest that the developed hydrogel can be used as a sensing platform in enzymatic reactions involving PNP as the final product.



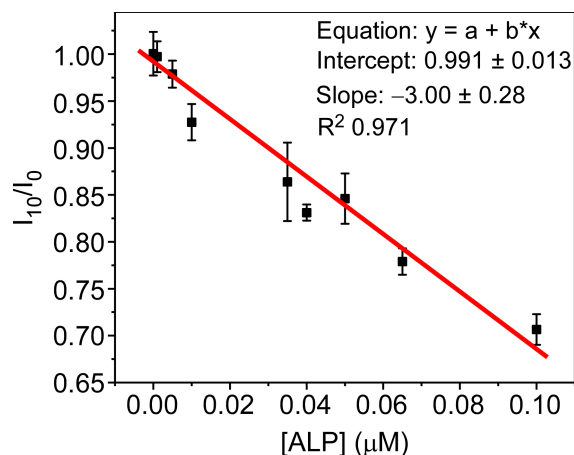


**Figure 8.** Effect of PNP on the fluorescence intensity of PFO@AETA hydrogels ( $\lambda_x = 396$  nm,  $\lambda_m = 438$  nm).

As a proof of concept, we investigated the possibility that PFO@AETA could be used for the detection of alkaline phosphatase (ALP), since ALP catalyzes the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP) to PNP. For the practical application of the sensor, the incorporation of the substrate PNPP inside the PFO@AETA hydrogel is desirable. To this end, PFO@AETA xerogel was swollen with a solution of PNPP (0.5 mM) until complete absorption. Hydrogels were then oven-dried and stored at room temperature until their use. Afterwards, the suitability of the co-encapsulated system PNPP@PFO@AETA xerogels to detect ALP activity was evaluated. For this purpose, identical slices of the xerogel were partially rehydrated with 0.9 mL of buffer; 0.9 mL of ALP solutions containing different concentrations of the enzyme were then added, and the fluorescence intensity was measured as a function of time. The results, presented in Figure S5, show that, in the absence of the enzyme, the fluorescence signal experienced no significant variation over time. The fluorescence decrease only occurred in the presence of the enzyme, and its kinetics depends on the total ALP amount. This result suggests that hydrolysis of PNPP to PNP is taking place, and confirms the ability of the nanocomposite platform to detect the presence of ALP. To calibrate the response of the sensor to different ALP concentrations and determine its sensitivity the fluorescence quenching was collected after 10 min of incubation; it was then plotted as a function of the ALP concentration assayed (Figure 9). The plot was linear in the studied concentration range from 0 to 0.1  $\mu$ M, with a limit of detection (LOD) of 21 nM, calculated from the following equation:  $\text{LOD} = 3\sigma/S$ , where  $S$  is the slope of the calibration curve and  $\sigma$  is the standard deviation of the blank.

In these preliminary assays, the developed device has demonstrated its ability to detect the presence of ALP in the nanomolar range in a similar way to other (disposable) ALP detection devices, some of which, although showing a slightly better detection limit, exhibit a lower linear response [40]. The achieved detection capacity of this first prototype, with a LOD equivalent to ALP  $\sim 40$  IU/L, makes it suitable for the detection of abnormally elevated ALP levels in serum, which are associated with disease conditions [41]. It is interesting to note that, although sensors/assays with higher sensitivity to ALP than the one described in this work have been published in the literature (see, for example, a recent review by Shaban et al. [42]), the developed platform has not yet been optimized; this lack of optimization is due to the fact that our interest in this study was to verify that the synthesized nanocomposite material has the capacity to be used as a turn-off fluorescence sensor. We consider that, after minimal optimization, the device will be able to detect physiological levels of ALP in serum in an easy and low-cost way, as well as ALP activity in environmental samples, due to its interest as a bio-indicator and possible eutrophication biomarker [43,44]. Furthermore, we also want to highlight that the design of the device could allow not only the detection of this enzyme, but potentially also the detection of

other enzymatic reactions involving PNP as an end product (such as those catalyzed by lipases, proteases or glucosidases). This could occur by simply modifying the substrate to the appropriate one for each enzyme.



**Figure 9.** ALP calibration curve and fit parameters. Fluorescence quenching was measured 10 min after the addition of each ALP concentration ( $I_{t=10}/I_{t=0}$ ) to partially rehydrated PNPP@PFO@AETA xerogels. Error bars represent the standard deviation of three replicates.

#### 4. Conclusions

In this study, we have developed and characterized two fluorescent acrylamide nanocomposite hydrogels containing conjugated polymer nanoparticles (CNPs) based on polyfluorenes—one emitting in the blue (PFO) and the other in the yellow (F8BT) regions—using a green protocol. In solution, both types of CNPs showed negative surface charge and diameters around 70 nm; for the PFO\_CNPs, the presence of two phases (“glassy” phase and  $\beta$ -phase) was detected.

Two strategies for preparing the nanostructured hydrogels PFO@AETA and F8BT@AETA were explored: incorporation of CNPs during the polymerization process (in situ), and embedment after the hydrogel formation (ex situ). A slightly lower swelling degree was achieved for the in situ synthesized hydrogels, while the fluorescence spectra collected showed both a slight widening in the fluorescence bands of the CNPs and possible evidence of aggregation for PFO\_CNPs. As a result, the ex situ method was selected.

Monitorization of the fluorescent properties of ex situ PFO@AETA and F8BT@AETA hydrogels showed that PFO@AETA presented higher stability and homogeneity, resulting in its selection as a sensing element. Moreover, drying of this hydrogel renders xerogels with improved fluorescent properties (higher signal and less variability), and allowed storage at room temperature for at least 30 days, which facilitates its use in the field of sensing.

Finally, as a proof of concept, PFO@AETA was used as a platform to specifically detect the enzyme alkaline phosphatase (ALP) in aqueous media, based on the ability of PNP (as a product of enzyme activity) to quench the fluorescence of the hydrogel. The developed prototype proved its ability to measure ALP in the nanomolar range with a LOD of 21 nM, showing great potential to quantify, after appropriate optimization, physiological ALP levels, as well as ALP activity in environmental samples. The main advantages of the synthesized material are its ease of handling, portability and great versatility. Its dimensions can be modified to adapt it to measurements in cuvettes, plate readers, etc. Sample analysis does not require the addition of substrate, as in other assays, as the substrate has been previously integrated into the platform. Furthermore, the design of the device would allow not only the detection of ALP, but potentially also the detection of other enzymatic reactions involving PNP as an end product, simply by modifying the substrate for the appropriate one for each enzyme.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/bios13030408/s1>, Figure S1: Normalized fluorescence emission of CNPs in chloroform; Figure S2: Fluorescence lifetimes of CNPs and PFO@AETA; Figure S3: Effect of increasing concentrations of CNPs; Figure S4: Digital image of F8BT@AETA. Figure S5: Fluorescence quenching kinetics of PFO@AETA with ALP.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.M., M.J.M.-T. and C.R.M.; methodology, Y.A., R.E. and C.R.M.; validation, Y.A. and R.E.; formal analysis, Y.A., R.E. and M.J.M.-T.; investigation, Y.A., R.E. and M.J.M.-T.; resources, F.M. and C.R.M.; writing—original draft, Y.A., R.E., M.J.M.-T. and C.R.M.; supervision, M.J.M.-T. and C.R.M.; project administration, F.M. and C.R.M.; funding acquisition, F.M. and C.R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (TED2021-129894B-I00). The study forms part of the Advanced Materials programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and Generalitat Valenciana (MFA/2022/058). DLS, FESEM and Fluorescence lifetime spectrometer equipment acquisition funded by Generalitat Valenciana–Conselleria d'Educació Investigació Cultura i Esport and EU-FEDER “Una forma de hacer Europa” (GVA-IDIFEDER/2018/020 and GVA-IDIFEDER/2021/036).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data reported in the study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Peppas, N.A.; Hilt, J.Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345–1360. [[CrossRef](#)]
2. Barbero, C.A.; Martínez, M.V.; Acevedo, D.F.; Molina, M.A.; Rivarola, C.R. Cross-Linked Polymeric Gels and Nanocomposites: New Materials and Phenomena Enabling Technological Applications. *Macromol* **2022**, *2*, 440–475. [[CrossRef](#)]
3. Sennakesavan, G.; Mostakhdemin, M.; Dkhar, L.K.; Seyfoddin, A.; Fatihhi, S.J. Acrylic acid/acrylamide based hydrogels and its properties—A review. *Polym. Degrad. Stab.* **2020**, *180*, 109308. [[CrossRef](#)]
4. Rafieian, S.; Mirzadeh, H.; Mahdavi, H.; Masoumi, M.E. A review on nanocomposite hydrogels and their biomedical applications. *Sci. Eng. Compos. Mater.* **2019**, *26*, 154–174. [[CrossRef](#)]
5. Azady, M.A.R.; Ahmed, S.; Islam, M.S. A review on polymer nanocomposite hydrogel preparation, characterization, and applications. *Eur. J. Chem.* **2021**, *12*, 11. [[CrossRef](#)]
6. Haraguchi, K.; Takehisa, T. Nanocomposite Hydrogels: A Unique Organic–Inorganic Network Structure with Extraordinary Mechanical, Optical, and Swelling/De-swelling Properties. *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1120–1124. [[CrossRef](#)]
7. Li, Y.; Young, D.J.; Loh, X.J. Fluorescent gels: A review of synthesis, properties, applications and challenges. *Mater. Chem. Front.* **2019**, *3*, 1489–1502. [[CrossRef](#)]
8. Herrmann, A.; Haag, R.; Schedler, U. Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, e2100062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Wei, S.; Li, Z.; Lu, W.; Liu, H.; Zhang, J.; Chen, T.; Tang, B.Z. Multicolor Fluorescent Polymeric Hydrogels. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 8608–8624. [[CrossRef](#)]
10. Chang, C.; Peng, J.; Zhang, L.; Pang, D.-W. Strongly fluorescent hydrogels with quantum dots embedded in cellulose matrices. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 7771–7776. [[CrossRef](#)]
11. Qasemi, S.; Ghaemy, M. Highly sensitive and strongly fluorescent gum tragacanth based superabsorbent hydrogel as a new biosensor for glucose optical detection. *J. Mater. Chem. C* **2020**, *8*, 4148–4156. [[CrossRef](#)]
12. Chen, M.; Grazon, C.; Sensharma, P.; Nguyen, T.T.; Feng, Y.; Chern, M.; Baer, R.C.; Varongchayakul, N.; Cook, K.; Lecommandoux, S.; et al. Hydrogel-Embedded Quantum Dot-Transcription Factor Sensors for Quantitative Progesterone Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 43513–43521. [[CrossRef](#)]
13. Martín, C.; Martín-Pacheco, A.; Naranjo, A.; Criado, A.; Merino, S.; Díez-Barra, E.; Herrero, M.A.; Vázquez, E. Graphene hybrid materials? The role of graphene materials in the final structure of hydrogels. *Nanoscale* **2019**, *11*, 4822–4830. [[CrossRef](#)]
14. Yan, X.; Rahman, S.; Rostami, M.; Tabasi, Z.A.; Khan, F.; Alodhayb, A.; Zhang, Y. Carbon Quantum Dot-Incorporated Chitosan Hydrogel for Selective Sensing of Hg<sup>2+</sup> Ions: Synthesis, Characterization, and Density Functional Theory Calculation. *ACS Omega* **2021**, *6*, 23504–23514. [[CrossRef](#)]
15. Shao, J.; Yu, Q.; Wang, S.; Hu, Y.; Guo, Z.; Kang, K.; Ji, X. Poly(vinyl alcohol)–Carbon Nanodots Fluorescent Hydrogel with Superior Mechanical Properties and Sensitive to Detection of Iron(III) Ions. *Macromol. Mater. Eng.* **2019**, *304*, 1900326. [[CrossRef](#)]

16. Martín-Pacheco, A.; Del Río Castillo, A.E.; Martín, C.; Herrero, M.A.; Merino, S.; García Fierro, J.L.; Díez-Barra, E.; Vázquez, E. Graphene Quantum Dot–Aerogel: From Nanoscopic to Macroscopic Fluorescent Materials. Sensing Polyaromatic Compounds in Water. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 18192–18201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Grijalvo, S.; Mayr, J.; Eritja, R.; Díaz, D.D. Biodegradable liposome-encapsulated hydrogels for biomedical applications: A marriage of convenience. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 555–574. [[CrossRef](#)]
18. Gao, D.; Hu, D.; Liu, X.; Zhang, X.; Yuan, Z.; Sheng, Z.; Zheng, H. Recent Advances in Conjugated Polymer Nanoparticles for NIR-II Imaging and Therapy. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2*, 4241–4257. [[CrossRef](#)]
19. MacFarlane, L.R.; Shaikh, H.; Garcia-Hernandez, J.D.; Vespa, M.; Fukui, T.; Manners, I. Functional nanoparticles through  $\pi$ -conjugated polymer self-assembly. *Nat. Rev. Mater.* **2021**, *6*, 7–26. [[CrossRef](#)]
20. Koralli, P.; Nega, A.; Vagiaki, L.; Pavlou, A.; Siskos, M.; Dimitrakopoulou-Strauss, A.; Gregoriou, V.; Chochos, C. New Conjugated Polymer Nanoparticles with High Photoluminescence Quantum Yields for Far-red and Near Infrared Fluorescence Bioimaging. *Mater. Chem. Front.* **2020**, *4*, 2357–2369. [[CrossRef](#)]
21. Chen, X.; Hussain, S.; Abbas, A.; Hao, Y.; Malik, A.H.; Tian, X.; Song, H.; Gao, R. Conjugated polymer nanoparticles and their nanohybrids as smart photoluminescent and photoresponsive material for biosensing, imaging, and theranostics. *Mikrochim. Acta* **2022**, *189*, 83. [[CrossRef](#)]
22. Alacid, Y.; Martínez-Tomé, M.J.; Mateo, C.R. Reusable Fluorescent Nanobiosensor Integrated in a Multiwell Plate for Screening and Quantification of Antidiabetic Drugs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 25624–25634. [[CrossRef](#)]
23. Aguado, R.; Santos, A.; Vallejos, S.; Valente, A.J.M. Paper-Based Probes with Visual Response to Vapors from Nitroaromatic Explosives: Polyfluorenes and Tertiary Amines. *Molecules* **2022**, *27*, 2900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, X.; Hussain, S.; Chen, X.; Hao, Y.; Zhang, P.; Gao, R. Fabrication of conjugated polymer encapsulated fluorescent hybrid micelles for augmented, highly selective and step-wise detection of nitroaromatic pollutants and hepatobiliary biomarker. *Sens. Actuators B Chem.* **2023**, *377*, 133081. [[CrossRef](#)]
25. Ji, X.; Yao, Y.; Li, J.; Yan, X.; Huang, F. A Supramolecular Cross-Linked Conjugated Polymer Network for Multiple Fluorescent Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 74–77. [[CrossRef](#)]
26. Nangung, H.; Jo, S.; Lee, T.S. Fluorescence Modulation of Conjugated Polymer Nanoparticles Embedded in Poly(N-Isopropylacrylamide) Hydrogel. *Polymers* **2021**, *13*, 4315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rubio-Camacho, M.; Martínez-Tomé, M.J.; Mira, A.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Formation of Multicolor Nanogels Based on Cationic Polyfluorenes and Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic monoethyl ester): Potential Use as pH-Responsive Fluorescent Drug Carriers. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Alacid, Y.; Martínez-Tomé, M.J.; Esquembre, R.; Herrero, M.A.; Mateo, C.R. Portable Alkaline Phosphatase–Hydrogel Platform: From Enzyme Characterization to Phosphate Sensing. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2672. [[PubMed](#)]
29. Alacid, Y.; Quintero Jaime, A.F.; Martínez-Tomé, M.J.; Mateo, C.R.; Montilla, F. Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels. *Biosensors* **2022**, *12*, 698. [[CrossRef](#)]
30. Qu, F.; Meng, L.; Zi, Y.; You, J. Ratiometric detection of alkaline phosphatase based on aggregation-induced emission enhancement. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 7431–7440. [[CrossRef](#)]
31. Li, X.; Wang, X.; Guo, W.; Wang, Y.; Hua, Q.; Tang, F.; Luan, F.; Tian, C.; Zhuang, X.; Zhao, L. Selective Detection of Alkaline Phosphatase Activity in Environmental Water Samples by Copper Nanoclusters Doped Lanthanide Coordination Polymer Nanocomposites as the Ratiometric Fluorescent Probe. *Biosensors* **2022**, *12*, 372. [[CrossRef](#)]
32. He, J.; Jiang, X.; Ling, P.; Sun, J.; Gao, F. Ratiometric Sensing for Alkaline Phosphatase Based on Two Independent Signals from in Situ Formed Nanohybrids of Semiconducting Polymer Nanoparticles and MnO<sub>2</sub> Nanosheets. *ACS Omega* **2019**, *4*, 8282–8289. [[CrossRef](#)]
33. Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M.J.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Fluorescent Biosensor for Phosphate Determination Based on Immobilized Polyfluorene-Liposomal Nanoparticles Coupled with Alkaline Phosphatase. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 136–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pecher, J.; Mecking, S. Nanoparticles of Conjugated Polymers. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6260–6279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Urbano, L.; Clifton, L.; Ku, H.K.; Kendall-Troughton, H.; Vandera, K.-K.A.; Matarese, B.F.E.; Abelha, T.; Li, P.; Desai, T.; Dreiss, C.A.; et al. Influence of the Surfactant Structure on Photoluminescent  $\pi$ -Conjugated Polymer Nanoparticles: Interfacial Properties and Protein Binding. *Langmuir* **2018**, *34*, 6125–6137. [[CrossRef](#)]
36. Eggimann, H.J.; Le Roux, F.; Herz, L.M. How  $\beta$ -Phase Content Moderates Chain Conjugation and Energy Transfer in Polyfluorene Films. *J. Phys. Chem.* **2019**, *10*, 1729–1736. [[CrossRef](#)]
37. Wu, C.; McNeill, J. Swelling-Controlled Polymer Phase and Fluorescence Properties of Polyfluorene Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, *24*, 5855–5861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhao, X.; Li, R.; Jia, Y. Tuning the formation of  $\beta$ -phase poly(9,9-di-n-octylfluorenyl-2,7-diyl) via nano-confinement and polystyrene blending for improved photocatalysis. *Chem. Phys. Mater.* **2022**, *1*, 219–226. [[CrossRef](#)]
39. Cao, A.; Tang, Y.; Liu, Y. Novel Fluorescent Biosensor for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Screening Based on Cationic Conjugated Polymers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 3773–3778. [[CrossRef](#)]
40. Astier, Y.; Bartlett, P.N. The measurement of alkaline phosphatase at nanomolar concentration within 70 s using a disposable microelectrochemical transistor. *Bioelectrochemistry* **2004**, *64*, 53–59. [[CrossRef](#)]

41. National Library of Medicine. ALP—Blood Test. Available online: <https://medlineplus.gov/ency/article/003470.htm> (accessed on 14 February 2023).
42. Shaban, S.M.; Jo, S.B.; Hafez, E.; Cho, J.H.; Kim, D.-H. A comprehensive overview on alkaline phosphatase targeting and reporting assays. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *465*, 214567. [[CrossRef](#)]
43. Martínez-Crego, B.; Romero, J.; Alcoverro, T. The use of surface alkaline phosphatase activity in the seagrass *Posidonia oceanica* as a biomarker of eutrophication. *Mar. Ecol.* **2006**, *27*, 381–387. [[CrossRef](#)]
44. Bañeras, L.; Ros-Ponsatí, M.; Cristina, X.P.; Garcia-Gil, J.L.; Borrego, C.M. Phosphorus deficiency and kinetics of alkaline phosphatase in isolates and natural populations of phototrophic sulphur bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2010**, *73*, 243–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



# Fluorescent Nanocomposite Hydrogels Based on Conjugated Polymer Nanoparticles as Platforms for Alkaline Phosphatase Detection

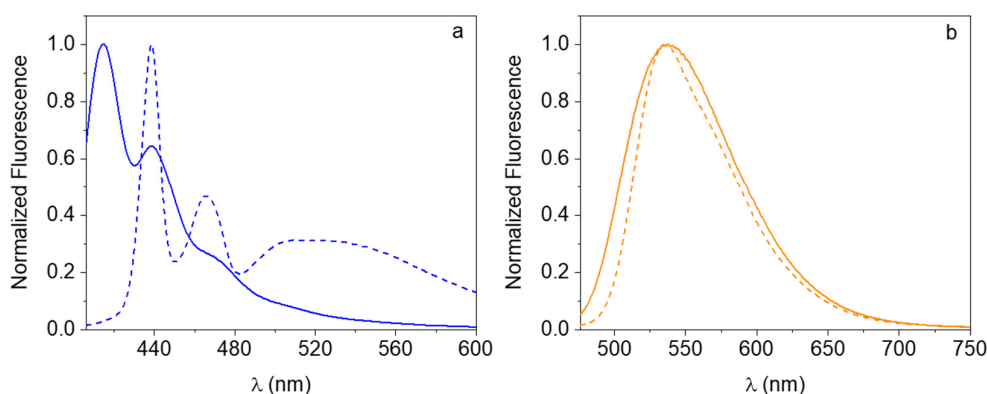
Yolanda Alacid <sup>1,2</sup>, Rocío Esquembre <sup>1</sup>, Francisco Montilla <sup>2</sup>, María José Martínez-Tomé <sup>1,\*</sup> and C. Reyes Mateo <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDI<sub>BE</sub>), Universidad Miguel Hernández, Avenida de la Universidad s/n, 03202, Elche, Alicante, Spain

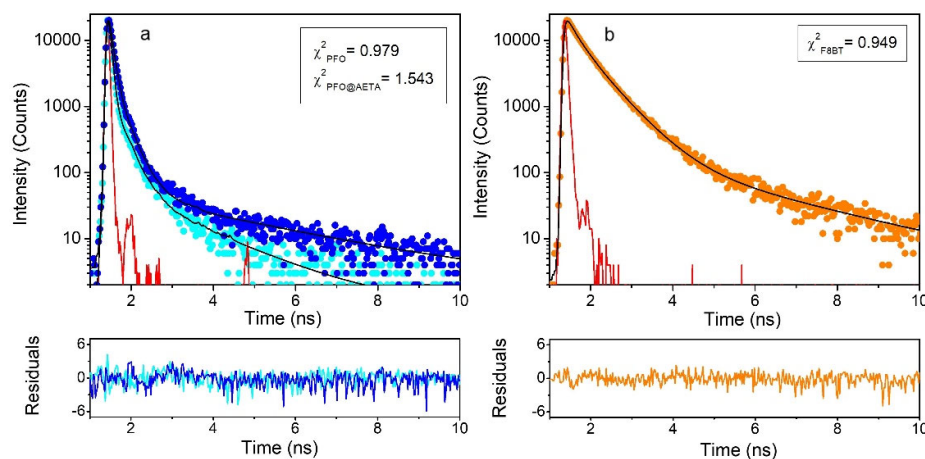
<sup>2</sup> Departamento de Química Física and Instituto Universitario de Materiales de Alicante (IUMA), Universidad de Alicante, Carretera San Vicente s/n, 03690, Alicante, Spain

\* Correspondence: mj.martinez@umh.es (M.J.M.T), rmateo@umh.es (C.R.M)

**Keywords:** Nanocomposite hydrogel; polyfluorene; fluorescent sensor; alkaline phosphatase; immobilization; portable device;

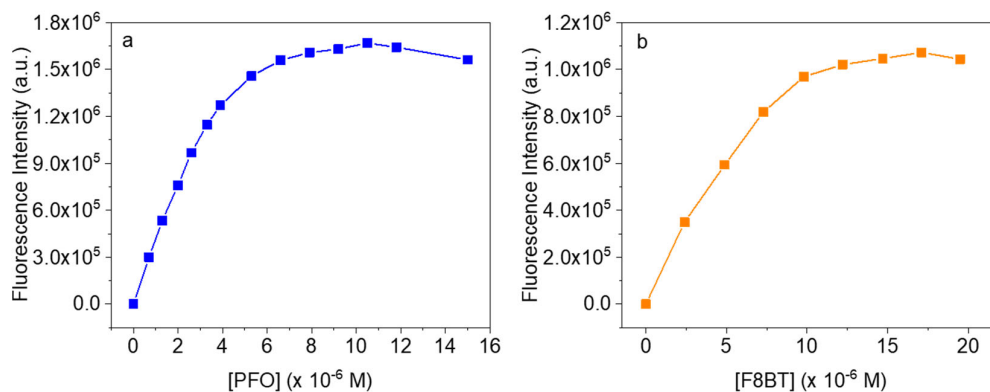


**Figure S1.** Normalized fluorescence emission spectra of PFO (a) and F8BT (b) NPs in chloroform (solid line) and TRIS buffer (dash line).



**Figure S2.** Semi-log plot of fluorescence decays recorded at 20°C for (a) FPO (cyan) and FPO@AETA (blue), and (b) F8BT (orange). The fitting curves are presented in black and the instrumental

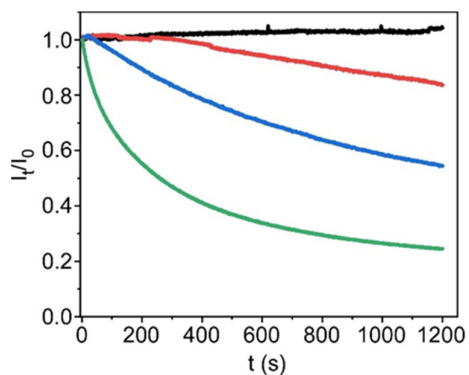
response function measured with a LUDOX colloidal solution in red. The value of  $\chi^2$  and weighted residuals (lower panels), both used to assess the quality of the fits, are also shown.



**Figure S3.** Influence of increasing concentrations of PFO\_CNPs (a) and F8BT\_CNPs (b) on the maximum fluorescence intensity to a buffered solution.



**Figure S4.** Digital image of ex situ F8BT@AETA hydrogel taken under irradiation with UV light (365 nm) after three days of preparation.



**Figure S5.** Fluorescence quenching kinetics ( $I_t/I_0$ ) measured in PNPP@PFO@AETA hydrogels during their immersion in solutions containing concentrations of 0 (black), 0.01 (red), 0.1 (blue) and 3 (green)  $\mu$ M ALP.



## Artículo 7.3.

# Portable Alkaline Phosphatase–Hydrogel Platform: From Enzyme Characterization to Phosphate Sensing

Yolanda Alacid <sup>1</sup>, María José Martínez-Tomé <sup>1</sup>, Rocío Esquembre <sup>1</sup>, M. Antonia Herrero <sup>2</sup>, C. Reyes Mateo <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain.

<sup>2</sup> Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Camilo José Cela, s/n, 13071 Ciudad Real, Spain

*International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3), 2672

doi: 10.3390/ijms24032672



Factor de impacto: 5.6





Article

# Portable Alkaline Phosphatase–Hydrogel Platform: From Enzyme Characterization to Phosphate Sensing

Yolanda Alacid <sup>1</sup>, María José Martínez-Tomé <sup>1</sup>, Rocío Esquembre <sup>1</sup>, M. Antonia Herrero <sup>2</sup>  and C. Reyes Mateo <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), 03202 Elche, Spain

<sup>2</sup> Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Camilo José Cela, s/n, 13071 Ciudad Real, Spain

\* Correspondence: rmateo@umh.es

**Abstract:** Here, we present a study on the incorporation and characterization of the enzyme alkaline phosphatase (ALP) into a three-dimensional polymeric network through a green protocol to obtain transparent hydrogels (ALP@AETA) that can be stored at room temperature and potentially used as a disposable biosensor platform for the rapid detection of ALP inhibitors. For this purpose, different strategies for the immobilization of ALP in the hydrogel were examined and the properties of the new material, compared to the hydrogel in the absence of enzyme, were studied. The conformation and stability of the immobilized enzyme were characterized by monitoring the changes in its intrinsic fluorescence as a function of temperature, in order to study the unfolding/folding process inside the hydrogel, inherently related to the enzyme activity. The results show that the immobilized enzyme retains its activity, slightly increases its thermal stability and can be stored as a xerogel at room temperature without losing its properties. A small portion of a few millimeters of ALP@AETA xerogel was sufficient to perform enzymatic activity inhibition assays, so as a proof of concept, the device was tested as a portable optical biosensor for the detection of phosphate in water with satisfactory results. Given the good stability of the ALP@AETA xerogel and the interesting applications of ALP, not only in the environmental field but also as a therapeutic enzyme, we believe that this study could be of great use for the development of new devices for sensing and protein delivery.

**Keywords:** hydrogel; alkaline phosphatase; immobilization; biosensor; portable device; protein thermal stability



**Citation:** Alacid, Y.; Martínez-Tomé, M.J.; Esquembre, R.; Herrero, M.A.; Mateo, C.R. Portable Alkaline Phosphatase–Hydrogel Platform: From Enzyme Characterization to Phosphate Sensing. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2672. <https://doi.org/10.3390/ijms24032672>

Academic Editor: Silvana Alfei

Received: 13 December 2022

Revised: 23 January 2023

Accepted: 27 January 2023

Published: 31 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Naturally occurring enzymes have been exploited, among other applications, in industry, in the manufacture of biosensors, and as therapeutic agents in the treatment of a variety of disorders and diseases [1–5]. In many of these applications, it is essential that the enzyme is immobilized/encapsulated to facilitate its handling and potential reuse or even to improve its stability, which is a critical step since the majority of enzymes are considered very sensitive and unstable at elevated temperatures. In addition, the enzyme requires a suitable environment to be operational [6–8]. Although researchers have been working on this task for decades, it remains a challenge to immobilize enzymes in a medium that allows storage for long periods of time at room temperature and high biomolecule concentrations, while maintaining their activity, and that is easily transportable and versatile to suit any application.

Immobilization on a 2D surface by means of chemical or physical interaction is the prevailing technique for protein immobilization but it has the limitation of insufficient loading capacity, among others. In this regard, 3D materials such as hydrogels can incorporate higher amounts of biomolecules, thus improving the performance of the application. These porous polymeric materials, composed of a high water content and a cross-linked polymer network, provide a biocompatible microenvironment for enzymes, allowing the diffusion

of substrates and inhibitors through them [9–11]. However, although the aqueous medium is essential in most cases for their activity, the presence of water is not desirable for long-term storage, since the enzymes eventually lose their stability by hydrolytic degradation pathways, and aqueous medium tends to be more susceptible to bacterial contamination.

Some chemically cross-linked hydrogels can afford reversible swelling–deswelling cycles in water, returning to their original shape and mass without compromising the mechanical properties [12]. This property can be very useful in the storage of enzymes since it allows the water content of the hydrogel to be removed through different drying methods until the material is transformed into an aerogel or xerogel. If the hydration layer surrounding the protein is preserved during this process, the enzyme will maintain its activity when the hydrogel is rehydrated [13]. An example of such hydrogels are acrylamide-based hydrogels, which are biocompatible, non-carcinogenic and non-toxic [14]. Despite the interest generated by these materials, there are hardly any studies in which proteins have been immobilized in this type of hydrogels. Furthermore, the objective of these works has been more directed to characterizing and optimizing the hydrogel rather than the immobilized protein, merely to evaluate its activity [15,16].

With this in mind, we proposed to immobilize an enzyme in a hydrogel that could be dried and stored at room temperature while maintaining its properties, to be used as a portable system in order to improve its performance. The enzyme selected for the study was alkaline phosphatase (ALP), a homodimeric metalloenzyme that nonspecifically catalyzes the hydrolysis of phosphoryl esters in alkaline media and whose activity has been exploited in the design of biosensors for the direct measurement of enzyme substrates or the indirect detection of inhibitory compounds [17–21]. ALP has been previously encapsulated in 3D matrices such as sol–gel glasses, with satisfactory results [19,20]. However, these materials, in spite of their biocompatibility and protective properties, are fragile and easily breakable, which complicates their manipulation and possible miniaturization and portability. The use of acrylamide-based hydrogels is, therefore, a very interesting alternative for the immobilization of ALP. This protein is negatively charged at  $\text{pH} > 7$ , so it could be immobilized in cationic hydrogels by electrostatic interactions, without the need for covalent bonds that could affect its active site.

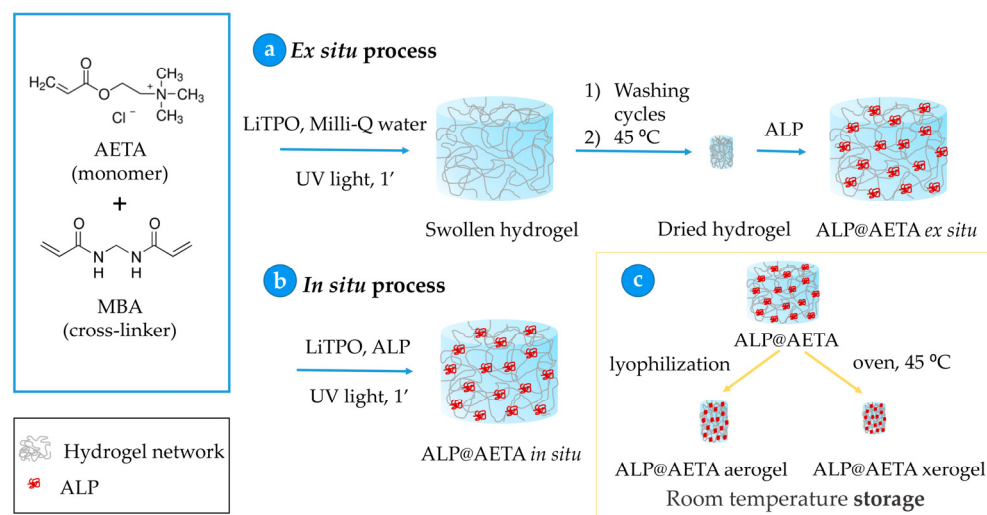
Recently, a polyacrylamide-based cationic hydrogel with high transparency and super-absorbent properties was synthesized by radical polymerization of [2-(acryloyloxy)ethyl] trimethyl-ammonium chloride (AETA) and *N,N'*-methylenebis(acrylamide) (MBA) as a cross-linker [22,23]. The hydrogel remained unaltered after several swelling–deswelling cycles and was nanostructured with graphene quantum dots to test its capacity for polyaromatic molecule sensing. Given the interesting properties of this hydrogel, in the present work we have studied its ability to immobilize ALP, exploring the conformation, stability and activity of the enzyme under different immobilization strategies to obtain the best storage conditions. The new material remains stable and functional after the drying process and subsequent rehydration, demonstrating strong interactions between the enzyme and the polymeric material. Moreover, it can be stored at room temperature for at least one month, so it could be envisaged as a portable, enzymatic system with versatile applications.

As a proof of concept, the device was used as a disposable and portable colorimetric biosensor for the detection of phosphate in water, a competitive inhibitor of ALP. The determination of this analyte is essential in environmental studies since variations in its optimum concentrations are associated with water quality. Its concentration is usually determined by conventional time-consuming analytical methods which use some carcinogenic chemicals, such as molybdenum, which are harmful to health [24,25]. Therefore, biosensors represent a promising alternative for phosphate detection, and although a large number of them have been developed so far, it is still a challenge to obtain one that allows rapid in situ determinations and that is easily usable, stable and economically viable [20,24]. In this sense, the prototype biosensor developed in this work is promising as it meets many of these requirements such as a low cost, easy handling and storage, as well as the possibility of transporting it in a miniaturized form in order to perform the determination in situ.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Immobilization of ALP in AETA Hydrogels

AETA hydrogels without and with ALP entrapped inside were fabricated as described in the Materials and Methods section (Scheme 1). The ALP-free hydrogel was generated in a few minutes under UV radiation, giving rise to a transparent matrix as shown in Figure S1a. After oven-drying for subsequent washing, the material became much more opaque and harder in consistency, making it easier to handle (Figure S1). As a first immobilization strategy (ex situ method), a weighted portion of the dried hydrogel was rehydrated in a solution containing ALP, until its complete absorption, ensuring 100% enzyme entrapment and forming the so-called ALP@AETA. As a second option (in situ method), the protein was added to the precursor, the crosslinking agent and the photoinitiator and the mixture was irradiated under the UV lamp until the ALP@AETA in situ hydrogel was formed, with the enzyme remaining entrapped inside. The hydrogel was then oven-dried at 45 °C and, after washing, a small portion was cut and rehydrated in buffer to a concentration and volume equivalent to that of the protein immobilized ex situ (approximately a cylindrical shape of 0.75 cm in diameter 1.5 cm in height). The incorporation of the protein into the hydrogel by any of the two routes did not result in visible changes in the material, which remained transparent in the hydrated state, as shown in Figure S1d, thus allowing its characterization by optical techniques.



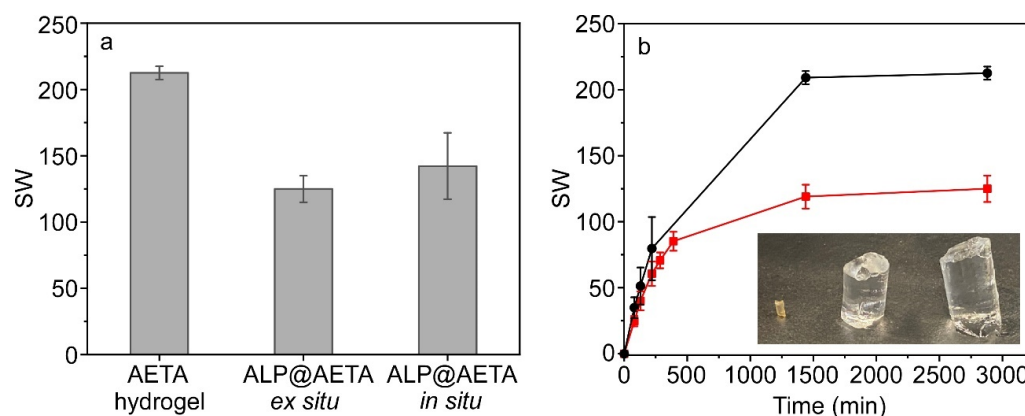
**Scheme 1.** ALP entrapped process based on the incorporation of ALP (a) ex situ and (b) in situ. (c) ALP@AETA hydrogel storage methodology.

### 2.2. Swelling Study

The rate and swelling degree of hydrogels control the diffusion and release of compounds through the polymer network. A high degree of swelling is desired for most of their applications; however, hydrogels in a fully swollen state usually demonstrate low strength and mechanical stability which limit their use. Stability can be enhanced via the addition of reinforcing units that interact with the cross-linked chains [26]. The fact that AETA hydrogel is a cationic network and ALP is negatively charged at pH 9 (its pI is ~4.8) suggests that for both ex situ and in situ immobilization methods, the enzyme remains anchored through electrostatic interactions which could affect some of the mechanical properties of the hydrogel. In order to explore this issue, the swelling behavior of hydrogels in the absence and presence of ALP (ALP@AETA in situ and ALP@AETA ex situ) was studied. Experiments were carried out as described in the Materials and Methods section by placing the three dried hydrogels in excess Milli-Q water and allowing them to swell. Water was absorbed by the hydrogel, thus increasing its weight over time, until the equilibrium swelling weight was reached (~24 h). The results show that all three hydrogels increased

greatly in volume, with respect to the dry hydrogel, demonstrating a high swelling capacity. However, the maximum swelling degree, determined from Equation (1), was clearly higher in the hydrogel without enzyme, and was very similar in the other two hydrogels, regardless of the enzyme immobilization method (Figure 1a). The swelling rate was also faster in the absence than in the presence of ALP, as shown in Figure 1b for ALP@AETA *ex situ*. The inset in Figure 1b also shows that the presence of the protein improves the robustness of the hydrogel, since, in general, the experiments showed a much easier breakage of the AETA hydrogel and more difficulty in sustaining itself.

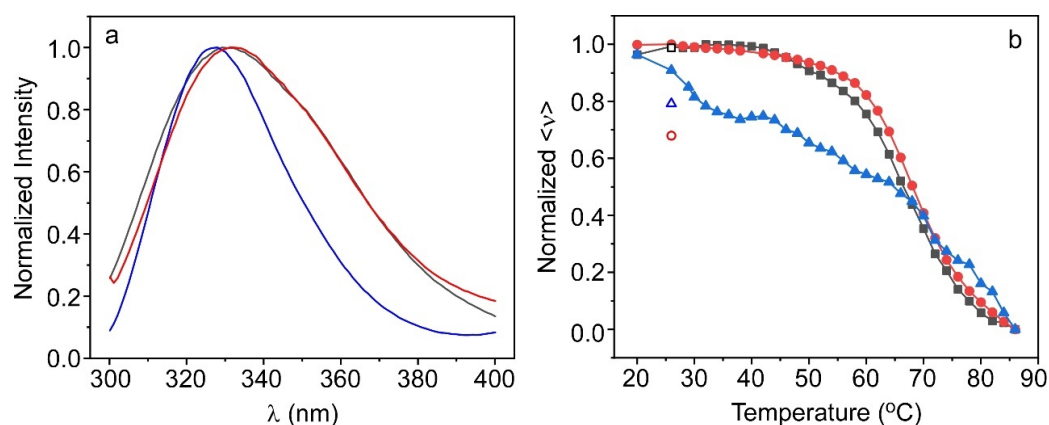
It is well known that the swelling of a hydrogel is mainly induced by the electrostatic repulsion of the ionic charges of its network [27]. In addition, hydrogen bonds can be established between the carboxylic groups of the enzyme and the amide groups of the acrylamide, resulting in a compaction of the structure that reduces the movement of the polymeric chains within the hydrogel network. Therefore, these results confirm that ALP is immobilized in the hydrogel and support the fact that the enzyme is interacting electrostatically with the cationic polymeric network, dampening cation–cation repulsions and, therefore, modifying their mechanical properties.



**Figure 1.** (a) Maximum swelling degree of AETA hydrogel, ALP@AETA *ex situ* and ALP@AETA *in situ* hydrogels (20  $\mu$ M of protein). (b) Swelling behavior of AETA (black) and ALP@AETA *ex situ* hydrogel (red). Inset: Digital image of the dried hydrogel (left), the fully swollen ALP@AETA *ex situ* (center) and AETA (right) hydrogels. Error bars stand for the standard deviation of three replicates.

### 2.3. Characterization of the Protein Inside the Hydrogel

The intrinsic fluorescence of ALP, mainly from tryptophan residues, was used to evaluate the suitability of the immobilization processes, given the high sensitivity of tryptophan fluorescence to the polarity of the local microenvironment, and thus to the conformational state of the protein [28]. According to Bortolato et al., ALP has four tryptophan residues per monomer, mostly located in hydrophobic regions of the protein [29]. Figure 2a shows the fluorescence emission spectra of the enzyme in Tris buffer and immobilized in the hydrogel by the two methodologies (ALP@AETA *in situ* and *ex situ*). For both the free enzyme and the *ex situ* immobilized enzyme, the shape of the fluorescence spectrum was almost similar, with a maximum of around 330 nm, characteristic of the protein in its native state [29]. In contrast, the spectrum of the enzyme encapsulated by the *in situ* method exhibited a narrowing of the band, suggesting that during the polymerization process, the conformation of the protein is altered, probably due to interactions with the precursors or intermediates involved in the formation of the hydrogel, which could quench some of the most exposed tryptophans. However, the fact that no red shift of the maximum is observed suggests that the protein is not unfolded and remains in a dimeric state [30]. It should be noted that circular dichroism experiments could not be carried out as a complementary tool to characterize the conformational state of the immobilized enzymes, since the hydrogel exhibited strong absorption below 270 nm.



**Figure 2.** (a) Normalized fluorescence emission spectra recorded at room temperature ( $\lambda_x = 290$  nm) and (b) evolution with temperature of the normalized mean fluorescence energy  $\langle \nu \rangle$  of ALP in solution (black), immobilized in situ (blue) and ex situ (red) in AETA hydrogels.  $\langle \nu \rangle$  values at 25 °C recorded after heat treatment are shown as empty symbols.

An experiment was performed to determine the range of appropriate enzyme concentrations to be immobilized in the hydrogel. Figure S2 shows the area under the normalized curve of the fluorescence emission spectrum of increasing concentrations of protein in solution and ALP@AETA hydrogels formed ex situ. In both cases the behavior was similar, confirming the correct immobilization of the protein. The fluorescence intensity increased up to a protein concentration of 20  $\mu\text{M}$  and above this value, it started to decrease, probably due to the effects of the inner filter and the self-absorption phenomenon [31]. Based on these results, we decided not to exceed this concentration for the rest of the experiments carried out in the work.

Changes in the fluorescence spectra of ALP were used to monitor conformational alterations of the immobilized enzyme after thermal denaturation. In the case of the ex situ immobilized enzyme, the behavior was very similar to that of free ALP, observing that, as the temperature increased, the fluorescence emission evolved towards broader, red-shifted spectra, due to the increased exposure of tryptophan to the solvent during the unfolding process. However, this effect was less pronounced for the enzyme immobilized in situ, which showed much less redshift and virtually no spectral band broadening (Figure S3).

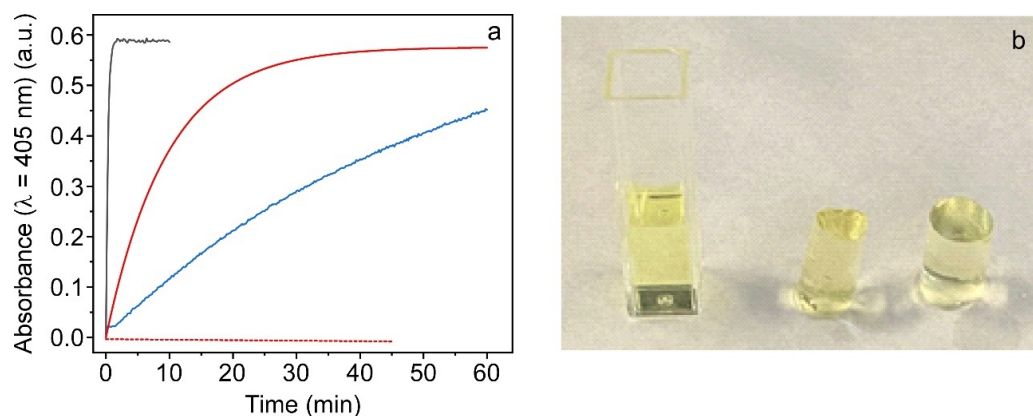
The average energy  $\langle \nu \rangle$ , which selects the spectral center of mass of intrinsic protein emission after excitation at 290 nm (see Equation (2)), allows good tracking of the thermal unfolding/folding process. For ALP in buffered medium,  $\langle \nu \rangle$  was constant up to approximately 48–50 °C (Figure 2b). Above this temperature, it decreased cooperatively, with a denaturation temperature ( $T_m$ ) of 67.3 °C, which suggests the presence of only two structurally distinct ALP conformations, without any intermediates between native and unfolding states, in agreement with results previously reported for this enzyme [29,30]. After cooling the sample, ALP refolded to its original conformation, as reflected in the values of  $\langle \nu \rangle$ , which recovered its initial value before heat treatment. In the case of the ex situ immobilized protein, behavior very similar to that found in buffer was observed, with a slightly higher  $T_m$  value (69.2 °C), which suggests a small stabilization of the protein inside the hydrogel (Table 1). However, initial  $\langle \nu \rangle$  was not recovered upon cooling, evidencing that the renaturation of ALP was incomplete. The non-reversibility of the process could be due to the fact that once unfolded, new regions of the protein become exposed to the hydrogel, so additional interactions, such as electrostatic or hydrogen bonds, can be established with the polymeric network, partially hindering the protein refolding. For the in situ immobilized ALP, however, the evolution of  $\langle \nu \rangle$  with temperature displayed non-cooperative behavior, suggesting that the enzyme denatures through folding intermediates rather than a two-state process (Figure 2b).

All these results support the hypothesis that the conformation of ALP is affected during the polymerization process, and that, therefore, the ex situ immobilization protocol seems to be more suitable than the in situ one.

### 2.3.1. Enzymatic Activity Study of Ex Situ and In Situ ALP@AETA Hydrogels

Enzyme activity was measured as described in the Materials and Methods section, monitoring the kinetics of PNP formation catalyzed by ALP (20  $\mu\text{M}$ ) in solution and ex situ and in situ ALP@AETA hydrogels, in the presence of PNPP (50  $\mu\text{M}$ ). Absorbance measurements in the hydrogel were carried out at 405 nm by placing a freshly prepared hydrogel inside the cuvette and then adding the PNPP solution, which was completely absorbed by the hydrogel. The appearance of the yellow coloration in the three hydrogels characteristic of PNP formation was indicative of enzyme activity, although the kinetics of formation differed between the three preparations (Figure 3). For ALP in solution, the absorbance of PNP reached its maximum value at  $\sim 1$  min, while for ex situ ALP@AETA, the reaction was not completed until  $\sim 40$  min of incubation. This slowing down of the kinetics was expected and can be attributed to diffusion restrictions imposed by the polymeric network, which limit the accessibility of PNPP to the active center of the enzyme, rather than a loss of its activity. Similar behavior has been observed for ALP immobilized in sol-gel matrices [20]. The results obtained for in situ ALP@AETA were different since, although the product was formed, the reaction was not completed even after 60 min of incubation, suggesting that the active center of most of the immobilized proteins is hardly or not at all accessible to the substrate, and/or that the conformational changes that take place during the hydrogel formation probably alter the active center shape, inactivating the immobilized enzyme.

Taking into account both the enzymatic activity and conformational stability results, we selected the ex situ protocol to immobilize ALP in the AETA hydrogel, so in the rest of the experiments shown in this work, we will refer to the hydrogel containing the enzyme as ALP@AETA, without specifying the synthetic method.



**Figure 3.** (a) Kinetics of PNP production by ALP in solution (black), ex situ (red) and in situ (blue) ALP@AETA hydrogels in 50  $\mu\text{M}$  PNPP presence. The dashed red line represents a hydrogel in the absence of ALP to which PNPP has been added. (b) Comparison of the visual appearance of ALP in solution, ALP@AETA ex situ and in situ hydrogels (from left to right) after incubation with 50  $\mu\text{M}$  PNPP for 20 min.

### 2.3.2. ALP@AETA Stability Study

In order to test whether the enzyme, once immobilized in the hydrogel, remained stable over time, the fluorescent properties (emission spectra and thermal behavior) of freshly prepared ALP@AETA hydrogels were analyzed for one month. For this purpose, three identical matrices were stored hydrated in the fridge at 4  $^{\circ}\text{C}$ , each of which was analyzed on different days: the first one was analyzed the day after its preparation and the other ones 21 and 30 days afterwards. The results were compared with those obtained for



ALP in solution at the same time periods (Table 1). For both systems, both fluorescence spectra and thermal denaturation curves showed the same behavior during the month of storage, thus maintaining the cooperativity of the unfolding process (Figure S4).

**Table 1.** Denaturation temperatures ( $T_m$ ) of free ALP and freshly prepared ALP@AETA hydrogels as a function of storage time at 4 °C and at room temperature for ALP@AETA xerogel. Standard deviation was determined from three trials.

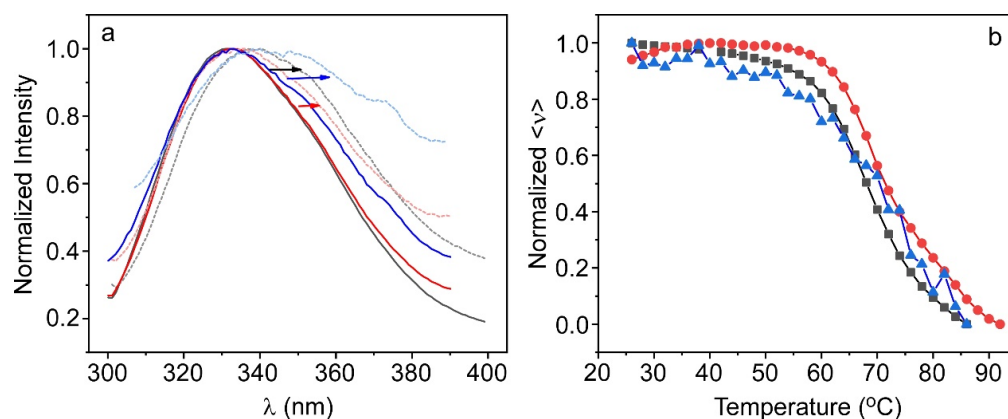
t (days)	ALP Solution	$T_m$ (°C) $\pm$ SD	
		ALP@AETA	ALP@AETA Xerogel
1	67.3 $\pm$ 0.2	69.2 $\pm$ 0.2	72.4 $\pm$ 0.5
21	67.8 $\pm$ 0.4	69.6 $\pm$ 0.2	
30	68.5 $\pm$ 0.4	68.9 $\pm$ 0.3	70.0 $\pm$ 0.7

#### 2.4. ALP@AETA Storage

Storage stability of immobilized enzymes is essential for their practical applications. The results of the previous section indicate that ALP@AETA hydrogels can be stored hydrated at 4 °C for at least one month without altering either the enzyme conformation or its thermal stability. However, a hydrated hydrogel is much more unfriendly to handle than a dry hydrogel, is more difficult to transport, takes up more space and must be kept in the fridge to minimize hydrolysis processes and possible bacterial contamination. Therefore, in order to facilitate the handling and potential application of ALP@AETA, we explore the feasibility of storing the material at room temperature as a dry hydrogel. For this purpose, a long cylindrical-shaped hydrogel, as that shown in Figure S1a, was prepared and swollen with ALP. After washing, two dehydration methods were evaluated for its storage: slow drying in an air oven at 45 °C, to avoid thermal denaturation of the protein, thus obtaining an ALP@AETA xerogel; or freeze-drying to obtain an ALP@AETA aerogel. Once dry, the two materials had a solid aspect quite similar to that shown in Figure S1c, although the appearance of the aerogel was more porous and less compact than that of the xerogel.

ALP@AETA xerogel and ALP@AETA aerogel were kept at room temperature and, after three days, two equal-weight portions (~0.07 g) were cut from each of them, rehydrated in buffer and placed in a quartz cuvette for subsequent fluorescence analysis. Figure 4 compares the fluorescence spectra as well as the thermal denaturation curve of both preparations with those obtained for a freshly prepared ALP@AETA hydrogel, not subjected to any drying process. The fluorescence spectrum of the rehydrated ALP@AETA xerogel was similar to that recorded for the freshly prepared ALP@AETA, although upon thermal denaturation, the redshift of the spectrum was slightly higher in the rehydrated xerogel. More notable differences were observed in the emission spectrum of the rehydrated aerogel, as it red-shifted at room temperature. Moreover, the spectrum recorded after the heat treatment greatly lowered the fluorescence signal and changed considerably in shape (Figure 4a). As for the thermal denaturation curves shown in Figure 4b, the results obtained with the rehydrated aerogel showed much variability and a small loss of cooperativity, while in the case of the xerogel, the cooperativity was maintained and a slight stabilization of the enzyme was observed, obtaining a  $T_m = 72.4 \pm 0.5$  °C (Table 1).

These results suggest that the drying process influences the conformation of the protein, so that the oven-drying treatment preserves the conformation of ALP and even slightly increases its stability, while the freeze-drying process partially induces the denaturation of the enzyme.

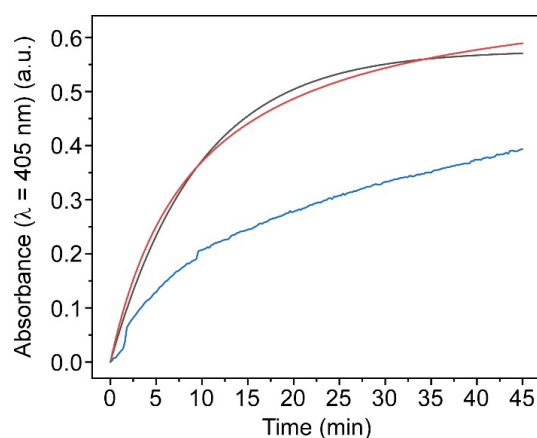


**Figure 4.** (a) Normalized fluorescence emission spectra ( $\lambda_x = 290$  nm) of freshly prepared ALP@AETA hydrogel (black), rehydrated ALP@AETA xerogel (red) and rehydrated ALP@AETA aerogel (blue) at room temperature (solid lines) and at 86 °C (dashed lines). (b) Evolution of the mean fluorescence energy  $\langle \nu \rangle$  of hydrated (black squares), post-drying (red circles) and post-lyophilized (blue triangles) ALP@AETA hydrogel.

#### 2.4.1. Enzymatic Activity of ALP@AETA Aerogel and Xerogel

Thermal stability studies suggest that in contrast to expectations, it should be better to store ALP@AETA hydrogel as a xerogel rather than as an aerogel. To confirm this assumption, enzyme activity was measured in both ALP@AETA aerogel and xerogel and the results were compared with those of a freshly prepared hydrogel. As is shown in Figure 5, the kinetics of formation of PNP in ALP@AETA hydrogel and ALP@AETA xerogel showed the same pattern, reaching a plateau after ~40 min of incubation. However, the results obtained for ALP@AETA aerogel were different since, although the formation of PNP was observed, the reaction was much slower and only ~60% of substrate was transformed after 40 min. This result agrees with the fluorescence study which suggests changes in the conformation and denaturation of ALP after hydrogel freeze-drying. Moreover, the result is also in agreement with those obtained previously for ALP, which reports that, although it can be considered a freeze-tolerant enzyme, the combined freeze-drying process causes a loss of activity whose effects can be minimized by the addition of different additives, such as carbohydrates or other proteins [32].

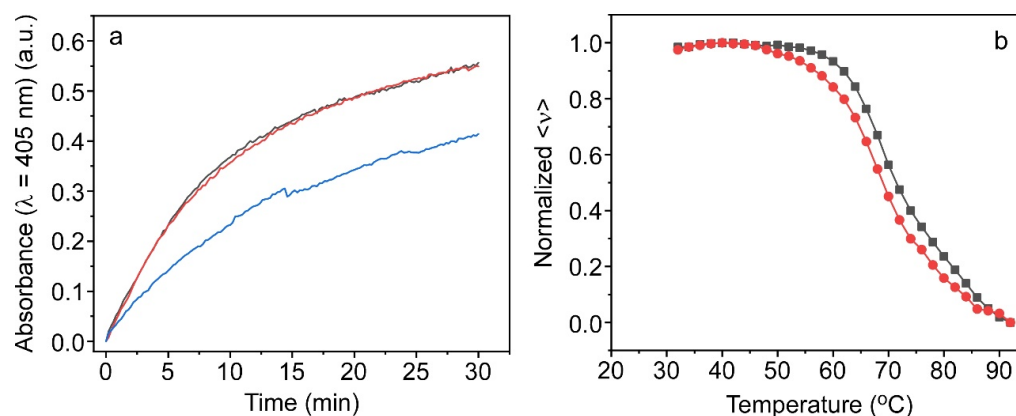
In view of these results, ALP@AETA xerogel was selected as the most suitable material for storing the enzyme, discarding ALP@AETA aerogel.



**Figure 5.** Kinetics of PNP production by alkaline phosphatase in ALP@AETA hydrogel (black), xerogel (red) and aerogel (blue) in 50  $\mu$ M PNPP presence. Samples were placed in quartz cuvettes of 1 cm path length and absorbance values were collected as a function of time at 405 nm.

#### 2.4.2. ALP@AETA Xerogel Storage

As was described in the Introduction, one of the main objectives of this work is to obtain an easily manipulable material that is able to incorporate and maintain the structural and functional properties of the enzyme at room temperature, so it can be cut into small slices and taken out of the laboratory for further applications. To this end, we tested whether, after one month of storage as ALP@AETA xerogel, the enzyme remained stable and active. The study was similar to those performed previously. On the one hand, the kinetics of PNP formation was monitored and, on the other hand, the thermal denaturation curve was recorded (Figure 6). The results show that both behaviors, activity and thermal stability, were similar to those obtained for the freshly prepared xerogel, confirming the suitability of storage at room temperature. The only difference was that the recovered  $T_m$  value (70 °C) shifted slightly to a lower temperature but was still higher than that of ALP in buffer (Table 1). Finally, we explored whether an ALP@AETA xerogel, which had been stored in the laboratory for 18 months at room temperature, still maintained enzyme activity. The result, included in Figure 6a, shows that after this period of time, the enzyme lost about 30% of its activity, although its remaining activity allows it to be used in inhibition assays.

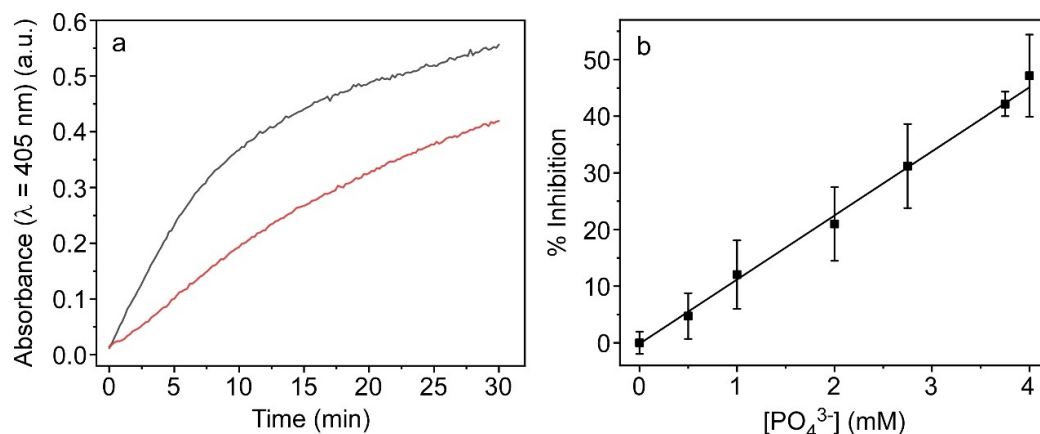


**Figure 6.** (a) Kinetics of PNP production by ALP@AETA freshly prepared xerogel (black), after a month (red) and after 18 months (blue) stored at room temperature. Samples were placed in quartz cuvettes of 1 cm path length and absorbance values were collected as a function of time at 405 nm. (b) Evolution of the mean fluorescence energy  $\langle v \rangle$  of ALP@AETA xerogels before (black squares) and after a month stored at room temperature (red circles).

#### 2.5. Application: Phosphate Detection

Once the stability of the ALP@AETA xerogel was confirmed, we considered the possibility of using the new material as a disposable colorimetric biosensor for the detection of ALP inhibitors. For this purpose, two identical slices of AETA@ALP xerogel (~0.07 g) were placed in cuvettes and both were swollen first with 0.9 mL of buffer and then with 0.9 mL of a 50  $\mu$ M PNPP solution which, for one of the cuvettes, also contained 4 mM phosphate ion, a competitive inhibitor of ALP. The formation of PNP was then monitored as a function of time (Figure 7a). The results show a drastic reduction in the rate of PNP formation upon phosphate addition, indicating that AETA@ALP detects the presence of the ion and thus confirms its ability to detect ALP inhibitors. The sensitivity of the biosensor to phosphate ion was also studied. For this experiment, slices of ALP@AETA xerogels were swollen in a buffered solution containing different concentrations of phosphate ion (between 0 and 4 mM). Then, 50  $\mu$ M PNPP was added and the absorbance value at 405 nm was measured in the hydrogel after 10 min incubation and plotted as % inhibition as a function of inhibitor concentration (Figure 7b). The plot was linear in the range of concentrations tested (up to 4 mM), with a limit of detection (LOD) of 511  $\mu$ M, calculated from the following equation:  $LOD = 3\sigma/S$ , where S is the slope of the calibration curve and  $\sigma$  is the standard deviation of the blank. It is interesting to note that, although enzyme

biosensors with a higher sensitivity to phosphate have been published in the literature (see, for example, [33,34]), one of the main advantages of the present biosensor is that it offers the possibility to perform rapid measurements of ALP inhibitors easily and at low cost outside the laboratory, using a sustainable methodology that can be extrapolated to other enzyme biosensors.



**Figure 7.** (a) PNP production kinetics measured in ALP@AETA after its immersion in a 50  $\mu\text{M}$  PNPP solution in the absence (black line) and presence (red line) of the phosphate ion inhibitor (4 mM). Samples were placed in quartz cuvettes of 1 cm path length and absorbance values were collected as function of time at 405 nm. (b) % Inhibition obtained for ALP@AETA in the absence and presence of different concentrations of phosphate ion after 10 min of incubation. Error bars stand for the standard deviation of three replicates.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Materials and Reagents

[2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride hydrogels were synthesized by the radical polymerization of [2-(acryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride solution (AETA) in the presence of *N,N'*-methylenebis(acrylamide) (MBA) as the crosslinking agent and 2,4,6-lithium trimethylbenzoylphenylphosphine (LiTPO) as the photoinitiator, all purchased from Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, Spain). The enzyme alkaline phosphatase (ALP) (EC 3.1.3.1; from bovine intestinal mucosa; lyophilized powder;  $M_w = 140,000 \text{ Da}$ ), the substrate p-nitrophenyl phosphate (PNPP) and the enzyme inhibitor dibasic sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) were purchased from Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, Spain). Stock solutions of ALP, PNPP and phosphate were prepared in Tris buffer (55 mM, pH 9) and stored at 4  $^\circ\text{C}$  at 45.1  $\mu\text{M}$ , 2 mM and 10 mM, respectively. Tris buffer (55 mM, pH 9) was prepared by mixing Tris base and hydrochloric acid with twice-distilled and deionized water using Milli-Q equipment (Millipore, Madrid, Spain). All other solvents were of spectroscopic or analytical reagent grade (Uvasol, Merck).

#### 3.2. Synthesis of [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammonium Chloride Hydrogels

Following the protocol previously described by Naranjo et al. [23], hydrogels were synthesized by photopolymerization of the cationic monomer AETA using MBA as the chemical crosslinking agent and LiTPO as the photoinitiator. In a typical experiment, 5.66 mL of AETA (26.4 mmol) and 0.01 g of MBA (0.06 mmol) were added to 5 mL of twice-distilled and deionized water. Finally, LiTPO (0.02 g, 0.06 mmol) was added to the monomer mixture. It was homogenized by gentle stirring under dark conditions. Then, 1 mL of the mixture was drawn through a disposable syringe and then exposed to UV light ( $\lambda = 335 \text{ nm}$ ) for 1 min. Finally, the tip of the syringe was cut off and the formed hydrogel of cylindrical shape was removed. The resulting material (0.3 cm diameter, 5 cm size) was immersed in twice-distilled and deionized water for 5 days, changing the water every day

to remove any unreacted precursor. The washed hydrogel polymer network was then dried by heating in an oven at 45 °C for 48 h.

### 3.3. ALP Immobilization in AETA Hydrogels

ALP was immobilized in AETA hydrogels using a procedure similar to the one previously described but in two different ways: in situ and ex situ incorporation of the enzyme into the hydrogel. For most characterization experiments, the final enzyme concentration was 20 µM. After immobilization, the hydrogel was washed by water immersion and these washing water fractions were analyzed by fluorescence. In no case was protein residue found, so it is assumed that the protein was retained at 100%, regardless of the immobilization method.

- Ex situ process: Embedding ALP into the hydrogel. In this process, the previously washed and dried AETA hydrogel prepared by the above methods was immersed in ALP solution for 24 h and stored at 4 °C. This step allows loading ALP from the enzymatic solution into the hydrogel network to form ALP@AETA (Scheme 1a).
- In situ process: Incorporation of ALP into the hydrogel. Milli-Q water was replaced as solvent by 5 mL of ALP buffered solution before the polymerization process started. After irradiation with UV light, ALP@AETA hydrogels were obtained (Scheme 1b).

Finally, to facilitate handling and storage at room temperature, ALP@AETA aerogels or xerogels were prepared by removing the aqueous content by freeze-drying or by heating in an oven (45 °C, 48 h), respectively (Scheme 1c).

### 3.4. Swelling Measurements

Swelling measurements were performed in triplicate on oven-dried hydrogels (about 0.07 g, 0.3 cm diameter, 0.6 cm size) in the absence and presence of enzyme, either using ex situ or in situ methodology. The dried hydrogels were immersed in excess Milli-Q water and stored at room temperature. The initial weight of each sample was recorded and successive measurements were taken over time as it swelled until the weight remained stable. The swelling degree (SW) was determined by applying the formula:

$$SW = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad (1)$$

where  $W_t$  is the weight of the hydrogel at time  $t$  and  $W_0$  is the initial weight of the dry hydrogel.

### 3.5. Fluorescence Measurements

Fluorescence spectra measurements, both in solution and in hydrogel, were performed by placing the samples in 10 × 10 mm quartz cuvettes using a PTI-QuantaMaster spectrofluorometer (PTI, Birmingham, NJ, USA) interfaced with a Peltier cell. Emission spectra were acquired with an excitation wavelength of 290 nm. The fluorescence intensity of the blanks (hydrogel without protein) was checked and subtracted from the samples. For thermal denaturation experiments, heating rates of 5 °C min<sup>-1</sup> and stabilization times of 30 s at each temperature were selected. Changes in the intrinsic fluorescence of ALP as a function of temperature were quantified as changes in the average energy of emission (spectral center of mass,  $\langle \nu \rangle$ ) calculated according to Equation (2):

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum_i F_i \nu_i}{\sum_i F_i} \quad (2)$$

where  $F_i$  stands for fluorescence emitted at wavenumber  $\nu_i$  [35]. The thermal denaturation temperature  $T_m$  of ALP was calculated by plotting the first derivative of the thermal denaturation curve. The final  $T_m$  value corresponds to the mean of three samples.

### 3.6. Colorimetric Activity Assay

ALP activity assays both in solution and in hydrogel were carried out in triplicate by colorimetry based on the production of p-nitrophenol (PNP), a product of the ALP-catalyzed hydrolysis reaction of PNPP, using a model UV–2700 spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) at room temperature. Samples were placed in quartz cuvettes of 1 cm path length. Absorbance values were collected as a function of time at 405 nm since PNP shows a strong absorption peak, maintaining a constant concentration of PNPP (50  $\mu$ M).

## 4. Conclusions

In this work, we have prepared a 3D enzyme–hydrogel composite, ALP@AETA, by anchoring alkaline phosphatase ALP in a cationic crosslinked network using a green protocol. The developed material showed a high swelling capacity, resulting in a robust and transparent matrix that allowed the characterization of the immobilized enzyme by monitoring its intrinsic fluorescence. Two immobilization strategies were examined, where the ex situ methodology was found to be the most suitable since the conformational state of ALP showed minimal differences with respect to the enzyme in solution. ALP@AETA hydrogels could be stored dry at room temperature in the form of xerogels. Storage also induced additional stability of the enzyme, which slightly shifted its denaturation temperature to higher values. The xerogel could be easily manipulated and cut into small, easily transportable pieces, which were swollen with the substrate to perform colorimetric enzyme assays. As a proof of concept, the device was tested as a portable optical biosensor for the detection of phosphate ion with satisfactory results, such as the possibility to perform rapid measurements of ALP inhibitors easily and at low cost outside the laboratory, using a sustainable methodology. This methodology could be extended to the fabrication of other biosensors of interest, as well as to the storage and delivery of therapeutic enzymes.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24032672/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.R.M. and M.J.M.-T.; methodology, C.R.M., Y.A., R.E. and M.A.H.; validation, Y.A. and M.J.M.-T.; formal analysis, Y.A. and M.J.M.-T.; investigation, M.J.M.-T., Y.A., R.E. and M.A.H.; resources, C.R.M. and M.A.H.; writing—original draft preparation, C.R.M., M.J.M.-T. and Y.A.; writing—review and editing, C.R.M., Y.A., R.E. and M.J.M.-T.; visualization, M.J.M.-T. and Y.A.; supervision, C.R.M. and M.J.M.-T.; project administration, C.R.M.; funding acquisition, C.R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (TED2021-129894B-I00.). The study forms part of the Advanced Materials programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and Generalitat Valenciana (MFA/2022/058).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data reported in the study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Singh, R.K.; Tiwari, M.K.; Singh, R.; Lee, J.K. From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1232–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulouse, A.J.; Bohlmann, G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6437–6474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Alacid, Y.; Martínez-Tomé, M.J.; Mateo, C.R. Reusable Fluorescent Nanobiosensor Integrated in a Multiwell Plate for Screening and Quantification of Antidiabetic Drugs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 25624–25634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Nguyen, H.H.; Lee, S.H.; Lee, U.J.; Fermin, C.D.; Kim, M. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials* **2019**, *12*, 121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Vellard, M. The enzyme as drug: Application of enzymes as pharmaceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 444–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ribeiro, L.M.O.; Falleiros, L.N.S.S.; de Resende, M.M.; Ribeiro, E.J.; Almeida, R.M.R.G.; da Silva, A.O.S. Immobilization of the enzyme invertase in SBA-15 with surfaces functionalized by different organic compounds. *J. Porous Mater.* **2019**, *26*, 77–89. [[CrossRef](#)]
7. Bolivar, J.M.; Woodley, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 6251–6290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Guisan, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Rocha-Martin, J.; Moreno-Gamero, D. Enzyme immobilization strategies for the design of robust and efficient biocatalysts. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2022**, *35*, 100593. [[CrossRef](#)]
9. Datta, S.; Christena, L.R.; Rajaram, Y.R. Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **2013**, *3*, 1–9. [[CrossRef](#)]
10. Baruch-Shpigler, Y.; Avnir, D. Enzymes in a golden cage. *Chem. Sci. J.* **2020**, *11*, 3965–3977. [[CrossRef](#)]
11. Maldonado, N.; Amo-Ochoa, P. Advances and Novel Perspectives on Colloids, Hydrogels, and Aerogels Based on Coordination Bonds with Biological Interest Ligands. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bustamante-Torres, M.; Romero-Fierro, D.; Arcentales-Vera, B.; Palomino, K.; Magaña, H.; Bucio, E. Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials. *Gels* **2021**, *7*, 182. [[CrossRef](#)]
13. Bordbar-Khiabani, A.; Gasik, M. Smart Hydrogels for Advanced Drug Delivery Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sennakesavan, G.; Mostakhdemin, M.; Dkhar, L.K.; Seyfoddin, A.; Fatihhi, S.J. Acrylic acid/acrylamide based hydrogels and its properties—A review. *Polym. Degrad. Stab.* **2020**, *180*, 109308. [[CrossRef](#)]
15. Schmiege, B.; Schimek, A.; Franzreb, M. Development and performance of a 3D-printable poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogel suitable for enzyme entrapment and long-term biocatalytic applications. *Eng. Life. Sci.* **2018**, *18*, 659–667. [[CrossRef](#)]
16. Meyer, J.; Meyer, L.E.; Kara, S. Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. *Eng. Life Sci.* **2022**, *22*, 165–177. [[CrossRef](#)]
17. Millán, J.L. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 335–341. [[CrossRef](#)]
18. Jornet-Martínez, N.; Campíns-Falcó, P.; Hall, E.A.H. Zein as biodegradable material for effective delivery of alkaline phosphatase and substrates in biokits and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *86*, 14–19. [[CrossRef](#)]
19. García Sánchez, F.; Navas Díaz, A.; Ramos Peinado, M.C.; Belledone, C. Free and sol-gel immobilized alkaline phosphatase-based biosensor for the determination of pesticides and inorganic compounds. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *484*, 45–51. [[CrossRef](#)]
20. Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M.J.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Fluorescent Biosensor for Phosphate Determination Based on Immobilized Polyfluorene-Liposomal Nanoparticles Coupled with Alkaline Phosphatase. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 136–144. [[CrossRef](#)]
21. Alacid, Y.; Quintero Jaime, A.F.; Martínez-Tomé, M.J.; Mateo, C.R.; Montilla, F. Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels. *Biosensors* **2022**, *12*, 698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Martín-Pacheco, A.; Del Río Castillo, A.E.; Martín, C.; Herrero, M.A.; Merino, S.; García Fierro, J.L.; Díez-Barra, E.; Vázquez, E. Graphene Quantum Dot–Aerogel: From Nanoscopic to Macroscopic Fluorescent Materials. Sensing Polyaromatic Compounds in Water. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 18192–18201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Naranjo, A.; Martín, C.; López-Díaz, A.; Martín-Pacheco, A.; Rodríguez, A.M.; Patiño, F.J.; Herrero, M.A.; Vázquez, A.S.; Vázquez, E. Autonomous self-healing hydrogel with anti-drying properties and applications in soft robotics. *Appl. Mater. Today* **2020**, *21*, 100806. [[CrossRef](#)]
24. Upadhyay, L.S.B.; Verma, N. Recent advances in phosphate biosensors. *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 1335–1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rahman, M.A.; Park, D.-S.; Chang, S.-C.; McNeil, C.J.; Shim, Y.-B. The biosensor based on the pyruvate oxidase modified conducting polymer for phosphate ions determinations. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1116–1124. [[CrossRef](#)]
26. Kumru, B.; Shalom, M.; Antonietti, M.; Schmidt, B.V.K.J. Reinforced Hydrogels via Carbon Nitride Initiated Polymerization. *Macromolecules* **2017**, *50*, 1862–1869. [[CrossRef](#)]
27. Ibrahim, A.G.; Hai, F.A.; Wahab, H.A.E.; Mahmoud, H. Synthesis, Characterization, Swelling Studies and Dye Removal of Chemically Crosslinked Acrylic Acid/Acrylamide/N,N-Dimethyl Acrylamide Hydrogels. *Am. J. Appl. Chem.* **2016**, *4*, 221. [[CrossRef](#)]
28. Royer, C.A. Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769–1784. [[CrossRef](#)]
29. Bortolato, M.; Besson, F.; Roux, B. Role of metal ions on the secondary and quaternary structure of alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa. *Proteins* **1999**, *37*, 310–318. [[CrossRef](#)]
30. Dumitrașcu, L.; Stănciuc, N.; Aprodu, I.; Ciuciu, A.-M.; Alexe, P.; Bahrim, G.E. Monitoring the heat-induced structural changes of alkaline phosphatase by molecular modeling, fluorescence spectroscopy and inactivation kinetics investigations. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 6290–6300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Panigrahi, S.K.; Mishra, A.K. Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2019**, *41*, 100318. [[CrossRef](#)]

32. Shimizu, T.; Korehisa, T.; Imanaka, H.; Ishida, N.; Imamura, K. Characteristics of proteinaceous additives in stabilizing enzymes during freeze-thawing and -drying. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2017**, *81*, 687–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cui, J.; Ogabiela, E.E.; Hui, J.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Tong, L.; Zhang, J.; Adeloju, S.B.; Zhang, X.; Wu, Y. Electrochemical Biosensor based on Pt/Au Alloy Nanowire Arrays for Phosphate Detection. *J. Electrochem. Soc.* **2015**, *162*, B62. [[CrossRef](#)]
34. Karthikeyan, R.; Berchmans, S. Inorganic-Organic Composite Matrix for the Enzymatic Detection of Phosphate in Food Samples. *J. Electrochem. Soc.* **2013**, *160*, B73. [[CrossRef](#)]
35. Esquembre, R.; Sanz, J.M.; Wall, J.G.; del Monte, F.; Mateo, C.R.; Ferrer, M.L. Thermal unfolding and refolding of lysozyme in deep eutectic solvents and their aqueous dilutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 11248–11256. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



# SUPPLEMENTARY MATERIAL

## Portable alkaline phosphatase-hydrogel platform: from enzyme characterization to phosphate sensing

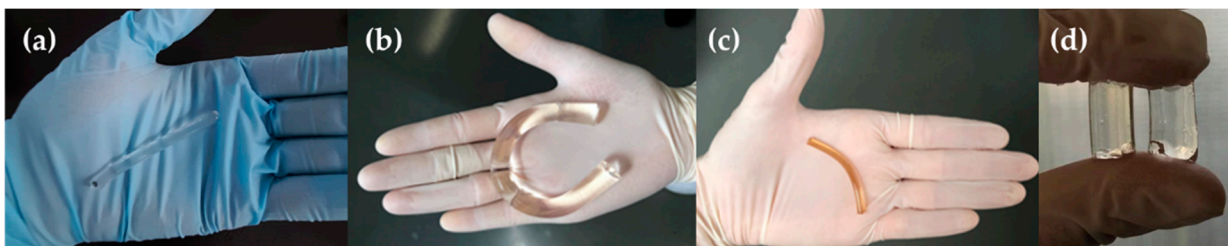
Yolanda Alacid <sup>1</sup>, María José Martínez-Tomé <sup>1</sup>, Rocio Esquembre <sup>1</sup>, Maria Antonia Herrero <sup>2</sup>  
and C. Reyes Mateo <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE),  
Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), 03202 Elche, Alicante, Spain.

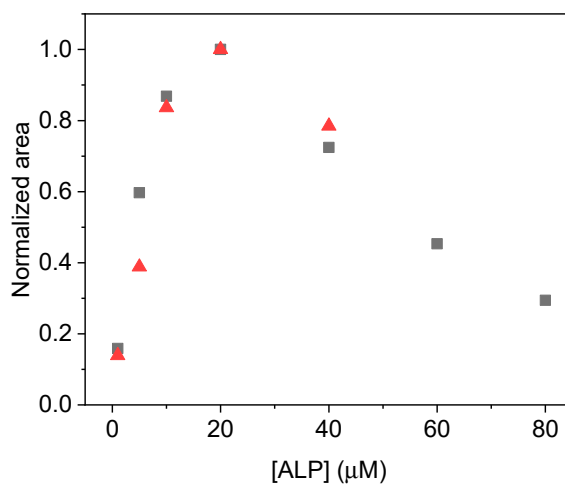
<sup>2</sup> Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), 13071 Ciudad Real, Spain.

\* Correspondence: [rmateo@umh.es](mailto:rmateo@umh.es)

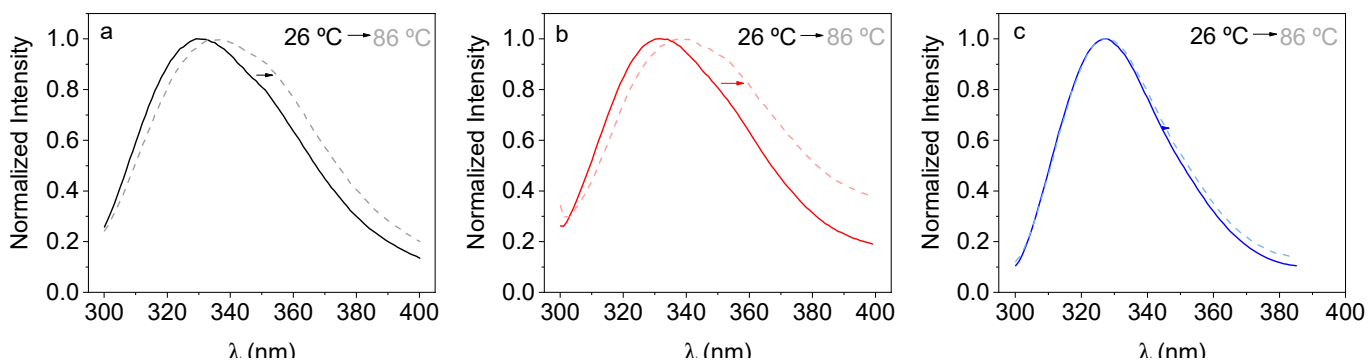
**KEYWORDS:** Hydrogel; alkaline phosphatase; immobilization, biosensor, portable device,  
protein thermal stability



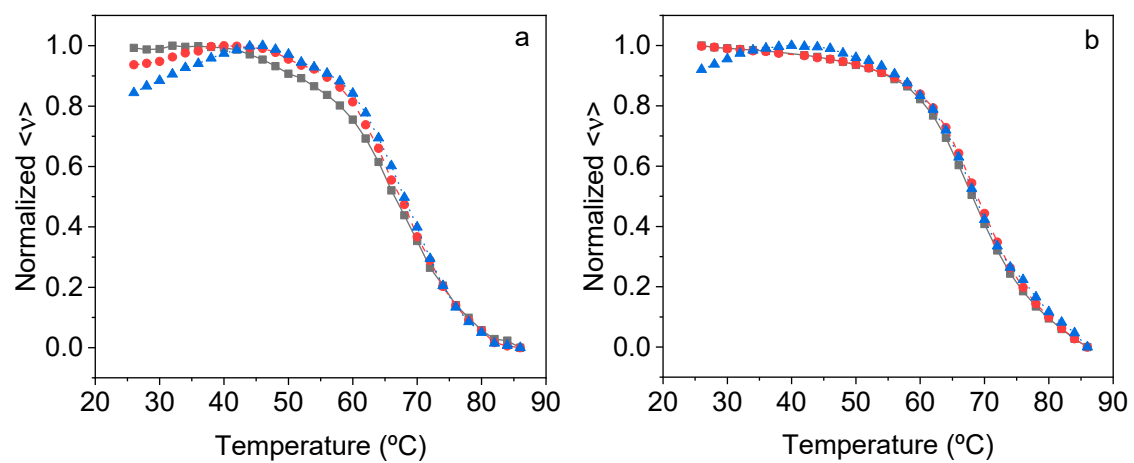
**Figure S1.** Digital image of (a) freshly prepared, (b) swollen, (c) oven-dried AETA hydrogel and (d) cylindrical-shaped swollen *in situ* (left) and *ex situ* (right) ALP@AETA hydrogels (0.75 cm diameter, 1.5 cm of size and 0.9 mL of solution inside).



**Figure S2.** Area under the normalized curve of fluorescence emission spectra ( $\lambda_x = 290$  nm;  $\lambda_{em} = 300-400$  nm) of increasing concentrations of ALP in solution (black dots) and immobilized in the hydrogel (red triangle).



**Figure S3.** Normalized fluorescence emission spectra of ALP in buffered solution (a), *ex situ* (b) and *in situ* (c) immobilization in hydrogel at 26 °C (solid lines) and 86 °C (dashed lines).



**Figure S4.** Evolution of the mean fluorescence energy  $\langle \nu \rangle$  of ALP in solution (a) and *ex situ* ALP@AETA (b) samples after 1 (■), 21 (●), 30 (▲) days stored at 4°C.



## Artículo 7.4.

# Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels

Yolanda Alacid <sup>1</sup>, Andrés F. Quintero Jaime <sup>2</sup>, María José Martínez-Tomé <sup>1</sup>, C. Reyes  
Mateo <sup>1</sup>, Francisco Montilla <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche,  
Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain.

<sup>2</sup> Departamento de Química Física and Instituto Universitario de Materiales de Alicante  
(IUMA), Universidad de Alicante, Carretera San Vicente s/n, 03690 Alicante, Spain

*Biosensors*, 2022, 12(9), 698

doi: [doi.org/10.3390/bios12090698](https://doi.org/10.3390/bios12090698)

Factor de impacto: 5.4



Communication

# Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels

Yolanda Alacid <sup>1</sup>, Andrés F. Quintero Jaime <sup>2</sup> , María José Martínez-Tomé <sup>1</sup>, C. Reyes Mateo <sup>1</sup>   
and Francisco Montilla <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Avenida de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Química Física and Instituto Universitario de Materiales de Alicante (IUMA), Universidad de Alicante, Carretera San Vicente s/n, 03690 Alicante, Spain

\* Correspondence: francisco.montilla@ua.es

**Abstract:** The present work describes the development of an easy-to-use portable electrochemical biosensor based on alkaline phosphatase (ALP) as a recognition element, which has been immobilized in acrylamide-based hydrogels prepared through a green protocol over disposable screen-printed electrodes. To carry out the electrochemical transduction, an electroinactive substrate (hydroquinone diphosphate) was used in the presence of the enzyme and then it was hydrolyzed to an electroactive species (hydroquinone). The activity of the protein within the matrix was determined voltammetrically. Due to the adhesive properties of the hydrogel, this was easily deposited on the surface of the electrodes, greatly increasing the sensitivity of the biosensor. The device was optimized to allow the determination of phosphate ion, a competitive inhibitor of ALP, in aqueous media. Our study provides a proof-of-concept demonstrating the potential use of the developed biosensor for in situ, real-time measurement of water pollutants that act as ALP inhibitors.

**Keywords:** electrochemical sensor; acrylamide matrix; voltammetric detection; ALP; phosphate inhibitor



**Citation:** Alacid, Y.; Quintero Jaime, A.F.; Martínez-Tomé, M.J.; Mateo, C.R.; Montilla, F. Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels. *Biosensors* **2022**, *12*, 698. <https://doi.org/10.3390/bios12090698>

Received: 30 June 2022

Accepted: 26 August 2022

Published: 29 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Alkaline phosphatase (ALP) is a superfamily of very stable and inexpensive metalloenzymes abundantly present in nature. ALP belongs to the group of hydrolases and catalyses the cleavage of phosphoric acid esters releasing the corresponding alcohol and inorganic phosphate. Its active site is electrostatically flexible, with large polar surfaces, which satisfy the requirements for hydrolysis of a wide range of substrates [1]. This promiscuity in substrate recognition and consequently low biocatalytic selectivity, together with its abundance in nature and its physiological role of dephosphorylating compounds, have made ALP activity assessments one of the most widely performed enzyme assays today [2].

ALP is applied in chemical analysis for solving a wide variety of analytical problems. It can be used as a clinical biomarker, since changes in its catalytic activity can be related to pathological situations such as hepatitis, different bone diseases, prostate cancer, etc. It is also widely used in the design of immunosensors and biosensors, either for direct monitoring of analytes (substrates) or for indirect monitoring of inorganic and organic compounds (i.e., heavy metals, herbicides, pesticides, and different biologically active metabolites) which act as inhibitors [3–7]. This second approach is particularly suitable for the screening of drugs or for environmental applications when there is a need for rapid assessment of water quality and real-time warning of water quality decline.

The selection of the substrate for these analytical applications depends mainly on the type of transducer used. Examples of ALP substrates and ALP bioassays strategies

include colorimetric, fluorometric, chemiluminescent, and electrochemical techniques among others [8]. Many of these sensing schemes often involve high economic and time costs, as they include several steps and the use of reactants, which can sometimes be very expensive and must be used in a laboratory by specialized personnel. However, for many of the above applications, simpler, cheaper, faster, and more portable devices are needed to enable urgent decisions to be made in real time.

The immobilization of ALP in these sensing devices has the advantage of ease of handling and the possibility of miniaturization, allowing in situ measurements. Silica matrices prepared by the sol-gel process are most often used to immobilize enzymes with very satisfactory results, especially in electrochemical and optical biosensor development [9–11]. This methodology has been used in the past to immobilize ALP to develop fluorescent biosensors capable of detecting enzyme inhibitors such as pesticides and phosphate [12,13]. Although the sol-gel process provides a versatile technology, with high biocompatibility and protective properties, one of its main limitations is the low flexibility and extreme fragility (easy breakage) of the matrices, which limits their manipulation, possible miniaturization, and their ability to adapt to any situation and application.

The use of organic hydrogels based on polyimide or methacrylate among other “soft materials” is presented as a very interesting alternative for the manufacture of sensory devices [14–16]. These polymeric materials are mechanically stronger and more flexible than sol-gel matrices and can easily accommodate a great number of enzymes, providing a highly aqueous and natural mimicking microenvironment that increases the stability of biomolecules and preserves their functionality [17,18]. In addition, depending on their composition, it is possible to modulate properties such as adhesion, permeability, transparency, degree of swelling, hydrophobicity, conductivity, etc., which makes them easily coupled to different transducers.

Disposable screen-printed electrodes (SPEs) are a convenient research platform for biosensing allowing rapid in situ detection [19,20]. They are usually made by covering a plastic or ceramic support with a conductive paste layer and are often modified with nanomaterials and biomolecules to enhance sensitivity and selectivity. Different electrochemical detection techniques such as chronoamperometry or cyclic voltammetry can be used for analysis; the latter allowing determination of the stability range of the biosensor and the redox processes present on the surface of the modified electrode. Despite the multiple applications of ALP, especially for detecting inhibitors, the modification of SPEs with this enzyme, compared to other enzymes and biomolecules, has been described much less frequently.

In the present work, we have developed an easy-to-use portable electrochemical biosensor based on ALP as a recognition element that can serve as a platform to detect water pollutants that act as ALP inhibitors. Using a green protocol, we have prepared an acrylate-based cationic hydrogel incorporating ALP (ALP@AETAC) that was synthesized directly on a disposable screen-printed carbon electrode. The working principle of the biosensor is based on the detection of hydroquinone, an electroactive species, the product of the hydrolysis reaction of hydroquinone diphosphate (that is non-electroactive) catalysed by ALP. The presence of ALP inhibitors, such as the phosphate ion, reduces the enzymatic activity resulting in a lower production of hydroquinone that can be detected with this device. The device was optimized to detect phosphate in water, a competitive inhibitor of ALP. The determination of this analyte is of great interest, both from a clinical and environmental point of view since variations in its concentrations can be associated with different pathologies and water qualities.

## 2. Experimental Part

### 2.1. Materials and Reagents

Enzyme alkaline phosphatase (ALP, E.C. 232-631-4 from bovine intestinal mucosa, lyophilized powder,  $\geq 10$  DEA units  $\text{mg}^{-1}$ , PM 140 kDa), hydroquinone (HQ,  $\geq 97\%$ ), [2-(acryloyloxy)ethyl]trimethyl-ammonium chloride (AETAC, 80% wt., 600 ppm monomethyl-

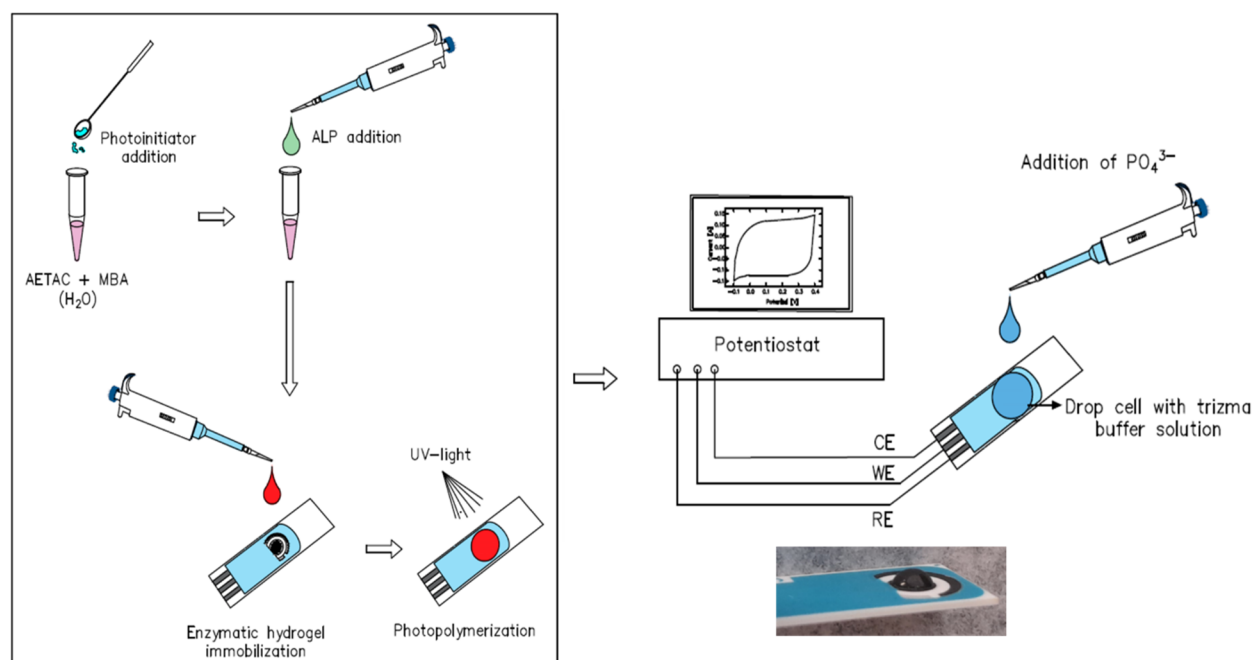


ether hydroquinone as a stabilizer), *N,N'*-methylene-bis(acrylamide) (MBA,  $\geq 99\%$ ), lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LiTPO,  $\geq 95\%$ ), and sodium phosphate dibasic (puriss. p.a.) were obtained from Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, Spain). Nitric acid ( $\text{HNO}_3$ , 67–70%) from VMR, potassium nitrate ( $\text{KNO}_3$ ,  $\geq 99\%$ ), and tris(hydroxymethyl) aminomethane (Trizma, 99.9%) were used to prepare the buffer solution (0.1 M Trizma, the pH was adjusted to 8.4 by adding nitric acid). Hydroquinone diphosphate (HQ2P), used as enzymatic substrate for the alkaline phosphatase and screen-printed carbon electrodes (SPE, Ref: DRP-C110, geometric area of the working electrode  $0.126 \text{ cm}^2$ ), were obtained from Metrohm DropSens. All the solutions were prepared using ultrapure water ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , Merck Millipore<sup>®</sup> Milli-Q<sup>®</sup> water, Spain).

## 2.2. Synthesis of ALP@AETAC Hydrogels-Based Electrochemical Biosensor

AETAC hydrogels were synthesized following the slightly modified protocol previously described by Martín-Pacheco et al. [21]. In a typical experiment, 5.66 mL of AETAC (26.4 mmol) and 0.1 g of the crosslinking agent MBA (0.06 mmol) were added to 5 mL of ultrapure water. Finally, the photoinitiator LiTPO (0.02 g, 0.06 mmol) was added to the monomer mixture and the sample was homogenized by gentle agitation in dark conditions for 1 min. For the immobilization of the ALP into the hydrogel, a buffer solution containing the enzyme was mixed with the hydrogel solution in a volume ratio of 1:1 before the crosslinking. For this study, a different concentration of ALP was evaluated, being  $6 \mu\text{M}$  as the optimal enzyme concentration [13].

Before the preparation of the biosensor, the SPE electrode was sonicated in a mixture of ethanol: water (1:1 volume ratio) for 30 min and let dry. Then, a  $5 \mu\text{L}$ -drop of the hydrogel precursor solution (in the absence or presence of the protein) was deposited onto the carbon working electrode of the SPE. Then, the modified electrode was irradiated for 1 min under UV light ( $\lambda = 335 \text{ nm}$ ) to initiate the photopolymerization. Scheme 1 depicts the stepwise biosensor fabrication.



**Scheme 1.** Stepwise preparation of the ALP@AETAC-modified electrode.

Therefore, the hydrogel layer is generated in situ on the working electrode, coating it. The adhesion of the matrix to the support is evidenced in the images shown in the Supplementary Information (Figure S1) and in that included in Scheme 1.

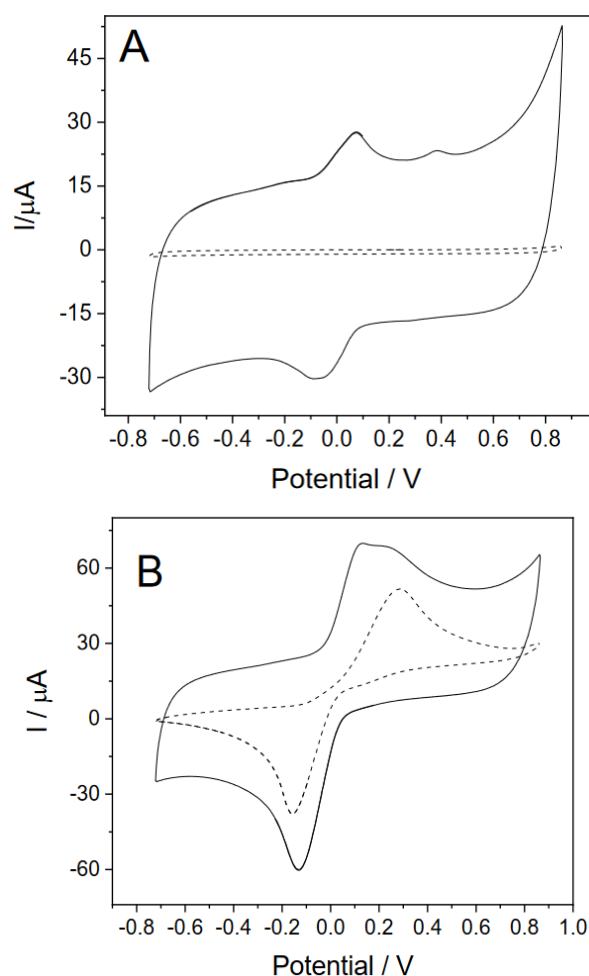
### 2.3. Electrochemical Measurements

Electrochemical measurements were carried out using an eDAQ Potentiostat (EA163 model) coupled to a wave generator (EG&G Parc Model 175) and the data acquisition was performed with an eDAQ e-corder 410 unit (eDAQ Chart and Scope Software, ES500, Denistone East, Australia). For the electroanalytical and ALP activity measurements, the carbon working-electrode was modified with the 5  $\mu\text{L}$  of the mixture ALP and hydrogel. On top of the hydrogel, a drop volume of 100  $\mu\text{L}$  of trizma buffer solution was added to the electrode surface. Before the addition of the substrate, all the ALP@AETAC-modified electrodes were stabilized by voltammetric cycling between  $-0.6$  and  $0.6$  V in the buffer solution. Then, an aliquot of the substrate, HQ2P, was added to the drop cell to attain a final concentration of  $0.5$  mM. For phosphate sensing, the ALP@AETAC-modified electrodes were stabilized in a 100  $\mu\text{L}$  drop in absence of the substrate, followed by continuous addition of different concentrations of phosphate ions up to  $10$  mM.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Electrochemical Characterization of AETAC and ALP@AETAC-Modified Electrode

Figure 1 shows the stabilized cyclic voltammograms of a bare SPE electrode and an AETAC-modified electrode in  $0.1$  M trizma buffer solution ( $\text{pH} = 8.4$ ) in the absence and presence of  $1$  mM HQ at a scan rate of  $100$   $\text{mV s}^{-1}$ . A stabilized voltammogram was obtained after 8 cycles between the upper and lower potential limits.

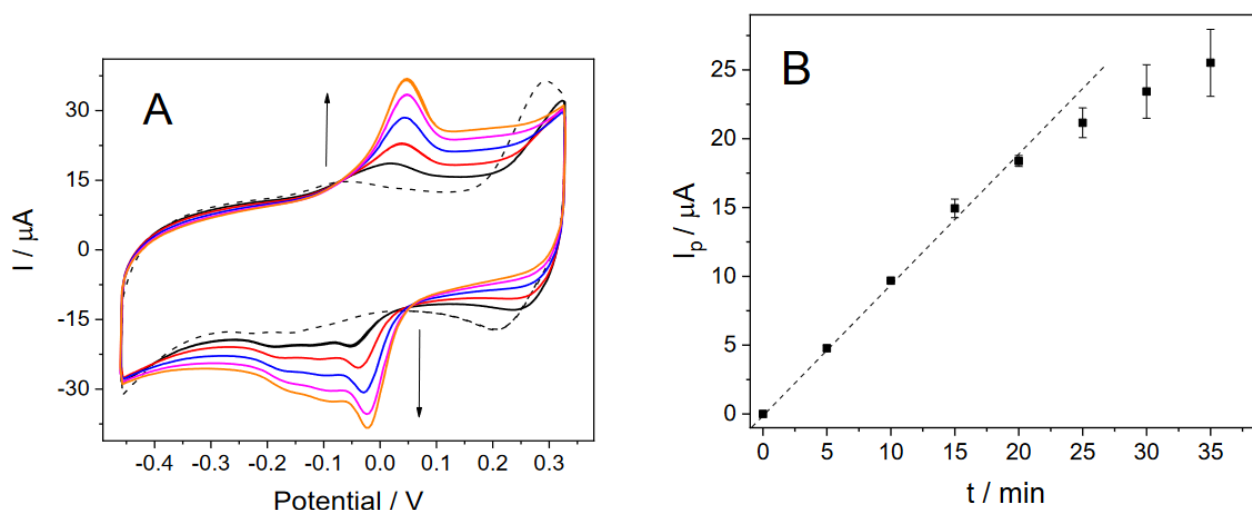


**Figure 1.** Stabilized cyclic voltammogram of pristine SPE carbon electrode (dashed lines) and AETAC-modified electrode in  $0.1$  M trizma buffer solution ( $\text{pH} = 8.4$ ) in the absence (A) and presence (B) of  $1$  mM HQ at  $100$   $\text{mV s}^{-1}$  and room atmosphere. Potentials are referred to the Ag pseudoreference electrode of the SPE.

A cyclic voltammogram of the modified electrode in the blank solution, Figure 1A, shows an important increase in the double-layer charge contribution as well as the presence of a redox couple at  $E^{1/2} = 0.0$  V once the hydrogel is immobilized onto the SPE electrode surface. These peaks are indicative of the presence of electroactive species within the hydrogel, probably due to the presence of stabilizer (hydroquinone species) in the precursor reactant. Considering that the enzymatic reaction of the ALP with the substrate (hydroquinone diphosphate) produces its hydrolysis to hydroquinone (HQ), the electrochemical response of the AETAC-modified electrode has been evaluated in presence of the product HQ.

Figure 1B shows the cyclic voltammogram of 1 mM HQ in solution with the AETAC-modified electrode in trizma buffer. In the scan to positive potentials, an oxidation peak appears at about +0.13 V with a faradaic current intensity of +40  $\mu$ A, while the counter process appears in the reverse scan at  $-0.13$  V. Peak current values of the oxidation and reduction processes are higher for the modified electrode than the current in the bare SPE electrode, which might suggest a higher electroactive surface area. In addition, the peak separation between the anodic and the cathodic features ( $\Delta E = 264$  mV) shows a more reversible behaviour in the modified electrode than in the bare SPE ( $\Delta E = 442$  mV). The latter could be a result of the ionic conductivity provided by the hydrogel, facilitating the current flow and electron transfer process [22].

Figure 2A shows cyclic voltammograms recorded for an ALP@AETAC-modified electrode in trizma buffer containing the substrate, 0.5 mM HQ2P.



**Figure 2.** (A) Cyclic voltammograms recorded with ALP@AETAC-modified electrode in trizma buffer solution containing 0.5 mM HQ2P at  $100 \text{ mV s}^{-1}$  under room atmosphere. Number of cycles: 1 (dashed black line), 19 (black line); 38 (red line); 76 (blue line); 114 (magenta line); 152 (orange line). (B) Evolution of the oxidation peak intensity as a function of the time.

In the initial scan, no clear oxidation or reduction peaks appear related to the presence of HQ, indicating that the substrate lacks intrinsic electrochemical response. In the successive potential cycling, well-defined cathodic and anodic peaks develop located at around  $-0.02$  V and  $0.04$  V, respectively, in agreement with the formation of HQ species in solution, coming from the substrate hydrolysis catalysed by the encapsulated ALP. These redox peaks grow with the continued cycling reaching a current peak of  $37.1 \mu$ A for the oxidation process after 152 cycles.

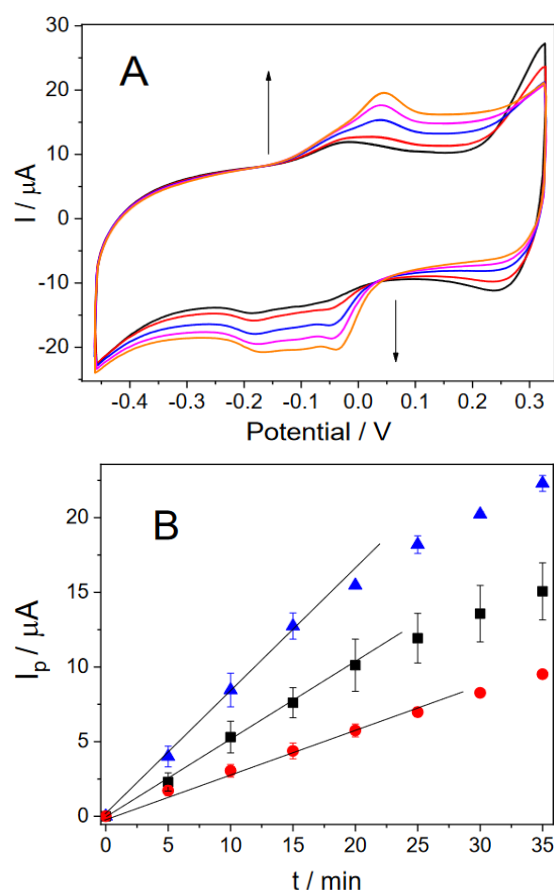
The oxidation peak intensity is directly related to the concentration of product generated (HQ) by the enzymatic reaction. Figure 2B shows the intensity of the oxidation peak as a function of the time, in which a linear correlation between 0 and 20 min can be observed. Considering that initial period, we can determine the activity of the enzyme from the slope of the linear region. Assuming a relation of the HQ concentration with the oxidation peak

of  $0.025 \text{ mM } \mu\text{A}^{-1}$  (as determined in Figure 1B), the hydrolysis rate was calculated to be  $0.0235 \text{ mM min}^{-1}$  in these conditions. This result suggests that the designed device could be applied to monitor ALP activity in an aqueous environment.

Additional experiments were performed to check the effect of the presence of different anions, other than phosphate, in the biosensor response. We added to the trizma buffer solution chloride, nitrate, and sulfate (sodium salts) anions in concentration  $0.05 \text{ M}$  in an experiment performed in similar conditions to that shown in Figure 2. The cyclic voltammogram was recorded initially and after 20 min of experiment (see Supplementary Information, Figure S2). From this voltammogram the hydrolysis rate of the substrate reached was  $0.027 \text{ mM min}^{-1}$ . This rate is very similar to the value in trizma, indicating that these species do not interfere in the response of the biosensor.

### 3.2. Biosensing Assays for Phosphate Detection

To validate the potential application of the ALP@AETAC-modified electrodes as a biosensor platform, the electrodes were tested in the presence of phosphate ions in solution. Figure 3A shows the cyclic voltammograms for the ALP@AETAC-modified electrode in a trizma buffer solution containing  $5 \text{ mM PO}_4^{3-} + 0.5 \text{ mM HQ2P}$ .



**Figure 3.** (A) Cyclic voltammograms recorded with ALP@AETAC-modified electrode in  $0.5 \text{ mM HQ2P} + 5 \text{ mM PO}_4^{3-} + 0.1 \text{ M trizma}$  buffer solution ( $\text{pH} = 8.4$ ) at  $100 \text{ mV s}^{-1}$  under room atmosphere. Number of cycles: 19 (black line); 38 (red line); 76 (blue line); 114 (magenta line); 152 (orange line). (B) Current intensity of the oxidation peak as function of time obtained at different concentration of  $\text{PO}_4^{3-}$  in solution  $0.5 \text{ mM HQ2P} + 0.1 \text{ M trizma}$  buffer solution ( $\text{pH} = 8.4$ ):  $1 \text{ mM}$  (blue triangles),  $3.3 \text{ mM}$  (black squares), and  $5 \text{ mM}$  (red circles).

The voltammograms show the redox processes associated with the formation of HQ by the enzymatic reaction of the substrate. The current intensity for redox processes grows more slowly in comparison with the same experiments performed in absence of

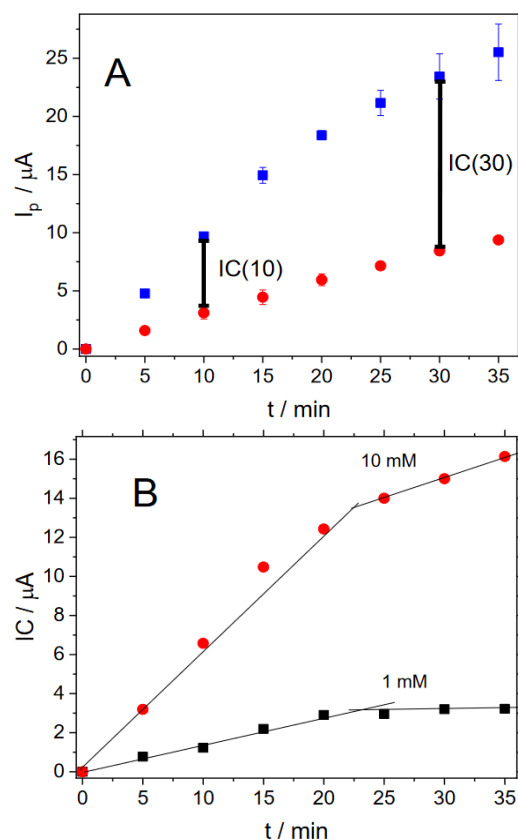
the phosphate (See Figure 2A) Therefore, the presence of  $\text{PO}_4^{3-}$  in solution, a well-known inhibitor, induces a decrease in the enzymatic activity.

Figure 3B shows the evolution of the intensity of the oxidation peak related to the presence of HQ as a function of the time for experiments performed at different concentrations of phosphate ion. For the case of the 1 mM phosphate concentration, the hydrolysis rate reaches a value of  $0.0198 \text{ mM min}^{-1}$ , which is a value 15% lower than the hydrolysis rate in the absence of this ion. Higher concentrations of phosphate ions lead to a lower hydrolysis rate, reaching  $0.0128 \text{ mM min}^{-1}$  and  $0.00707 \text{ mM min}^{-1}$  for 3.3 mM and 5 mM of phosphate, respectively. The decreasing production rate of the hydroquinone evidences the inhibiting effect and allows the use of this platform as a biosensor to detect this inhibitor molecule in solution.

To optimize the operating conditions for phosphate sensing, a kinetic study of the ALP@AETAC-modified electrode has been carried out in the absence and presence of the inhibitor. We defined a parameter called inhibition current ( $IC$ ) as:

$$IC(t) = I_p^0(t) - I_p^{[\text{PO}_4^{3-}]}(t)$$

with  $I_p^0(t)$  being the peak current detected at time  $t$  in the blank solution and  $I_p^{[\text{PO}_4^{3-}]}(t)$  the peak current detected at time  $t$  in the experiment performed in the presence of phosphate. Figure 4A shows the evolution of the peak current related to the oxidation of the product in an experiment performed in the blank solution + 0.5 mM HQ2P and a parallel experiment performed after the addition of 10 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  blank solution difference of the peak current detected.

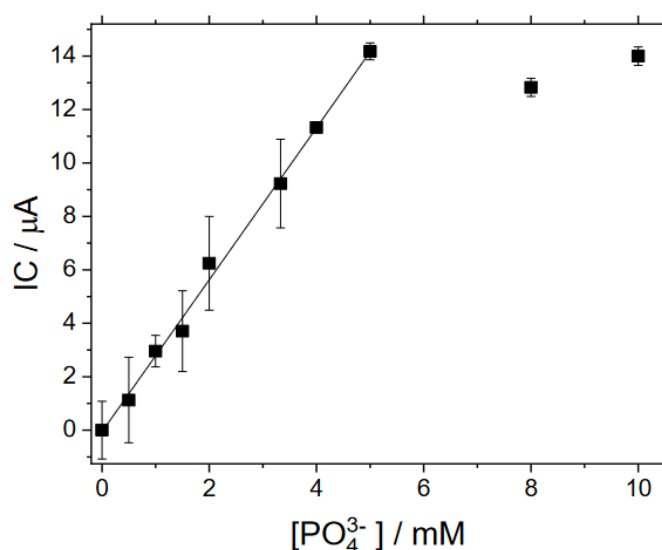


**Figure 4.** (A) Evolution of the oxidation peak current intensity recorded during the cyclic voltammetry in trizma buffer solution (pH = 8.4) + 0.5 mM HQ2P in the absence of (blue squares) and presence of  $\text{PO}_4^{3-}$  10 mM (red circles). (B) Inhibition current ( $IC$ ) obtained at different times of measurement for different concentrations of phosphate: 10 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  (red circles) and 1 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  (black squares).

The values of  $IC(t)$  are marked as bars for different times,  $t = 10$  min and  $t = 30$  min. As can be observed, the  $IC$  values increase with the time of reaction, reaching  $\sim 1/3$  of the current intensity in absence of the inhibitor after 25 min of measurement.

Figure 4B plots the  $IC(t)$  values as a function of the time of measurement for two experiments performed at different concentrations of phosphate inhibitor (1 and 10 mM). We can observe that the inhibition current increases linearly in both cases for the range time from 0 to 20 min, indicating that the measurement is more sensitive the more time is employed for detection. Measurements performed over 25 min do not produce further enhancement in the  $IC$  values. In this regard, the sensitivity of the biosensor improves with the time of measurement, thus 25 min is considered an acceptable and optimum time for the use of the biosensor.

Figure 5 shows the evolution of the inhibition current measured after 25 min of incubation— $IC(25)$ —for different concentrations of phosphate in the drop electrode.



**Figure 5.** Calibration curve for the determination of phosphate obtained for the ALP@AETAC-modified electrochemical biosensor. The value of the coefficient of determination of the linear zone is  $R^2 = 0.9993$ .

The addition of  $PO_4^{3-}$  produces a continual increase in the  $IC(25)$  values due to the rising in the inhibition of the HQ production. The limit of detection for the ALP@AETAC-modified electrode was found to be 0.5 mM of  $PO_4^{3-}$ . This value was determined as  $LOD = 3\sigma/S$ , where  $S = 2.827 \mu A mM^{-1}$  is the sensitivity of the sensor, which is the slope of the calibration straight in Figure 5, and  $\sigma = 0.5 \mu A$  is the standard deviation of the blank (hydrogel matrix in the absence of substrate). The developed biosensor showed a broad linear response for phosphate ions in the range of 0–5.0 mM, which together with its detection limit makes this sensor adequate to analyze phosphate in biological fluids or environmental samples [23] with high sensitivity for disposable screen-printed electrodes ( $22.5 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$ , calculated from the geometric area of the working electrode). In this sense, the proposed biosensor shows competitive performance compared to previously reported work, as is shown in Table 1, offering a portable platform for phosphate detection with a short time of analysis.

It is interesting to highlight that, although enzymatic biosensors with higher sensitivity to phosphate than the one described in this work have been published in the literature, as inferred from Table 1, one of the main advantages of the present biosensor is the voltammetric transduction. Voltammetry makes it possible to detect the presence of other electroactive species that could interfere with the measurements and that can be distinguished from the analyte of interest during the voltammetric sweep. This property is an advantage compared to the usual chronoamperometric responses obtained at a fixed potential, where

the measured current can come from different species. This also opens the opportunity to obtain reusable biosensors, one of the objectives we intend to achieve in future work since, after a suitable cleaning procedure, the current related to the entrapped products can be considered as a background current, which can be discarded in subsequent experiments.

**Table 1.** Comparison of the figures of merit for the ALP@AETAC-modified electrode in the detection of phosphates with other biosensors reported in the literature.

Composition of the Biosensor	Linear Range [mM]	Sensitivity [ $\mu\text{A mM}^{-1}$ ]	LOD [ $\mu\text{M}$ ]	Method of Detection	Reference
SiO <sub>2</sub> -AgNPs-EDC/NHS-ALP	0.5–5	–	50	conductimetric	[23]
Pyruvate oxidase/Pt/Au nanowires	0.25–1.5	0.07	250	Chronoamperometric	[24]
Pyruvate oxidase/CuNPs/MBA/Au	0.25–2	1.81	100	Chronoamperometric	[25]
MP-Mut-GOD (trienzymatic)/poly(1,2-diaminobenzene)/Pt	0.005–0.8	0.00455	0.00245	Amperometric	[26]
ALP@AETAC	0.5–5	2.82	500	Voltammetric	This work

#### 4. Conclusions

We have developed an easy-to-use portable electrochemical biosensor to measure the activity in situ and in real-time of the enzyme ALP to identify the presence of inhibitors. The biosensor is based on the voltammetry measurement of the electroactive compound hydroquinone, which is the hydrolysis product of the electroinactive substrate hydroquinone diphosphate as catalyzed by the ALP.

AETAC hydrogel containing the enzyme has been directly generated on disposable screen-printed carbon electrodes. The detection of HQ in the hydrogel is more sensitive than the bare SPE electrode. The biosensor was able to quantify the presence of the phosphate ion inhibitor in an aqueous sample with an optimum time of measurement of over 25 min and a LOD of 500  $\mu\text{M}$ . These biosensors can be used to detect and quantify potential ALP inhibitors as potential marine pollutants.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/bios12090698/s1>, Figure S1: Photographic images of the AETAC hydrogels adhered to the working electrode of the SPE and Figure S2: Cyclic voltammograms recorded with ALP@AETAC-modified electrode in a solution of 0.5 mM HQ2P in trizma buffer solution containing sodium chloride (50 mM), sodium sulphate (50 mM) and sodium nitrate (50 mM).

**Author Contributions:** Conceptualization, F.M. and C.R.M.; methodology, Y.A. and A.F.Q.J.; investigation, Y.A. and A.F.Q.J.; resources, F.M.; writing—original draft preparation, Y.A. and A.F.Q.J.; writing—review and editing, Y.A., A.F.Q.J., M.J.M.-T., C.R.M. and F.M.; visualization M.J.M.-T.; supervision, C.R.M. and F.M.; funding acquisition, C.R.M. and F.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Ministerio de Ciencia e Innovación (projects PID2019-105923RB-I00, PDC2021-120884-I00, European Union NextGenerationEU PRTR-C17.11) and Generalitat Valenciana (project GVA-THINKINAZUL/2021/015 and PROMETEO/2018/087).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Pabis, A.; Kamerlin, S.C.L. Promiscuity and electrostatic flexibility in the alkaline phosphatase superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *37*, 14–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rankin, S.A.; Christiansen, A.; Lee, W.; Banavara, D.S.; Lopez-Hernandez, A. Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 5538–5551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nsabimana, A.; Lan, Y.; Du, F.; Wang, C.; Zhang, W.; Xu, G. Alkaline phosphatase-based electrochemical sensors for health applications. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 1996–2006. [[CrossRef](#)]
- Mazzei, F.; Botrè, F.; Montilla, S.; Pilloton, R.; Podestà, E.; Botrè, C. Alkaline phosphatase inhibition based electrochemical sensors for the detection of pesticides. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *574*, 95–100. [[CrossRef](#)]

5. Arduini, F.; Cinti, S.; Caratelli, V.; Amendola, L.; Palleschi, G.; Moscone, D. Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 346–354. [[CrossRef](#)]
6. Islam, M.S.; Sazawa, K.; Hata, N.; Sugawara, K.; Kuramitz, H. Determination of heavy metal toxicity by using a micro-droplet hydrodynamic voltammetry for microalgal bioassay based on alkaline phosphatase. *Chemosphere* **2017**, *188*, 337–344. [[CrossRef](#)]
7. Rashida, M.; Iqbal, J. Inhibition of alkaline phosphatase: An emerging new drug target. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 41–51. [[CrossRef](#)]
8. Shaban, S.M.; Jo, S.B.; Hafez, E.; Cho, J.H.; Kim, D.H. A comprehensive overview on alkaline phosphatase targeting and reporting assays. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *465*, 214567. [[CrossRef](#)]
9. Casero, E.; Petit-Domínguez, M.D.; Vázquez, L. *Handbook of Sol-Gel Science and Technology: Processing, Characterization and Applications*; Klein, L., Aparicio, M., Jitianu, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 3705–3743.
10. Kandimalla, V.; Tripathi, V.S.; Ju, H. Immobilization of biomolecules in sol-gels: Biological and analytical applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2006**, *36*, 73–106. [[CrossRef](#)]
11. Alacid, Y.; Martínez-Tomé, M.J.; Mateo, C.R. Reusable fluorescent nanobiosensor integrated in a multiwell plate for screening and quantification of antidiabetic drugs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 25624–25634. [[CrossRef](#)]
12. Sánchez, F.G.; Díaz, A.N.; Peinado, M.C.R.; Belledone, C. Free and sol-gel immobilized alkaline phosphatase-based biosensor for the determination of pesticides and inorganic compounds. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *484*, 45–51. [[CrossRef](#)]
13. Kahveci, Z.; Martínez-Tomé, M.J.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. Fluorescent biosensor for phosphate determination based on immobilized polyfluorene-liposomal nanoparticles coupled with alkaline phosphatase. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 136–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bobinger, M.R.; Romero, F.J.; Salinas-Castillo, A.; Becherer, M.; Lugli, P.; Morales, D.P.; Rodríguez, N.; Rivadeneyra, A. Flexible and robust laser-induced graphene heaters photothermally scribed on bare polyimide substrates. *Carbon N. Y.* **2019**, *144*, 116–126. [[CrossRef](#)]
15. Toral, V.; Loghin, F.C.; Rodríguez-Diéguez, A.; Lapresta-Fernández, A.; Morales, D.P.; Rivadeneyra, A.; Salinas-Castillo, A. Optimization of Cost-Effective and Reproducible Flexible Humidity Sensors Based on Metal-Organic Frameworks. *Sensors* **2020**, *20*, 6981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lapresta-Fernández, A.; Salinas-Castillo, A.; Capitán-Vallvey, L.F. Synthesis of a thermoresponsive crosslinked MEO2MA polymer coating on microclusters of iron oxide nanoparticles. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3947. [[CrossRef](#)]
17. Meyer, J.; Meyer, L.E.; Kara, S. Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. *Eng. Life Sci.* **2022**, *22*, 165–177. [[CrossRef](#)]
18. Herrmann, A.; Haag, R.; Schedler, U. Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2100062. [[CrossRef](#)]
19. Hughes, G.; Westmacott, K.; Honeychurch, K.C.; Crew, A.; Pemberton, R.M.; Hart, J.P. Recent Advances in the Fabrication and Application of Screen-Printed Electrochemical (Bio)Sensors Based on Carbon Materials for Biomedical, Agri-Food and Environmental Analyses. *Biosensors* **2016**, *6*, 50. [[CrossRef](#)]
20. Ahmed, M.U.; Hossain, M.M.; Safavieh, M.; Wong, Y.L.; Rahman, I.A.; Zourob, M.; Tamiya, E. Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *36*, 495–505. [[CrossRef](#)]
21. Martín-Pacheco, A.; Del Río Castillo, A.E.; Martín, C.; Herrero, M.A.; Merino, S.; Fierro, J.L.G.; Díez-Barra, E.; Vázquez, E. Graphene Quantum Dot-Aerogel: From Nanoscopic to Macroscopic Fluorescent Materials. Sensing Polyaromatic Compounds in Water. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 18192–18201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Gamero-Quijano, A.; Huerta, F.; Salinas-Torres, D.; Morallón, E.; Montilla, F. Electrocatalytic Performance of SiO<sub>2</sub>-SWCNT Nanocomposites Prepared by Electroassisted Deposition. *Electrocatalysis* **2013**, *4*, 259–266. [[CrossRef](#)]
23. Upadhyay, L.S.B.; Verma, N. Alkaline phosphatase inhibition based conductometric biosensor for phosphate estimation in biological fluids. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 611–616. [[CrossRef](#)]
24. Cui, J.; Ogabiela, E.E.; Hui, J.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Tong, L.; Zhang, J.; Adeboju, S.B.; Zhang, X.; Wu, Y. Numerical Simulation and Experimental Verification of Additive Distribution in Through-Silicon via during Copper Filling Process. *J. Electrochem. Soc.* **2014**, *162*, D62. [[CrossRef](#)]
25. Karthikeyan, R.; Berchmans, S. Inorganic-Organic Composite Matrix for the Enzymatic Detection of Phosphate in Food Samples. *J. Electrochem. Soc.* **2013**, *160*, D73. [[CrossRef](#)]
26. Yao, T.; Takashima, K.; Nanjyo, Y. Simultaneous determination of orthophosphate and total phosphates (inorganic phosphates plus purine nucleotides) using a bioamperometric flow-injection system made up by a 16-way switching valve. *Talanta* **2003**, *60*, 845–851. [[CrossRef](#)]



## Supporting information for

# Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels

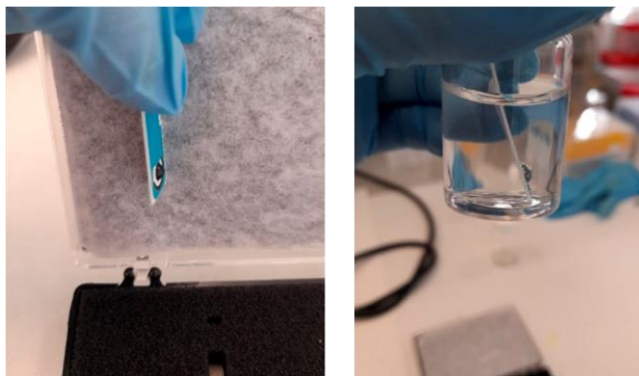
Yolanda Alacid <sup>1</sup>, Andrés F. Quintero Jaime <sup>2</sup>, María José Martínez-Tomé <sup>1</sup>, C. Reyes Mateo <sup>1</sup> and Francisco Montilla <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Avenida de la Universidad, s/n. 03202 Elche, Alicante, Spain

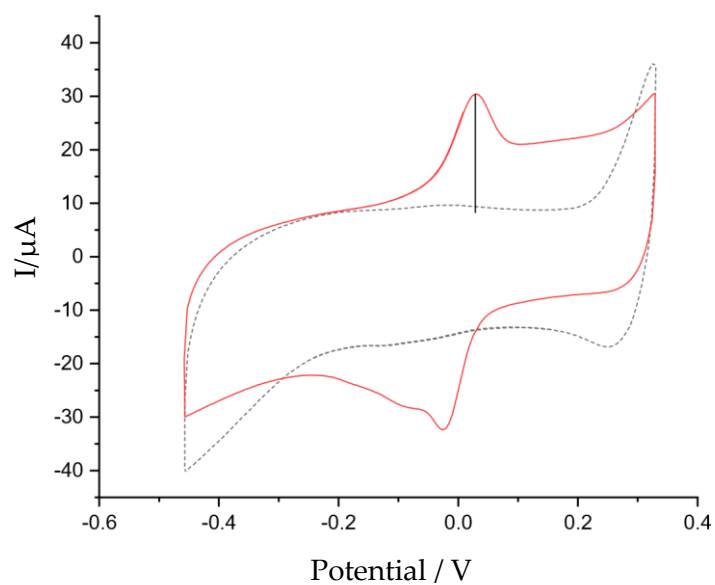
<sup>2</sup> Departamento de Química Física and Instituto Universitario de Materiales de Alicante (IUMA), Universidad de Alicante, Carretera San Vicente s/n, 03690 Alicante, Spain

\* Correspondence: francisco.montilla@ua.es

**Keywords:** electrochemical sensor; acrylamide matrix; voltammetric detection; ALP; phosphate inhibitor



**Figure S1.** Photographic images of the AETAC hydrogels adhered to the working electrode of the SPE.



**Figure S2.** Cyclic voltammograms recorded with *ALP@AETAC*-modified electrode in a solution of 0.5 mM HQ2P in trizma buffer solution containing sodium chloride (50 mM), sodium sulphate (50 mM) and sodium nitrate (50 mM). Dashed line: Initial voltammogram in the presence of the substrate. Solid line: After 20 min of the addition of the substrate.





# Agradecimientos

Estos años han marcado un punto de inflexión tanto a nivel profesional como personal y quiero aprovechar este momento para agradecer a todas las personas que han contribuido a que esta Tesis Doctoral sea una realidad.

En primer lugar, no puedo comenzar de otra manera que agradeciendo a **M<sup>a</sup> José** y **Reyes**, por haber dirigido esta Tesis. Les agradezco la paciencia, dedicación y predisposición que han mostrado durante todos estos años. Por tener siempre su puerta abierta para lo que necesitase, por el interés preguntando con intriga “¿cómo ha salido?” mientras hacía algún experimento decisivo, por emocionarse cuando las cosas han salido bien y por sentarse conmigo y darle vueltas cuando algo se ha complicado más de lo esperado. Gracias por enseñarme tanto y ayudarme a crecer como científica. Estoy segura que no podía haber elegido mejores guías. Muchísimas gracias.

A pesar de que en ciertos momentos he sido “la única habitante” del laboratorio, he tenido la suerte de compartir espacio con muy buenos compañeros. Quiero hacer mención especial a **Marta**, con la que he pasado la mayor parte del tiempo, y a **Raúl**, que se unió al equipo el último año. Que si algo les tengo que agradecer, a parte de la buena compañía y el apoyo, es que hayan hecho de guías cuando hemos salido a congresos, porque se conoce que la orientación no es precisamente mi fuerte, seguro que ellos lo pueden confirmar. También agradecer a los compañeros que han pasado por el laboratorio para hacer sus TFGs o TFMs, **Javi**, **Marina** y **Javier** y, en particular, a **Naiara** por su disposición a permitirme codirigir su TFM.

Al Dr. Francisco Montilla, o como todos lo conocemos, **Paco**. Le agradezco haberme acogido en su laboratorio durante mi estancia predoctoral en la Universidad de Alicante. También por la confianza, los consejos y por contar conmigo para nuevos proyectos. Esta oportunidad también me ha permitido conocer a **Andrés**, al que le tengo que agradecer la infinita paciencia los primeros días enseñándome todo lo que necesitase sobre electroquímica y por ser tan atento mientras estuve allí.

También quiero agradecer a **Rocío Esquembre** por ayudarme, entre otras cosas, con las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo, pero sobre todo por la amabilidad y cercanía que ha mostrado siempre.

A la Dra. **Marian Herrero** por acceder a que pasase unas semanas en su laboratorio del IRICA, en Ciudad Real, para aprender a hacer hidrogeles orgánicos, que finalmente han sido indispensables en esta Tesis Doctoral. No puedo olvidarme de la Dra. **Ana Martín**, quien estuvo a mi lado mañana y tarde enseñándome durante esos intensos días.

Al Dr. **Ricardo Mallavia** le agradezco habernos cedido los polímeros conjugados sintetizados en su laboratorio.

A **Elisa**, nuestra técnico, por echar una mano en el laboratorio y a **Kike**, por su ayuda con las imágenes de microscopio electrónico.

También quiero agradecer a las personas que me han acompañado fuera del entorno académico. Mi familia y amigos, que aunque a veces no terminen de entender qué es lo que hago en el laboratorio, siempre se han interesado y preocupado por cómo me iba.

A mis amigos, **Mario**, **Sandra** y **Juanjo**, que se han convertido en una parte muy importante de mi vida, casi como familia. Les agradezco de todo corazón el cariño, el apoyo que me han dado y los momentos vividos, en los que, por supuesto, nunca nos hemos quedado con hambre: las carreras, meriendas, celebraciones y alguna que otra escapada. A **Rosa**, mi compañera de Tesis (aunque de otra universidad), porque ha sido un verdadero lujo tener a alguien tan cercano que me comprendiese tan bien y habernos animado mutuamente cada vez que hacíamos un avance.

Quiero dar las gracias a mi hermana, **Nerea**. Aunque somos como la noche y el día, es ella quien mejor me conoce y ha sido uno de mis mayores apoyos cuando más lo he necesitado. A pesar de ser “la pequeña de la casa”, la considero un auténtico ejemplo a seguir. Estoy increíblemente orgullosa de ella, y no puedo esperar a ver todo lo maravilloso que el futuro le tiene preparado.

A mis abuelos, **Luisa, Pepe, Ginés** y **Mercedes**. Han sido, son y siempre serán un pilar importantísimo para mí. Tengo que agradecerles haberse mostrado siempre orgullosos, haga lo que haga, y haberme enseñado las lecciones más valiosas de mi vida, como la de SEGUIR siempre adelante, por muy difícil que vengan las cosas, cuando algo te importa.

A **Fran**, mi compañero de vida, lo que ha tenido que aguantar estos años el pobre. Le agradezco infinitamente que haya seguido ahí a pesar de mi intensidad en algunos momentos. Por la paciencia, comprensión y empatía que ha mostrado. Pero sobre todo, por quererme como soy. Espero que siga a mi lado muchos años más.

Por último, pero no menos importante, termino agradeciendo a mis padres, **Ramón** y **Yolanda**, porque sin ellos, nada de esto habría sido posible. Por creer en mí, consolarme en los momentos difíciles y por celebrar conmigo mis logros. Por ayudarme a construir la persona que soy hoy, animándome a seguir estudiando y formándome, y dándome la libertad para elegir mi propio camino. Gracias por el esfuerzo y todo lo que habéis hecho por mí.

Gracias a todos.

