

5.1.1 Optimización de condiciones experimentales

Con el objetivo de conseguir unas condiciones experimentales apropiadas para que la actividad enzimática de la ALKP fuera la óptima, se llevaron a cabo una serie de estudios a diferente pH, diferente concentración de enzima y cofactor Mg^{2+} . En todos ellos el volumen total y el volumen de sustrato PNPP permanecieron constantes. Los resultados obtenidos fueron comparados y combinados en la siguiente gráfica para hacerlos más visuales (Figura 9).

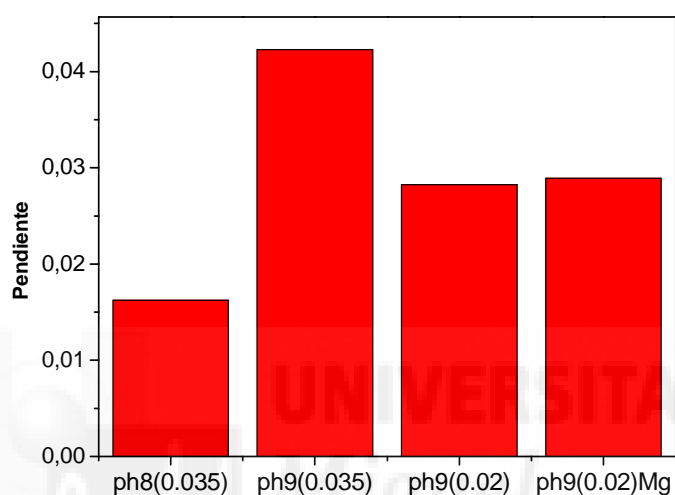


Figura 9: Representación en gráfica de barras de los resultados obtenidos en los experimentos de optimización. Los números entre paréntesis del eje de abscisas indican la concentración utilizada de ALKP en μM . El eje de ordenadas muestra la pendiente correspondiente a la cinética enzimática en la zona lineal (velocidad inicial).

Estos resultados sirvieron para elegir como pH de trabajo el pH=9, ya que según los experimentos anteriores fue el que permitió una actividad de la enzima ALKP óptima. De manera que desde este momento todos los experimentos fueron realizados a dicho pH. Por otro lado, una vez elegido éste, se probó el efecto del cofactor Mg^{2+} ($MgSO_4$ 1.18 mM) y como se puede comprobar en la gráfica, no pareció tener efectos significativos por lo que se decidió no utilizarlo.

Ahora era necesario determinar la concentración de enzima. Para ello se llevó a cabo un nuevo experimento en el que se obtuvieron cinéticas a diferentes concentraciones crecientes de ALKP, manteniendo la cantidad de sustrato constante. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Figura 10).

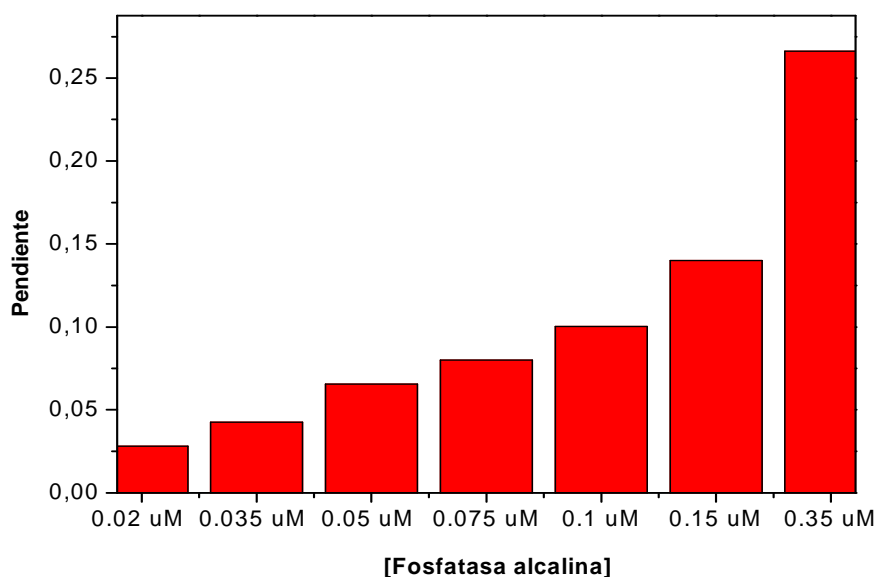


Figura 10: Representación en gráfica de barras de los resultados obtenidos en los experimentos de concentraciones crecientes de ALKP. El eje de ordenadas muestra la pendiente correspondiente a la cinética enzimática en la zona lineal (velocidad inicial).

Con los resultados obtenidos se tuvo que elegir una concentración de enzima adecuada para ser usada en la técnica fluorescente y posteriormente en el biosensor. La elección no resultó fácil ya que lo ideal era encontrar la concentración, a la cual la actividad enzimática fuera la mayor con la menor cantidad posible de enzima, lo que respondía a un interés puramente económico por ser ésta cara. Finalmente se eligió una concentración de 0.15 μM de ALKP, que fue la utilizada en todos los experimento posteriores.

5.2 Estudios de fluorescencia en disolución

Una vez estudiada y optimizada la actividad enzimática de la ALKP con la técnica de absorbancia, se procedió a entrar en el grueso de la parte experimental de este trabajo, que consistía en el desarrollo de una técnica de fluorescencia basada en el polielectrolito conjugado HTMA-PFP. En ella se siguieron utilizando todas las condiciones puestas a punto anteriormente.

5.2.1 HTMA-PFP y agregación

Hasta ahora solo se han mencionado las importantes ventajas del HTMA-PFP, sin embargo este polímero posee una desventaja considerable y es su tendencia a la agregación en medio acuoso. En estudios previos a este trabajo ya se comprobó que se auto-ensamblaba y formaba agregados en disolución acuosa, tal y como ocurre con el resto de los CPEs. Esta agregación se debe a interacciones hidrofóbicas intercatenarias y da lugar con el tiempo, a una gran disminución de su intensidad de emisión y a un desplazamiento de los espectros de absorción, excitación y emisión hacia el rojo (Kahveci y col., 2013).

Con el fin de comprobar este fenómeno se realizó un experimento en el que se adicionó polielectrolito (1.5 μM) a tampón Tris, y se fue recogiendo su espectro de fluorescencia cada 10 minutos durante dos horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11.

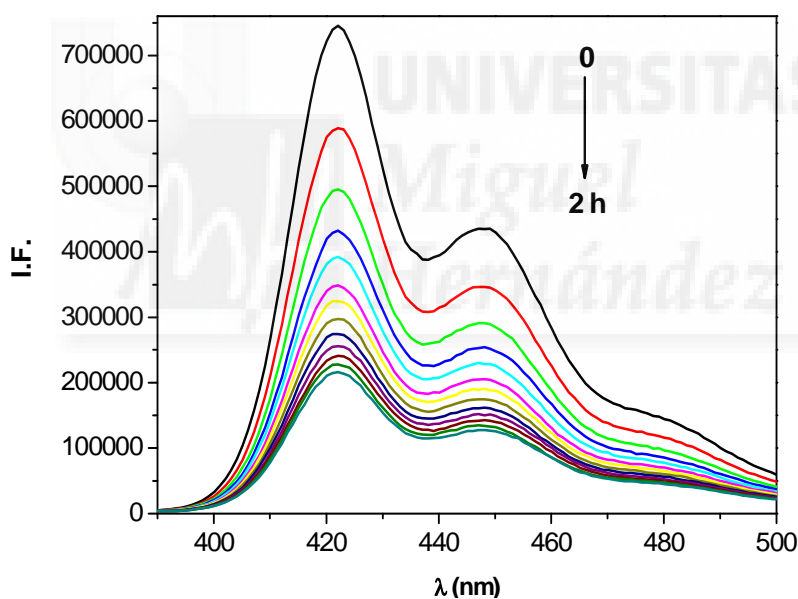


Figura 11: Espectros de emisión de fluorescencia del HTMA-PFP en tampón, medidos cada 10 minutos durante 2 horas.

Tal y como se esperaba, los espectros registrados estaban ligeramente desplazados hacia el rojo (ya que el máximo de emisión del HTMA-PFP ha de estar en 415 nm), y la intensidad de fluorescencia del polímero fue disminuyendo con el tiempo, lo que indicaba la existencia de agregados inestables del polielectrolito en disolución acuosa. El hecho de que la disolución se pusiera cada vez más turbia apoyó este resultado, confirmando que el tamaño de los agregados aumentaba con el tiempo.

5.2.2 Nanopartículas fluorescentes (NPs)

Con el objetivo de solucionar el grave inconveniente de la agregación del HTMA-PFP, y así poder estabilizar la señal fluorescente, se recurrió a una estrategia basada en la formación de nanopartículas liposomales. Se trata de una técnica que consiste en la incorporación del HTMA-PFP a liposomas, y que da lugar a las denominadas nanopartículas fluorescentes (NPs), en las que el polímero es capaz de mantenerse estable y altamente fluorescente en disoluciones acuosas (Kahveci y col., 2013).

Los liposomas, de forma aproximadamente esférica y talla normalmente nanométrica, se han convertido en los últimos años en herramientas muy versátiles en campos como la Bioquímica o la Medicina. Se trata de vesículas con una fase acuosa interna rodeada por una o más bicapas lipídicas anfipáticas, y pueden clasificarse atendiendo al número de éstas y al tamaño de las mismas en vesículas multilamelares o unilamelares.

En este trabajo las vesículas lipídicas preparadas para contener al HTMA-PFP fueron multilamelares (LUVs), con aproximadamente 100 nm de diámetro. Además, al utilizarse el fosfatidil glicerol (PG) para su producción poseían un carácter aniónico, provocando que el polielectrolito al incorporarse en ellas quedara en el interior de la bicapa lipídica, de manera similar a la representada en la Figura 12 (Kahveci y col., 2013).

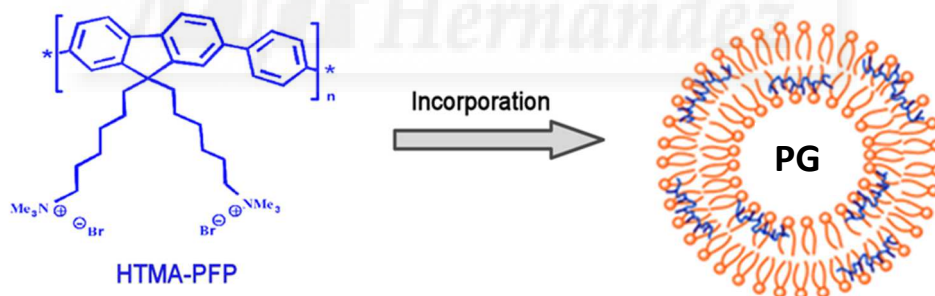


Figura 12: Imagen en la que se ilustra la incorporación y disposición del HTMA-PFP en la bicapa lipídica del liposoma de PG.

Una vez preparadas las LUVs de PG a una determinada concentración, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado materiales y métodos, se realizó un experimento similar al anterior (Figura 11) pero esta vez con el HTMA-PFP no en disolución acuosa, sino formando parte de las NPs. El procedimiento de incorporación del polímero a los liposomas que se siguió aparece también en ese apartado del trabajo. El objetivo de dicho estudio fue observar el efecto de estas NPs sobre la agregación del polímero. La Figura 13 muestra los resultados obtenidos.

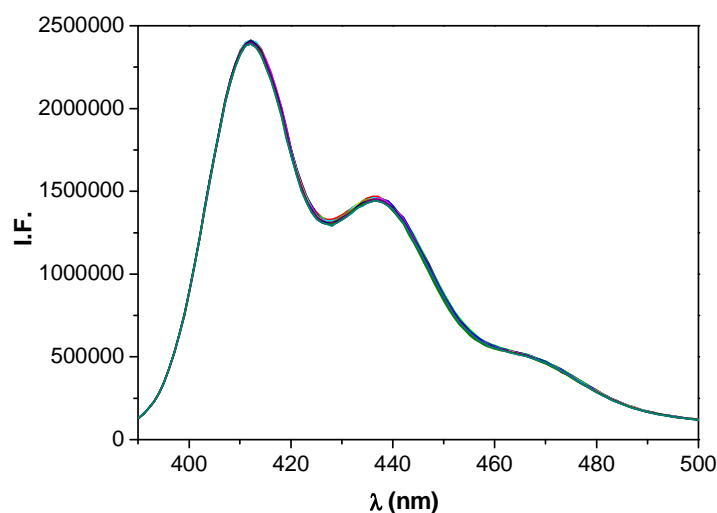


Figura 13: Espectros de emisión de fluorescencia del HTMA-PFP en LUVs de PG, medidos cada 10 minutos durante 2 horas.

Los resultados de los dos experimentos anteriores se han recopilado en una única gráfica (Figura 14) que permite su mejor comparación. En ella queda manifiesta la gran estabilidad que le confiere al HTMA-PFP su incorporación en los liposomas, en un entorno acuoso. Prueba de ello es la importante intensidad de fluorescencia que fue capaz de emitir, al igual que el mantenimiento de la misma a lo largo de las dos horas que duró el seguimiento.

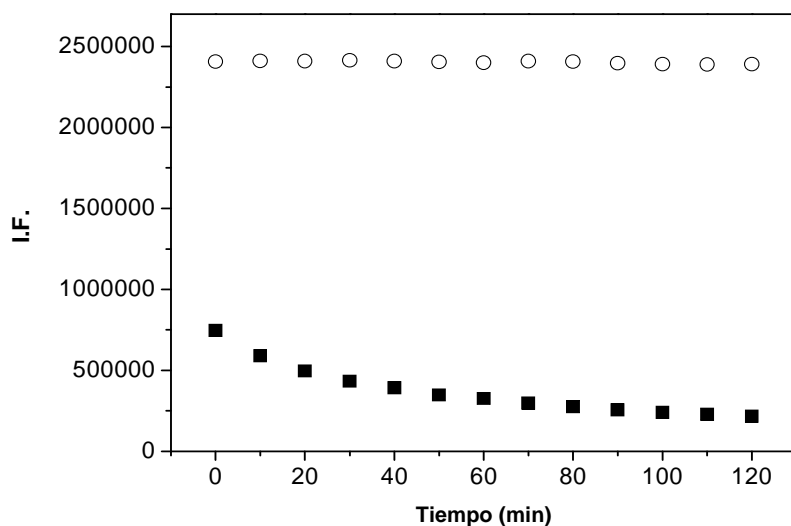


Figura 14: Estudio de estabilidad con el tiempo del HTMA-PFP libre (■) o incorporado en LUVs de PG (○). ($\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$) ($\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$).

5.2.3 Comprobación de la incorporación del HTMA-PFP a las LUVs

Una vez comprobada la estabilidad del HTMA-PFP en las nanopartículas fluorescentes, era necesario establecer una relación óptima polielectrolito/LUVs en cuanto a sus concentraciones, que permitiera la incorporación de todo el polímero añadido a los liposomas de PG. Para ello se llevó a cabo un experimento en el que se adicionaron a 9 cubetas concentraciones crecientes de LUVs, desde 0 hasta 1 mM, y posteriormente una concentración fija de HTMA-PFP de 1.5 μM . A continuación se le realizó un espectro de emisión de fluorescencia a la disolución de cada cubeta (Figura 15). El aumento de la señal fluorescente y el desplazamiento del espectro hacia el azul indican la ruptura de los agregados de polielectrolito al entrar en contacto con la membrana lipídica. También se representó en una gráfica el área de cada espectro en función de la concentración de PG (Figura 16).

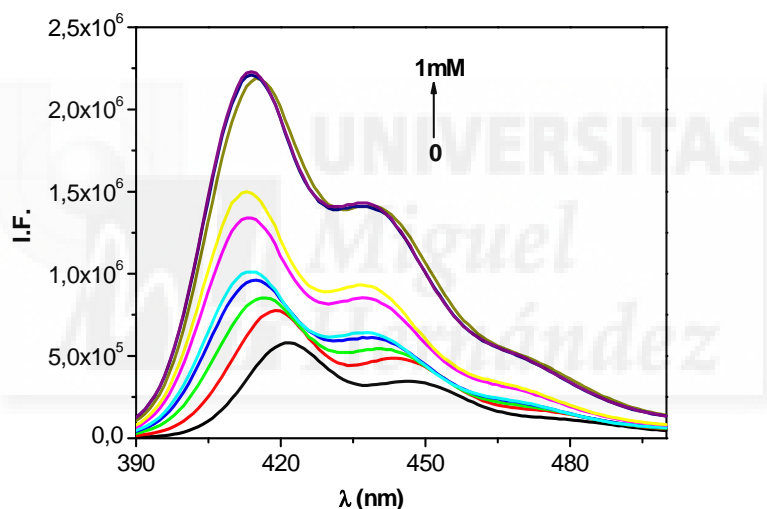


Figura 15: Espectros de emisión de fluorescencia del HTMA-PFP (1.5 μM) en diferentes concentraciones de LUVs (0-1 mM).

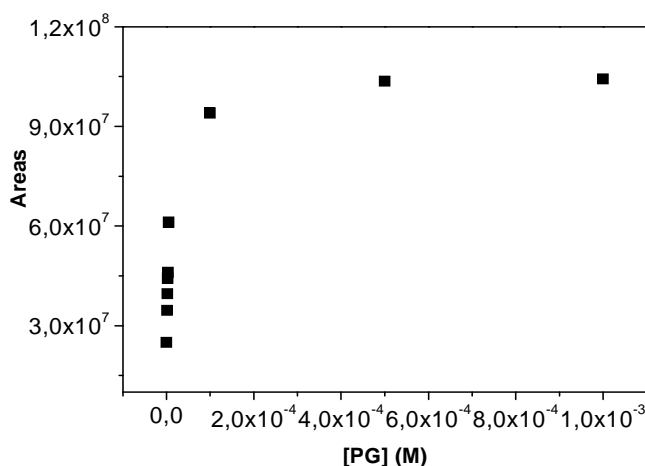


Figura 16: Representación de las áreas de cada espectro de emisión de la Fig. 15 frente a la concentración de LUVs (M).

Atendiendo a los resultados obtenidos en este experimento se acabó eligiendo una concentración de LUVs de 0.5 mM, ya que con ella era segura la incorporación de todo el HTMA-PFP añadido a una concentración de 1.5 μM (Figura 16).

5.2.4 Desactivación de la fluorescencia del HTMA-PFP por PNP

Una vez elegidas las concentraciones de liposomas y de polímero que se iban a usar a partir de ahora para fabricar las NPs, llegaba la hora de probar el PNP y comprobar su efecto desactivador sobre la fluorescencia de las mismas.

Para ello se diseñó un experimento en el que se adicionaron alícuotas de concentraciones crecientes de PNP (0-50 μM), a una solución de tampón que contenía previamente las NPs (Figura 17).

También se realizó paralelamente otro experimento que sirvió de blanco del anterior, y en el que lo único diferente fue la utilización de tampón en lugar de PNP a la hora de adicionar las alícuotas.

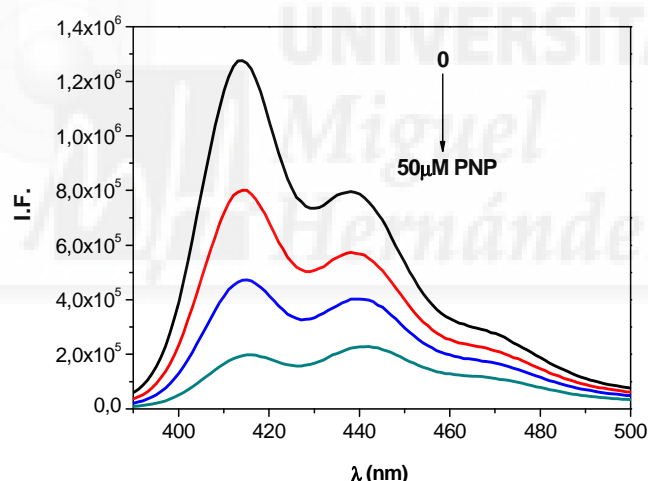


Figura 17: Espectros de emisión de las NPs tras su desactivación de fluorescencia por PNP (0-50 μM).

Estos resultados fueron luego analizados mediante el ajuste de Stern-Volmer (Ec.1 de materiales y métodos), que demostró una desactivación muy eficiente característica de este polímero, ya que la tendencia es lineal en todo el rango de concentraciones utilizado y se obtiene un valor de $K_{SV} = 4.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Figura 18). Esta desactivación puede deberse a un mecanismo de transferencia de energía entre el HTMA-PFP, que actuaría como donador, y el PNP, que sería el aceptor, dado que el espectro de emisión de las NPs (Figura 17) solapa con el espectro de absorción del PNP (Figura 8A).

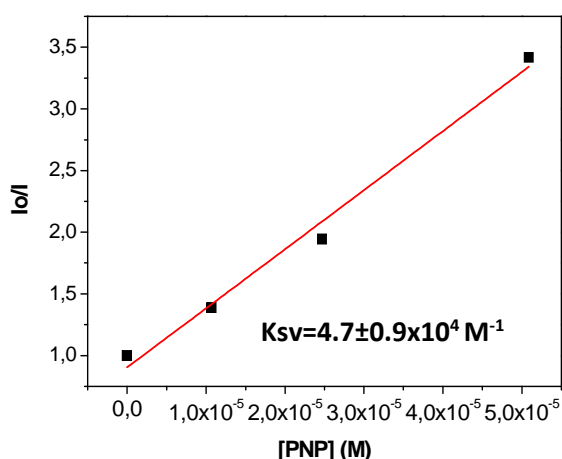


Figura 18: Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de fluorescencia de las NPs por PNP.

5.2.5 Medida de la actividad enzimática en disolución

Llegados a este punto el siguiente paso fue asegurarse de que las NPs podían ser desactivadas en presencia de la enzima ALKP y su sustrato PNPP. Además, el experimento que se realizó en esta ocasión permitía también comprobar, por comparación con el anterior, si existe o no una relación aproximada 1:1 entre la desactivación de fluorescencia producida por una determinada concentración de PNP, y la ocasionada por la misma concentración pero de PNPP. Para ello se preparó en primer lugar una cubeta con una disolución de NPs a la que también se añadió la enzima ALKP (0.15 μM), y posteriormente cada cinco minutos, fueron adicionándose concentraciones crecientes de PNPP (0-50 μM). A los cinco minutos de cada adición se tomó un espectro de la fluorescencia del polímero, de manera que cada bajada de su intensidad fue debida al producto PNP obtenido en dicha reacción enzimática (Figura 19). A partir de los espectros se representó la gráfica de Stern-Volmer en la que se ha obtenido un valor de $K_{sv} = 3.9 \pm 0.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Figura 20).

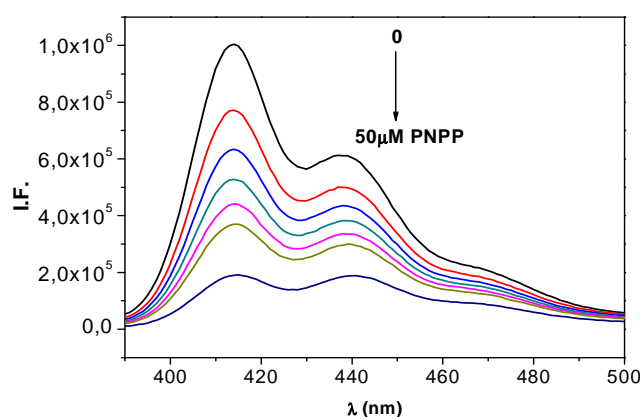


Figura 19: Espectros de emisión de las NPs tras su desactivación de fluorescencia en presencia de ALKP y PNPP (0-50 μM).

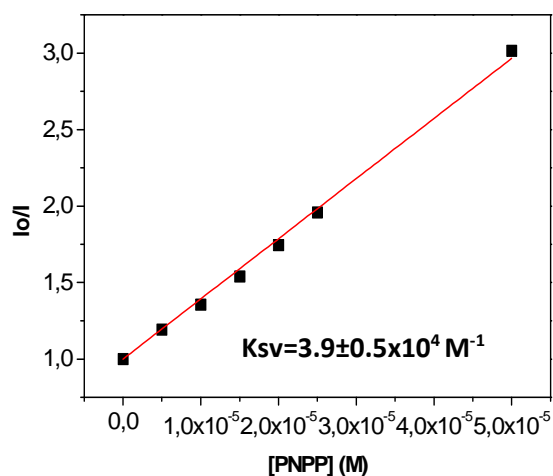


Figura 20: Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de fluorescencia de las NPs, por el PNP formado a partir de ALKP y PNPP.

Tras la comparación de las K_{sv} obtenidas en ambos experimentos (Figuras 18 y 20), que fueron muy parecidas, se llegó a la conclusión de que la desactivación de fluorescencia del HTMA-PFP era prácticamente la misma tanto si se adicionaban directamente 50 μM de PNP, como si se añadía la misma concentración de PNPP en presencia de ALKP. Este resultado confirmó que el método fluorescente planteado funcionaba correctamente para seguir la actividad enzimática de la ALKP. Durante el resto del trabajo se utilizó esta concentración de sustrato PNPP (50 μM), ya que permitía una desactivación de fluorescencia importante y adecuada.

5.3 Estudios de fluorescencia en sol-gel

Una vez concluidos todos los estudios necesarios para poner a punto el método fluorescente, se pasó a inmovilizar los componentes con objeto de fabricar un biosensor que fuera capaz de detectar actividad enzimática de la ALKP. Para ello, se optó por un método de atrapamiento conocido como proceso sol-gel, que permite la retención de las biomoléculas en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa y transparente, construida a partir de alcóxidos metálicos de silicio como el TEOS (Figura 21), mediante el proceso descrito en el apartado materiales y métodos. Además, también permite el uso de técnicas ópticas, como la fluorescencia, gracias a esta transparencia.

Otras ventajas que llevaron a decantarse por esta técnica fueron, por un lado, la sencillez y facilidad a la hora de la inmovilización de los compuestos, y por otro, la resistencia a la desorción, al igual que el mantenimiento de las propiedades y de la actividad que éstos presentan en disolución. Además, en el grupo de investigación, ya se había utilizado el proceso sol-gel en la fabricación de otros biosensores, por lo que tenían experiencia en el tema (Salinas-Castillo y col., 2008).

Sin embargo, para el uso de este método en el desarrollo del biosensor, es fundamental que los analitos externos sean capaces de entrar y difundir dentro de la matriz sol-gel para interactuar con la proteína (Dunn y col., 1998), lo cual puede convertirse en un factor limitante, ya que puede ralentizar la respuesta del biosensor.

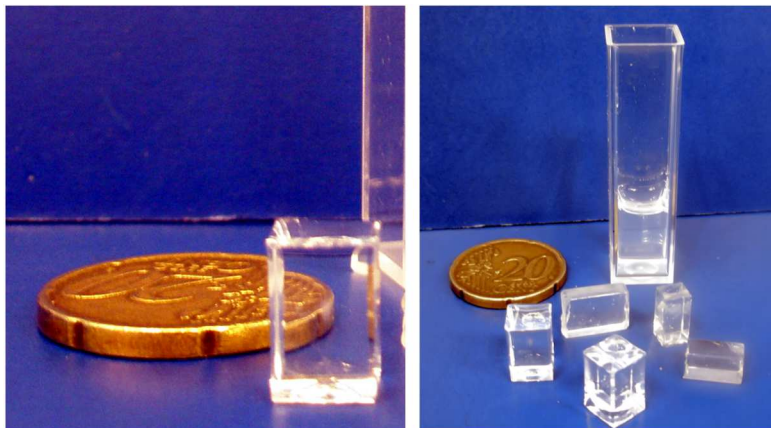


Figura 21: Imagen de matrices de sílice 10x10 mm obtenidas en el laboratorio mediante el proceso sol-gel.

5.3.1 Inmovilización de la ALKP: comprobación por fluorescencia del triptófano (Trp)

Una vez fabricados los monolitos con la enzima ALKP, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado materiales y métodos, era de gran importancia comprobar si ésta había sido inmovilizada correctamente. Para ello se aprovechó la fluorescencia intrínseca que posee la proteína, debido a los aminoácidos Trp que contiene y su sensibilidad al ambiente que los rodea (Lakowicz., 1999).

El experimento consistió en realizar primero un espectro a la enzima en disolución, excitando la muestra a 280 nm y recogiendo la emisión en un rango de 290-380 nm, y seguidamente realizar otro espectro con las mismas condiciones pero a una matriz con ella inmovilizada.

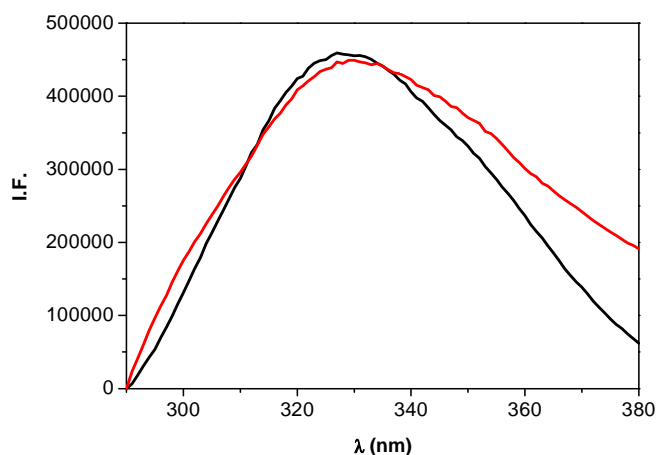


Figura 22: Espectros de emisión de la ALKP en tampón (negro), e incorporada en una matriz sol-gel (rojo).

El espectro de emisión del triptófano presenta su máximo a 348 nm (Teale y Weber., 1957), sin embargo en los resultados obtenidos (Figura 22), tanto en tampón como en la matriz sol-gel, los triptófanos presentes en la enzima mostraron su máximo de emisión alrededor de 330 nm. Este desvío hacia el azul indica que se encontraban en un medio poco polar, y por tanto poco expuestos al agua. En cambio la desnaturalización de la proteína hace que éste espectro se desplace hacia el rojo (longitudes de onda mayores) al pasar de un ambiente no polar a uno polar.

Por lo tanto, el hecho de que el sol-gel mostrara un espectro de emisión muy similar al de la enzima en disolución, era indicativo de que la ALKP se encontraba en su interior y sin desnaturalizar, lo que confirmaba su correcta inmovilización.

5.3.2 Comprobación de la funcionalidad de ALKP

El hecho de que la inmovilización fuera un éxito no aseguraba la funcionalidad de la enzima en el interior de la matriz, lo que llevó a diseñar un sencillo experimento cualitativo, con objeto de comprobar si su actividad enzimática se había visto afectada por estar inmovilizada.

El experimento consistió en la adición del monolito con la ALKP inmovilizada a un vial, que contenía una disolución de sustrato PNPP (50 μ M), para ver si con el tiempo se producía un cambio de color. Tras un tiempo de espera se observó que la disolución había adquirido un color amarillo, característico del compuesto PNP formado (Figura 23). Este resultado sirvió para confirmar la conservación de la funcionalidad de la enzima en el interior del monolito.



Figura 23: Aspecto de la disolución una vez finalizado el experimento.

5.3.3 Inmovilización de NPs fluorescentes: comprobación por espectros de emisión

Para asegurarse de que también las NPs, al igual que la ALKP, quedaban retenidas en el interior de la matriz tras su inmovilización, se fabricó un monolito en el que éstas fueron inmovilizadas, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado materiales y métodos. A los dos días se desmoldó y se midió directamente la fluorescencia del monolito. El espectro obtenido fue comparado con el resultante del mismo estudio en disolución (Figura 24).

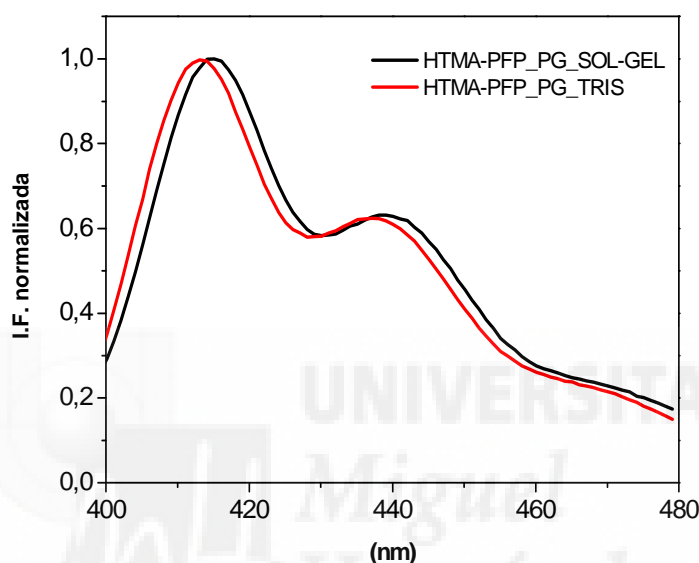


Figura 24: Espectros normalizados de las NPs

fluorescentes en disolución (rojo) y en sol-gel (negro).

El resultado confirmaba que las NPs habían quedado inmovilizadas en el interior de la matriz y mantenían su estabilidad, al haber emitido el monolito fluorescencia, siendo además el espectro de fluorescencia el característico del HTMA-PFP. El ligero desplazamiento observado hacia el rojo, puede deberse al diferente entorno notado por las NPs.

5.3.4 Actividad de la ALKP en presencia de PNPP: montaje del experimento

Una vez confirmada la correcta inmovilización y posterior mantenimiento de la funcionalidad, de los componentes del biosensor por separado, se llevó a cabo su co-inmovilización. Para ello se fabricaron nuevos monolitos de 10x2 mm, en los cuales fueron inmovilizados juntos, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado materiales y métodos, la enzima ALKP y las NPs.

Con objeto de comprobar el funcionamiento del biosensor creado, se realizó un estudio en el que se midió la cinética de transformación de PNPP a PNP. Para ello, en primer lugar se depositó un monolito de 10x2 mm con ALKP y NPs inmovilizadas, en la cara más ancha de una cubeta de cuarzo triangular (Figura 25).

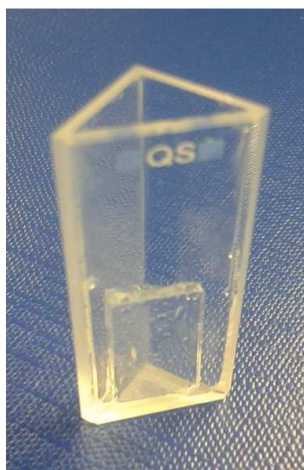


Figura 25: Colocación adecuada del monolito en el interior de una cubeta de cuarzo triangular.

A continuación fue colocada la cubeta, a la que se le añadió tampón, en el portamuestras del fluorímetro, como se muestra en la Figura 26, con objeto de que el haz de excitación incidiera directamente sobre el monolito y se pudiera recoger su fluorescencia.

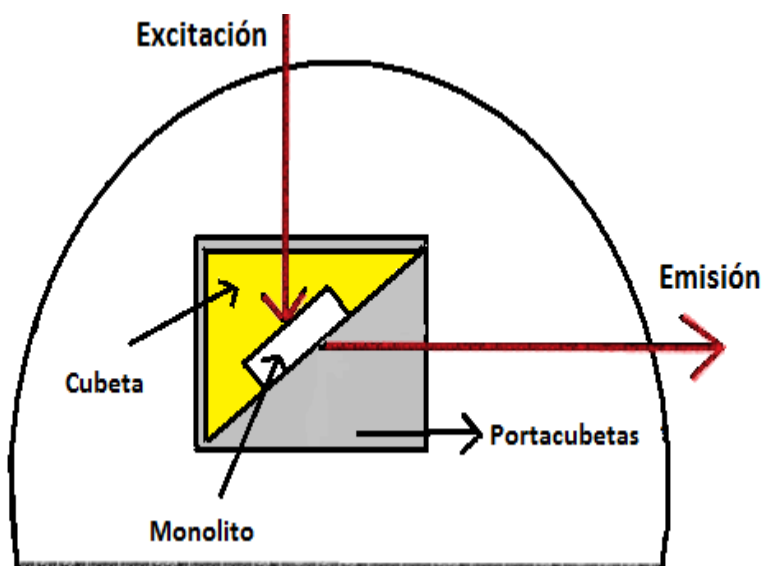


Figura 26: Dibujo de la disposición de la cubeta en el interior del fluorímetro.

Posteriormente se añadió el PNPP ($50 \mu\text{M}$) y comenzó a realizarse la cinética, midiendo la fluorescencia del monolito a diferentes tiempos (Figura 27). Sin embargo el modo de proceder fue diferente al de las cinéticas realizadas anteriormente en disolución, ya que se abrió la rendija de excitación únicamente durante el tiempo de cada medición, y permaneció cerrada durante el tiempo de espera. Todo ello con el fin de minimizar el posible fotoblanqueo del HTMA-PFP en el interior de la matriz. Este fenómeno, que había sido comprobado en un experimento anterior no ocurre en disolución, donde las NPs pueden difundir libremente.

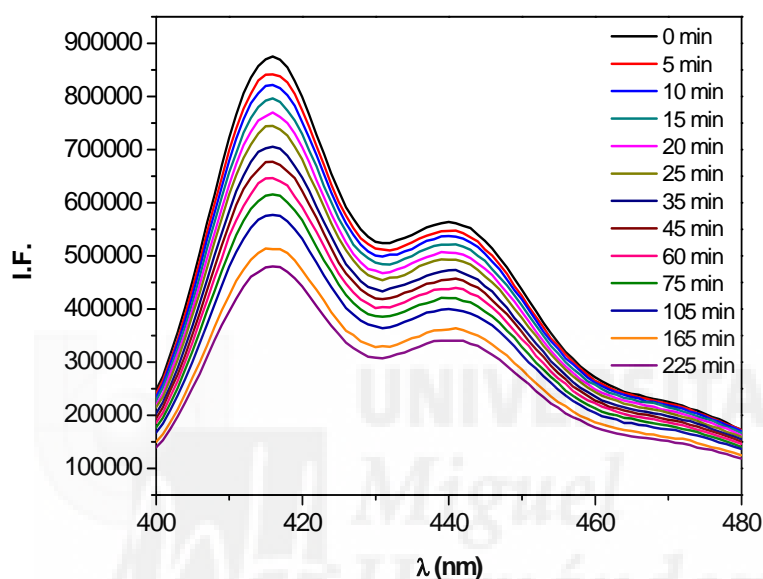


Figura 27: Espectros de desactivación de fluorescencia del HTMA-PFP a diferentes tiempos, durante la cinética de transformación del sustrato a PNP en sol-gel.

De esta forma, la disminución de la intensidad de fluorescencia tras cada medición (Figura 27) se debió únicamente, una vez restado el blanco, a la desactivación provocada por el PNP formado durante la reacción enzimática, a partir del sustrato PNPP añadido inicialmente.

El monolito, una vez lavado con tampón Tris durante 24 horas, recuperó prácticamente la fluorescencia inicial, lo que sugiere que el biosensor podría ser reutilizable. Para confirmarlo, se colocó en un vial con tampón al que se le añadió sustrato. La aparición de un color amarillo en la disolución confirmó su reusabilidad.

5.3.5 Comparación de las cinéticas

Los resultados obtenidos en el experimento de cinética se compararon con los correspondientes medidos en disolución (Figura 28). Como se puede observar, en sol-gel la cinética resultó ser extremadamente lenta, lo que se traduce en un tiempo de respuesta muy largo por parte del biosensor.

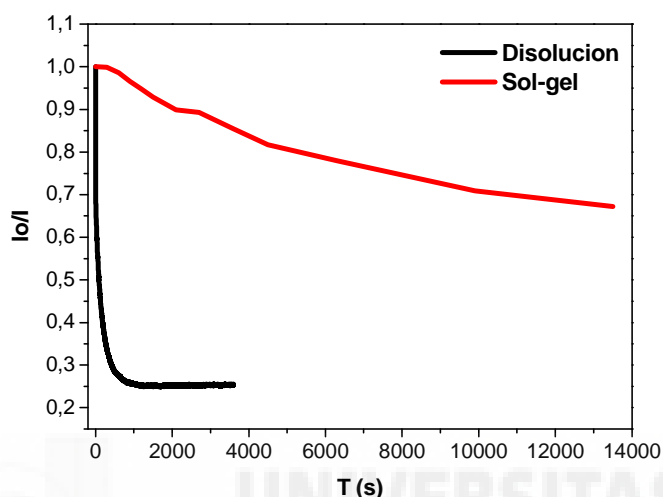


Figura 28: Comparación de la cinética de producción de PNP en disolución (negro) y en sol-gel (rojo).

Esta lentitud en la respuesta se debe en gran medida, a las peculiares y complicadas condiciones espaciales en las que se desarrolla la reacción enzimática. Al encontrarse la ALKP inmovilizada en el interior de los poros que conforman el monolito, el PNPP añadido en la disolución debe primero difundir por toda la madeja de canales porosos interconectados, hasta llegar a la enzima. A continuación tiene lugar la hidrólisis del sustrato a PNP, y éste debe difundir hasta las NPs para desactivarlas.

5.3.6 Optimización del biosensor

Los resultados anteriores muestran el desarrollo de un biosensor fluorescente que permite detectar actividad enzimática de la ALKP. Sin embargo, para que este biosensor pueda tener éxito desde un punto de vista comercial, será necesario optimizar su tiempo de respuesta. Para ello modificaciones en la temperatura, concentración de sustrato, concentración de ALKP, grosor del monolito, etc, deben de ser investigadas.

Experimentos preliminares han demostrado que un aumento de la temperatura a 37°C no favorece la respuesta, dado que la eficiencia de la desactivación de fluorescencia es menor que a temperatura ambiente (Figura 29).

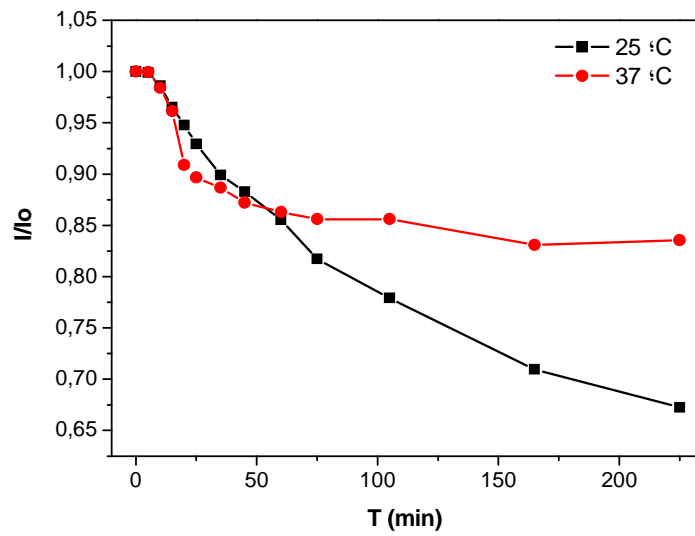


Figura 29: Comparación de la cinética de producción de PNP a 25°C (negro) y a 37°C (rojo).

La optimización de este biosensor, y su posible utilización para detectar inhibidores será objeto de un próximo trabajo.



6. Conclusiones

Las conclusiones que se extraen del presente trabajo son las siguientes:

1. Se han obtenido nanopartículas fluorescentes (NPs \approx 100 nm) estables en medio acuoso, formadas por vesículas lipídicas aniónicas que contienen al polielectrolito HTMA-PFP.
2. La fluorescencia de las nanopartículas puede ser desactivada de manera eficaz por la presencia de PNP, probablemente debido a un mecanismo de transferencia de energía.
3. Se ha puesto a punto un método fluorescente para medir la actividad enzimática de la ALKP, utilizando las NPs en presencia del sustrato PNPP.
4. Tanto la enzima ALKP como las NPs han sido inmovilizadas correctamente en matrices de sílice, mediante la metodología sol-gel, comprobándose que es una técnica útil para inmovilizar proteínas sin que se produzca la desnaturalización de las mismas.
5. Se ha fabricado un biosensor fluorescente y reversible que permite medir la actividad de la ALKP, gracias a la transparencia de la matriz.
6. Dada la lenta difusión del sustrato y el producto en el interior del monolito, el tiempo de respuesta del biosensor es muy lento, por lo que habrá que optimizar diferentes parámetros que permitan reducirlo.
7. El biosensor podría ser utilizado para detectar y cuantificar más sensiblemente inhibidores de la ALKP, entre los que se encuentran ciertos plaguicidas e insecticidas de gran importancia sanitaria y ambiental.

7. Bibliografía consultada

Achyuthan, K. E.; McClain, J. L.; Zhou, Z.; Whitten, D. G.; Branch, D. W. Spectroscopic analyses of the noncovalent self-assembly of cyanines upon various nucleic acid scaffolds. *Anal. Sci.* 2009, 25: 469–474.

Arroyo M. "Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications". *Ars Pharmaceutica* 1998, 39 (2): 23-39.

Cao Ali, Tang Yanli, and Liu Yue. "Novel fluorescent biosensor for α -glucosidase inhibitor screening based on cationic conjugated polymers". *ACS Applied Materials & Interfaces* 2012, 4: 3773-3778.

Chaudhury N.K., Bhardwaj R. y Murari B.M. "Fluorescence spectroscopic study to characterize and monitor TEOS based sol-gel for development of optical biosensor". *Current Applied Physics* 2003, 3: 177-184.

Dunn B., Miller J.M., Dave C., Valentine JS. y Zink J.I. "Strategies for encapsulating biomolecules in sol-gel matrices". *Acta Mater.* 1998, 46: 737-741.

Ferrer M.L del Monte F. y Levy D. "A novel and simple alcohol-free sol-gel route for encapsulation of labile proteins". *Chem. Matter.* 2002.

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.

Kepczynski, M; Jamroz, D.; Wytrwal, M.; Bednar, J.; Rząd, E.; Nowakowska, M. Interactions of a hydrophobically modified polycation with zwitterionic lipid membranes. *Langmuir* 2012, 28: 676–688.

Lakowicz J.R. "Principles of fluorescence spectroscopy". 2ª Edición. Editado por Lakowics J.R. Kluwer Academic-Plenum Publishers (1999).

L. Dean Rob., "Kinetic Studies with Alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations ". *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2002, 6: 401-407.

Ligler F.S. y Taitt C.R. "Optical Biosensor : Present y Future". *Elsevier Science*. 2002.

Nasredine L, Parent-Massin D. "Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry?". Elsevier Science. 2002.

Ngo, A.T.; Karam, P.; Cosa, G. "Conjugated polyelectrolyte-lipid interactions: Opportunities in biosensing". *Pure Appl. Chem*. 2011, 83: 43–55.

Salinas-Castillo A, Pastor I, Mallavia R, Mateo CR. "Immobilization of a trienzymatic system in a sol-gel matrix: A new fluorescent biosensor for xanthine". *Biosensors & Bioelectronics* 2008, 24(4): 1059-1062.

Teale F.J. y Weber G. "Ultraviolet florescence of the aromatic amino acids". *Biochemistry* 1957, 65: 476-482.

Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A. y Wilson G.S. "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification". *Pure Appl. Chem*. 1999, 71 (12): 2333-2348.

Wang, B.; Yuan, H.; Zhu, C.; Yang, Q.; Lv, F.; Liu, L.; Wang, S. "Polymer-drug conjugates for intracellular molecule-targeted photoinduced inactivation of protein and growth inhibition of cancer cells". *Sci. Rep*. 2012, 2, doi:10.1038/srep00766.

Zhu, C.; Liu, L.; Yang, Q.; Lv, F.; Wang, S. "Water-soluble conjugated polymers for imaging, diagnosis, and therapy". *Chem. Rev*. 2012, 112: 4687–4735.