



Universidad Miguel Hernández de Elche

# **Desarrollo de un biosensor fluorescente para la detección de actividad de la fosfatasa alcalina basado en polímeros conjugados.**

**Antonio Joaquín Lozano Navarro**

Tutora: Carmen Reyes Mateo Martínez

Cotutora: María José Martínez Tomé

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de conocimiento: Química-Física

Grado en Biotecnología

Curso 2014/2015

**Resumen:** En este trabajo se ha puesto a punto un nuevo método fluorescente para detectar la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina. El método se basa en los cambios de fluorescencia que experimenta el polielectrolito conjugado poli-[[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo)-2,7-fluoreno-alt 1,4-fenileno] (HTMA-PFP), por la presencia del p-nitrofenol (uno de los productos resultantes de la reacción enzimática). Tanto la enzima como el polielectrolito han sido coinmovilizados con éxito en una matriz sol-gel, con objeto de fabricar un biosensor fluorescente que pueda ser reutilizable y fácilmente manipulable. Este biosensor podría servir para detectar cualquier inhibidor de la fosfatasa alcalina, como ciertos plaguicidas o pesticidas, cuya detección y control son cada vez más necesarios por motivos de salud y seguridad en sectores como el agroalimentario o el medioambiental.

**Palabras clave:** fluorescencia, fosfatasa alcalina (ALKP), HTMA-PFP, desactivación, p-nitrofenol, nanopartículas fluorescentes, método sol-gel.

**Abstract:** In this work a new fluorescent method has been developed to detect enzymatic activity of alkaline phosphatase. The method is based on the changes of fluorescence which conjugated polyelectrolyte poly{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimethylammonium)hexyl]fluorene-phenylene} (HTMA-PFP) experiences, by the presence of p-nitrophenol (one of the products resulting from the enzymatic reaction). Both the enzyme and the polyelectrolyte have been co-immobilised successfully in a sol-gel matrix, in order to produce a fluorescent biosensor which can be reusable and easily manipulated. This biosensor could be used to detect any inhibitor of alkaline phosphatase, such as certain pesticides whose detection and control are increasingly necessary for health and safety reasons in areas such as food and agriculture or environmental.

**Keywords:** fluorescence, alkaline phosphatase (ALKP), HTMA-PFP, quenching, p-nitrophenol, fluorescent nanoparticles, sol-gel method.

# Índice

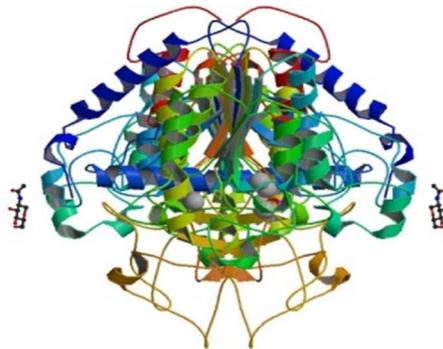
1. Introducción .....	4
1.1 Fosfatasa alcalina (ALKP) .....	4
1.1.1 Actividad enzimática .....	5
1.1.2 Condiciones óptimas de funcionamiento de ALKP .....	5
1.1.3 Inhibidores de la ALKP .....	5
1.2 Biosensores .....	6
1.2.1 Biosensores ópticos enzimáticos .....	7
2. Antecedentes .....	7
2.1 Técnica estándar para medición de actividad enzimática de ALKP: espectrofotometría.	7
2.2 Polielectrolitos conjugados fluorescentes (CPEs) .....	8
2.2.1 Sistemas basados en fluoreno .....	9
2.2.2 HTMA-PFP .....	9
2.3 Desactivación de la fluorescencia inducida por PNP.....	10
2.4 Esquema del biosensor.....	10
3. Objetivos del trabajo .....	11
4. Materiales y métodos .....	12
4.1 Materiales .....	12
4.2 Métodos .....	13
5. Resultados y discusión .....	16
5.1 Estudios de absorbancia en disolución.....	16
5.1.1 Optimización de condiciones experimentales.....	17
5.2 Estudios de fluorescencia en disolución .....	18
5.2.1 HTMA-PFP y agregación .....	19
5.2.2 Nanopartículas fluorescentes (NPs).....	20
5.2.3 Comprobación de la incorporación del HTMA-PFP a las LUVs .....	22
5.2.4 Desactivación de la fluorescencia del HTMA-PFP por PNP.....	23
5.2.5 Medida de la actividad enzimática en disolución .....	24
5.3 Estudios de fluorescencia en sol-gel .....	25
5.3.1 Inmovilización de la ALKP: comprobación por fluorescencia del Trp.....	26
5.3.2 Comprobación de la funcionalidad de ALKP.....	27
5.3.3 Inmovilización de NPs: comprobación por espectros de emisión.....	28
5.3.4 Actividad de la ALKP en presencia de PNPP: montaje del experimento.....	28
5.3.5 Comparación de las cinéticas.....	31
5.3.6 Optimización del biosensor.....	31
6. Conclusiones.....	33
7. Bibliografía .....	34

# 1. Introducción

## 1.1 Fosfatasa alcalina (ALKP)

La fosfatasa alcalina (ALKP) es una enzima hidrolasa perteneciente al grupo de las fosfomonoesterasas, y por lo tanto, es capaz de catalizar la hidrólisis de un enlace químico. Su actividad principal consiste en llevar a cabo la desfosforilación de determinadas moléculas como proteínas, nucleótidos y alcaloides, a pH alcalino, como su propio nombre indica. Por todo ello también recibe el nombre de orto-fosfórico-monoéster hidrolasa. Se encuentra presente en la mayoría de los animales, y en los humanos forma parte de muchos tejidos del organismo, aunque es especialmente abundante en órganos como el hígado, riñones, intestinos y placenta, donde parece estar involucrada en el movimiento de moléculas a través de las membranas. También en los huesos, donde participaría en el proceso de mineralización.

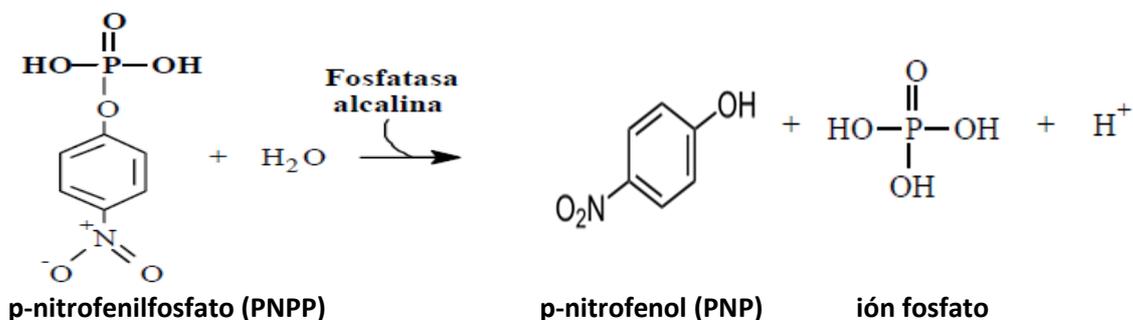
En cuanto a su estructura (Figura 1), se trata de una proteína formada por dos cadenas polipeptídicas, cada una con un sitio activo capaz de hidrolizar grupos fosfato. Las dos cadenas al plegarse contienen un número considerable de regiones con estructuras secundarias Alfa y Beta, junto a otras muchas regiones sin estructura regular, y puesto que son idénticas, hacen de esta enzima un claro ejemplo de homomultímero.



**Figura 1:** Estructura de la enzima fosfatasa alcalina.

### 1.1.1 Actividad enzimática

La ALKP, en disolución acuosa y condiciones óptimas de funcionamiento, es capaz de hidrolizar al sustrato p-nitrofenilfosfato (PNPP), que es un éster de fosfato artificial, y dar como productos ión fosfato y p-nitrofenol (PNP) (Esquema 1).



Esquema 1: Reacción enzimática de la ALKP.

### 1.1.2 Condiciones óptimas de funcionamiento de ALKP

La ALKP presenta su máxima actividad enzimática a pH básico entre 7.5 y 9.5 y a una temperatura de 37 °C. Además, suele requerir cofactores iónicos como el Mg<sup>2+</sup> o el Zn<sup>2+</sup>.

### 1.1.3 Inhibidores de la ALKP

La gran mayoría de las sustancias capaces de modular la actividad enzimática de la ALKP son xenobióticos, compuestos cuya estructura química en la naturaleza es inexistente o infrecuente, al ser sintetizados por el ser humano en el laboratorio. Entre ellos destacarían, por su elevada toxicidad en altas concentraciones, pesticidas y plaguicidas químicos, cuyo uso en la agricultura a nivel mundial desde hace ya unas décadas es desmesurado, y aumenta constantemente, debido a la elevada demanda de alimentos por la masificación de la población. Esto conlleva graves implicaciones, no solo de residualidad en los alimentos producidos, sino también de contaminación de aguas, suelos, aire y demás seres vivos, ya que la mayoría de estos compuestos son recalcitrantes a la biodegradación.

Por tanto no es de extrañar, que ante este preocupante panorama, diariamente los mercados internacionales y cada vez más los gobiernos, se vuelvan muy exigentes con respecto a los límites máximos permitidos, tanto en los diferentes productos de consumo humano como a nivel medioambiental (Nasreddine y col., 2002).

De manera que aunque es sin duda éste, uno de los campos donde los métodos de análisis convencionales ha hecho grandes aportes, a pesar de su evolución siguen en muchos casos siendo poco sensibles, y conllevando largas y engorrosas etapas en el tratamiento de la muestra, la extracción, la limpieza y la validación. Esto les impide en multitud de ocasiones obtener resultados sensibles y en tiempo real, lo que puede poner en riesgo la salud de la población.

Como solución a estos problemas, son muchos los científicos que han pensado en los biosensores y a día de hoy, ya existen algunos comercializados y otros muchos en desarrollo de los cuales una gran parte son enzimáticos, que representan una verdadera y atractiva alternativa frente a los métodos analíticos clásicos. Entre sus ventajas destacarían una detección y cuantificación de los compuestos de forma más sensible, sencilla y barata, que garantice la comercialización de productos seguros, y un control adecuado de éstos en las aguas, los suelos y el aire.

## **1.2 Biosensores**

El término biosensor hace referencia a un tipo específico de sensor químico que comprende un elemento de reconocimiento biológico en íntimo contacto con un transductor físico-químico (Thévenot y col., 1999). De manera que la interacción del elemento de reconocimiento (enzima, anticuerpo, microorganismos, DNA, etc.) con el analito produce un cambio en las propiedades de la disolución, como por ejemplo la formación de un producto, que el transductor convierte en una señal cuantificable.

Los biosensores iniciaron su desarrollo y comercialización hace varias décadas, orientados a ciertas aplicaciones clínicas y de impacto bioquímico, y a día de hoy abarcan todo un campo multidisciplinar con un futuro brillante, en el que hay depositadas muchas ilusiones y en el que existe una gran investigación, una importante inversión económica y un mercado en auge a nivel global.

Han llegado a protagonizar una verdadera revolución en el sector del diagnóstico clínico y en la actualidad, están comenzado a revolucionar otros sectores también de enorme importancia como el agroalimentario y el medioambiental, al gozar de ciertas características tan deseables como una elevada sensibilidad y selectividad, manejo sencillo, mínimo volumen de muestra, análisis in situ, capacidad multi-análisis, bajo coste de producción o reversibilidad, que los han convertido en una alternativa muy atractiva frente a los métodos analíticos clásicos.

### **1.2.1 Biosensores ópticos enzimáticos**

Dentro de los tipos de biosensores que existen, los ópticos son uno de los grupos más importantes debido a su simplicidad y bajo coste. Se basan en un indicador que cambia sus propiedades espectroscópicas en respuesta a la presencia de un analito determinado. (Ligler y Taitt., 2002). Los transductores ópticos que los forman, permiten la cuantificación de bioanalitos mediante la determinación de sus características ópticas, como por ejemplo la variación de la intensidad de fluorescencia en el caso de los biosensores fluorescentes. Biosensores que por cierto, están adquiriendo una enorme importancia debido a su potencial para detectar ligeros cambios bioquímicos (Chaudhury y col., 2007).

Además atendiendo al elemento de reconocimiento biológico que contengan, los biosensores se pueden clasificar en enzimáticos, inmunosensores, genosensores, etc. Sin embargo, no cabe duda de que son las enzimas uno de los materiales biológicos preferidos por su elevada especificidad y selectividad (Arroyo., 1998), de manera que los biosensores ópticos enzimáticos, son capaces de detectar las reacciones enzimáticas producidas a través de cambios colorimétricos o cambios en la fluorescencia.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Técnica estándar para medición de actividad enzimática de ALKP: espectrofotometría**

Hasta ahora la técnica analítica que se ha venido utilizando para la detección de la actividad enzimática de la ALKP ha sido la espectrofotometría de absorción (L. Dean., 2002), debido al color amarillo que posee el compuesto PNP obtenido como producto, en dicha reacción enzimática (Esquema 1) a pH alcalino. Este color le permite ser monitorizado colorimétricamente a una longitud de onda de 405 nm y en consecuencia, permite también un seguimiento de la actividad enzimática de la ALKP.

La espectrofotometría de absorción y más concretamente la de UV-visible (fracción de la radiación electromagnética en la que absorbe el PNP), es una técnica analítica que mide la cantidad de luz de una determinada longitud de onda absorbida por la muestra. En ella el color se puede correlacionar en la mayoría de ocasiones con la presencia de una sustancia química particular, y dado que las medidas de absorbancia son baratas y fáciles de realizar, se ha usado y se usa ampliamente para mediciones cualitativas y cuantitativas.

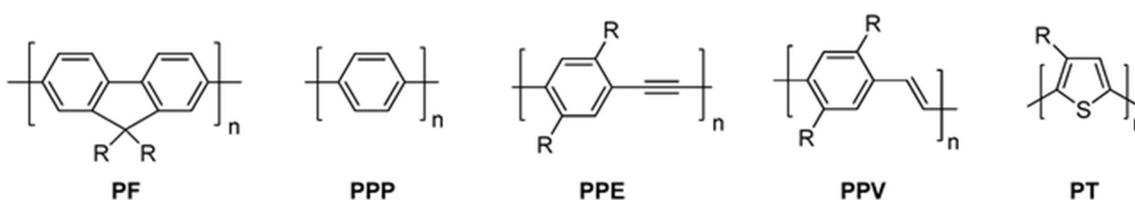
Sin embargo estos métodos colorimétricos presentan una serie de desventajas como su baja sensibilidad, elevadas interferencias y necesidad de una gran cantidad de muestra, que los hacen poco adecuados para ser utilizados en la detección de sustancias reactivas o peligrosas. Como alternativa están los métodos fluorimétricos, que presentan la importante característica de ser mucho más sensibles en sus detecciones.

## **2.2 Polielectrolitos conjugados fluorescentes (CPEs)**

Los polielectrolitos son polímeros de cualquier tipo y estructura, con grupos ionizables cargados positiva o negativamente, cuya interacción con los lípidos juega un papel importante en muchas aplicaciones biofísicas (Kepczynski y col., 2012).

Más concretamente, los polielectrolitos conjugados fluorescentes son un tipo de polielectrolitos que presenta unas propiedades muy interesantes. Se trata de polímeros  $\pi$ -conjugados que poseen un esqueleto rígido o semirrígido formado por enlaces conjugados, los cuales facilitan la rápida migración intra e intercatenaria de los electrones (Figura 2). Además, les permiten respuestas ópticas colectivas y señales amplificadas en comparación con los pequeños fluoróforos, mostrando una fuerte absorción y alta eficiencia en electroluminiscencia y fotoluminiscencia. También contienen cadenas laterales con grupos iónicos que les facilitan su solubilización en agua (Ali Cao y col., 2012).

Normalmente presentan baja citotoxicidad y elevada fotoestabilidad. Además, son fácilmente susceptibles a la bioconjugación con diversos elementos de reconocimiento a través de sus cadenas laterales (Wang y col., 2012). Por otro lado, tienen la capacidad de autoensamblarse de manera reversible mediante interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas, con otras especies de carga opuesta, dando lugar a estructuras supramoleculares con importantes propiedades ópticas (Achyuthan y col., 2009). Todo ello hace de los CPEs unos nuevos y sensibles materiales para el desarrollo de biosensores y la detección de biomoléculas (Ngo y col., 2011).



**Figura 2:** Ejemplos de polielectrolitos conjugados (CPEs). La letra R representa una cadena lateral.

### 2.2.1 Sistemas basados en fluoreno

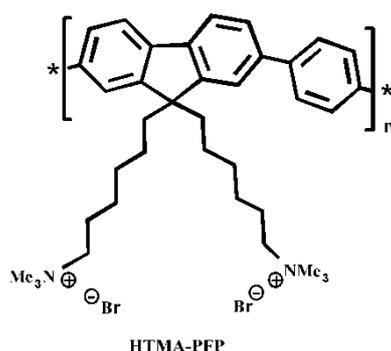
Los CPEs basados en anillos de fluoreno (Figura 2 izquierda) poseen grandes ventajas ya que presentan, además de una alta fotoestabilidad, excelente estabilidad térmica y buena accesibilidad sintética, altos rendimientos cuánticos de fluorescencia y emisión en el azul (adecuada para experimentos de transferencia de energía) (Zhu y col., 2012).

Constan de una cadena principal rígida e hidrofóbica de polifluoreno, con cadenas laterales flexibles cargadas positivamente que son las responsables de su agregación, un fenómeno que se tratará más adelante y que afecta directamente a su fluorescencia intrínseca (Wang y col., 2012).

### 2.2.2 HTMA-PFP

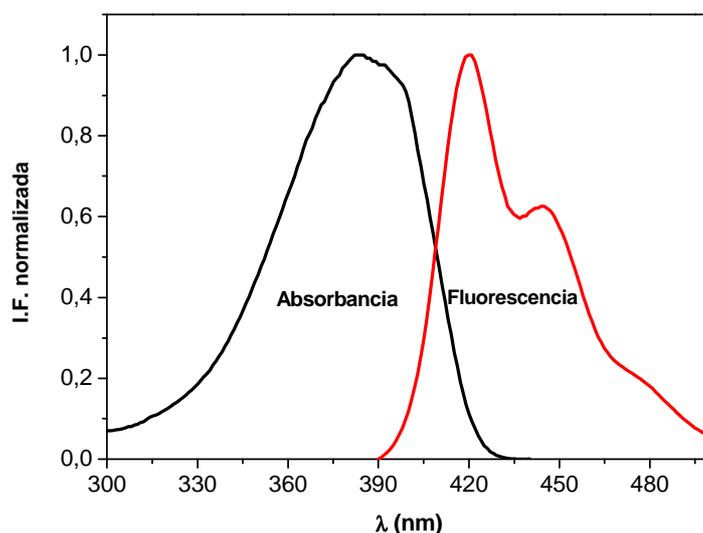
En este trabajo se utilizó un CPE catiónico basado en fluoreno denominado: bromuro de poli-[(9,9-bis (6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo)-2,7-fluoreno-alt 1,4-fenileno] (HTMA-PFP), que fue previamente sintetizado en el laboratorio.

Se trata de un compuesto parcialmente soluble en agua que consta de una fracción hidrofóbica, formada por una cadena principal aromática y dos cadenas laterales alquílicas, y una fracción hidrofílica constituida por aminas cuaternarias. Éstas son las responsables de las interacciones electrostáticas no específicas que establece con especies de carga opuesta, y que pueden ser controladas por cambios en su fluorescencia intrínseca. Su estructura química se muestra a continuación (Figura 3).



**Figura 3:** Estructura química del HTMA-PFP.

En la Figura 4 se muestra el espectro de absorción del HTMA-PFP en tampón, que presenta su máximo a 380 nm, y el de emisión de fluorescencia cuyo máximo se encuentra hacia 420 nm.



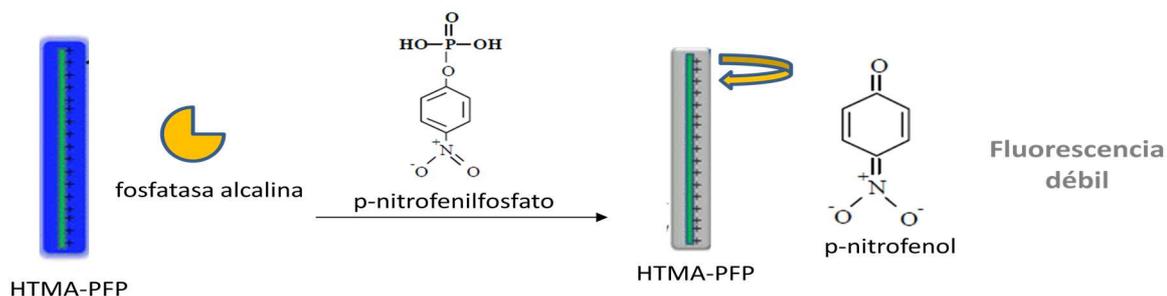
**Figura 4:** Espectros de absorción (negro) y de emisión (rojo) del HTMA-PFP en tampón.

### **2.3 Desactivación de la fluorescencia inducida por PNP**

Hasta ahora se ha mencionado el importante papel del PNP en el seguimiento de la actividad enzimática de la ALKP, gracias a su cuantificación colorimétrica. Este compuesto también presenta otra propiedad muy importante en este trabajo, que es su excelente capacidad desactivadora de la fluorescencia en CPEs, como el HTMA-PFP (Ali Cao y col., 2012). Se trata de un compuesto aniónico y soluble en agua, que tendría la capacidad de actuar como nexo de unión entre la actividad enzimática de la ALKP y la fluorescencia del polímero.

### **2.4 Esquema del biosensor**

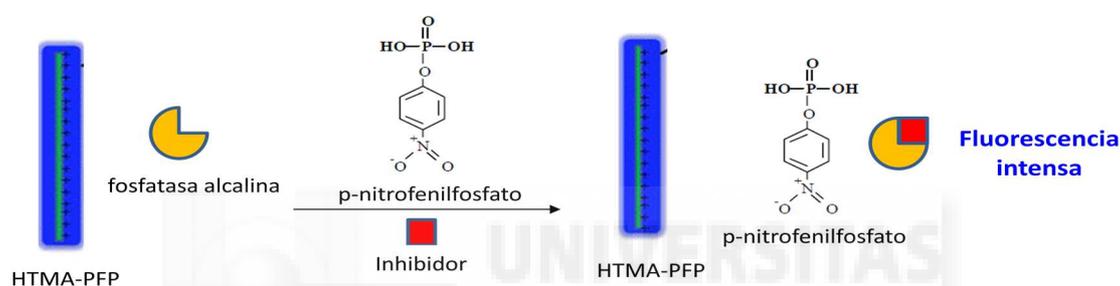
Con todo lo expuesto anteriormente ya es posible realizar un esquema (Figura 5a), que plasme la idea en la que se basa el funcionamiento del biosensor fluorescente que se deseaba fabricar.



**Figura 5a:** Esquema del biosensor

En él se puede observar cómo la enzima ALKP sería capaz de hidrolizar todo el sustrato añadido a PNP y, tras ser excitado el polielectrolito a la longitud de onda adecuada, el producto formado ocasionaría una importante bajada de su intensidad de fluorescencia que sería proporcional a su concentración.

El biosensor podría tener aplicaciones en la detección de inhibidores, como se muestra en la Figura 5b. En presencia de un inhibidor, éste se uniría a la ALKP ocasionando una destacable bajada de su actividad enzimática. Como consecuencia de ello la enzima solo sería capaz de hidrolizar una parte del PNPP a producto (que sería mayor o menor dependiendo de la concentración del inhibidor en la muestra), lo que provoca una bajada de la intensidad de fluorescencia mucho menor.



**Figura 5b:** Esquema del biosensor en presencia de un inhibidor.

Es por ello que el desarrollo de este biosensor podría llegar a ser un éxito a la hora de buscar en muestras de interés nuevos inhibidores, o cuantificar otros ya conocidos de manera más sensible a como se viene haciendo hasta ahora.

### 3. Objetivos del trabajo

El presente trabajo busca dos objetivos principales, ambiciosos y prometedores:

1. Poner a punto un método fluorimétrico capaz de detectar actividad enzimática de la ALKP basado en el polielectrolito conjugado HTMA-PFP.
2. Inmovilizar los componentes del ensayo (ALKP y polielectrolito) en una matriz, con objeto de fabricar un biosensor fluorescente que sea fácilmente manipulable y reutilizable.

## 4. Materiales y métodos

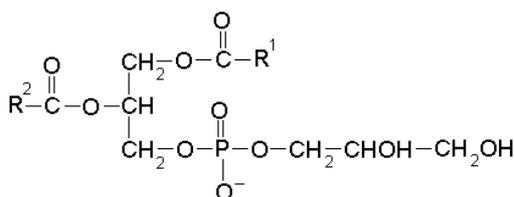
### 4.1 Materiales

El CPE HTMA-PFP ( $M = 8340$  g/mol, siendo el peso de la unidad de repetición molecular, 694,71 g/mol;  $n'=12$  basándose en la calibración del polifluoreno) fue obtenido y caracterizado en el laboratorio. Se sintetizó un lote del polímero de bajo peso molecular poly[9,9-bis(6'-bromohexil)-fluoreno-fenileno] por la reacción de acoplamiento de Suzuki, utilizando Pd (II) como catalizador, y se trató con trimetilamina en fase gaseosa para obtener el correspondiente polielectrolito catiónico. Las soluciones stock de HTMA-PFP ( $3,65 \cdot 10^{-4}$  M, en unidades de repetición) fueron preparadas en DMSO y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de su uso.

El tampón Tris (55 mM, pH 9) utilizado en todos los experimentos se preparó mezclando Tris básico con agua dos veces destilada y desionizada (agua MQ proveniente del equipamiento Milli-Q (Millipore, Madrid)).

La enzima ALKP empleada, de Sigma-Aldrich, se encontraba en forma de polvo liofilizado y procedía de mucosa intestinal de bovino ( $M_w = 140$  KDa). Fue disuelta en Tris para su posterior uso.

El lípido adquirido de Sigma-Aldrich para la fabricación de los liposomas fue el L- $\alpha$ -Fosfatidil-DL-glicerol (PG), procedente de lecitina de yema de huevo (Figura 6).



**Figura 6:** Estructura del fosfatidilglicerol (PG) empleado. Imagen cogida de la página web de Sigma-Aldrich.

El desactivador de fluorescencia PNP, de Sigma-Aldrich, se disolvió en Tris para ser posteriormente utilizado.

El sustrato empleado en la reacción enzimática fue el PNPP disódico hexahidratado, en polvo,  $[\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OP}(\text{O})(\text{ONa})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  ( $M_w = 371.14$ ) procedente de Sigma-Aldrich. Se disolvió en Tris para su uso posterior.

## **4.2 Métodos**

**Formación de vesículas unilamelares grandes (LUVs):** Para obtenerlas en primer lugar, al lípido PG pesado en un vial de cristal de boca ancha se le adicionó cloroformo/metanol en una proporción 2:1, con el fin de disolverlo. A continuación se procedió a secar la disolución con argón, quedando una película lipídica en la base del vial que tras su resuspensión con tampón Tris, dió lugar a las vesículas multilamelares (MLVs). A éstas se les aplicaron posteriormente tres sesiones de sonicación de 5 minutos, y seguidamente fueron sometidas con ayuda de un extruder (Figura 7) a un proceso de extrusión a presión, a través de unos filtros de policarbonato de 0.1 micras, tras el cual se consiguieron las LUVs.



**Figura 7:** Extruder para la formación de LUVs por extrusión a presión.

**Producción de las nanopartículas fluorescentes (NPs):** Una vez preparadas las LUVs de PG, a una concentración de 0.5 mM se añadió una alícuota de HTMA-PFP en DMSO para obtener una concentración final de éste de 1.5  $\mu$ M. Inmediatamente después se agitó vigorosamente la disolución con una pipeta Pasteur de vidrio, para que el polímero se introdujera en los liposomas y se incubó la muestra durante 5 minutos.

**Fabricación de monolitos mediante el empleo de la técnica sol-gel:** De todos los métodos de inmovilización enzimática existentes, el proceso sol-gel es uno de los más utilizados por las muchas ventajas que posee. Los monolitos o matrices que con él se obtienen presentan entre otras bondades, estabilidad térmica y química, posibilidad de variar el número y tamaño de sus poros, estabilidad de las biomoléculas encapsuladas en su interior, y resistencia a la pérdida y desorción de las mismas.

El proceso sol-gel está incluido por tanto dentro de los métodos de atrapamiento. Se basa en una reacción de polimerización de alcóxidos metálicos como el tetraetil ortosilicato (TEOS), que es el empleado en este trabajo, y da como resultado una matriz porosa y transparente en cuyos poros es posible la inmovilización de la ALKP y del HTMA-PFP (Salinas-Castillo y col., 2008).

El protocolo seguido en este trabajo para la fabricación de matrices sol-gel, fue descrito por primera vez por Ferrer y col. en el año 2002 para la inmovilización de membranas lipídicas en sol-gel, de manera que se le realizaron las modificaciones necesarias para inmovilizar los compuestos de nuestro interés.

-Preparación de TEOS hidrolizado: En un vial de boca ancha se preparó a temperatura ambiente una disolución madre de sílice (sol), mezclando TEOS (4.46 mL) con agua MQ (1.44 mL) y HCl 0.6 M (40 µL). La disolución, con dos fases claramente diferenciadas, se puso a agitar vigorosamente durante aproximadamente 1 hora, tiempo necesario para que el TEOS se hidrolizase. La aparición de una sola fase se utilizó de indicador visual para saber que la hidrólisis había finalizado. Como producto de esta reacción química se genera etanol.

-Rotación del TEOS hidrolizado: El objetivo de esta fase fue la completa eliminación del etanol residual generado durante el proceso de hidrólisis, ya que puede interferir negativamente con las biomoléculas inmovilizadas y en las proteínas, inducir un desplegamiento total o parcial de su conformación nativa. Para ello en primer lugar, se mezcló una cantidad determinada de TEOS hidrolizado con agua MQ en proporción 1:1. Entonces se pesó el vial con la disolución en una balanza y a continuación, se sometió a rota-evaporación a vacío en el Rotavapor. Tras 15 minutos aproximadamente se paró la rotación y se volvió a pesar el vial, con el objetivo de comprobar si todo el etanol había sido eliminado, sabiendo que 1 mL de TEOS contiene 0.62 g de etanol. El poco volumen perdido fue restaurado con agua MQ.

-Preparación de matrices con la enzima ALKP y el HTMA-PFP: Una vez obtenido el TEOS rotado, en cubetas cuya forma y tamaño dependía de la aplicación final, se mezclaron en tampón las NPs previamente preparadas con la enzima ALKP, y por último el TEOS rotado (ya que una vez adicionado se produce rápidamente la polimerización). Enseguida con la misma pipeta, se agitó la mezcla varias veces pero cuidadosamente para no formar burbujas. Siguiendo este protocolo, se produjo la formación del gel en aproximadamente 15 minutos a presión y temperatura ambiente. Tras una espera de 60 minutos se añadió Tris sobre la superficie de las matrices formadas para mantenerlas hidratadas, se taparon con parafilm y se guardaron a 4°C durante, al menos, 48 horas.

También fueron preparados monolitos en los que no se inmovilizó la ALKP aunque sí el HTMA-PFP, y sirvieron de blanco en los experimentos.

Cabe destacar que los monolitos fabricados fueron de dos tipos: unos de 10x10 mm que sirvieron para caracterización, y otros más finos de 10x2 mm que se utilizaron para el estudio de la actividad enzimática de la ALKP, en los diferentes experimentos que con ella se realizaron.

-Desmoldado de los monolitos: después de 48 horas se les retiró el tampón que los cubría, y se desmoldaron uno a uno todos los monolitos fabricados dando pequeños golpecitos sobre la bancada, con la mano que contenía la cubeta, siempre con cuidado de que no se rompieran al desmoldarse. El resultado eran monolitos de sílice con la enzima y el HTMA-PFP inmovilizados en su interior.

Las enzimas, así inmovilizadas, conservan su actividad durante varios meses, siempre que se mantengan hidratadas.

**Espectros de absorción y fluorescencia:** Las mediciones de absorción se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando un modelo de espectrofotómetro UV-1603 (Shimadzu, Tokio, Japón). Por otro lado para la obtención de todos los espectros de fluorescencia, fue empleado un espectrofluorímetro QuantaMaster (PTI, Birmingham, Nueva Jersey, EE.UU). Con respecto a las cubetas utilizadas para los experimentos de absorción y fluorescencia en disolución, las muestras se colocaron en cubetas de cuarzo de 10 x 10 mm. Sin embargo en los estudios de fluorescencia en sol-gel las cubetas fueron de cuarzo triangulares. En todos los experimentos la longitud de onda de excitación para el HTMA-PFP se fijó en 380 nm.

**Experimentos de desactivación de fluorescencia:** la emisión de fluorescencia del HTMA-PFP se estudió en presencia y en ausencia de diferentes concentraciones de PNP, tanto en disolución como en sol-gel. A los resultados de desactivación obtenidos se les aplicó el análisis de Stern-Volmer, de acuerdo con la ecuación 1:

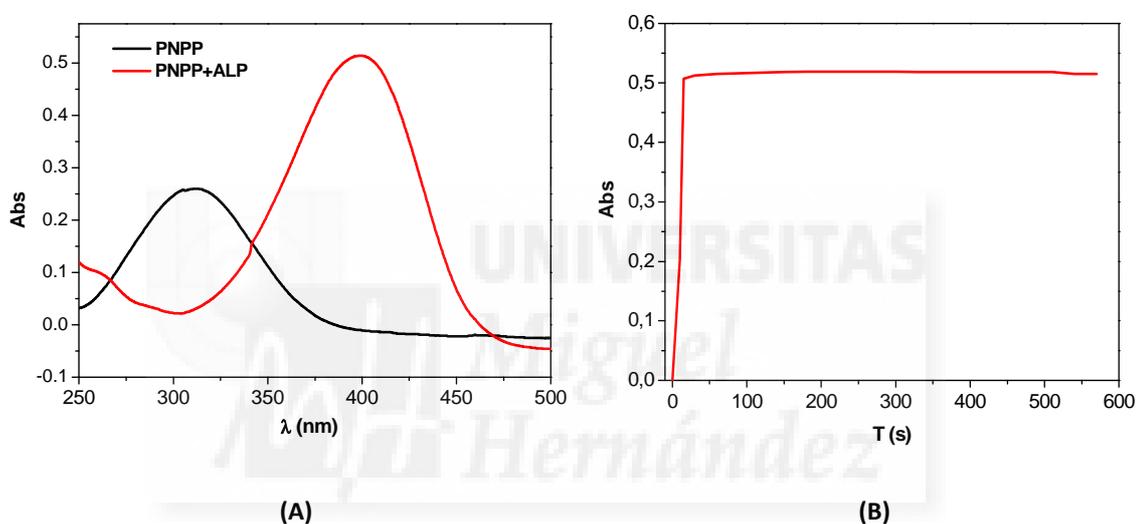
$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Ec. 1}$$

Donde  $I_0$  e  $I$  representan las intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia del PNP respectivamente,  $[Q]$  es la concentración de PNP, y  $K_{SV}$  la constante de Stern-Volmer, que indica el grado de desactivación de fluorescencia provocado por el desactivador.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Estudios de absorbancia en disolución

Los primeros experimentos que se realizaron en este trabajo fueron una serie de estudios de absorbancia en disolución, cuyo objetivo principal era comprobar la actividad enzimática de la ALKP, mediante la hidrólisis del sustrato PNPP a PNP (Figura 8A). También se realizó una cinética de la transformación (Figura 8B). Los espectros obtenidos muestran como la banda de absorción típica del PNPP, con su máximo de absorción a 310 nm, desaparece tras la adición de la enzima, y aparece en su lugar una nueva banda a 405 nm característica del PNP formado.



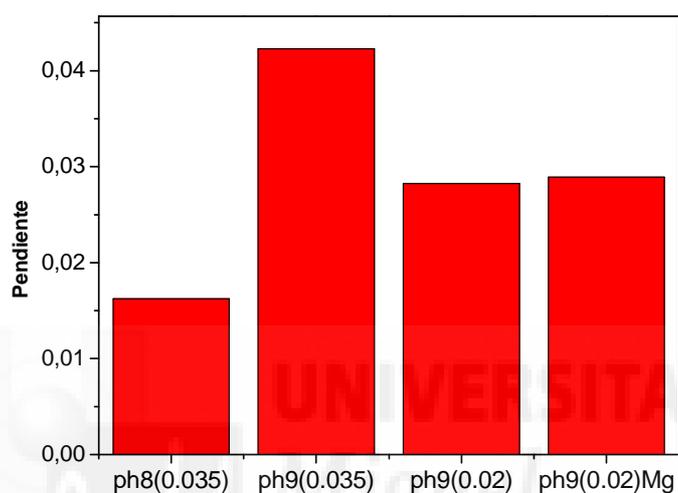
**Figura 8:** (A) Espectros de absorción del PNPP 50  $\mu$ M (negro), y del PNP formado tras la adición de ALKP 0.15  $\mu$ M (rojo). (B) Cinética de transformación del PNPP en PNP.

Estos resultados confirman la actividad de la enzima ALKP, y su especificidad por el PNPP, al que es capaz de hidrolizar por completo rápidamente, en menos de 5 minutos, como muestra su cinética.

Es por dicha razón por la que este método es un referente en la detección de inhibidores de la ALKP, ya que permite detectarlos y cuantificarlos en poco tiempo, añadiendo la enzima y su sustrato a la muestra y midiendo la señal obtenida a 405 nm (L. Dean., 2002).

### 5.1.1 Optimización de condiciones experimentales

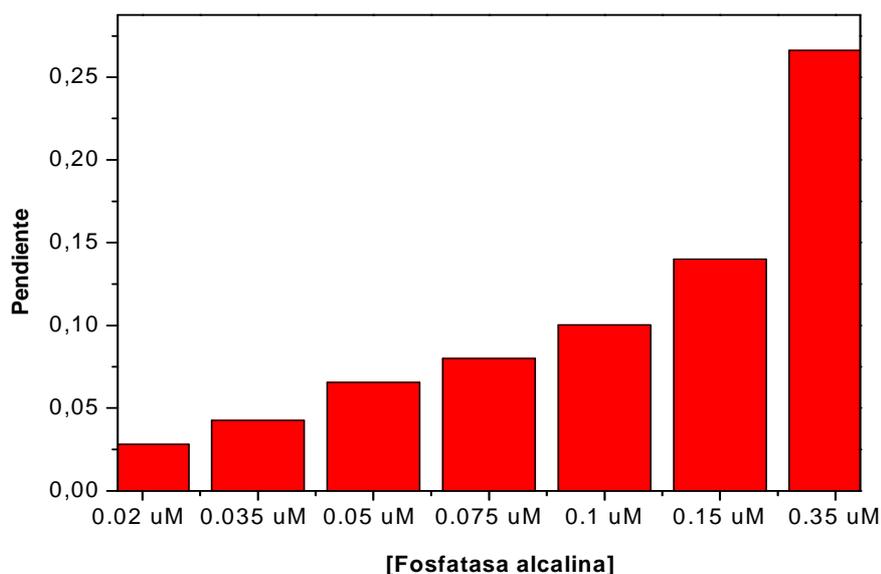
Con el objetivo de conseguir unas condiciones experimentales apropiadas para que la actividad enzimática de la ALKP fuera la óptima, se llevaron a cabo una serie de estudios a diferente pH, diferente concentración de enzima y cofactor  $Mg^{2+}$ . En todos ellos el volumen total y el volumen de sustrato 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  $\mu M$ . 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  $\mu\text{M}$  de ALKP, que fue la utilizada en todos los experimentos posteriores.

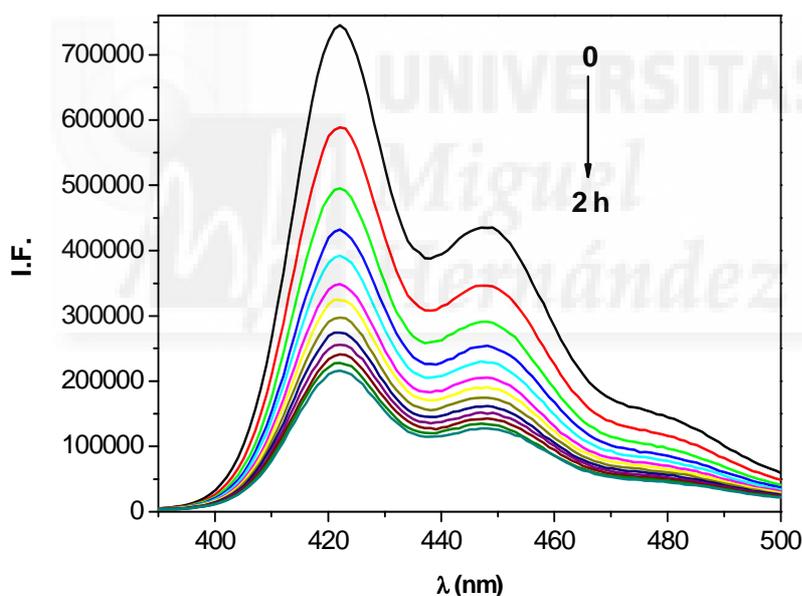
## **5.2 Estudios de fluorescencia en disolución**

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  $\mu\text{M}$ ) 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.

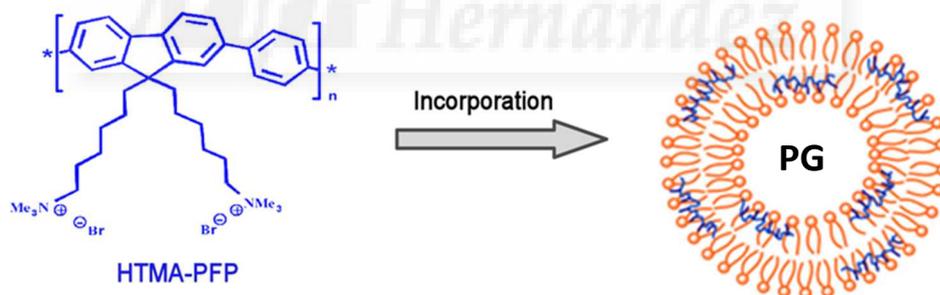
Tal y como se esperaba, los espectros registrados estaban ligeramente desplazados hacia el rojo (ya que el máximo de emisión del HTMA-PFP ha de estar en 415 nm), y la intensidad de fluorescencia del polímero fue disminuyendo con el tiempo, lo que indicaba la existencia de agregados inestables del polielectrolito 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).

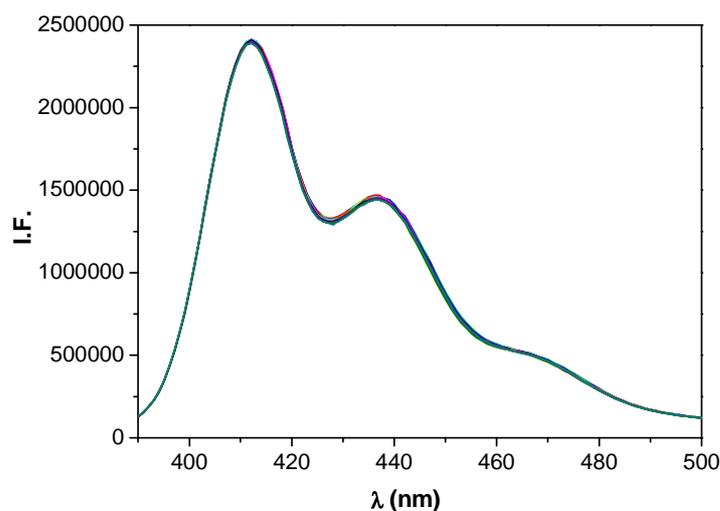
Los liposomas, de forma aproximadamente esférica y talla normalmente nanométrica, se han convertido en los últimos años en herramientas muy versátiles en campos como la Bioquímica o la Medicina. Se trata de vesículas con una fase acuosa interna rodeada por una o más bicapas lipídicas anfipáticas, y pueden 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).



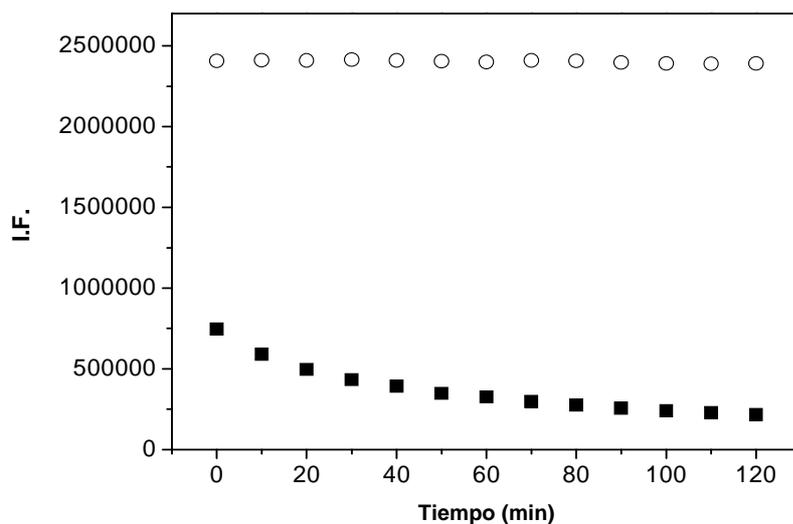
**Figura 12:** Imagen en la que se ilustra la incorporación y disposición del HTMA-PFP en la bicapa lipídica del liposoma de PG.

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.

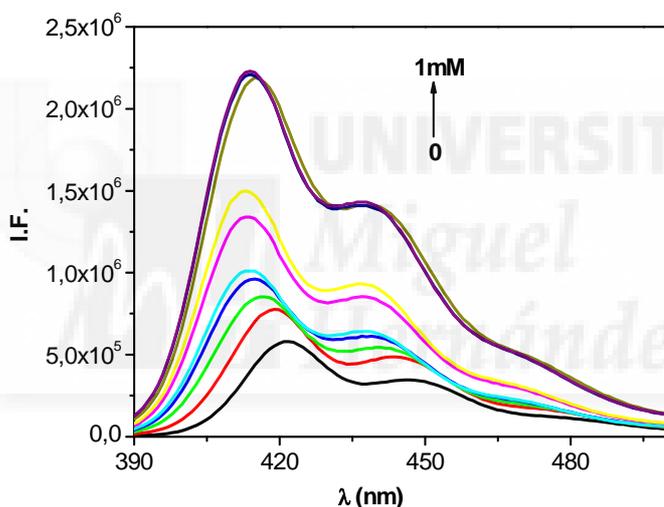
Los resultados de los dos experimentos anteriores se han recopilado en una única gráfica (Figura 14) que permite su mejor comparación. En ella queda manifiesta la gran estabilidad que le confiere al HTMA-PFP su incorporación en los liposomas, en un entorno acuoso. Prueba de ello es la importante intensidad 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.



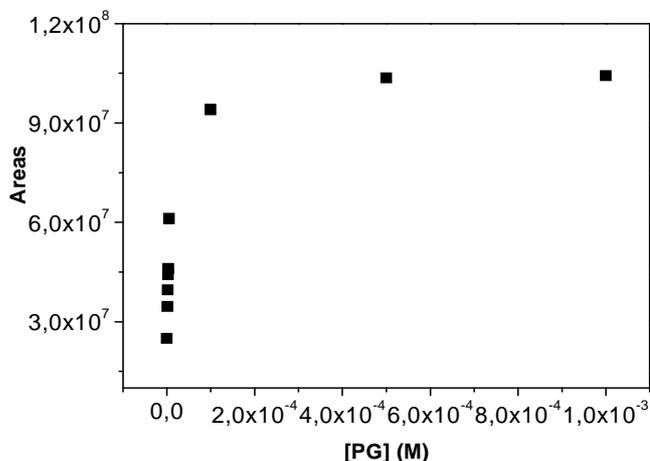
**Figura 14:** Estudio de estabilidad con el tiempo del HTMA-PFP libre (■) o incorporado en LUVs de PG (○). ( $\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$ ) ( $\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$ ).

### 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  $\mu\text{M}$ . 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  $\mu\text{M}$ ) 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).

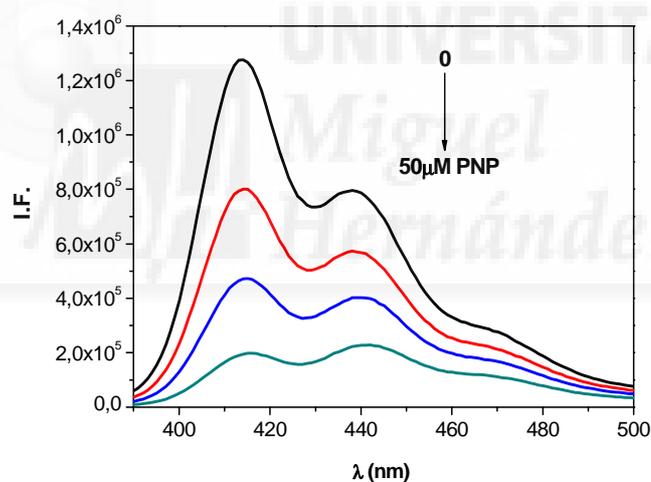
Atendiendo a los resultados obtenidos en este experimento se acabó eligiendo una concentración de LUVs de 0.5 mM, ya que con ella era segura la incorporación de todo el HTMA-PFP añadido a una concentración de 1.5  $\mu\text{M}$  (Figura 16).

#### 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.

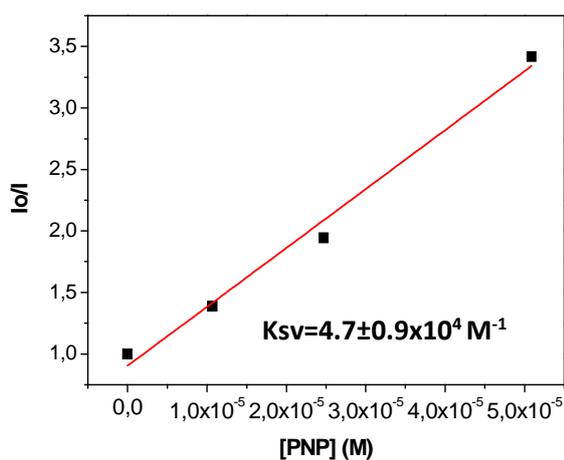
Para ello se diseñó un experimento en el que se adicionaron alícuotas de concentraciones crecientes de PNP (0-50  $\mu\text{M}$ ), a una solución de tampón que contenía previamente las NPs (Figura 17).

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  $\mu\text{M}$ ).

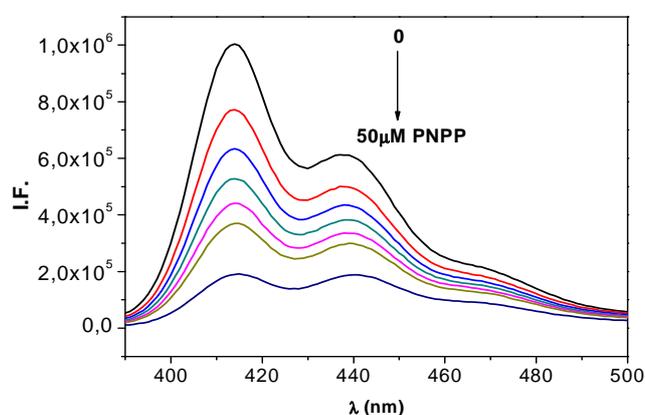
Estos resultados fueron luego analizados mediante el ajuste de Stern-Volmer (Ec.1 de materiales y métodos), que demostró una desactivación muy eficiente característica de este polímero, ya que la tendencia es lineal en todo el rango de concentraciones utilizado y se obtiene un valor de  $K_{SV} = 4.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (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).



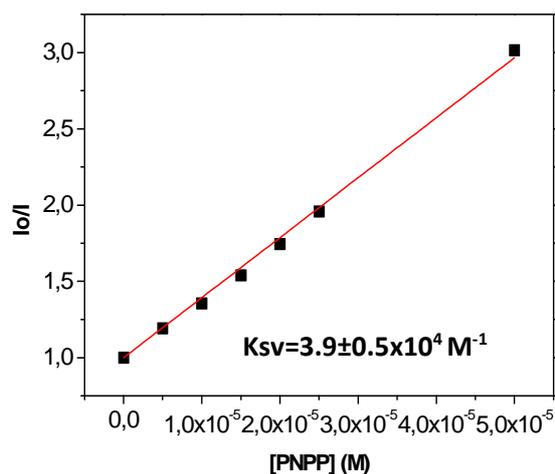
**Figura 18:** Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de fluorescencia de las NPs por PNP.

### 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  $\mu\text{M}$ ), y posteriormente cada cinco minutos, fueron adicionándose concentraciones crecientes de PNPP (0-50  $\mu\text{M}$ ). 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  $\mu\text{M}$ ).



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

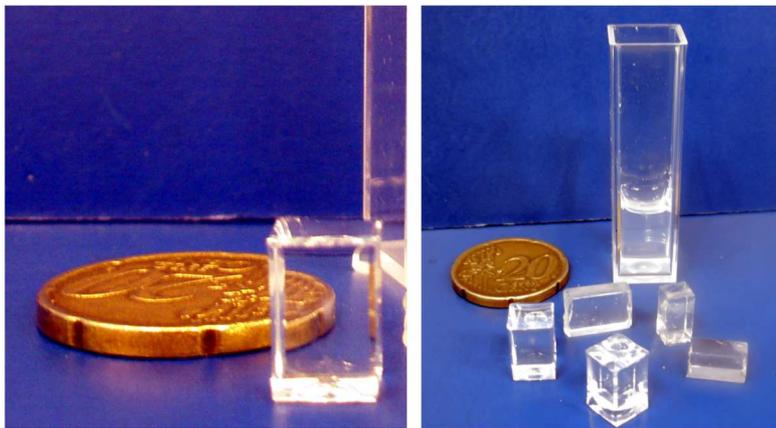
Tras la comparación de las  $K_{sv}$  obtenidas en ambos experimentos (Figuras 18 y 20), que fueron muy parecidas, se llegó a la conclusión de que la desactivación de fluorescencia del HTMA-PFP era prácticamente la misma tanto si se adicionaban directamente 50  $\mu\text{M}$  de PNP, como si se añadía 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  $\mu\text{M}$ ), 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.

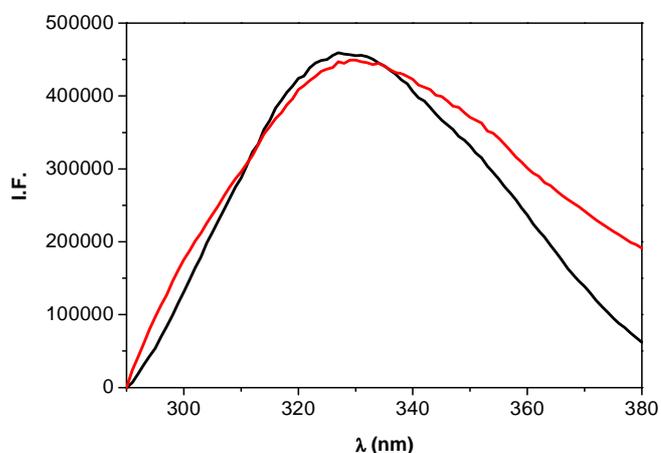


**Figura 21:** Imagen de matrices de sílice 10x10 mm obtenidas en el laboratorio mediante el proceso sol-gel.

### 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.

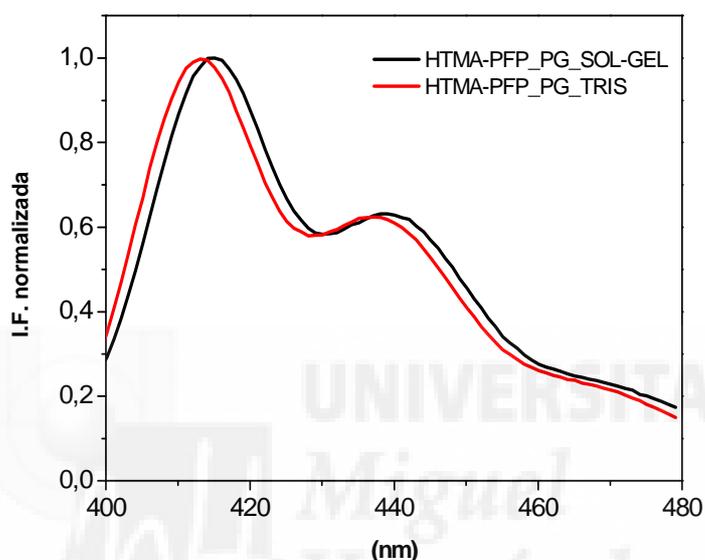
El experimento consistió en la adición del monolito con la ALKP inmovilizada a un vial, que contenía una disolución de sustrato PNPP (50  $\mu$ M), para ver si con el tiempo se producía un cambio de color. Tras un tiempo de espera se observó que la disolución había adquirido un color amarillo, característico 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

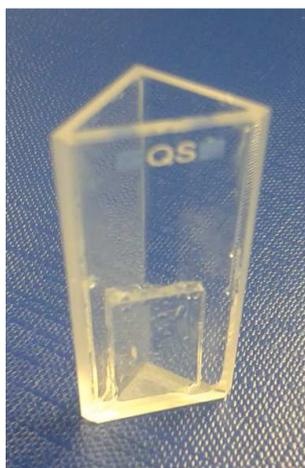
fluorescentes en disolución (rojo) y en sol-gel (negro).

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

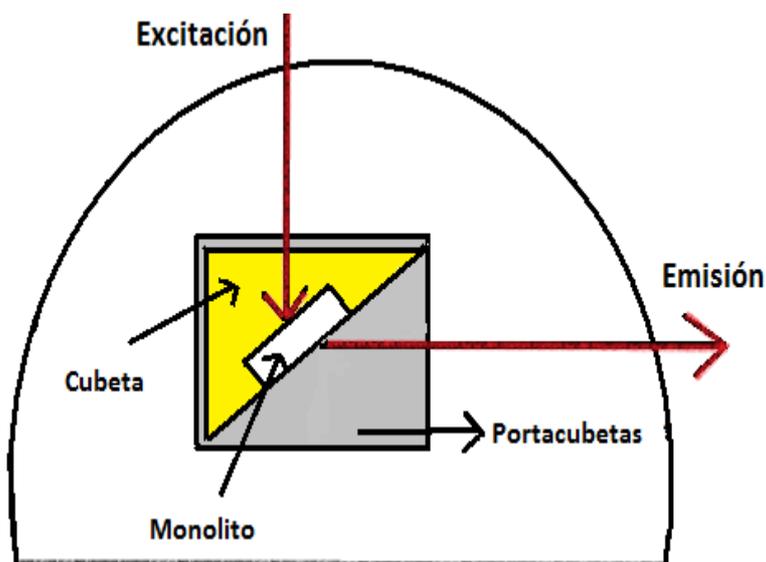
Una vez confirmada la correcta inmovilización y posterior mantenimiento de la funcionalidad, de los componentes del biosensor por separado, se llevó a cabo su co-inmovilización. Para ello se fabricaron nuevos monolitos de 10x2 mm, en los cuales fueron inmovilizados juntos, siguiendo el procedimiento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



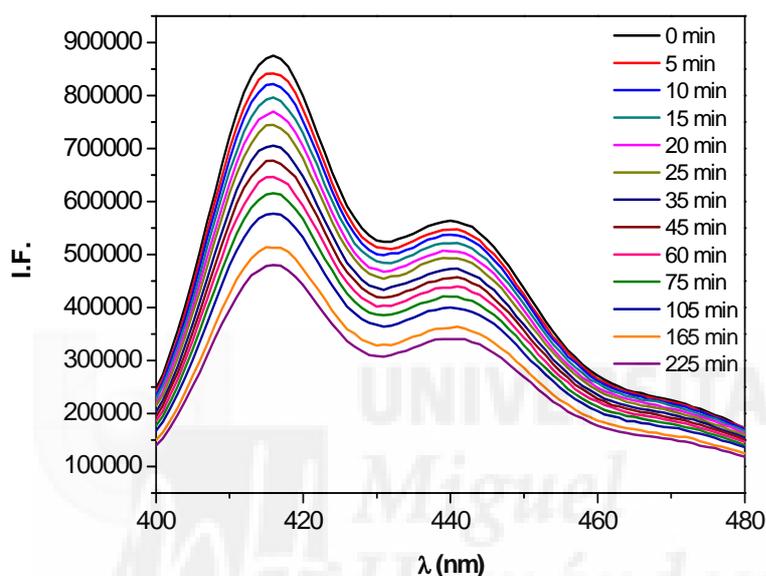
**Figura 25:** Colocación adecuada del monolito en el interior de una cubeta de cuarzo triangular.

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.



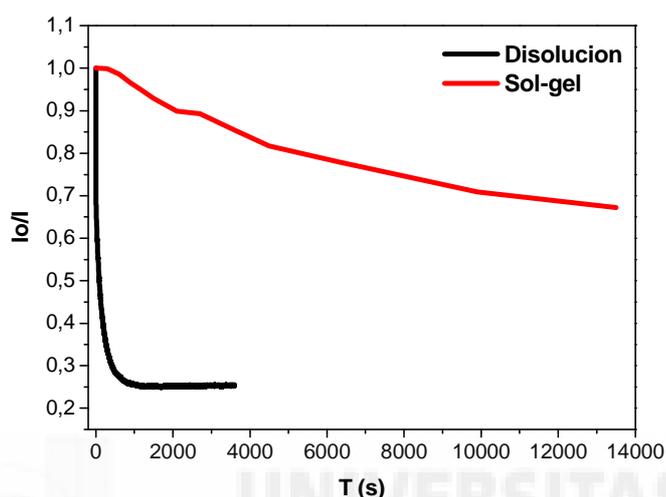
**Figura 27:** Espectros de desactivación de fluorescencia del HTMA-PFP a diferentes tiempos, durante la cinética de transformación del sustrato a PNP en sol-gel.

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.



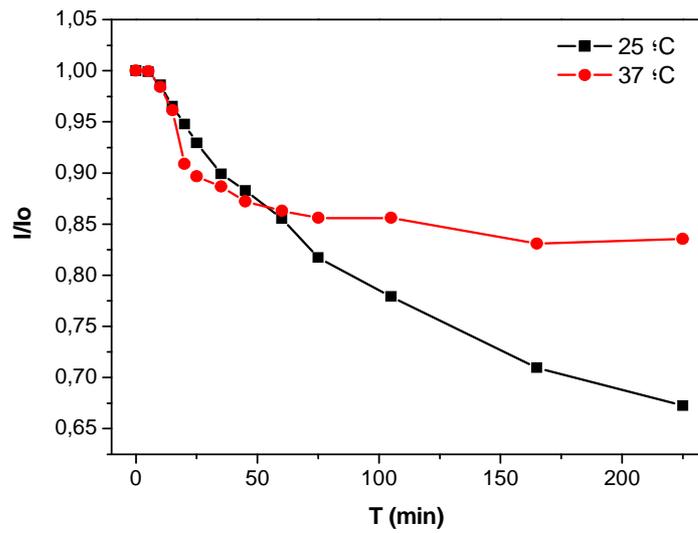
**Figura 28:** Comparación de la cinética de producción de PNP en disolución (negro) y en sol-gel (rojo).

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  $\alpha$ -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.