



TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

CURSO 2023-24

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Biblioteca

Desarrollo de matrices híbridas multifuncionales: Aplicaciones biotecnológicas

Autor: Ahmed Balah Tahiri

Tutora académica: María José Martínez Tomé

Co-tutora: Rocío Esquembre Tomé



Resumen

La calidad del agua es esencial para la salud humana y la de los ecosistemas. Los compuestos fenólicos representan uno de los mayores grupos de contaminantes entre los que se encuentran colorantes, fármacos y compuestos derivados de la fabricación de plásticos. Estos compuestos suelen ser poco biodegradables y por tanto tienen elevada persistencia. El uso de la enzima lacasa es una alternativa interesante para la biorremediación de aguas residuales debido a su amplio espectro oxidativo contra compuestos fenólicos y aromáticos. Sin embargo, hasta la fecha, el uso industrial de esta enzima no está muy extendido por su dificultad de reutilización y necesidad de calentamiento para obtener una catálisis efectiva. La inmovilización en matrices poliméricas podría ser una estrategia prometedora para contrarrestar alguna de estas limitaciones. Además, estudios recientes han señalado un efecto sinérgico entre nanoestructuras plasmónicas, como posibles soportes que permiten un control fototérmico de la actividad enzimática.

En este Trabajo de Fin de Máster se han desarrollado materiales híbridos con capacidad fototérmica y catalítica. Se ha dotado al material de propiedades fototérmicas utilizando nanopartículas de oro (AuNPs), que fueron previamente sintetizadas y caracterizadas en disolución acuosa y en tampón, tanto desnudas como recubiertas con dos polímeros estabilizantes, uno catiónico y otro neutro. Para ello se han estudiado el tamaño y la carga con técnicas de dispersión de luz dinámica, la longitud de onda del plasmón y la respuesta térmica frente a la irradiación láser. Por su parte, la lacasa se ha utilizado como enzima modelo por sus propiedades catalíticas y fue caracterizada en disolución estudiando su estado conformacional y estabilidad térmica, así como la actividad catalítica. Ambos componentes se han inmovilizado y caracterizado sintetizando hidrogeles orgánicos poliméricos basados en acrilamida y matrices inorgánicas de sílice obtenidas mediante el proceso sol-gel.

Los resultados muestran que la lacasa inmovilizada en hidrogeles y matrices sol-gel mantiene su estructura, aunque con cierta reducción en la actividad enzimática y estabilidad térmica frente a la enzima en disolución. Asimismo, las AuNPs recubiertas de PVP e inmovilizadas conservaron sus propiedades fototérmicas, incrementando significativamente la temperatura del medio bajo irradiación láser.

Aunque es posible seguir optimizando la estabilidad y la actividad enzimática en las matrices 3D, este estudio sienta las bases para el desarrollo de matrices híbridas multifuncionales, habiendo conseguido la coinmovilización de ambas nanoestructuras en las matrices de sílice.

Palabras clave: Lacasa, nanopartículas de oro (AuNPs), hidrogeles, sol-geles, inmovilización, caracterización.

Abstract

Water quality is essential for human health and ecosystem stability. Phenolic compounds represent one of the largest groups of contaminants, including dyes, pharmaceuticals, and compounds derived from plastic manufacturing. These compounds are typically poorly biodegradable and, therefore, highly persistent. The use of the enzyme laccase offers an interesting alternative for the bioremediation of wastewater due to its broad oxidative spectrum against phenolic and aromatic compounds. However, to date, the industrial use of this enzyme is not widespread due to its difficulty in reuse and the need for heating to achieve effective catalysis. Immobilization in polymeric matrices could be a promising strategy to counteract some of these limitations. Additionally, recent studies have indicated a synergistic effect between plasmonic nanostructures, which can serve as potential supports that allow for photothermal control of enzymatic activity.

In this Master's Thesis, hybrid materials with photothermal and catalytic capabilities have been developed. The materials were endowed with photothermal properties by utilizing gold nanoparticles (AuNPs), which were previously synthesized and characterized in aqueous solution and buffer, both uncoated and coated with two stabilizing polymers. The size and charge were studied using dynamic light scattering techniques, along with the plasmon wavelength and thermal response to laser irradiation. Laccase was used as a model enzyme for its catalytic properties and was characterized in solution by studying its conformational state, thermal stability, and catalytic activity. Both components were immobilized and characterized by synthesizing polymeric organic hydrogels based on acrylamide and inorganic silica matrices obtained through the sol-gel process.

The results show that laccase immobilized in hydrogels and sol-gel matrices retains its structure, albeit with some reduction in enzymatic activity and thermal stability compared to the enzyme in solution. Additionally, PVP-coated AuNPs, once immobilized, maintained their photothermal properties, significantly increasing the medium's temperature under laser irradiation. While it is possible to further optimize enzymatic stability and activity within 3D matrices, this study lays the groundwork for the development of multifunctional hybrid matrices, having successfully co-immobilized both nanostructures in silica matrices.

Keywords: Laccase, gold nanoparticles (AuNPs), hydrogels, sol-gels, immobilization, characterization.

Índice

Contenido

Resumen	3
Abstract	4
Índice	5
1 Introducción y antecedentes	7
1.1 Nanotecnología	7
1.2 Nanopartículas	8
1.2.1 Síntesis de Nanopartículas	9
1.2.1.1 Síntesis física	9
1.2.1.2 Síntesis química	9
1.2.1.3 Síntesis biológica	10
1.2.2 Tipos y clasificación de las NPs	11
1.2.2.1 Nanopartículas orgánicas	11
1.2.2.2 Nanopartículas de carbono	11
1.2.2.3 Nanopartículas inorgánicas	12
1.2.3 Resonancia de plasmón superficial localizado	13
1.3 Enzimas	14
1.3.1 Factores que influyen en la capacidad catalítica de las enzimas	15
1.3.2 Lacasa	16
1.3.2.1 Aplicaciones de la lacasa	18
1.3.2.2 Métodos de inmovilización de las enzimas	18
2. Objetivos	22
3. Procedimiento experimental	23
3.1 Tampones	23
3.2 Síntesis de AuNPs y recubrimiento	23
3.2.1 Técnicas de Dispersión de Luz Dinámica	24
3.3 Síntesis de matrices híbridas multifuncionales	25
3.3.1 Síntesis de hidrogeles orgánicos	25
3.3.2 Inmovilización de AuNPs y lacasa en el hidrogel	26
3.3.2.1 Introducción de las AuNPs mediante el método ex-situ	26
3.3.2.2 Síntesis AuNPs in-situ	26
3.3.2.3 Inmovilización de la lacasa	27
3.3.3 Síntesis de matrices Sol-Gel de sílice	27
3.3.3.1 Inmovilización de AuNPs y lacasa en matrices en sol-gel	27
3.4 Técnicas espectroscópicas	28
3.4.1 Fluorescencia	28

3.4.2 Absorción.....	28
3.5 Conversión fototérmica.....	29
3.6 Actividad enzimática.....	29
3.6.1 Actividad enzimática en disolución.....	29
3.6.2 Actividad enzimática en el hidrogel.....	29
3.6.3 Actividad enzimática en Sol-Gel.....	29
3.7 Swelling.....	30
4. Resultados y Discusión.....	31
4.1 Caracterización de las AuNPs.....	31
4.1.1. Tamaño de las AuNPs.....	31
4.1.2. Carga.....	32
4.1.3. Absorción.....	33
4.1.4. Comportamiento en medio tamponado.....	34
4.1.5 Pruebas de irradiación en disolución.....	36
4.2 Caracterización de la enzima.....	36
4.2.1. Fluorescencia.....	36
4.2.2 Ensayo de actividad a diferentes temperaturas.....	38
4.2.3 Ensayo de actividad con AuNPs.....	39
4.3 Hidrogeles orgánicos.....	40
4.3.1 Inmovilización de AuNPs.....	40
4.3.1.1. Inmovilización de AuNPs ex-situ.....	40
4.3.1.2 Inmovilización de AuNPs in-situ.....	41
4.3.2. Swelling.....	43
4.3.3 Conversión fototérmica.....	44
4.3.4. Inmovilización de la lacasa en el hidrogel.....	45
4.3.5 Ensayo de actividad de la lacasa en el hidrogel.....	47
4.4 Matrices Sol-gel de sílice.....	48
4.4.1 Inmovilización de AuNPs.....	48
4.4.2 Conversión fototérmica.....	49
4.4.3 Inmovilización de la lacasa en matrices sol-gel.....	49
4.4.4 Ensayos de actividad de la lacasa en matrices sol-gel.....	51
4.4.5 Coinmovilización.....	53
5. Conclusiones y Perspectivas futuras.....	55
6. Bibliografía.....	56

1 Introducción y antecedentes

1.1 Nanotecnología

La nanotecnología es un campo científico relativamente reciente. Fue a mediados del siglo 20, gracias al físico Richard Feynman, cuando se comenzó a hablar por primera vez de esta área científica. Feynman planteó la idea de crear máquinas que, a su vez, crearan máquinas más pequeñas llegando incluso hasta el nivel molecular. En el 1974 el científico japonés Norio Taniguchi fue el primero en emplear y definir el término “nanotecnología”. Según él, la nanotecnología consistía en “el procesamiento de la separación, consolidación y deformación de materiales, átomo a átomo o molécula a molécula” [1].

Hoy en día y, según la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos (NNI por sus siglas en inglés), la nanotecnología se define de la siguiente forma: “una ciencia, ingeniería y tecnología llevadas a cabo a escala nanométrica (de 1 a 100 nm), dónde fenómenos únicos permiten llevar a cabo aplicaciones novedosas en una amplia gama de campos, desde la química, física, biología, medicina, ingeniería y electrónica” [1].

A pesar de su corta edad, la nanotecnología está siendo adoptada por diferentes industrias a escala mundial, llevando así a inversiones cada vez mayores [2].

El medioambiente es una de las grandes preocupaciones a nivel global y gracias a los avances científicos y tecnológicos, se consiguen productos cada vez más seguros, baratos y sostenibles. La nanotecnología también contribuye en gran parte a este hito siendo más barata y limpia, reemplazando tecnologías anteriores de producción masiva y maquinaria pesada [2].

Gracias a los grandes avances logrados en las últimas décadas, también está bastante presente dentro del mundo biomédico. Un claro ejemplo de este hecho es el logro reciente de las vacunas desarrolladas en tiempo récord contra el coronavirus o el test de antígenos donde se emplean nanopartículas de oro para una rápida detección de la infección [3].

A pesar de los grandes beneficios que aporta a la humanidad la nanotecnología no está exenta de riesgos a los cuales nos exponemos diariamente. Esto ha llevado incluso a la generación de nuevas ramas científicas como la nanotoxicología y nanomedicina, para ahondar más en los efectos adversos que pueden generar estas partículas [4].

Para poder evaluar los posibles riesgos de los nanomateriales, es fundamental conocer sus propiedades fisicoquímicas, y no únicamente eso, también hay que prestar atención a los procesos empleados para sintetizar las nanopartículas ya que los desechos generados pueden ser dañinos para el ser humano o el medioambiente.

Por ejemplo, existe el riesgo de la liberación de nanotubos de carbono de su matriz con la quema de residuos que contengan estas partículas. Para poder descomponer estos nanotubos de carbono son

necesarias temperaturas por encima de 850°C, con la consecuencia de que estos se quedan en la atmósfera incrementando el riesgo de ser inhalados o ser ingeridos a través de los alimentos [5].

La creación del “Reglamento de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas” (REACH por sus siglas en inglés) en 2007 ha sido un paso adelante en términos de protección contra estos riesgos ya que requiere del registro de todo producto que emplee algún tipo de nanomaterial [4].

1.2 Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) mencionadas anteriormente son materiales diminutos con tamaños entre 1-100 nm. Aunque según la clasificación dimensional se denomina nanopartículas solo a aquellas nanoestructuras cuyas tres dimensiones están en este rango, comúnmente se puede utilizar el término nanopartícula como sinónimo de nanomaterial englobando entonces a nanofibras, nanobarras, nanocapas, etc. que poseen al menos una dimensión dentro de la escala nanométrica. Estas partículas, debido a su tamaño tan reducido, tienen una gran área de superficie que les confiere propiedades físicas y/o químicas únicas, despertando así el interés de muchos científicos por su gran aplicabilidad en diversos campos como el biomédico, la agricultura, la biotecnología o el medioambiente, entre otros [6].

El procesamiento de desechos de comida a energía mediante nanobioprocesamiento enzimático o el uso de nanotubos de carbono para el tratamiento de aguas residuales, serían algunos ejemplos de aplicaciones de las nanopartículas/nanoestructuras en nuestro día a día [7].

Existen diferentes formas de NPs. Pueden ser esféricas, cilíndricas, irregulares, cónicas, poliédricas, etc (Figura 1.1). Por lo general son bastante complejas y están compuestas de 3 capas [8, 9].

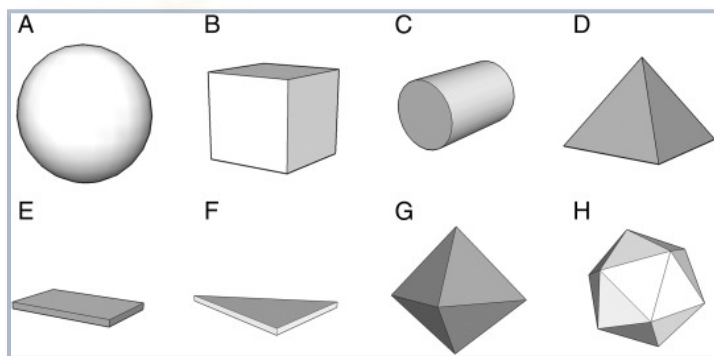


Figura 1.1. Representación esquemática de diversas formas de nanopartículas. (A) Esféricas, (B) Cúbicas, (C) Cilíndricas, (D) Piramidales, (E) Nanoplacas rectangulares, (F) Nanoplacas triangulares, (G) Octaédricas, (H) Icosaédricas [10].

(i) La capa superficial es la capa más externa e interactúa directamente con el entorno. Esta capa puede ser funcionalizada con una gran variedad de moléculas pequeñas, metales iónicos, surfactantes o polímeros, mejorando su compatibilidad. (ii) La capa de revestimiento que puede ser químicamente diferente al núcleo. La función de esta capa es, entre otras, la de brindar estabilidad a las NPs evitando así una posible reacción o agregación indeseada. Para ello se genera una barrera física y/o química alrededor de las NPs que evita este fenómeno y, por último, (iii) el núcleo, que es la parte más interna de todas y está formado por los átomos principales de la misma nanopartícula. Las propiedades intrínsecas de la

partícula también están definidas por esta capa. El tamaño, forma, propiedades ópticas, magnéticas, etc. son determinadas por el núcleo [11, 12].

1.2.1 Síntesis de Nanopartículas

Existen principalmente dos enfoques para la síntesis de NPs; el *top-down* (de arriba hacia abajo) y el *bottom-up* (de abajo hacia arriba), que a su vez son subdivididos en diferentes subclases dependiendo de las condiciones empleadas (Figura 1.2).

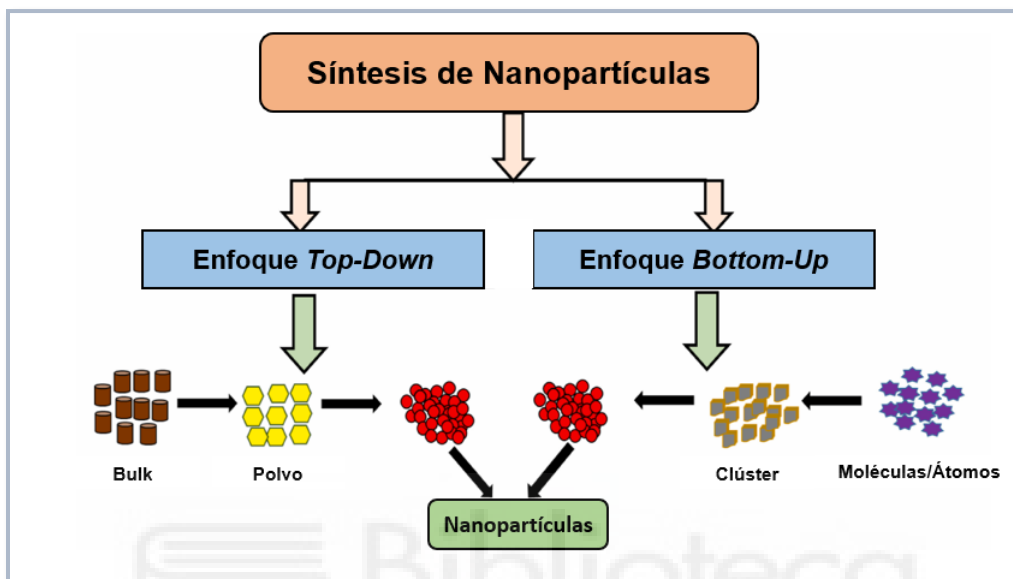


Figura 1.2. Representación esquemática de los métodos *top-down* y *bottom-up* para la síntesis de nanopartículas.

Figura adaptada de [13].

1.2.1.1 Síntesis física

Para la síntesis física se suele usar el enfoque *top-down* donde se opta por ir fragmentando un material más grande hasta obtener las nanopartículas del tamaño deseado. Este método de síntesis no requiere de un disolvente y genera nanopartículas monodispersas. Ablación o pirólisis láser, condensación de gas inerte, etc. son algunos ejemplos empleados para la síntesis física.

Esta alternativa de producción de NPs está bastante integrada dentro de la industria de los semiconductores, con métodos como la fotolitografía [6, 13].

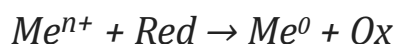
1.2.1.2 Síntesis química

Por otra parte, el enfoque *bottom-up* se basa en ir uniendo átomos o moléculas creando estructuras más grandes utilizando generalmente métodos químicos. Esta variante permite la síntesis de nanopartículas con formas y tamaños uniformes. Para la síntesis de nanopartículas inorgánicas se tiende a elegir esta estrategia usando técnicas de química húmeda [13, 14]. Es el método más empleado para la producción de nanopartículas metálicas por su alta eficiencia, bajo coste y facilidad, ya que no requiere de maquinaria avanzada.

Reducción química

El control de las condiciones de síntesis determina en gran medida las características de la nanopartícula [4, 13]. Para la reducción química se requiere de un precursor metálico, un disolvente, un agente reductor (de origen natural o sintético) y un estabilizador [4]. Este método se puede subdividir en 2 o 3 grandes fases (Figura 1.3):

- 1) La reducción: en este paso se lleva a cabo la reacción redox, donde el metal (Me) acepta los electrones proporcionados por el agente reductor (Red) pasando de una carga neta positiva a una neutra, generando átomos de metal libres insolubles.



- 2) Nucleación: cuando se alcanza el estado de supersaturación, es decir, cuando la concentración de átomos de metal libres supera su solubilidad en la disolución, estos empiezan a colisionar entre sí formando pequeños núcleos que servirán como base para el crecimiento de la nanopartícula. El número y el tamaño de los núcleos generados es dependiente de las condiciones empleadas para la síntesis.
- 3) Crecimiento y estabilización: en la fase de crecimiento, las NPs se van haciendo cada vez más grandes y por ello es necesaria la presencia de un agente estabilizador para detener este proceso. Existen varias formas de estabilización: electrostática, estérica, electro estérica e hidratación[4].

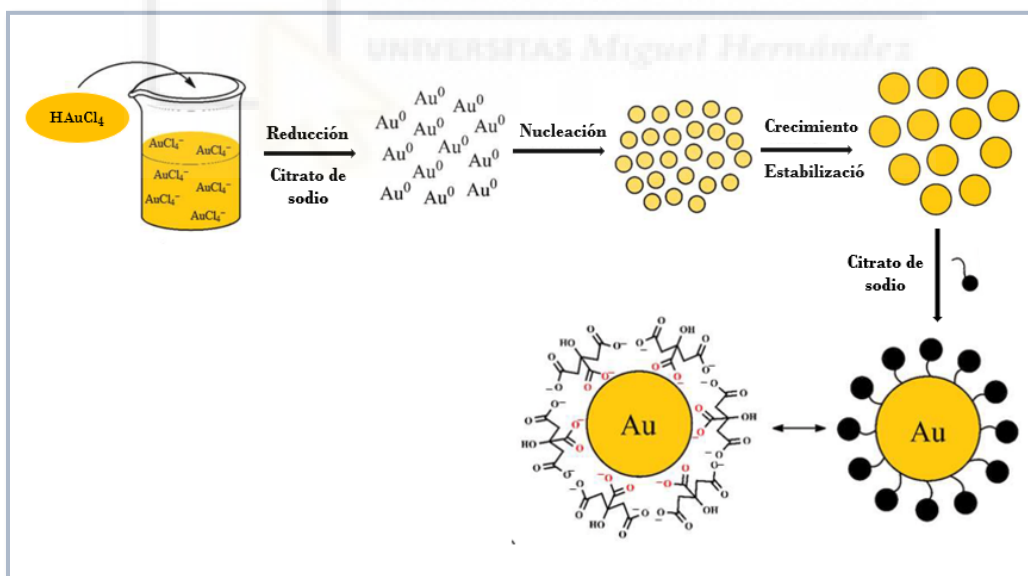


Figura 1.3. Representación esquemática de un proceso de síntesis químico de AuNPs utilizando citrato de sodio como agente reductor y estabilizador. Figura adaptada de [15].

1.2.1.3 Síntesis biológica

La síntesis fisicoquímica de las NPs es muy eficiente, pero también tiene sus efectos negativos como la generación de desechos químicos potencialmente peligrosos, altos costes y una dificultad para la purificación. Los métodos biológicos para sintetizar NPs se pueden dividir en tres categorías, (a) síntesis basada en biomoléculas, (b) síntesis basada en microorganismos y (c) síntesis basada en plantas [13]. Estos

métodos sostenibles normalmente producen partículas ecológicas, no tóxicas, adecuadas para las aplicaciones biomédicas y medioambientales.

1.2.2 Tipos y clasificación de las NPs

Las nanopartículas se suelen clasificar en 3 categorías en base a su composición: orgánicas, nanopartículas de carbono e inorgánicas [9].

1.2.2.1 Nanopartículas orgánicas

Dentro de esta categoría se incluyen las NPs compuestas de materiales orgánicos como proteínas, lípidos, polímeros, etc. Suelen ser bio-degradables además de tener propiedades no tóxicas y son sensibles a la radiación térmica y electromagnética. Los ejemplos más conocidos dentro de esta categoría son los dendrímeros, liposomas y micelas [9]. Este tipo de nanopartículas son muy utilizadas dentro del campo biomédico para la administración de fármacos debido a las características mencionadas anteriormente [8].

1.2.2.2 Nanopartículas de carbono

Las NPs de carbono están compuestas únicamente de átomos de carbono. Quantum Dots de carbono (CQD), fulerenos, grafeno, nanotubos y nanofibras de carbono, son algunos ejemplos de NPs que entran en esta categoría (Figura 1.4).

- Los fulerenos son moléculas esféricas de carbono unido mediante una hibridación sp^2 . Dependiendo de la cantidad de átomos de carbono y de la cantidad de capas que formen la partícula, el diámetro puede llegar hasta una longitud de 36 nm [8].
- Los CQD, por su parte, son partículas de carbono casi esféricas que no superan los 10 nm de diámetro y presentan un gran potencial en aplicaciones foto catalíticas. El precio de producción no es muy elevado, presentan una baja toxicidad, son químicamente inertes, fáciles de funcionalizar, etc. Todas estas ventajas hacen que los CQD estén ganando mucho interés dentro de la familia de las nanopartículas de carbono [16].
- El grafeno es un alótropo de carbono. Es una red hexagonal de estructura de panal compuesta por átomos de carbono en una superficie plana bidimensional. Con estas láminas y, dependiendo de la nanopartícula deseada, se sintetizan los nanotubos y/o las nanofibras de carbono. Para los nanotubos de carbono se suelen enrollar las láminas de grafeno creando una forma cilíndrica hueca por dentro. Dependiendo de la cantidad de láminas utilizadas pueden tener diámetros desde 0.7 nm hasta 100 nm con una longitud desde varios micrómetros hasta varios milímetros [16].

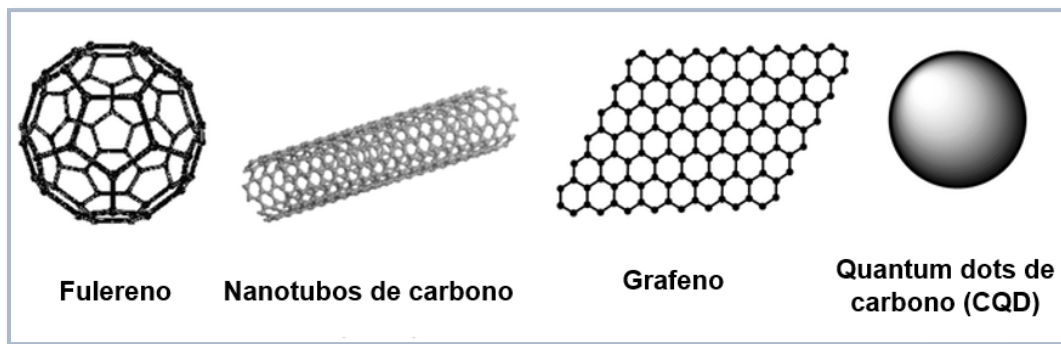


Figura 1.4. Ejemplos de nanopartículas de carbono. Figura adaptada de [17].

1.2.2.3 Nanopartículas inorgánicas

El resto de NPs, que no son orgánicas ni hechas únicamente de carbono, pertenecen a esta categoría. Como ejemplo tenemos las NPs metálicas que están compuestas de uno o varios precursores de metales. Aunque se pueden sintetizar NPs de prácticamente todos los metales, los más utilizados son el aluminio (Al), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), hierro (Fe), plomo (Pb), plata (Ag) y zinc (Zn) [8].

Nanopartículas de oro

Antes de que se empezara a hablar de la nanotecnología, dentro de la ciencia el oro era conocido únicamente como un metal. No fue hasta después de 1974 que se empezaron a descubrir las excelentes características fisicoquímicas de este material hasta llegar al punto de convertirse en una de las nanopartículas más importantes y a la vez de las más utilizadas [18]. Algunas de estas características fisicoquímicas tan interesantes son: la resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR), gran relación superficie-volumen, fácil funcionalización/conjugación, una gran biocompatibilidad y baja toxicidad, habilidad para *quenchar* (desactivar) la fluorescencia, etc.

Por su gran versatilidad, las nanopartículas de oro (AuNPs) han sido aprovechadas, entre otros, por el mundo biomédico. La unión entre las AuNPs y otras moléculas altera las propiedades fisicoquímicas de las partículas y esta variación puede ser detectada. Este mecanismo, por ejemplo, se podría usar como una vía de diagnóstico [19].

En una solución acuosa y en función de su tamaño, estas nanopartículas presentan distintos colores. Las AuNPs esféricas de un tamaño reducido (< 100nm) tienen un color rojo rubí. A medida que aumentan de tamaño, el color tiende a volverse más azulado (Figura 1.5), algo que también es una indicación característica de una mayor agregación entre las nanopartículas que modifican la resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR).

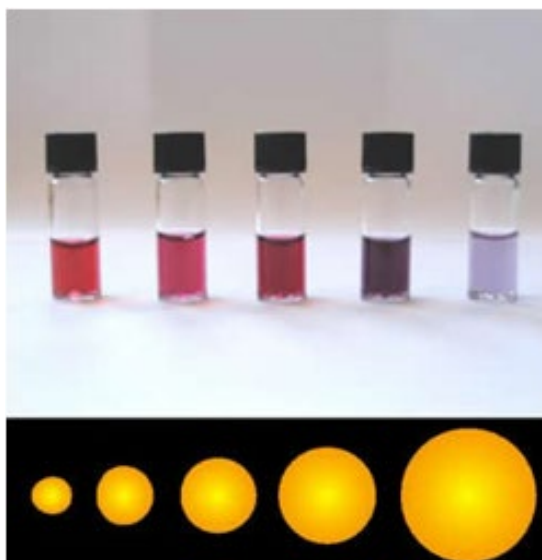


Figura 1.5. Parte superior: Disoluciones de AuNPs en viales, mostrando un cambio de color de rojo a azul a medida que aumenta la agregación. Parte inferior: AuNPs esféricas en crecimiento, visualizando la correlación entre el tamaño y el cambio de color [20].

1.2.3 Resonancia de plasmón superficial localizado

Los átomos en el interior de las partículas metálicas se consideran puntos masivos fijos con una carga positiva neta, rodeados por una “nube de electrones libres”. Los plasmones masivos son ondas cuantizadas de un número de electrones móviles que se producen cuando estos electrones vibran a una frecuencia característica ligada al metal del cual esté compuesta la nanopartícula [21].

Los plasmones de superficie tienen una frecuencia y una energía bastante menor, comparada con la de los plasmones masivos. Cuando las NPs son irradiadas con luz a una determinada longitud de onda, el campo electromagnético induce una oscilación colectiva, y en resonancia con el campo de los electrones libres, dando lugar al fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR por sus siglas en inglés) por el que la luz incidente es absorbida. Estos electrones móviles deslocalizados son desplazados lejos de la partícula creando un dipolo eléctrico inducido por el campo eléctrico de la luz incidente, que tiende a restaurar la posición de equilibrio (Figura 1.6) [22, 23].

Las oscilaciones colectivas de los electrones confinados en pequeños volúmenes metálicos se denominan plasmones de superficie localizados (LSPR). Este suceso ocurre únicamente cuando la partícula tiene un tamaño mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente, por lo que depende directamente del tamaño de la nanopartícula. Utilizando un espectrofotómetro UV-visible se puede medir la extensión de la LSPR [22, 23].

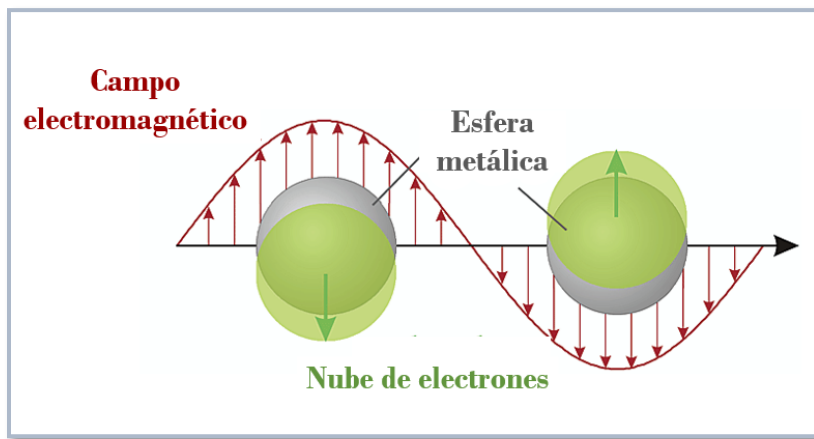


Figura 1.6. Representación visual de la oscilación del plasmón. Figura adaptada de [24].

La excitación láser de la LSPR, provoca interacciones entre los fotones y electrones presentes, resultando en la generación de calor. Esta propiedad permite que las AuNPs adquieran características fototérmicas convirtiendo la energía óptica absorbida en energía térmica. La cantidad de energía térmica generada puede ser modulada según la concentración de las AuNPs o la longitud de onda del láser, que a su vez está determinada por el pico de absorción de la LSPR [25].

Factores que influyen en la LSPR

Tamaño: Adaptando el tamaño de las NPs metálicas es posible controlar la posición y el número de modos del plasmón y a la vez la proporción entre la cantidad de energía absorbida y dispersada por el mismo. Las partículas con un tamaño de no más de 10 nm exhiben un pico máximo en torno a los 520 nm, mientras que para partículas dentro del rango de 10-80 nm se desplaza hacia valores entre 520-540 nm [24].

A medida que sigue aumentando el tamaño, este pico máximo sigue desplazándose hacia longitudes de onda más altas, en relación con una menor frecuencia de oscilación de los electrones [24].

Forma de la partícula: Al modificar la forma de la partícula también varía la geometría de la superficie, causando un cambio en la densidad del campo eléctrico en la superficie. Esto, a su vez, genera una variación en la frecuencia de oscilación de los electrones que cambia las características del LSPR [24].

Entorno: La absorción del plasmón también se ve afectada por el entorno dieléctrico circundante, el cual también depende del disolvente, del sustrato y de otras especies químicas presentes en el entorno [24].

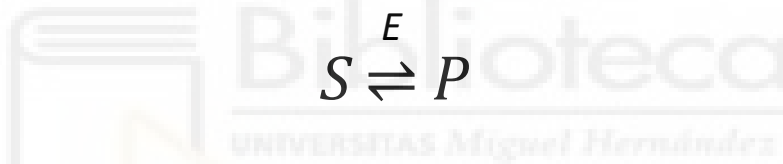
1.3 Enzimas

Las reacciones químicas en el cuerpo humano ocurren a la temperatura fisiológica de aproximadamente 37°C. A esta temperatura, una alta cantidad de reacciones químicas deberían llevarse a cabo a baja velocidad debido a la falta de energía térmica. Sin embargo, en la realidad, ocurren a una velocidad muy elevada sugiriendo que existe algún tipo de factor que acelere este proceso: las enzimas. Las enzimas son un tipo de proteínas producidas por las células de los organismos vivos que actúan como biocatalizadoras, aumentando la velocidad de las reacciones al reducir la energía de activación necesaria [26–28].

Las enzimas están compuestas por una o varias cadenas de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos formando estructuras terciarias o cuaternarias. Estas proteínas poseen sitios específicos conocidos como sitios activos, donde se une el sustrato y se lleva cabo la reacción catalítica. Algunas enzimas, llamadas apoenzimas, carecen de actividad en ausencia de un elemento externo. Este elemento externo, conocido como grupo prostético puede ser una coenzima (proteína) o una molécula no proteica (cofactor), que al unirse a una apoenzima forman una holoenzima funcional. Por ejemplo, la tiamina pirofosfato (vitamina B₁) actúa como cofactor enzimático en enzimas como la transcetolasa, la piruvato deshidrogenasa y la cetoglutarato deshidrogenasa, controlando el metabolismo de los glúcidos y la síntesis de ácidos nucleicos [28, 29].

Según el tipo de reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en seis categorías: (1) oxidorreductasas, encargadas de transferir electrones y protones entre una molécula donante y aceptante; (2) transferasas, que movilizan la transferencia de grupos funcionales entre moléculas; (3) hidrolasas, que rompen los enlaces C-O, C-C, C-N y otros enlaces utilizando H₂O; (4) liasas, que degradan enlaces y añaden o eliminan grupos funcionales a través de enlaces dobles; (5) isomerasas, que facilitan reorganizaciones estructurales de las moléculas; y por último, (6) ligasas, que forman enlaces entre dos moléculas separadas [28, 30].

El principio catalítico enzimático es ilustrado en el siguiente ejemplo:



Donde S es el sustrato, P el producto y la E la enzima.

1.3.1 Factores que influyen en la capacidad catalítica de las enzimas

La temperatura y el pH son factores que influyen significativamente en la estructura de la proteína y su actividad catalítica. La mayoría de las enzimas ya han sido caracterizadas en términos de sus condiciones óptimas, lo cual es de conocimiento común en la comunidad científica.

Cambios en el pH pueden afectar a las cargas de los grupos funcionales ionizados de la enzima, generando modificaciones en su estructura o en el grado de unión del sustrato al sitio activo. Dependiendo de la magnitud de la variación, estos efectos pueden ser reversibles.

La temperatura, por su parte, también influye en el comportamiento de la enzima. Un aumento de la temperatura incrementa la energía cinética de las moléculas, lo que generalmente acelera la velocidad de reacción. Sin embargo, las enzimas tienden a desnaturalizarse con el tiempo, un proceso que se ve acelerado a altas temperaturas. Por lo tanto, aunque se incrementa la actividad catalítica, la estabilidad estructural de la enzima se ve comprometida, resultando en una pérdida temprana de su función catalítica [31].

1.3.2 Lacasa

Las lacasas son enzimas multicobre que están presentes en hongos y en una gran variedad de plantas, bacterias e insectos. Estas enzimas pertenecen a la familia AA1 según el sistema de clasificación CAZY (Carbohydrate Active Enzyme Database), donde se basan en la similitud en la secuencia [32].

Estas enzimas se presentan generalmente como glucoproteínas que pueden ser monoméricas, diméricas, triméricas o tetraméricas, con un contenido de carbohidratos entre 15 y 30%. La masa molecular de esta proteína oscila entre 50 y 110kDa y cada molécula contiene 4 átomos de cobre como cofactor, los cuales se encuentran en los centros activos de la enzima. Conviene mencionar la importancia de la glucosilación de estas proteínas ya que es necesaria para mantener el cobre, ayuda a mejorar la estabilidad térmica y a resistir la degradación proteolítica [33, 34].

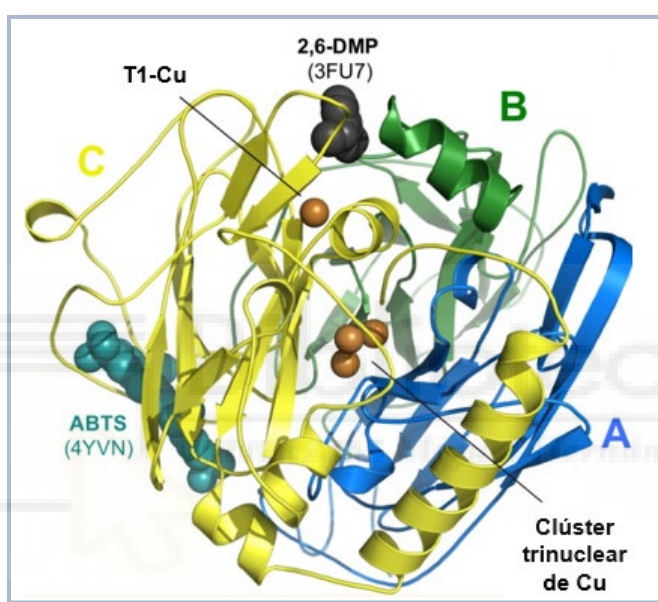


Figura 1.7. Estructura de la lacasa Mtl: los tres dominios de la enzima se muestran en diferentes colores: dominio A (AA 1-161) en azul, dominio B (AA 162-341) en verde y dominio C (AA 342-559) en amarillo. Los cuatro átomos de cobre se muestran como esferas naranjas en el centro de la imagen. Los sustratos 2,6-DMP (esferas negras) y ABTS (esferas cian) unidos al sitio activo T1 y un sitio de unión alternativo, respectivamente. Figura adaptada de [35].

Existen variantes recombinantes de esta oxidorreductasa, como la lacasa del hongo *Myceliophthora thermophila* (Mtl), que se expresa en *Aspergillus oryzae* (Figura 1.7). Esta enzima está compuesta por 559 aminoácidos con un punto isoeléctrico (pI) de 4.2 y una masa molecular de 75 kDa, de los cuales 13.5 kDa provienen de una cadena de glucósidos unida a un extremo N-terminal. La estructura cristalina revela un dímero donde el sitio de unión de los compuestos fenólicos permanece bloqueado, revelando que, en su conformación activa, la proteína es monomérica [35].

Entre los átomos de cobre presentes, se identifican 3 tipos: T1, T2 y T3, diferenciados por sus propiedades espectroscópicas. El cobre T1 es detectable mediante la resonancia paramagnética electrónica (RPE), proporciona el color azul a la proteína en su estado de oxidación y tiene un pico de absorción máximo a

una longitud de onda de 600 nm. Este átomo está unido a dos histidinas y una cisteína, y pertenece a uno de los sitios unión de la enzima.

El cobre T2, también unido a dos histidinas, se puede detectar mediante RPE, pero muestra una absorbancia muy baja dentro del espectro ultravioleta-visible (UV/VIS). Los dos átomos restantes de cobre pertenecen al tercer tipo y tienen enlaces de unión con seis moléculas de histidina, absorben a una longitud de onda de 330 nm y, a diferencia de los tipos T1 y T2, no emiten una señal RPE debido al acoplamiento antiferromagnético causado por un ligando hidróxido [33, 34].

Las lacasas catalizan la oxidación de una amplia gama de sustratos, generalmente compuestos fenólicos y aminas aromáticas, generando radicales libres. Los átomos de cobre T2 y T3 forman un clúster trinuclear que facilita la transferencia de electrones desde el T1 a través de los motivos His-Cis-His, liberando moléculas de agua como resultado de la reducción del oxígeno [34].

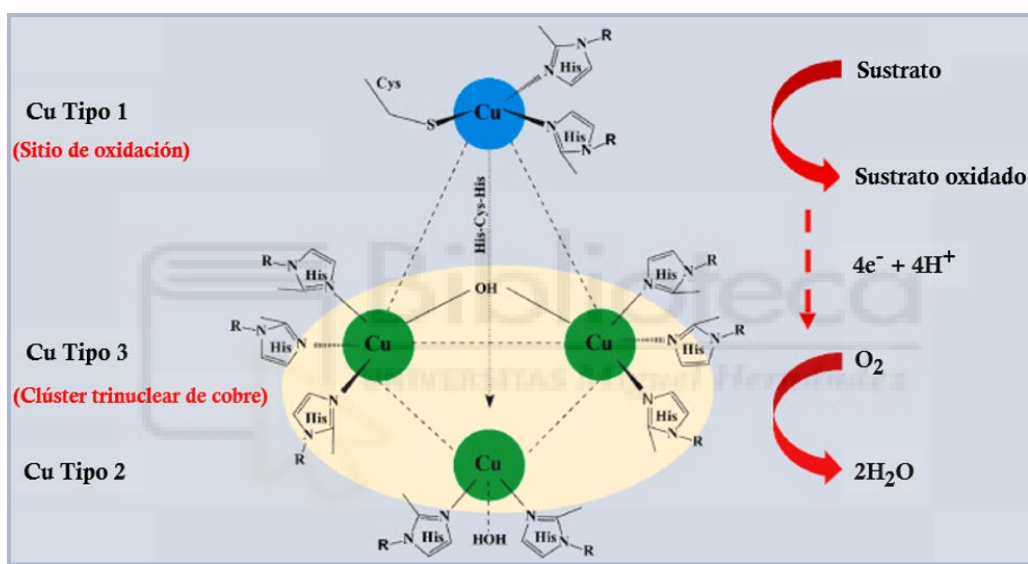


Figura 1.8. Representación esquemática de la hipótesis del mecanismo catalítico de la lacasa. Figura adaptada de [34].

El mecanismo exacto de acción no está completamente definido, aunque una hipótesis ampliamente aceptada (Figura 1.8) sugiere lo siguiente:

A nivel general, la reacción consiste en la oxidación secuencial de cuatro moléculas de sustratos reductores, cada una donando un electrón, seguido de dos reducciones de doble electrón sobre átomos de oxígeno, generando moléculas de H_2O . Simultáneamente, ocurre el intercambio catalítico de cuatro equivalentes de hidrógeno.

En primer lugar, la molécula de O_2 se une al clúster trinuclear generando una activación asimétrica que limita el acceso de otros agentes oxidantes a este sitio de unión. A continuación, el sustrato se une al sitio de unión del cobre T1 donando un electrón que es almacenado por la lacasa. Finalmente ocurre una transferencia interna del electrón desde el T1 hacia el clúster trinuclear para la reducción de la molécula de oxígeno a agua [33, 36, 37].

El potencial redox (E°) de las lacasas está directamente relacionado con la cantidad de energía necesaria para remover un electrón del sustrato reductor. En base a esto, las lacasas son divididas en tres grupos diferentes: lacasas de E° bajo ($< 460\text{mV}$), mayoritariamente presentes en plantas y bacterias; lacasas de E° medio ($460\text{-}710\text{mV}$), que se encuentran en ascomicetos y otros hongos degradadores de lignina; y, por último, lacasas de E° alto ($> 710\text{mV}$), principalmente halladas en hongos [36, 38].

1.3.2.1 Aplicaciones de la lacasa

Biorremediación

Con el fin de reducir o eliminar componentes tóxicos en el medio ambiente, se están incrementando los esfuerzos en el estudio sobre procesos catalizados por lacasas, debido a sus excelentes propiedades oxidativas contra estos compuestos. Estas características hacen que las lacasas se consideren herramientas ecológicas y efectivas para mitigar problemas medioambientales. Lacasas procedentes de varios organismos, han sido ya utilizadas en procesos industriales como la electrocatálisis o la producción de etanol.

Las lacasas fúngicas en particular, son bastante prometedoras, debido a su capacidad para oxidar sustratos con un alto E° . Estas enzimas se emplean principalmente en la oxidación de plásticos, compuestos fenólicos, colorantes azoicos (que representan hasta el 50% de los colorantes utilizados en la industria textil) o compuestos farmacéuticos activos. Por ejemplo, el E° del bisfenol A, p-nonilfenol y el colorante azoico BR114 está por encima de 600mV , una cifra inferior a los 710 mV comentada anteriormente [36].

Investigaciones previas han demostrado la capacidad oxidativa de las lacasas. Por ejemplo, la inmovilización de la lacasa de *Trametes versicolor* en esponjas de sílice-alginato o lufa, aumenta la eficacia en la eliminación de fenoles [39]. Por otra parte, el extracto crudo de *Trametes pubescens* es utilizado para la degradación de clorofenoles, mientras que el extracto crudo del hongo *Trametes hirsuta*, ha demostrado tener la capacidad de degradar el cloranfenicol, uno de los contaminantes más persistentes derivados de la industria farmacéutica [40].

1.3.2.2 Métodos de inmovilización de las enzimas

La estabilidad y actividad de las enzimas libres en disolución pueden verse seriamente afectadas por especies químicas presentes en el medio, por ejemplo, los contaminantes presentes en aguas residuales. [41]. Además, es difícil la reutilización de las enzimas cuando se utilizan en su forma libre [42].

Existen estrategias para mitigar estas desventajas siendo la inmovilización a través de una interacción física o química en materiales 2D una de las más recurrentes (Figura 1.9). Los métodos de inmovilización de las enzimas están basados en la adsorción a un soporte por medio de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o fuerzas de Van der Waals, o en la unión covalente o por afinidad [43].



Figura 1.9. Representación visual de inmovilización en 2 y 3 dimensiones: ejemplos de diferentes métodos de inmovilización de enzimas.

Sin embargo, el gran problema de la inmovilización 2D es su poca capacidad de carga enzimática. La inmovilización en materiales 3D soluciona este problema, ya que permite la introducción de cantidades más elevadas de proteínas [43].

Esta técnica no solo consigue proteger a la enzima, sino que, con ello, también se consiguen mejorar algunas de sus propiedades como se ha reportado en [41]. La inmovilización facilita la separación de la enzima del producto, incrementa la estabilidad térmica y mejora la resistencia de la enzima en ambientes más extremos y reactivos químicos. Sin embargo, la inmovilización de las enzimas podría llegar a alterar su conformación estructural y heterogeneidad, lo que podría provocar una ligera pérdida de actividad [44].

Existen diversas metodologías para la inmovilización 3D (Figura 1.9) de biomoléculas como el atrapamiento y la encapsulación.

Atrapamiento

Este método es definido como la retención física de las enzimas en una matriz porosa o en materiales con una red tridimensional. La enzima se suspende en la solución del monómero y, bajo las condiciones adecuadas, el monómero empieza a polimerizar, atrapando a la enzima dentro de la red polimérica formada. Se evita así el contacto directo de la enzima con el entorno. Es el método más simple, aunque tiene como gran desventaja la limitación en el intercambio de sustancias. En este trabajo de fin de máster se han utilizado hidrogeles inorgánicos como las matrices sol-gel de sílice e hidrogeles orgánicos basados en acrilatos y acrilamidas químicamente reticulados.

Las matrices sol-gel hechas en base a SiO_2 son un ejemplo de material semipermeable. Como se describe en la figura 1.10 el proceso de síntesis consiste en tres etapas: 1) hidrólisis de los precursores alcóxidos (siendo el ortosilicato de tetrametilo, TMOS, y el ortosilicato de tetraetilo, TEOS, los más utilizados) para

dar hidróxido de silicio (Si-OH) en presencia de un catalizador ácido o alcalino, 2) condensación de los grupos Si-OH para producir óxido de silicio (Si-O-Si), generando agua como subproducto. Si la condensación comienza antes de que se complete la reacción de hidrólisis, se produce alcohol como subproducto y habría que eliminarlo para evitar interferencias durante la polimerización del gel y 3) maduración de la matriz hasta alcanzar el punto gel [45, 46]. El proceso en detalle se tratará en el apartado de materiales y métodos.

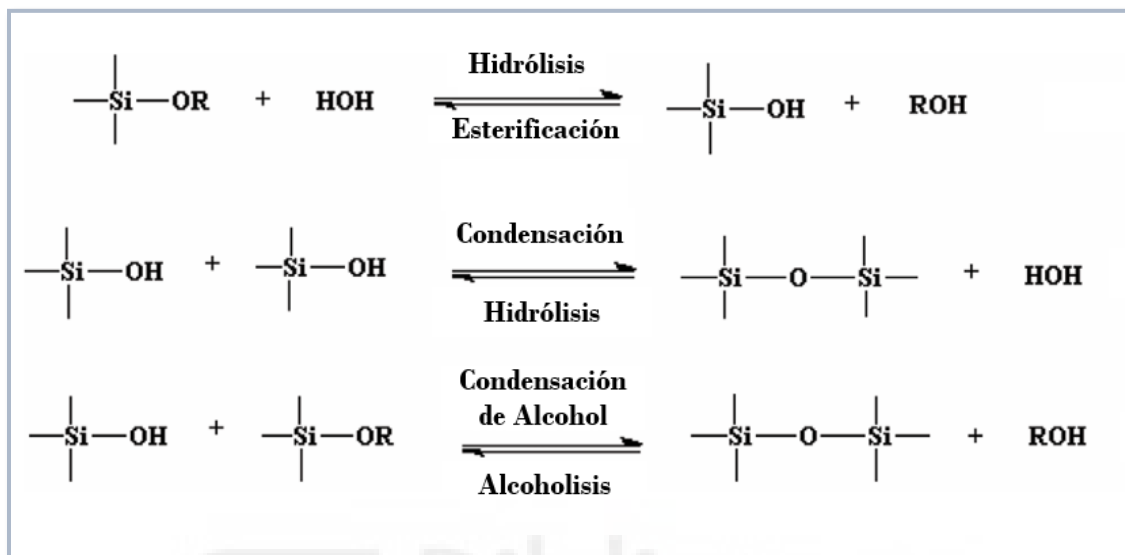


Figura 1.10. Representación esquemática de la hidrólisis y condensación de alcoholatos. Figura adaptada de [46].

Como se ha comentado anteriormente, además de la inmovilización en matrices sol-gel, también se pueden incorporar las biomoléculas en hidrogeles orgánicos. Estos hidrogeles están mayoritariamente compuestos de agua y una red polimérica entrecruzada. En el presente trabajo se van a sintetizar hidrogeles reticulados químicamente (fuerzas de unión de entrecruzamiento a través de enlaces covalente), basados en acrilatos y acrilamidas (precursores sintéticos), por su facilidad de preparación, ser mecánicamente robustos y flexibles, biocompatibles y tener alto grado de hinchamiento y transparencia [47]. En concreto se va a fabricar el hidrogel AETA-MBA utilizando como precursor el monómero catiónico hidrófilo cloruro de [2-(acrilóiloxi)etil]trimetilamonio (AETA) y el monómero bifuncional hidrófobo N, N'-metilénbis(acrilamida) (MBA), como agente entrecruzante. La combinación de estos monómeros en presencia de un fotoiniciador (LiTPO), en solución acuosa, provoca una reacción de polimerización en cadena que forma el hidrogel AETA-MBA [43].

La inmovilización de las enzimas en hidrogeles entrecruzados químicamente permite realizar varios ciclos de hinchamiento y secado en agua manteniendo la biomolécula dentro de la red sin comprometer sus propiedades mecánicas. Además, el hecho de poder eliminar el agua del hidrogel manteniendo la integridad de la biomolécula, representa una gran ventaja para el almacenamiento de la enzima, ya que la presencia de agua podría generar una pérdida de estabilidad de la enzima debido a una degradación hidrolítica, además de aumentar el riesgo de contaminación bacteriana [43].

En el presente trabajo se van a emplear estos materiales para coinmovilizar la enzima lacasa junto con las nanopartículas de oro para el desarrollo futuro de una plataforma biocatalítica para la degradación de fármacos en el medio ambiente.

Encapsulación

Otro método parecido al atrapamiento es la encapsulación, que también crea una barrera física como medio de protección para la biomolécula. Debido a la similitud de esta metodología con la del atrapamiento, también tiene la ventaja de que se protege la integridad de la estructura y la actividad de las enzimas, y posee la misma limitación en el transporte de sustratos y productos. Por ello se ha desarrollado la microencapsulación, una alternativa donde la enzima es atrapada en esferas de no más de varias micras hechas de un material semipermeable, permitiendo el intercambio de sustancias.



2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es la obtención de materiales híbridos (fototérmicos y/o con capacidad catalítica) para el desarrollo futuro de una plataforma multifuncional. Para la obtención de dichos materiales se partirá bien de geles orgánicos poliméricos basados en acrilamida o bien de matrices de sílice inorgánicas obtenidas mediante el proceso sol-gel incorporando AuNPs (elemento fototérmico) y/o Lacasa (elemento catalítico).

Para llevar a cabo el objetivo principal del trabajo de fin de máster se plantearon los siguientes subobjetivos y tareas a realizar:

1. Obtención y caracterización de nanopartículas de oro en disolución. Se llevará a cabo las síntesis en medio acuoso y tamponado de las AuNPs y su recubrimiento con polímeros estabilizantes. Se caracterizarán las partículas obtenidas en cuanto a su tamaño y carga, mediante el uso de técnicas de dispersión de luz dinámica. También se determinará la posición del plasmón mediante absorbancia y la capacidad de conversión fototérmica realizando ensayos de irradiación láser.
2. Caracterización de la enzima en disolución. Previamente a la inmovilización se determinará mediante la fluorescencia intrínseca de la proteína en su estado conformacional y estabilidad térmica en disolución. Además, se determinará mediante métodos colorimétricos la actividad de la enzima a distintas temperaturas y la posible influencia de AuNPs en los ensayos en disolución.
3. Obtención de materiales híbridos multifuncionales basados en geles de acrilamida. Se llevará a cabo la incorporación de manera independiente de las AuNPs y de la lacasa en geles de AETA. Para la inmovilización de AuNPs se utilizarán dos aproximaciones distintas. La primera el hinchamiento del xerogel con disoluciones de AuNPs (método ex-situ) y la segunda mediante síntesis de las AuNPs dentro del propio gel (método in-situ) a partir de los precursores metálicos. La incorporación de la enzima lacasa, se realizará por hinchamiento de xerogeles. Se caracterizarán las matrices obtenidas tanto desde el punto de vista de la matriz, capacidad de hinchamiento, como de los elementos incorporados: posición del plasmón y capacidad de conversión fototérmica de las AuNPs en las matrices; actividad de la enzima inmovilizada.
4. Obtención de materiales híbridos multifuncionales basades en matrices sol-gel de sílice. Se procederá al atrapamiento de las AuNPs recubiertas de PVP y de la Lacasa en las matrices incorporándose durante el proceso de gelificación. De nuevo, se caracterizarán las propiedades de las AuNPs tras la incorporación: absorbancia del plasmón y capacidad de calentamiento tras la irradiación. Se realizarán experimentos de fluorescencia para determinar la conformación y estabilidad de la proteína inmovilizada y ensayos de actividad y estabilidad con el tiempo. Además, se realizarán ensayos de actividad coinmovilizando proteína y AuNPs.

3. Procedimiento experimental

La mayoría de los materiales se adquirieron de Sigma-Aldrich y se van a ir describiendo a medida que aparecen en el texto.

3.1 Tampones

A continuación, se describen los tampones que han sido utilizados en este proyecto:

- Tampón acetato 100 mM pH 5:

El tampón acetato se preparó disolviendo 0,8203 g de CH_3COONa (Sigma Aldrich, S8750-500G) en 80 mL de agua Milli-Q (MQ) en un vaso de precipitado, bajo agitación constante. El pH de la solución se ajustó a 5 utilizando un pH-metro (Crison, pH-Meter basic 20⁺) con una disolución de HCl 6M previamente preparada en el laboratorio. Una vez ajustado el pH, la disolución se trasladó a un matraz aforado de 100 mL y se completó con agua MQ.

- Tampón fosfato 50 mM pH 7

Se preparó un stock de tampón fosfato disolviendo 2,9995 g de NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, 33,198-8) en 20mL de agua MQ en un vaso de precipitado y se ajustó el pH a 7 usando pellets de hidróxido de sodio (Sigma Aldrich, 795429-500G). Finalmente, la disolución se transfirió a un matraz aforado de 25,0 mL y se añadió agua MQ.

A partir de este stock, se prepararon diluciones a 50 mM pipeteando 500 μL del stock en un vial de 10 mL y añadiendo 9,500 mL de agua MQ.

3.2 Síntesis de AuNPs y recubrimiento

Las AuNPs se obtuvieron a través de la síntesis química mediante el método Turkevich [48]. Este método consiste en la reducción de HAuCl_4 por parte de moléculas de citrato.

Para ello se añadieron 20 mL de una disolución de HAuCl_4 1 mM (Sigma Aldrich 520918-1G) en una probeta y se pasaron a un matraz Erlenmeyer de 100 mL. A continuación, se calentó la disolución hasta llegar al punto de ebullición bajo agitación constante. Acto seguido, se pipetearon 2 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$ 38,8 mM (Sigma Aldrich 71402-100G) a la disolución y se dejó hirviendo y agitando hasta que adquirió un profundo color rojo (alrededor de 10 min), al mismo tiempo se iba añadiendo agua Milli-Q para reponer las pérdidas por evaporación. Por último, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente (Figura 3.1).

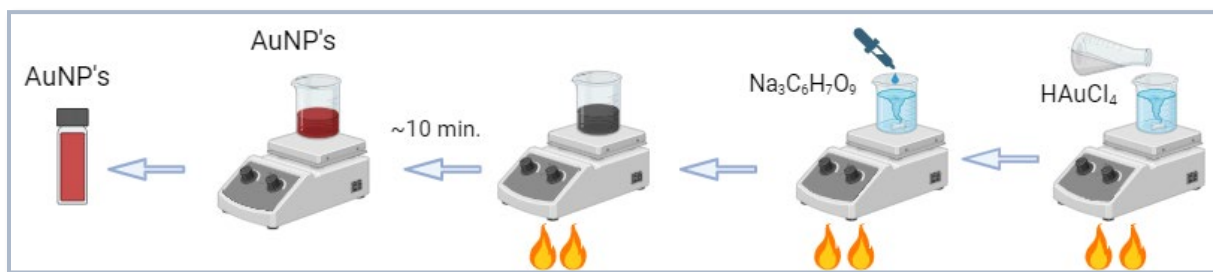


Figura 3.1. Ilustración visual de la síntesis de AuNPs mediante el método Turkevich.

Tras la obtención de las nanopartículas se llevó a cabo el recubrimiento mediante el uso de polímeros, buscando aumentar su estabilidad y versatilidad. Los polímeros utilizados fueron la polivinilpirrolidona (PVP) (Ref.856568, PM promedio ~55 kDa, como polímero neutro, y el cloruro de polidialildimetilamonio (PDADMACI) (Ref.522376, PM promedio <100 KDa), que presenta carga positiva (Ver figura 3.2).

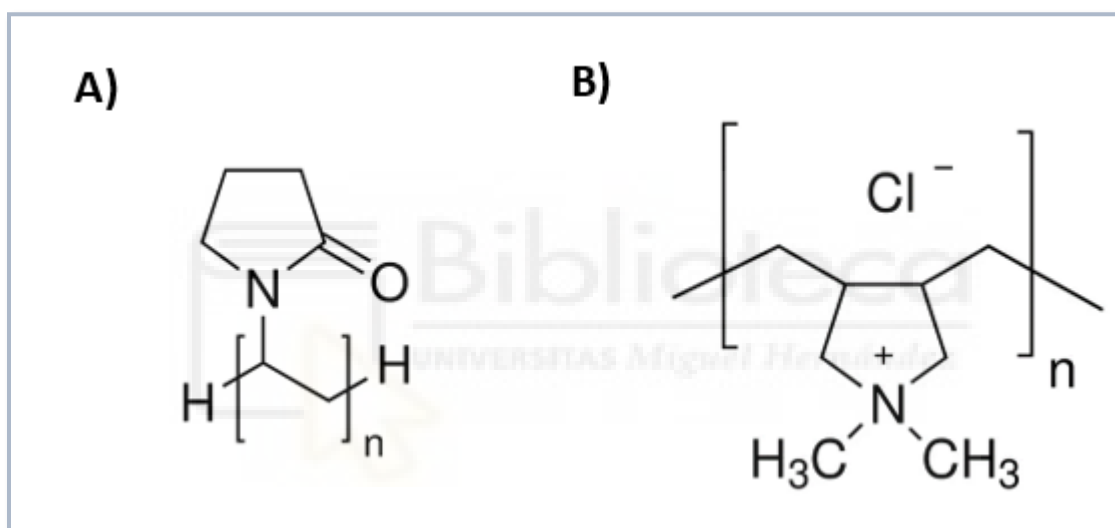


Figura 3.2. Estructura de los polímeros A) polivinilpirrolidona (PVP) y B) cloruro de polidialildimetilamonio (PDADMACI). Imagen obtenida de la web de Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com).

Para llevar a cabo el recubrimiento se añadieron distintas cantidades de polímero en disolución sobre las nanopartículas sintetizadas previamente mediante el método Turkevich, manteniéndose constante la concentración final de nanopartículas y sometiendo las muestras a agitación en noria durante 30 minutos.

3.2.1 Técnicas de Dispersión de Luz Dinámica

Para la caracterización del tamaño y el potencial Z de las AuNPs, se utilizó la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS por sus siglas en inglés) empleando un Malvern Zetasizer Nano-ZS equipado con un láser monocromático de Helio-Neon 4 mW como fuente de luz. Las medidas del tamaño de las partículas se realizaron con un ángulo de dispersión de 173°, analizando las fluctuaciones del patrón de luz generadas por el movimiento browniano de las partículas suspendidas en la muestra.

Este movimiento produce variaciones en el patrón de dispersión de la luz que dependen del tamaño de cada partícula. Las partículas de menor tamaño tienen una velocidad mayor y generan una mayor tasa de

fluctuación en el patrón de luz. Estas fluctuaciones son analizadas por un correlador aplicando la ecuación de Stokes-Einstein para determinar el tamaño de las partículas [49, 50].

El potencial Z es una medida de la magnitud de la atracción o repulsión electrostática (o de carga) que existe en una solución coloidal y da información sobre la estabilidad coloidal de las partículas en disolución. El potencial Z también se midió utilizando el Zetasizer Nano-ZS. Este equipo calcula el potencial Z de las partículas a partir de la movilidad electroforética de las partículas, la cual se determina mediante la electroforesis láser Doppler. Aplicando la ecuación de Henry, que relaciona la movilidad de las partículas en un campo eléctrico con su potencial Z, el equipo es capaz de convertir esta movilidad en el potencial Z [49, 51].

Para la caracterización de las AuNPs, 200 μ L de la disolución de AuNPs con una concentración de 0,179 mg/mL fue diluida con una cantidad variable (descrita en resultados) de polímero y agua MQ hasta llegar a 2 mL. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a 25°C y en cubetas desechables de poliestireno para la distribución de tamaños y en cubetas Malvern DTS1070, equipadas con electrodos para la determinación del potencial Z.

3.3 Síntesis de matrices híbridas multifuncionales

3.3.1 Síntesis de hidrogeles orgánicos

La síntesis de los hidrogeles se llevó a cabo siguiendo el protocolo diseñado por [43], mediante la polimerización radical de AETA en presencia de MBA y LiTPO. El AETA actúa como monómero, mientras que el MBA y LiTPO actúan como entrecruzante y fotoiniciador, respectivamente. Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich con los siguientes números de identificación:

- AETA: 496146-200ML
- MBA:146072-100G
- LiTPO: 900889-1G

Para eliminar la hidroquinona, una impureza presente en el AETA, se mezclaron 1,5 mL de AETA con 1,5 mL de cloroformo bajo campana. Esta mezcla generó dos fases distintas, por lo que se procedió con la separación de fases utilizando un embudo de decantación, descartando la fase más densa que contenía la hidroquinona y quedando así el AETA puro.

A continuación, se pipetearon 1,132 mL de AETA junto con 1 mL de agua MQ y se dejó agitando durante unos minutos antes de añadir 2 mg de MBA. El vial se cubrió con papel de aluminio para evitar interferencias lumínicas y se añadieron 4 mg de LiTPO. La mezcla se dejó agitando durante 1 minuto más antes de ser transferida a una jeringa desechable, dejando un ligero margen de aire en la punta. La jeringa se colocó debajo de una lámpara UV a 365 nm durante 1 minuto para inducir la polimerización del gel.

Una vez finalizada la polimerización, el extremo vacío de la jeringa se cortó para extraer el gel. Por último, el hidrogel fue sometido a 5 ciclos de lavado y secado con agua MQ para la eliminación de moléculas

libres. Cada ciclo consistió en 3 enjuagues de varios segundos con 10 mL de agua MQ y la posterior adición de 5 mL de agua MQ para la hidratación del gel (Figura 3.3 izquierda). Tras la absorción completa del agua, se deja secando a 45°C durante 48h. Una vez completados los 5 ciclos de lavado, se obtiene un hidrogel deshidratado (xerogel) (Figura 3.3 derecha) libre de excedente de reactivo.

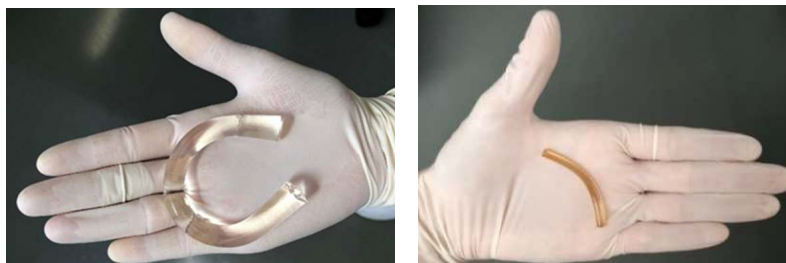


Figura 3.3. Imagen de un hidrogel hinchado (izquierda) y de un hidrogel seco (derecha).

3.3.2 Inmovilización de AuNPs y lacasa en el hidrogel

La inmovilización de las AuNPs y de las biomoléculas en el hidrogel se llevó a cabo de dos formas distintas: incorporación ex-situ de las AuNPs y la lacasa (Sigma Aldrich, SAE0050-50ML) y la síntesis in-situ de AuNPs.

3.3.2.1 Introducción de las AuNPs mediante el método ex-situ

En esta estrategia, la introducción de las AuNPs ex-situ fue llevada a cabo con las AuNPs previamente sintetizadas según el método Turkevich. Para ello se cortó un trozo de xerogel de aproximadamente 70 mg y se colocó en una cubeta desechable. A continuación, se añadieron 1,8 mL de la misma disolución utilizada para la caracterización de las AuNPs, permitiendo así que el xerogel absorbiera la disolución con las AuNPs (Figura 3.4a).

3.3.2.2 Síntesis AuNPs in-situ

Las AuNPs fueron sintetizadas directamente dentro del hidrogel mediante el método in-situ. Un trozo de xerogel, con un peso aproximado de 70 mg, se hinchó durante 12-24 horas en 1,8 mL de la solución de HAuCl_4 1 mM. Una vez el hidrogel alcanzó su volumen final, se colocó en una estufa a 45°C para eliminar el agua, manteniendo las moléculas de sal de oro en la matriz polimérica.

Tras la obtención del xerogel con el precursor de oro, se transfirió a un recipiente de mayor volumen y se añadió un exceso de agua MQ (alrededor de 60 mL), para permitir que el xerogel se hinchara al máximo de su capacidad, mientras se iban formando las AuNPs durante el proceso. Finalmente, el hidrogel es llevado a la estufa de nuevo para reducir su tamaño a proporciones manejables (Figura 3.4b).

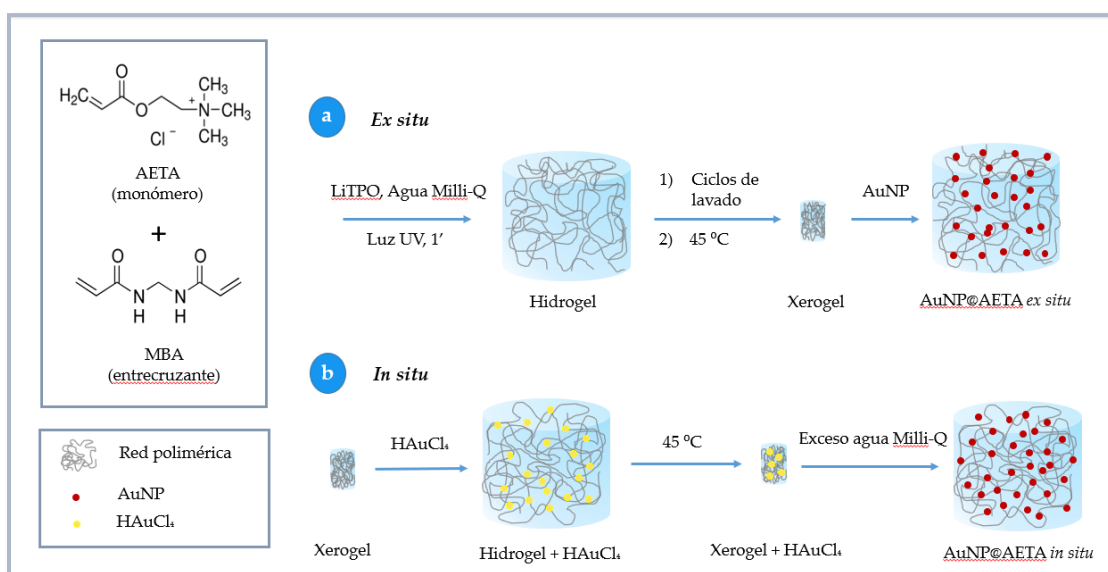


Figura 3.4. Visualización esquemática de la síntesis del hidrogel y la inmovilización de las AuNPs mediante los métodos ex-situ e in-situ.

3.3.2.3 Inmovilización de la lacasa

La inmovilización de la lacasa se realizó siguiendo el procedimiento ex-situ explicado anteriormente en el apartado de la introducción de las AuNPs en el hidrogel. En este caso, la disolución de AuNPs fue reemplazada por 1,8 mL de una disolución de la lacasa.

3.3.3 Síntesis de matrices Sol-Gel de sílice

Para la síntesis de las matrices sol-gel, se utilizó el ortosilicato de tetraetilo (TEOS), adquirido de Sigma-Aldrich (131903-500ML). Primero se mezclaron en un vial 4,46 mL de TEOS con 1,44 mL de agua MQ y 0,060 mL de HCl 0,62M para llevar a cabo la hidrólisis del precursor. Esta mezcla, que inicialmente forma dos fases distintas, se agitó hasta completar la hidrólisis obteniendo una sola fase homogénea.

Durante el proceso de la hidrólisis, se genera etanol, que debe ser eliminado dado que interfiere en la polimerización del gel. Para ello, se pipetearon 1 mL del TEOS hidrolizado y 1 mL de agua MQ en un vial, que se colocó bajo una campana extractora y se rotó en un rotavapor a 165 rpm, con una bañera de agua destilada a 65°C. La solución se rotó al vacío durante aproximadamente 8 minutos para eliminar el etanol, obteniendo una solución de sílice coloidal libre del alcohol.

3.3.3.1 Inmovilización de AuNPs y lacasa en matrices en sol-gel

Dependiendo del tamaño de la matriz sol-gel que se quiso generar, se pipetearon 350 o 700 µL de una solución de sílice coloidal en una cubeta desechable de 4,5 x 10 mm o 10 x 10 mm respectivamente. A esta solución se le añadió una cantidad equivalente de una disolución de enzima o AuNPs recubiertas de PVP en tampón fosfato 50 mM pH 7, o del mismo tampón para generar el blanco. Una vez iniciada la polimerización, se dejó completar durante 48h (Figura 3.5). Se llevó a cabo la inmovilización por separado de AuNPs y lacasa en dichas matrices, así como ensayos preliminares de coinmovilización de ambos componentes en la misma matriz.

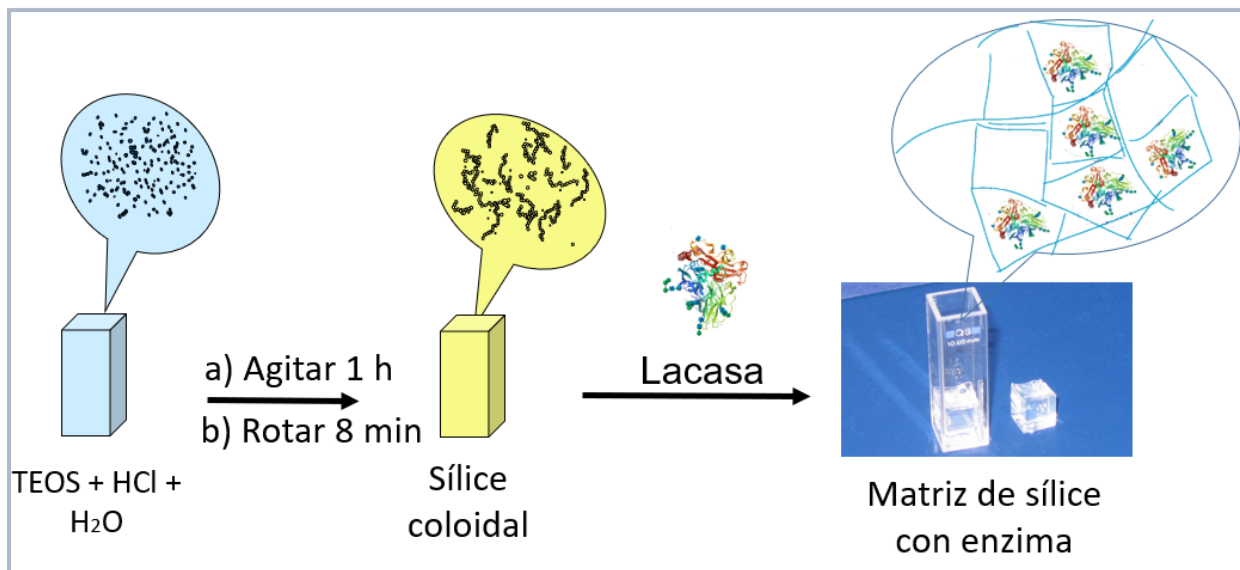


Figura 3.5. Representación esquemática del método Sol-Gel y ejemplo de encapsulación de la lacasa en monolitos.

3.4 Técnicas espectroscópicas

3.4.1 Fluorescencia

Para determinar el estado conformacional y la estabilidad de la enzima en disolución y en las matrices se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia. Gracias a la presencia de residuos aromáticos, especialmente triptófanos en la proteína, es posible estudiar su estado conformacional a partir de su fluorescencia intrínseca. Los triptófanos fueron excitados a una longitud de onda de 280 nm y se recogieron los espectros de emisión en un rango de 300 a 450 nm. Las muestras se pipetearon en cubetas de cuarzo de 10 x 10 mm y los espectros se adquirieron con un fluorímetro PTI-QuantaMaster, que cuenta con un sistema de peltier integrado.

También, se evaluó la estabilidad térmica de la enzima mediante rampas de desnaturalización. La temperatura fue incrementándose a una velocidad de 2°C cada minuto, partiendo de 26°C hasta 82°C. Con los resultados obtenidos se representó la proporción entre la emisión a 325 y 350 nm en función de la temperatura. Además, se registraron espectros de fluorescencia pre y post desnaturalización manteniendo las mismas longitudes de onda de excitación y emisión.

3.4.2 Absorción

Para caracterizar el plasmón de las AuNPs se llevaron a cabo espectros de absorción. Para ello, se preparó una disolución que contenía AuNPs desnudas o recubiertas con PDADMACI y PVP en agua MQ, tampón fosfato 50 mM a pH 7 o tampón acetato 100mM a pH 5. Los volúmenes de cada componente o el medio utilizado serán detallados en el apartado de resultados, debido a la variabilidad existente según el experimento a realizar. La disolución se transfirió a cubetas desechables de 10 x 10 mm y se recogieron los espectros de absorción en un rango de 400 a 800 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2700. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

3.5 Conversión fototérmica

La conversión fototérmica de las preparaciones de nanopartículas, en disolución e inmovilizadas en las distintas matrices fue estudiada midiendo el incremento de temperatura en función del tiempo de irradiación, utilizando un láser de diodo de 520 nm (PSU-H LED de CNI Laser). También se evaluó el calentamiento de las disoluciones y matrices en ausencia de AuNPs. Los experimentos se realizaron en cubetas de cuarzo estándar de 10 mm de paso óptico añadiendo un volumen total de muestra de 2mL, en el caso de las matrices el volumen se completó añadiendo disolución tampón. Las muestras se irradiaron con un láser monocromático (CNI MDL-D-520) durante 7 minutos a una longitud de onda de 520 nm, ajustando la potencia a 1200mW y se registraron los datos de temperatura de la cubeta cada 5 segundos utilizando un termopar adherido a la misma.

3.6 Actividad enzimática

La actividad enzimática de la lacasa se evaluó mediante un método colorimétrico basado en la oxidación del sustrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) adquirido de Sigma Aldrich (A1888-2G). La cinética se midió monitorizando el aumento de la absorbancia a 436 nm, generado por la formación del radical ABTS^{•+} como producto.

Primero se preparó un stock de ABTS 5 mM disolviendo 13,13 mg en 5 mL de tampón acetato. Una vez disuelto todo el sustrato se diluyó añadiendo 400 μ L del stock a 1600 μ L de tampón para obtener una concentración de 1mM. Tanto el stock como la dilución se mantuvieron protegidos de la luz cubriendo los viales con papel de aluminio, debido a la fotosensibilidad del ABTS.

3.6.1 Actividad enzimática en disolución

Para evaluar la actividad enzimática en disolución, se pipetearon 700 μ L de tampón acetato 100 mM pH 5 en una cubeta de paso estrecho (4,5 x 10 mm). A continuación, se añadieron 50 μ L de la enzima preparada por dilución 1/400 y 250 μ L de ABTS 1 mM. Las cinéticas se registraron durante 15 minutos, con mediciones realizadas en intervalos de 0,1 minutos.

3.6.2 Actividad enzimática en el hidrogel

Partiendo de un xerogel de 70 mg, colocado en una cubeta desechable de 10 x 10 mm, se añadieron 900 μ L de una disolución de lacasa en tampón acetato pH 5, manteniendo las concentraciones finales de ABTS y lacasa que en disolución. Una vez el hidrogel absorbió la disolución de enzima, se añadieron otros 900 μ L de ABTS 0,5 mM y se comenzó la cinética inmediatamente ya que en el momento de añadir el sustrato comienza la fase exponencial de la reacción. El ensayo se llevó a cabo durante 60 minutos con mediciones realizadas en intervalos de 0,1 minutos.

3.6.3 Actividad enzimática en Sol-Gel

Los ensayos de la actividad enzimática en sol-gel fueron llevados a cabo con monolitos de tamaño reducido como se puede apreciar en la figura. 3.6. Tras la inmovilización de la lacasa, y debido a las características

físicas del monolito este se desmoldó y se trasladó a un tubo Falcon de 15 mL. Posteriormente se le añadieron 2,25 mL de tampón acetato 100 mM pH 5 y 750 μ L de ABTS. 1mM La cinética se realizó durante 60 minutos midiendo en intervalos de 5 minutos. Para ello se pipeteó 1 mL de la disolución del Falcon en una cubeta desechable de paso estrecho.



Figura 3.6. Representación visual de los monolitos de distintos tamaños.

3.7 Swelling

Los hidrogeles utilizados fueron sometidos a una prueba de swelling (Sw) para determinar la capacidad de hinchamiento máxima. Se cortaron varios trozos de xerogel, con un peso aproximado de 70 mg y fueron sumergidos en un exceso de líquido que, dependiendo del experimento fue, agua MQ, una disolución de citrato 38,8 mM pH 7.2, tampón acetato 100 mM a pH 5. Durante las primeras 6 horas, el peso se registró con mayor frecuencia en una balanza (Serie SV-1000 – gran precisión), debido al rápido crecimiento inicial del hidrogel. Posteriormente el incremento de peso se estabilizó, por lo que las mediciones se realizaron a las 24 y 48 horas. El grado de swelling se calculó con la siguiente fórmula:

$$Sw = \frac{W_t - W_0}{W_0}$$

Donde W_t es el peso del hidrogel a cada tiempo y W_0 es el peso inicial del hidrogel deshidratado

4. Resultados y Discusión

Se ha decidido presentar los resultados conjuntamente con su discusión para facilitar la lectura y la comprensión de los mismos.

4.1 Caracterización de las AuNPs

La parte inicial de este TFM se ha centrado en la síntesis, estudio de la estabilidad y caracterización de las AuNPs en disolución como paso previo a su incorporación en las matrices. Tras la síntesis de las partículas en agua MQ se procedió a recubrir con los polímeros mencionados en el apartado 3.2.

Se utilizó una concentración constante de AuNPs de 0,179 mg/mL para todos los experimentos, variando únicamente la concentración de los polímeros, donde las concentraciones finales fueron las siguientes: PDADMACI 1,5 mg/mL y 3,0 mg/mL; PVP 1 mg/mL y 0,5 mg/mL.

4.1.1. Tamaño de las AuNPs

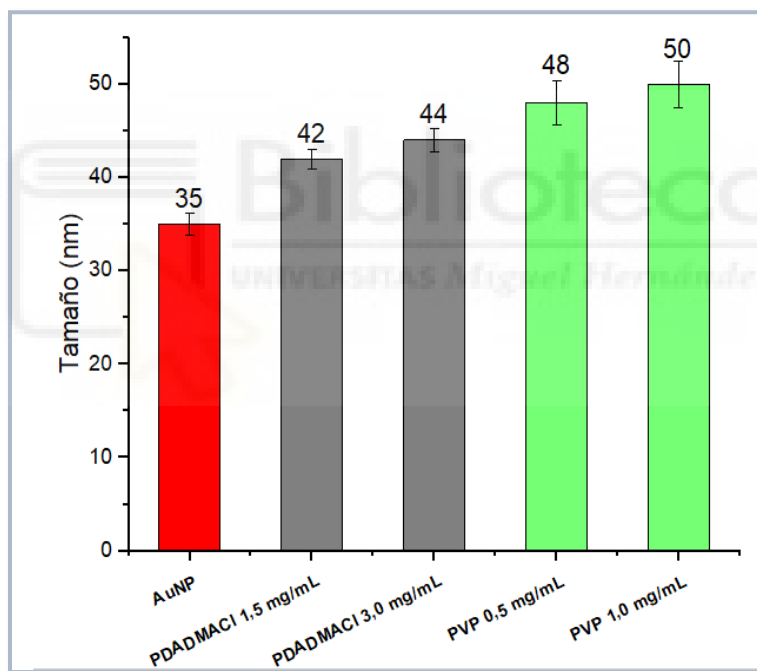


Figura 4.1. Representación del tamaño de las nanopartículas desnudas y recubiertas con PDADMACI y PVP diluidas en agua.

En la figura 4.1 se ve reflejado el tamaño de las nanopartículas sintetizadas. Las AuNPs sin recubrimiento muestran una población mayoritaria con un diámetro promedio de 35 nm. Cabe indicar que el valor del índice de polidispersidad fue elevado, mayor a 0,4 indicando la presencia de distintas poblaciones. El tamaño reflejado en la gráfica, corresponde a la población mayoritaria que representa un porcentaje mayor al 85%. Adicionalmente, se observaba la existencia de una población minoritaria de pequeño tamaño (~ 2 nm) que puede correlacionarse con permanencia de semillas iniciales de nucleación que proporcionaron la superficie para el crecimiento de las partículas más grandes [52].

Las AuNPs recubiertas de PDADMACI a una concentración de 1,5 mg/mL, mostraban un tamaño de 42 nm, mientras que, a una concentración de 3 mg/mL, el tamaño determinado fue de 44 nm. Estos resultados nos indican que el recubrimiento de las AuNPs con PDADMACI aumenta ligeramente el tamaño de las nanopartículas, aunque no se pueda apreciar una gran diferencia entre las distintas preparaciones.

En el caso de la PVP, recubrir las AuNPs con una concentración de 0,5 mg/mL, hacía que el tamaño de las AuNPs recubiertas aumentara hasta un diámetro de 48 nm, mientras que, a una concentración de 1 mg/mL, el tamaño ascendía hasta 50 nm. Similarmente, aunque se observe un ligero aumento en el tamaño con la adición de PVP, la diferencia entre las concentraciones estudiadas no es significativa.

Se ha descrito que el uso de cantidades subestequiométricas de polielectrolitos para el recubrimiento de AuNPs produce un incremento del tamaño de las nanopartículas. El aumento de tamaño es debido a efectos de "bridging", una molécula de polielectrolito enlaza varias nanopartículas al mismo tiempo. Además, dicho efecto provoca un cambio de color en las disoluciones apreciable a simple vista, por disminución de la intensidad de la banda a 520 nm y el aumento de absorbancia entre 600-650 nm [53]. Sin embargo, los cambios de tamaño detectados por el recubrimiento con PDADMACI y PVP son mínimos, mucho menores a los esperados en caso de agregación o "bridging" y no se apreciaban cambios en la coloración de las disoluciones, por lo que es posible atribuirlos a la presencia del polímero sobre la superficie de las NPs.

4.1.2. Carga

El potencial zeta de las AuNPs se midió para evaluar la estabilidad coloidal y carga superficial. En su estado inicial las AuNPs, en principio, son neutras, ya que los átomos de oro reducidos no poseen carga. La carga superficial, por lo tanto, depende del ligando al que se adhieran las partículas.

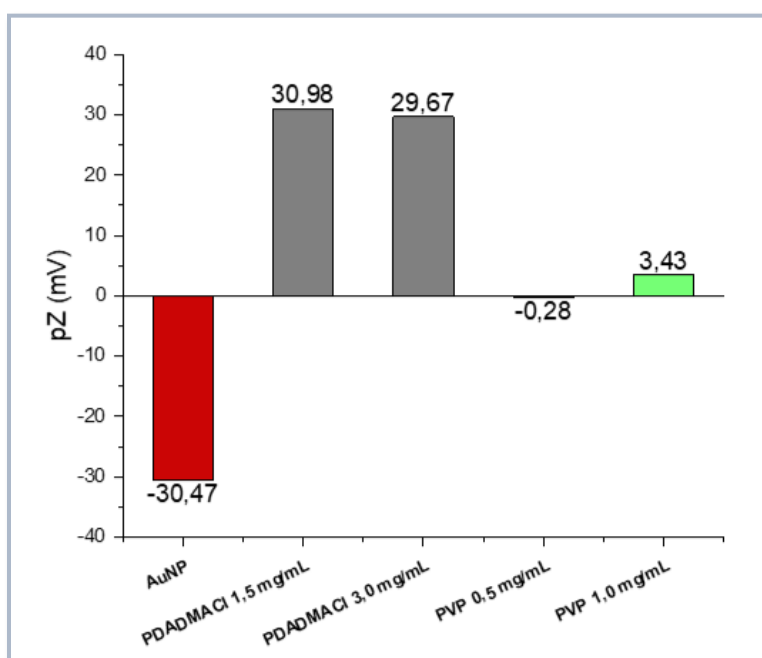


Figura 4.2. Valores de potencial Z de las AuNPs diluidas en agua.

Un valor de potencial zeta alrededor de ± 30 mV suele indicar una gran estabilidad coloidal en la solución, ya que valores más allá de ± 30 mV sugieren una fuerte repulsión electrostática entre las partículas, lo cual previene su agregación. En la gráfica se puede observar que las AuNPs presentan una carga de -30,47 mV en ausencia de PE, lo que permite considerar la muestra como coloidalmente estable.

Esta estabilidad proviene de la carga superficial negativa proporcionada por el recubrimiento de iones de citrato adsorbidos en la superficie de las AuNPs, que generan una repulsión electrostática significativa entre las partículas.

Las AuNPs recubiertas con PDADMACI a 1,5 y 3,0 mg/mL presentan una carga de 30,98 y 29,67 mV respectivamente, indicando una alta estabilidad derivada de la repulsión electrostática entre las moléculas de PDADMACI. Los grupos amonio cuaternario (N^+) presentes en la estructura del PDADMACI dotan a este polímero de una carga positiva, neutralizando la carga negativa del citrato y, debido a su exceso, otorgando una carga positiva a las nanopartículas.

Por otro lado, los resultados presentados en la gráfica revelan que las AuNPs recubiertas con PVP tienen una carga neutra. Este efecto se debe al desplazamiento de los iones de citrato adsorbidos en la superficie de las AuNPs por parte del polímero, eliminando la carga negativa de las AuNPs. Este proceso no siempre resulta en una eliminación completa del citrato, dejando ocasionalmente algunas moléculas residuales en la superficie [54]. La PVP previene la agregación de las AuNPs gracias a las fuerzas repulsivas por parte de sus cadenas de carbono hidrofóbicas [54–56].

4.1.3. Absorción

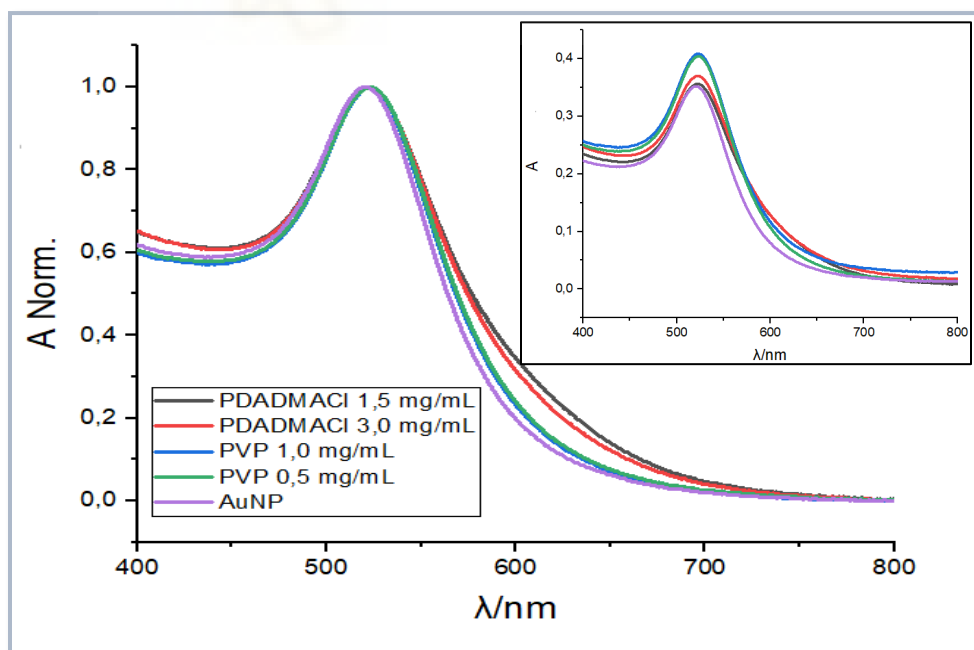


Figura 4.3. Representación de los espectros de absorción normalizados de las AuNPs diluidas en agua junto al inserto con los espectros de absorción sin normalizar.

La figura 4.3 muestra los espectros de absorción normalizados obtenidos para las distintas preparaciones de AuNPs. En ausencia de polímeros se observa la presencia de una banda bien definida con un máximo

en torno a 520 nm que correspondería con el pico de resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR), característico de partículas esféricas con un diámetro aproximado de 20-40 nm. Este fenómeno es coherente con los resultados obtenidos mediante DLS, donde se observó un tamaño promedio de 35 nm. La resonancia LSPR es un indicador de la interacción de la luz con las nanopartículas, su posición y apariencia pueden proporcionar información sobre el tamaño y la forma de las partículas [24].

Las AuNPs recubiertas con PDADMACI y PVP presentan un pico de absorción muy similar al de las AuNPs sin recubrimiento, lo que indica que la presencia de los polímeros no desplaza significativamente el pico LSPR, apenas se detecta un desplazamiento hacia el rojo de 1-2 nm en la posición del máximo. Esto sugiere que no ha habido una alteración notable en el tamaño de las nanopartículas, por lo que el ligero incremento observado por DLS para el tamaño de las AuNPs tras el recubrimiento podría ser atribuido a la presencia de una capa de polímero alrededor del núcleo de oro.

Además, la forma de los espectros de absorción puede proporcionar también información sobre la homogeneidad y la dispersión de la población de AuNPs en la solución. Un pico LSPR nítido y bien definido sugiere una distribución uniforme y una buena estabilidad coloidal, mientras que un pico más ancho, desplazado hacia el rojo o con más de una banda en el rango visible, indicaría un incremento en el tamaño de las partículas o en la polidispersión de la muestra [57, 58]. En este caso, la similitud en la forma y anchura de los picos LSPR entre las AuNPs sin recubrimiento y las recubiertas refuerza la idea de que los recubrimientos con PDADMACI y PVP no inducen agregación significativa de las nanopartículas.

En el inserto de la figura 4.3 se muestran los espectros sin normalizar donde se aprecia que las intensidades de todas las preparaciones, es muy similar, aunque ligeramente superior en las preparaciones con PVP. Está descrito que el cambio de índice de refracción del medio que rodea las partículas o incluso el cambio en el índice de refracción en la superficie producido por el recubrimiento con un compuesto orgánico transparente puede modificar el coeficiente de extinción y la posición del máximo del LSPR [59]. Por lo que las ligeras variaciones observadas en la intensidad y longitud de onda del máximo del LSPR en las partículas recubiertas pueden ser atribuidas a cambios del índice de refracción en la superficie de la nanopartícula debido al recubrimiento del polímero.

4.1.4. Comportamiento en medio tamponado

Debido a la proyección futura de este trabajo hacia la optimización de AuNPs en diferentes medios tamponados, se realizaron pruebas con las AuNPs sustituyendo el agua por diversos tampones. Los resultados mostraron que la estabilidad coloidal de las nanopartículas en dichos medios se vio comprometida. Esta pérdida de estabilidad podría atribuirse a la alteración de la fuerza iónica del medio, que podría neutralizar o debilitar las repulsiones electrostáticas entre las partículas, favoreciendo su agregación.

Los espectros de absorción y la determinación del tamaño mediante DLS de las AuNPs, mostrados en la Figura 4.4 a y b, se registraron siguiendo el mismo protocolo experimental previamente descrito en los puntos 3.2 y 3.4.2 de Materiales y Métodos, reemplazando el agua por tampón fosfato 50 mM a pH 7 y tampón acetato 100 mM a pH 5.

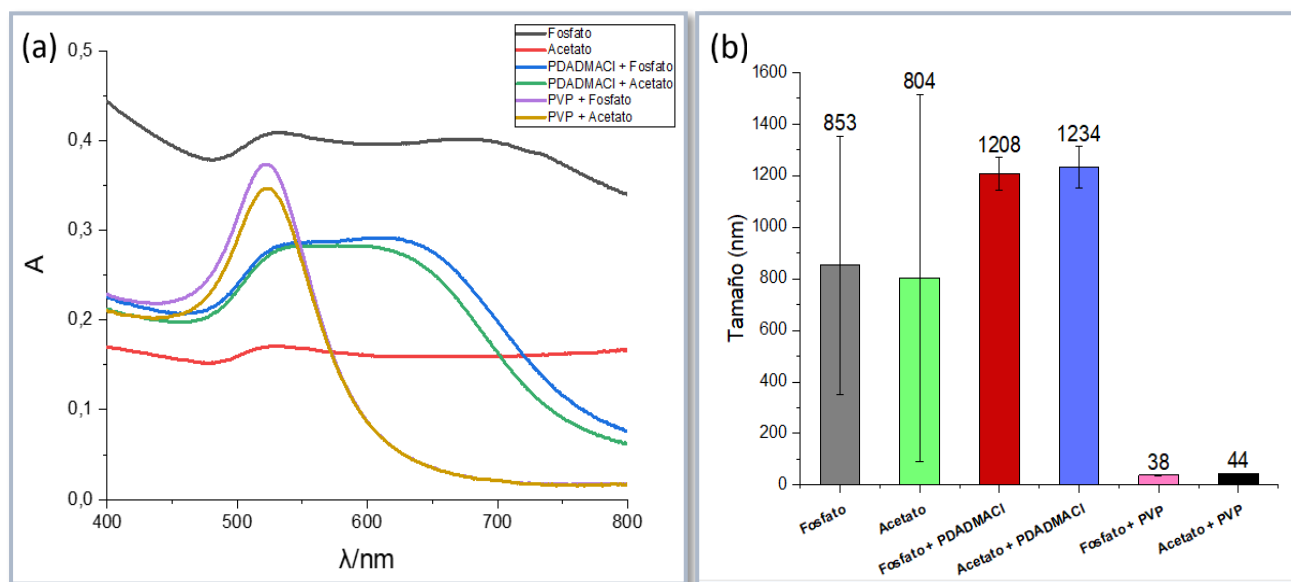


Figura 4.4. (a) Espectros de absorción de las AuNPs desnudas y recubiertas en diversos tampones. (b) Distribución de los tamaños.

Analizando los espectros de absorción de las AuNPs (Figura 4.4 a) en ausencia de recubrimiento en ambos tampones, se observó una línea prácticamente horizontal en la que el plasmón es casi indistinguible, mostrando un ensanchamiento aparente en comparación con las partículas dispersas en agua (Figura 4.3). Además, a pesar de que el tamaño determinado por DLS (Figura 4.4 b) en ambos tampones rondaba los 800 nm, las muestras mostraban elevada inestabilidad y sedimentaban con el tiempo impidiendo su correcta medida, como se deduce de los errores registrados en las medidas. Los espectros de las AuNPs recubiertas con PDADMACI mostraron un ensanchamiento de la banda hacia el rojo con un máximo no definido en forma de meseta, lo que parecería indicar distinto grado de agregación de las partículas. Por otro lado, el recubrimiento con PVP demostró ser eficaz en la estabilización de las nanopartículas en ambos tampones, como se deduce de la preservación de la forma y posición del plasmón.

Las medidas de DLS mostradas en la figura 4.4 (b) confirman el incremento en el tamaño de las nanopartículas, en presencia de PDADMACI, mientras que con PVP los tamaños se mantienen en valores similares a los de las AuNPs inicialmente sintetizadas. Destacar que, a priori, el desplazamiento y ensanchamiento del LSPR observado en el caso de las AuNPs recubiertas con PDADMACI no conlleva necesariamente implicaciones negativas. Dependiendo de la aplicación, puede ser interesante irradiar a otras longitudes de onda aprovechando sus propiedades fototérmicas a lo largo del espectro, siempre que se mantengan estables con el tiempo. Sin embargo, en el presente trabajo la irradiación de las AuNPs se

realizará a 520 nm por lo que se decidió continuar el estudio empleando exclusivamente AuNPs recubiertas con PVP (0,5 mg/mL), descartando el PDADMACI como agente estabilizante.

4.1.5 Pruebas de irradiación en disolución

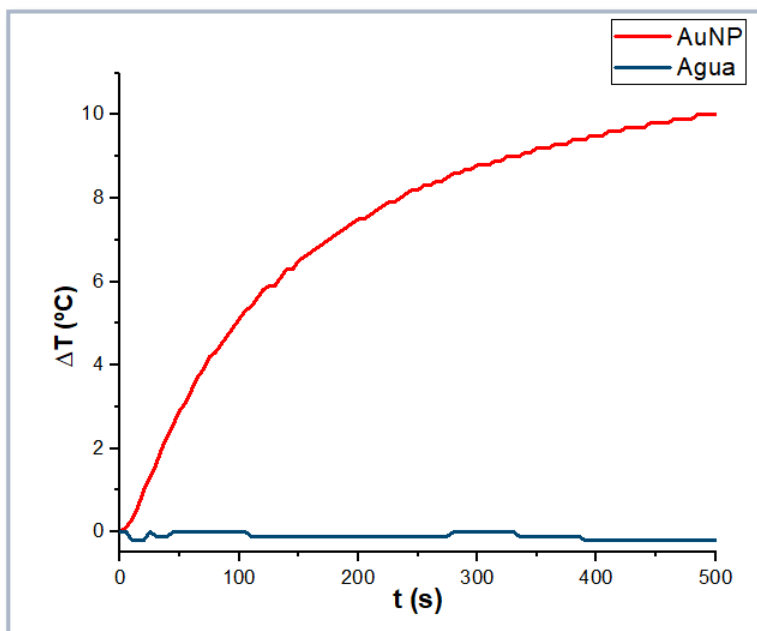


Figura 4.5. Efecto de la irradiación láser a 520 nm sobre la disolución de AuNPs y el agua.

La conversión fototérmica de las AuNPs en disolución, determinada como la capacidad para producir el calentamiento del medio, se evaluó irradiando una disolución de nanopartículas recubiertas con PVP utilizando un láser monocromático a una longitud de onda de 520 nm y con una potencia de 1200 mW. Para ello, se diluyeron 200 μL de la disolución de AuNPs con 125 μL PVP en agua hasta un volumen final de 2 mL. La figura 4.5 muestra el incremento de la temperatura en función del tiempo. La disolución de AuNPs ha conseguido aumentar notablemente su temperatura, alcanzando un incremento de 10 $^{\circ}\text{C}$ por encima del valor inicial. Por el contrario, no hubo variación alguna en la temperatura del agua irradiada a 520 nm, confirmándose la capacidad de las AuNPs sintetizadas para producir el calentamiento del medio al ser irradiadas.

4.2 Caracterización de la enzima

La caracterización de la lacasa en disolución se llevó a cabo a partir de los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína a temperatura ambiente, siguiendo la fluorescencia en función de la temperatura, para determinar la estabilidad térmica y realizando ensayos de actividad enzimática a diversas temperaturas. También se realizaron ensayos de actividad en presencia de AuNPs a temperatura ambiente para determinar su posible influencia.

4.2.1. Fluorescencia

Con el fin de caracterizar la conformación y estabilidad térmica de la enzima con vistas a su posterior inmovilización se realizaron experimentos de fluorescencia. La fluorescencia intrínseca de las proteínas es debida a la presencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), siendo el triptófano

el que más contribuye a la fluorescencia. La fluorescencia es utilizada comúnmente como herramienta para detectar cambios conformacionales en las proteínas, ya que modificaciones en el microentorno de los residuos aromáticos producen variaciones en la intensidad y máximo de los espectros de emisión. Por ejemplo, el desplegamiento o desnaturalización de la proteína provoca que la estructura inicial se pierda, exponiendo los triptófanos al solvente lo que induce cambios en los espectros de emisión que se desplazan generalmente hacia el rojo.

Para realizar los experimentos de fluorescencia se prepararon disoluciones con concentraciones de enzima de 0,03 μM en tampón fosfato 50 mM pH 7. Los espectros de emisión de la enzima se realizaron a 20 $^{\circ}\text{C}$ y se sometieron las muestras a una rampa de temperatura para inducir la desnaturalización térmica siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.1 de Materiales y Métodos. Por último, se volvieron a realizar los espectros de emisión a 20 $^{\circ}\text{C}$ tras la rampa de temperatura.

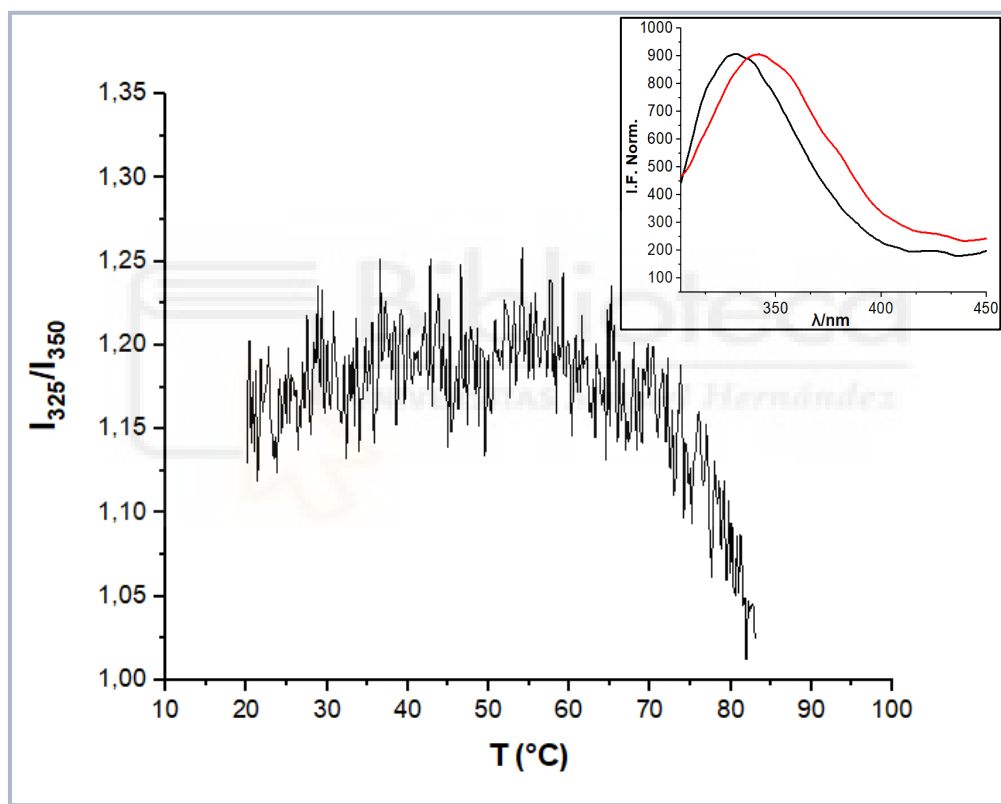


Figura 4.6. Efecto de la temperatura sobre la relación de intensidades I_{325}/I_{350} de la lacasa. Inserto: espectros de emisión a 20 $^{\circ}\text{C}$ de la lacasa nativa (negro) y tras la rampa de temperatura (rojo).

En la figura 4.6, se presentan los datos obtenidos de la rampa, representados como la relación entre las intensidades a 325 nm y 350 nm en función de la temperatura. El inserto muestra los espectros de emisión de la proteína recogidos antes y después de la realización de la rampa, ambos a 20 $^{\circ}\text{C}$. Los espectros de emisión muestran un único pico con un máximo en torno a 330 nm antes del proceso de calentamiento que se ensancha y desplaza hacia el rojo tras la rampa, indicando el cambio en la conformación, desnaturalización total o parcial de la proteína tras el calentamiento. La forma de la gráfica en función de la temperatura sugiere el comienzo del proceso de desnaturalización en torno a los 60 $^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, en el rango de temperaturas estudiado la gráfica no presenta el típico perfil sigmoidal observado en los

procesos de desnaturalización, indicando que la proteína no llega a desplegarse completamente. Se trata por tanto de una proteína altamente estable, como era de esperar por su origen. Por otro lado, el desplazamiento del espectro de emisión de la proteína a 20°C obtenido tras la realización de la rampa sugiere que el proceso es irreversible. La proteína no recupera su conformación nativa, dado que el espectro no retorna a su posición inicial. Aunque no es posible realizar el ajuste de los datos y determinar la T_m (temperatura de desnaturalización) los resultados obtenidos son compatibles con los obtenidos en estudios previos realizados por otros autores en los que observan irreversibilidad del proceso de desnaturalización y una elevada T_m (~ 87 °C) para esta lacasa [60].

4.2.2 Ensayo de actividad a diferentes temperaturas

Para evaluar la actividad enzimática de la lacasa en disolución, se realizaron ensayos de actividad a diferentes temperaturas con concentraciones finales de lacasa de 2,9 U/g y 0,125mM de ABTS en tampón acetato 100 mM a pH 5. Los ensayos se llevaron a cabo a 20°C, 30 °C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C, monitorizando el aumento de absorbancia a 436 nm en función del tiempo.

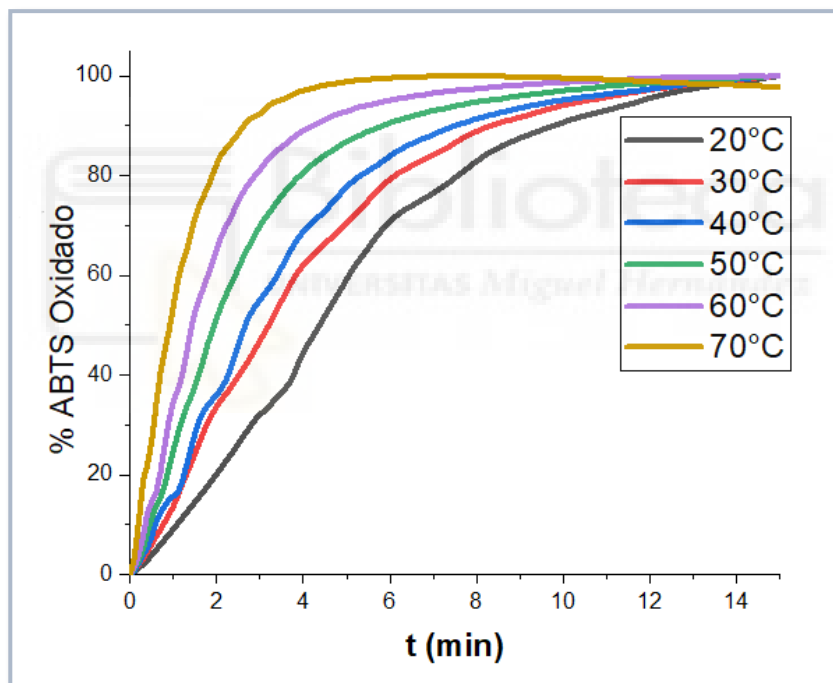


Figura 4.7. Representación del % de ABTS oxidado por parte de la lacasa a diferentes temperaturas en función del tiempo.

En la figura 4.7 se representa el % del ABTS oxidado por parte de la lacasas a diferentes temperaturas, donde se observa que, al aumentar la temperatura, la pendiente de las curvas es cada vez más pronunciada, indicando un incremento en la velocidad inicial de la reacción. Este resultado entra dentro de lo esperado ya que la lacasa utilizada proviene de *Myceliophthora thermophila*, un hongo termofílico cuya enzima exhibe elevada estabilidad y mayor actividad a temperaturas elevadas [61]. Además, dado que se pretende desarrollar en un futuro plataformas multifuncionales en las que la lacasa inmovilizada, sea activada mediante la irradiación de AuNPs, es fundamental que la enzima presente mejores rendimientos al incrementar la temperatura del medio.

4.2.3 Ensayo de actividad con AuNPs

Posteriormente, se evaluó la influencia de las AuNPs en la actividad enzimática. Para este ensayo se llevaron a cabo cinéticas en ausencia y presencia de una concentración de 0,179 mg/mL de AuNPs estabilizadas con PVP. Las concentraciones de lacasa y ABTS utilizadas en el ensayo fueron de 2,9 U/g y 0,25 mM, respectivamente en medio tamponado con acetato 100 mM pH 5. Se recogió además como blanco la absorbancia correspondiente a una disolución conteniendo la misma cantidad de ABTS y AuNPs que las muestras.

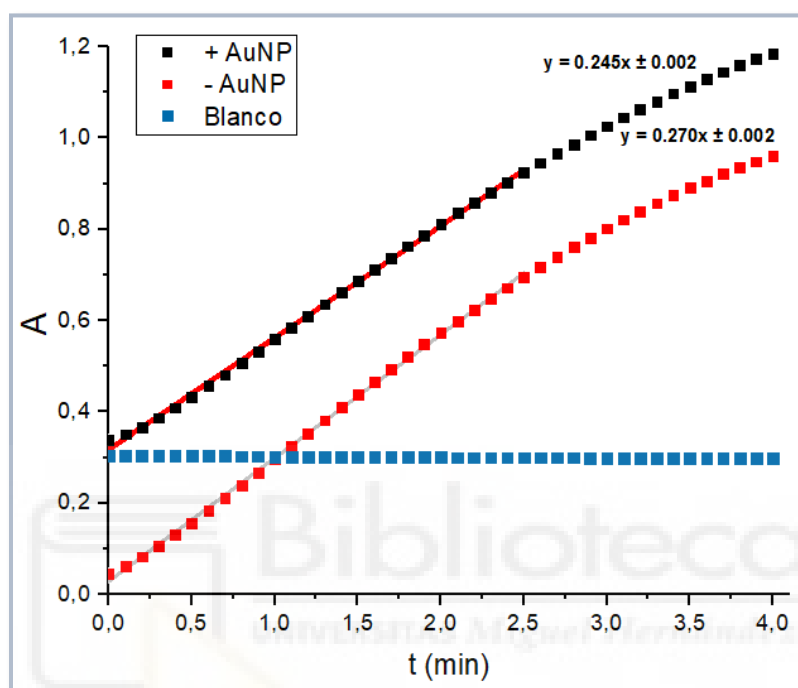


Figura 4.8. Cinéticas enzimáticas de la lacasa en presencia y ausencia de nanopartículas de oro.

Las cinéticas obtenidas se representan en la figura 4.7, donde se puede observar que la absorbancia de la muestra conteniendo AuNPs es superior a la que no contiene nanopartículas, como era de esperar debido a que las AuNPs absorben a la longitud de onda de medida (436 nm), como corrobora el blanco conteniendo AuNPs. A partir de los perfiles de absorción a 436 nm obtenidos no se aprecian grandes diferencias en la cinética enzimática debido a la presencia de AuNPs, aunque la velocidad inicial en presencia de AuNPs parece ser ligeramente más lenta, como indicarían los valores de las pendientes iniciales del ajuste de los datos de la representación ($0,270 \pm 0,002$ y $0,245 \pm 0,002$ ua/min, en ausencia y presencia de AuNPs, respectivamente). Estudios previos describen una disminución de la actividad de la enzima en presencia de AuNPs atribuyéndola a la adsorción de la enzima sobre la nanopartícula, llegando a perderse hasta el 50 % de la actividad enzimática [62]. Sin embargo, en nuestro caso la disminución es mucho menos acusada lo que podría deberse a que las AuNPs se encuentran recubiertas de PVP en lugar de obtenerse directamente a partir de citrato como en el estudio mencionado.

4.3 Hidrogeles orgánicos

En línea con el objetivo 3, se exploraron diversos métodos de inmovilización de las nanopartículas y la lacasa en matrices híbridas. En este apartado se discutirá la inmovilización por separado de las AuNPs y la lacasa en hidrogeles de AETA, utilizando dos métodos de inmovilización y evaluando la capacidad de hinchamiento, la conversión fototérmica y la actividad catalítica del hidrogel nanocompuesto.

4.3.1 Inmovilización de AuNPs

La inmovilización de las nanopartículas se llevó a cabo mediante dos rutas diferentes: (1) ex-situ e (2) in-situ descritas en Materiales y Métodos (Figura 3.4).

4.3.1.1. Inmovilización de AuNPs ex-situ

En primer lugar, se inmovilizaron las AuNPs en hidrogeles utilizando el método ex-situ. Partiendo de un hidrogel previamente deshidratado, se hinchó con una disolución de AuNPs recubiertas con PVP en tampón acetato 100 mM a pH 5. Estos resultados se compararon con los de las AuNPs en disolución (Figura 4.9).

Los espectros de absorbancia registrados muestran un pico de absorbancia máxima a 521 nm, lo que confirma la presencia de AuNPs en disolución estables. Por el contrario, la absorbancia medida en el hidrogel fue notablemente menor, donde apenas se puede apreciar un ligero pico en torno a 540 nm, indicando el desplazamiento del plasmón y que no se ha logrado una inmovilización efectiva de las AuNPs.

Las imágenes mostradas en el inserto corroboran esta observación. En la imagen izquierda, el hidrogel situado en el interior de la cubeta parece contener las AuNPs inmovilizadas. Sin embargo, al desmoldar el hidrogel (imagen de la derecha), se observa claramente que las AuNPs se encuentran adheridas a las paredes de la cubeta.

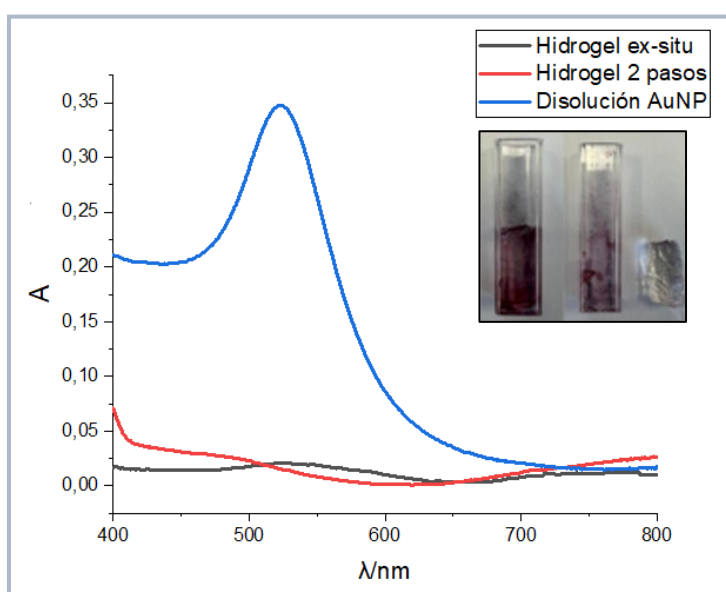


Figura 4.9. Espectros de absorbancia de AuNPs en disolución e inmovilizadas en un hidrogel por el método ex-situ y prehinchadas con tampón acetato y AuNPs en 2 pasos. Inserto: Imagen que muestra visualmente que las AuNPs inmovilizadas en el hidrogel (izquierda) no han sido incorporadas debido a la ausencia de coloración al desmoldarlo (derecha).

Como alternativa al método de inmovilización ex-situ convencional, se intentó la inmovilización de AuNPs mediante un método de prehinchamiento, donde se añadieron 900 μL de tampón acetato para incrementar el tamaño de los poros del hidrogel antes de añadir otros 900 μL de la disolución de AuNPs. No obstante, el espectro de la figura 4.9 confirma que este método alternativo tampoco logró introducir efectivamente las AuNPs en el hidrogel ya que, además de unos valores de absorción mínimos, tampoco se observa el pico característico del plasmón alrededor de 520 nm.

4.3.1.2 Inmovilización de AuNPs in-situ

El método in-situ ofrece una nueva vía de inmovilización de AuNPs en un hidrogel que, según nuestro conocimiento, no ha sido descrita previamente en la literatura. Este método se basa en la introducción del precursor metálico en un xerogel, seguido de la reducción in-situ para generar las AuNPs dentro del mismo hidrogel durante el proceso de hinchamiento.

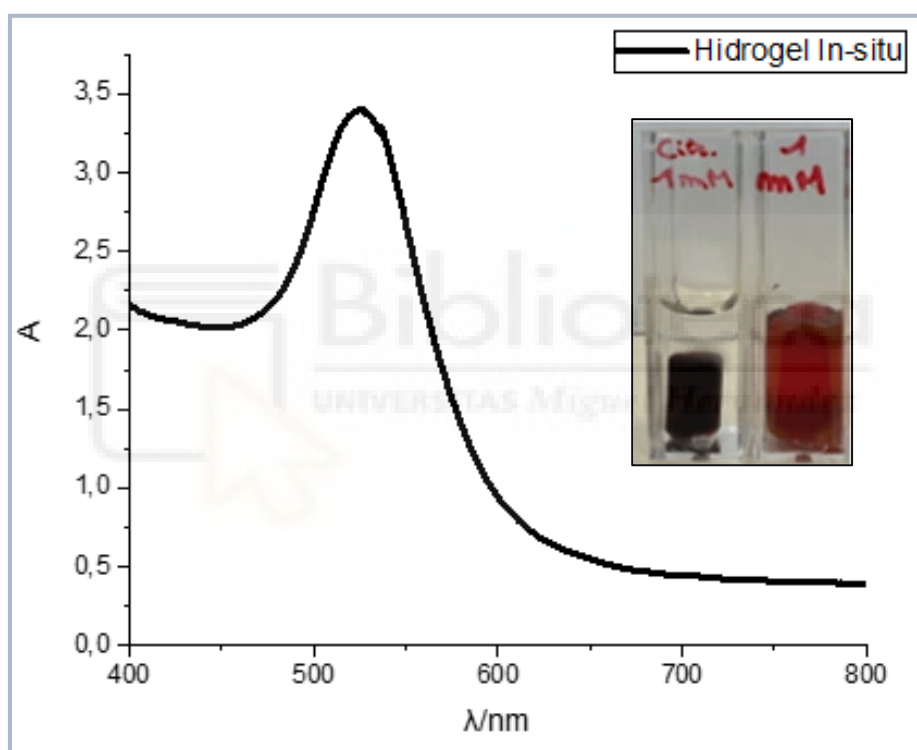


Figura 4.10. Espectro de absorción del hidrogel nanocompuesto sintetizado mediante el método in-situ partiendo de una concentración de 1mM de HAuCl_4 . Inserto: Representación visual de las AuNPs inmovilizadas en el hidrogel hinchado con agua (derecha) e hinchado con citrato (izquierda).

Para la preparación de los hidrogeles nanocompuestos, se utilizaron dos xerogeles, previamente tratados con HAuCl_4 1mM, siguiendo el primer apartado del protocolo descrito en la sección 3.3.2.2. Posteriormente, se añadieron 1800 μL de una solución de citrato 38,8 mM pH 7.2 a un xerogel y 1800 μL de agua MQ al xerogel restante. La figura 4.10 muestra el espectro de absorción del hidrogel hinchado en agua, donde se observa un pico de absorción máxima a 520 nm, lo que confirma la presencia del plasmón y, por ende, de AuNPs dentro del hidrogel.

El espectro de absorción del hidrogel hinchado con citrato, también se realizó, aunque sin éxito. Debido al tamaño reducido del hidrogel (inserto izquierda Figura 4.10), el haz de luz incidente no lograba atravesar

el hidrogel, lo que resultó en espectros de baja calidad (datos no mostrados). Sin embargo, el color rojo intenso observado en la foto, sugiere la formación de AuNPs dentro del hidrogel indicando que la reducción de HAuCl_4 en presencia de agua es menos eficiente en comparación con el citrato como agente reductor. La generación de las AuNPs in situ en ausencia de citrato podría deberse a una reducción de HAuCl_4 por parte de los grupos amino y amida presentes en el AETA y MBA respectivamente. Estudios previos reportan utilizar polímeros que contienen estos grupos funcionales como método de síntesis de AuNPs, confirmando estas capacidades [63–65].

La diferencia en la intensidad del color sugiere que podrían generarse más nanopartículas, dado que ambos hidrogeles parten de la misma concentración inicial de HAuCl_4 . La síntesis de AuNPs dentro de la matriz nos imposibilita, de momento, la caracterización y la cuantificación de la concentración de nanopartículas dentro del mismo hidrogel.

Un problema observado con este método es la falta de control sobre la cantidad de AuNPs generadas. Utilizando una concentración inicial de 1 mM de HAuCl_4 , se observó que la absorción era demasiado elevada. Por este motivo, se probaron concentraciones más bajas de 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM y 0,75 mM.

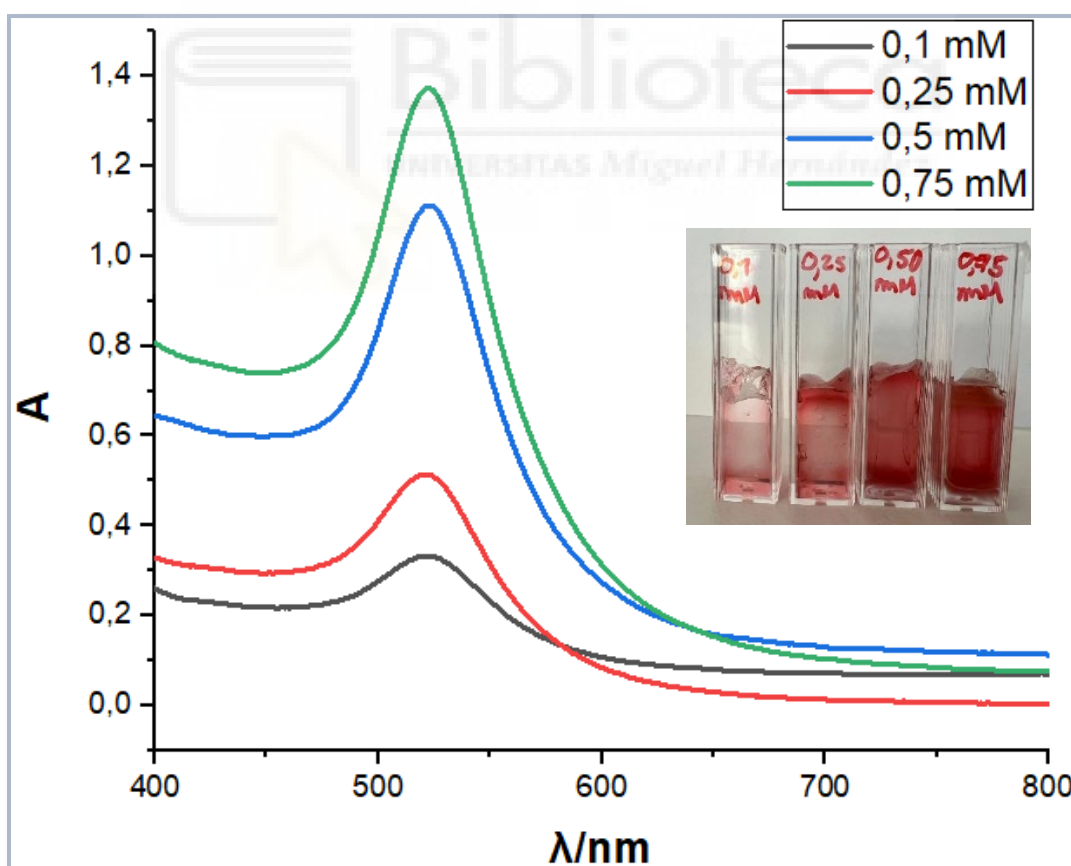


Figura 4.11. Espectros de absorción de hidrogeles nanocompuestos obtenidos con concentraciones crecientes de HAuCl_4 (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 mM) mediante el método in-situ. Inserto: Representación visual de las AuNPs inmovilizadas en el hidrogel hinchado con concentraciones crecientes de HAuCl_4 (izquierda a derecha).

La figura 4.11 presenta los espectros de absorción de los hidrogeles nanocompuestos sintetizados con concentraciones crecientes de HAuCl_4 . Basado en la absorción del hidrogel a una concentración inicial de

1 mM, teóricamente al encontrarse dentro del rango de linealidad, la reducción de la concentración inicial a la mitad debería resultar en una disminución proporcional de la absorbancia. Sin embargo, los resultados demuestran que esto no ocurre de manera consistente, indicando una falta de reproducibilidad en la síntesis de AuNPs, con variaciones en la cantidad de nanopartículas generadas. Este comportamiento también se observa en las concentraciones de 0,5 mM y 0,25 mM.

La falta de homogeneidad de los hidrogeles podría representar un problema durante los experimentos de irradiación, ya que la eficacia de las propiedades fotocatalíticas de las AuNPs podría variar dependiendo del punto de incisión del haz de luz.

Aunque el color rojo del hidrogel junto con la presencia del pico característico del plasmón a 520 nm sugiere la formación de AuNPs con un tamaño inferior a 50 nm, no es posible utilizar la técnica de DLS para confirmar dichos tamaños.

4.3.2. Swelling

Un detalle interesante a tener en cuenta en el inserto de la figura 4.10, es la diferencia de tamaño observado entre los hidrogeles hinchados con agua MQ y citrato. Inicialmente se pensó que la presencia de una mayor cantidad de AuNPs en el hidrogel con citrato alteraba fuertemente las propiedades mecánicas del hidrogel, dado que estudios previos [43] confirmaron que la presencia de moléculas externas puede influir en la capacidad de hinchamiento de estos hidrogeles. Para confirmar esta hipótesis, se procedió con la determinación del grado de swelling.

Como se describe en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos, se cortaron 4 trozos de xerogel de 70 mg. Dos de estos xerogeles fueron hinchados y deshidratados previamente con una solución de HAuCl_4 a 1 mM. A continuación, la capacidad de hinchamiento o swelling fue comparada sumergiendo los xerogeles en dos medios acuosos diferentes: citrato 38,8 mM pH 7.2 y agua MQ. Los dos xerogeles restantes también se hincharon bajo las mismas condiciones en ausencia de HAuCl_4 . En la figura 4.12, se registró el grado de hinchamiento cada cierto tiempo a temperatura ambiente.

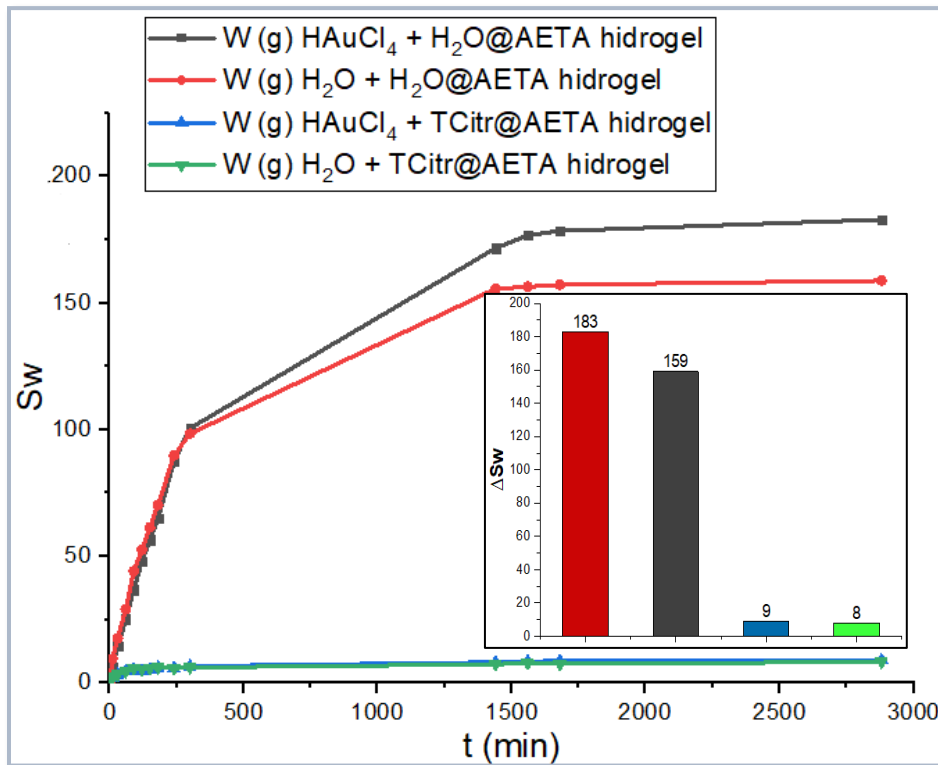


Figura 4.12. Grado de swelling de los hidrogeles hinchados con citrato 38,8 mM pH 7.2 y agua MQ en presencia y en ausencia de H_{AuCl} 1 mM. Inserto: incremento del grado de swelling.

Como se puede observar, los xerogeles hinchados en agua incrementaron su tamaño hasta 183 veces respecto a su peso inicial (inserto figura 4.12). En cambio, los hinchados con citrato mostraron un incremento mínimo, solo multiplicando su peso inicial por 9.

Dado que en ambos hidrogeles se sintetizaron AuNPs, no debería haber una diferencia significativa en términos de Sw. Sin embargo, la diferencia en el tamaño final es considerable, lo que indica que las AuNPs no son responsables de restringir la capacidad de swelling del hidrogel.

La hipótesis inicial sugiere que el citrato afecta de alguna u otra forma a las propiedades mecánicas del hidrogel, restringiendo el estiramiento de las cadenas poliméricas. La capacidad de hinchamiento de los hidrogeles se basa principalmente en la repulsión electrostática entre los grupos iónicos presentes en la red polimérica [66]. La carga negativa del citrato podría estar interactuando con los grupos amino del AETA y/o amida de la MBA, neutralizando su carga positiva, reduciendo así su capacidad de repulsión y limitando el estiramiento del hidrogel.

4.3.3 Conversión fototérmica

A continuación, se estudió la conversión fototérmica de los hidrogeles nanocompuestos siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado 3.5. En la figura 4.13 se presenta la curva de incremento de temperatura en función del tiempo utilizando un láser de diodo de 520 nm. Se observó que el hidrogel nanocompuesto con AuNPs incrementó su temperatura considerablemente llegando a 12,7 °C por encima de la temperatura inicial en un periodo de 7 minutos. Por otro lado, la temperatura en el hidrogel blanco y en la muestra de agua usados como controles permaneció estable, lo que indica que, en ausencia de

AuNPs la irradiación a 520 nm no tiene influencia alguna en la temperatura de la muestra. Este resultado confirma que las AuNPs conservan sus propiedades fototérmicas dentro del hidrogel.

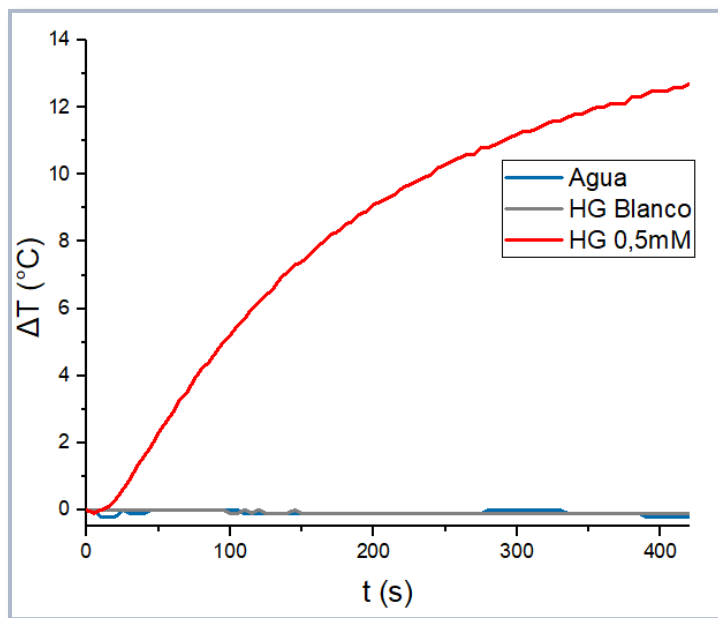


Figura 4.13. Incremento de temperatura en función del tiempo de irradiación utilizando un láser de diodo de 520 nm durante 7 minutos en un hidrogel nanocompuesto con AuNPs, un hidrogel blanco y una muestra de agua MQ.

4.3.4. Inmovilización de la lacasa en el hidrogel

Una vez inmovilizadas las AuNPs, se procedió con la inmovilización de la lacasa en los hidrogeles. Utilizando el método ex-situ, se hinchó un xerogel de 70 mg con 1800 μL de disolución de enzima a una concentración de 0,03 μM en tampón acetato 100 mM pH 5. Para confirmar la presencia de la lacasa en el hidrogel se realizó un espectro de fluorescencia excitando a 280 nm, longitud de onda característica para la detección de los residuos de triptófano y se recogió entre 300-450.

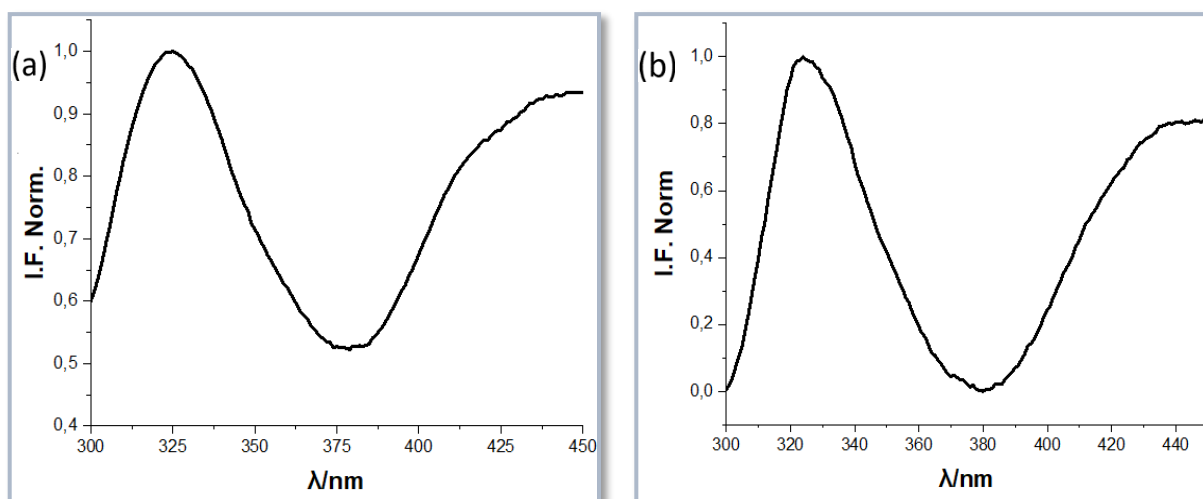


Figura 4.14. (a) Espectro de emisión de la lacasa inmovilizada en un hidrogel ex-situ. (b) Espectro de emisión de un hidrogel blanco.

La figura 4.14 (a) muestra el espectro de emisión de la lacasa en tampón acetato 100 mM a temperatura ambiente. En dicho espectro se puede apreciar un pico de emisión en torno a 325 nm. El desplazamiento del máximo de la proteína hacia el azul con respecto al observado en disolución puede ser atribuido a la presencia de un entorno menos polar alrededor de los residuos aromáticos, lo que podría deberse a la presencia de grupos apolares en la matriz o a algún tipo de agregación de la proteína. No obstante, también se detectó que existía interferencia por parte de la hidroquinona presente en el precursor monomérico AETA, la cual se excita a una longitud de onda similar, tal y como se observó tras la realización de los espectros de fluorescencia de hidrogeles que carecían de proteína (figura 4.4 (b)), lo que complica la detección precisa de los triptófanos presentes.

Ante esta limitación, y con objeto de confirmar la inmovilización de la lacasa en el hidrogel, se decidió complementar los espectros de fluorescencia con experimentos de swelling. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio [43] demostraron que la presencia de enzimas dentro de los poros del hidrogel, puede afectar a su capacidad de hinchamiento.

Para ello, un xerogel con la enzima lacasa inmovilizada ex-situ y otro xerogel blanco fueron hidratados con un exceso de tampón acetato 100 mM pH 5 y, siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos, se monitorizó el incremento del peso durante 48h.

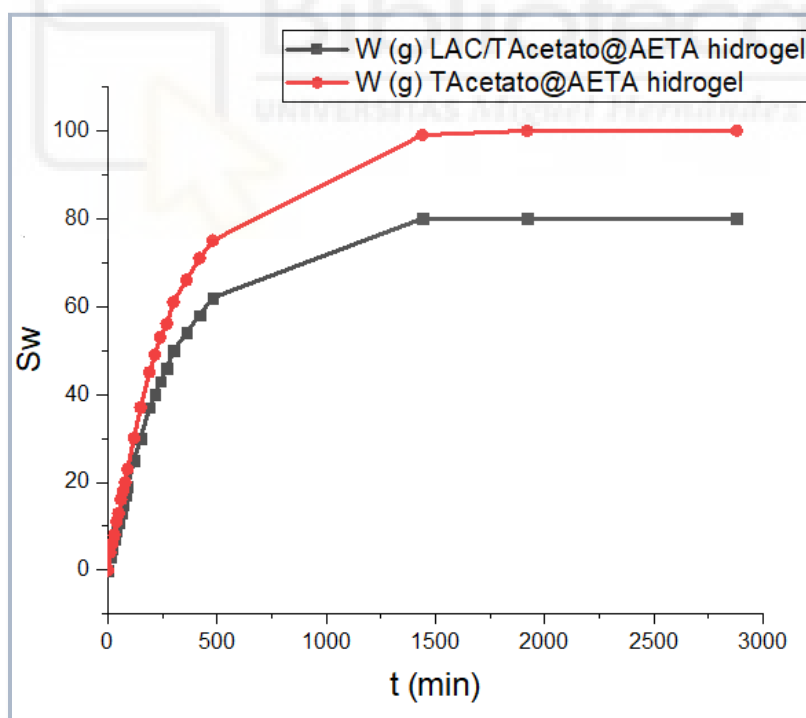


Figura 4.15. Grado de swelling del hidrogel en presencia y en ausencia de la lacasa.

Como se observa en la figura 4.15, el grado de hinchamiento fue mayor y un poco más rápido en el hidrogel en ausencia de enzima respecto al hidrogel con enzima. Esta diferencia, similar a la observada en presencia de citrato, aunque no tan pronunciada, podría deberse al hecho de que el hidrogel AETA es una red catiónica y, junto a la ligera carga negativa de la lacasa a pH 5 (su PI es 4,2), la enzima permanece anclada

a través de interacciones electrostáticas lo que podría afectar algo a las propiedades mecánicas del hidrogel. Este hecho también ha sido comprobado para otras enzimas como la fosfatasa alcalina [43]. Por tanto, estos resultados confirman que la lacasa está inmovilizada en el hidrogel.

4.3.5 Ensayo de actividad de la lacasa en el hidrogel

Una vez confirmada la inmovilización de la enzima, se procedió a evaluar la actividad enzimática dentro del hidrogel. Un xerogel con lacasa, fue prehinchado con 900 μL de tampón acetato 100 mM a pH 5 en una cubeta desechable de 10 x 10 mm. Tras la hidratación completa del xerogel, se añadieron otros 900 μL del sustrato ABTS 0,5 mM y se monitorizó el aumento de absorbancia a 436 nm durante 60 minutos.

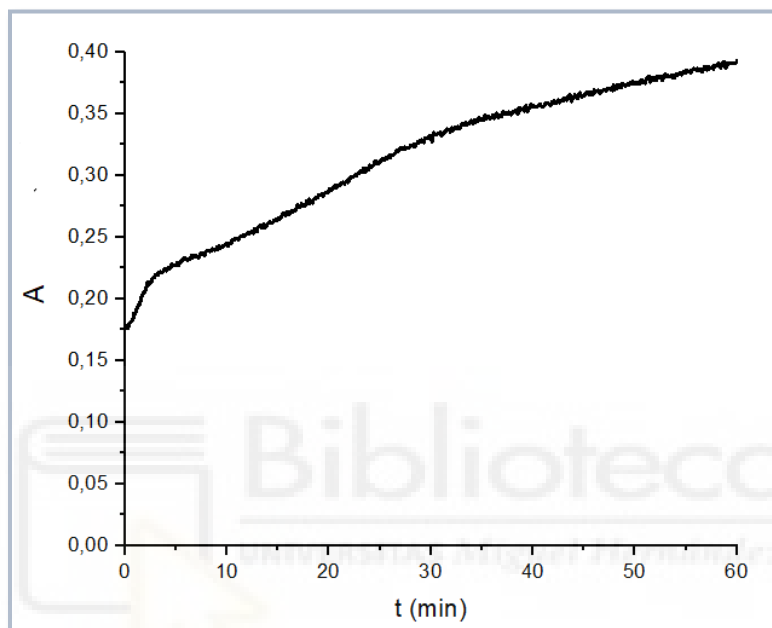


Figura 4.16. Cinética de formación del radical ABTS^+ a partir de lacasa 2,9 U/g en hidrogel ex situ.

La cinética representada en la figura 4.16 indica que la lacasa permanece activa dentro del hidrogel, aunque se ve enormemente reducida, incrementándose la absorbancia en apenas 0,2 unidades en una hora. Esta disminución podría deberse a inactivación parcial de la enzima debido a interacciones con el hidrogel. Según se ha discutido en el punto 4.3.4, debido a la interferencia de la hidroquinona no se puede confirmar el estado conformacional de la proteína por fluorescencia. Otra posible causa de la baja actividad enzimática podría ser la limitada difusión del ABTS hacia el sitio activo de la enzima debido a la estructura del hidrogel.

Finalmente, un inconveniente adicional fue la alta capacidad de absorción de líquidos por parte de estos hidrogeles. Esta característica dificulta las medidas de actividad y representa una limitación para aplicaciones industriales, donde es más interesante que, una vez el sustrato ha sido oxidado por la lacasa, el producto sea capaz de difundir fuera del hidrogel. Se están explorando alternativas para reducir esta capacidad de hinchamiento, variando la concentración de entrecruzante o modificando las características del medio de hinchamiento.

4.4 Matrices Sol-gel de sílice

Siguiendo lo mencionado en el objetivo 4, se procedió con la inmovilización de las nanopartículas y de la lacasa en matrices de sol-gel siguiendo el protocolo descrito en 3.3.3.1.

4.4.1 Inmovilización de AuNPs

Para la inmovilización de las AuNPs dentro del sol-gel, se diluyeron 70 μL de la disolución madre de AuNPs recubiertas con PVP en 280 μL de tampón fosfato 50 mM a pH 7. A continuación, se añadieron 350 μL de la disolución del sílice coloidal, previamente hidrolizada y rotada, según el método detallado en la sección 3.3.3.1. Tras iniciar el proceso de gelificación, se guardó en nevera a 4°C durante 36-48h para que el proceso de polimerización se completara.

Pasadas las 48h de polimerización, se desmoldaron y se realizaron espectros de absorbancia para detectar el plasmón dentro de la matriz sol-gel. En concreto, dicho espectro se comparó con el espectro de las AuNPs en disolución (Figura 4.17). Ambos espectros presentan un pico de absorción máximo alrededor de 520 nm, sin desplazamiento del máximo del plasmón, lo que sugiere que las AuNPs consiguen mantener sus propiedades. Sin embargo, el ensanchamiento del pico, podría sugerir un incremento en la polidispersidad de la muestra, indicando que parte de las nanopartículas podrían verse afectadas durante el proceso de inmovilización causando su agregación. La diferencia en los espectros, además se ve acentuada por la mayor cantidad de luz dispersa en la matriz sol gel observándose un aumento en la línea base que se acentúa al disminuir la longitud de onda. Este efecto se observa también en las matrices en ausencia nanopartículas. Sin embargo, la corrección por sustracción de la señal de la matriz no resulta efectiva, porque las matrices que no incorporan elementos en su interior difieren ligeramente en el tamaño de los poros y por tanto en su capacidad de dispersión.

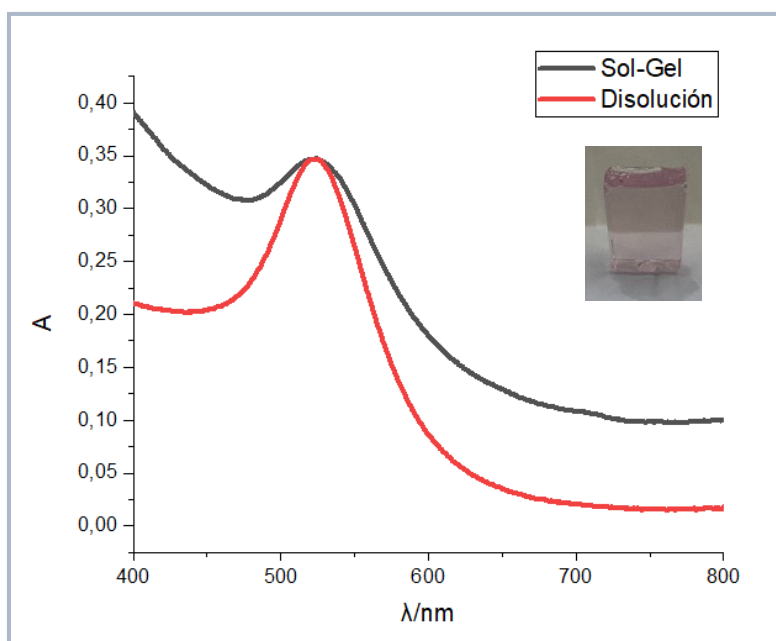


Figura 4.17. Espectros de absorción de las AuNPs en disolución e inmovilizadas en una matriz sol-gel. Inserto: Representación visual de las AuNPs inmovilizadas en la matriz sol-gel.

4.4.2 Conversión fototérmica

Confirmada la presencia de AuNPs en las matrices sol-gel y, dado que parece que mantienen la posición del plasmón, se procedió a su irradiación, como ya se realizó previamente en disolución y en el hidrogel.

Un monolito sol-gel blanco, una muestra de agua MQ y el mismo monolito con AuNPs utilizado para los espectros de absorción, fueron irradiados durante 7 minutos con un láser monocromático a 520 nm y a una potencia de 1200 mW. La evolución de la temperatura en función del tiempo se presenta en la figura 4.18. El monolito sol-gel con AuNPs mostró un incremento de temperatura de 9°C, en comparación con los 1,4°C del sol-gel control, mientras que el agua MQ apenas varió su temperatura. Estos resultados confirman una vez más que las AuNPs inmovilizadas en la matriz sol-gel mantienen su estabilidad y capacidad de inducir calentamiento en el medio que las rodea por irradiación del plasmón.

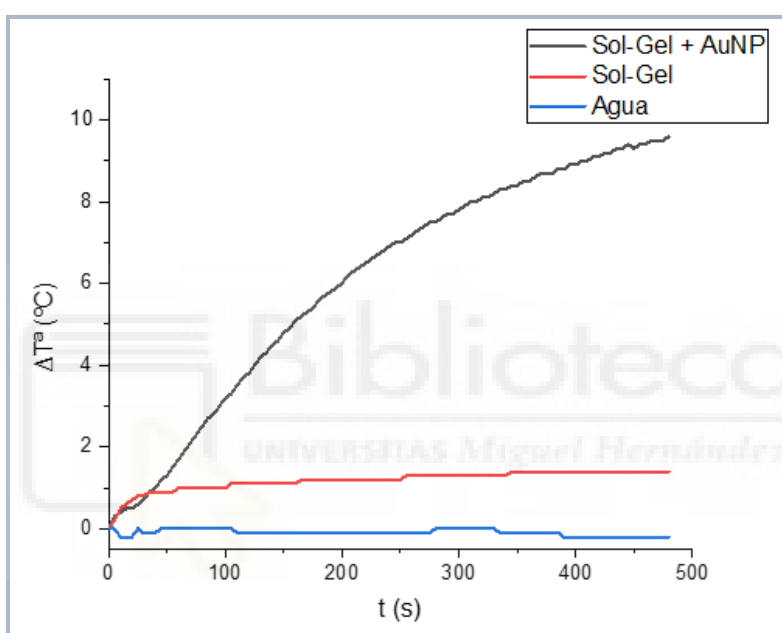


Figura. 4.18. Incremento de la temperatura en función del tiempo, tras la irradiación con un láser de diodo de 520 nm durante 7 minutos a 1200 mW en una matriz sol-gel en presencia y en ausencia de AuNPs y una muestra de agua MQ.

4.4.3 Inmovilización de la lacasa en matrices sol-gel

Para estudiar la estabilidad de la lacasa y confirmar su presencia dentro de la matriz de sílice, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de la proteína excitando a una longitud de onda de 280 nm y recogiendo la emisión desde 305 a 450 nm. En la figura 4.19 se compara el espectro de emisión del monolito con la lacasa inmovilizada con el de una disolución de lacasa en su forma activa ambos a una concentración de 0,03 μM . La similitud casi total entre ambos espectros sugiere que la estructura tridimensional de la proteína se mantiene intacta dentro de la matriz sol-gel, evidenciado por la ausencia de un desplazamiento hacia el rojo en el espectro.

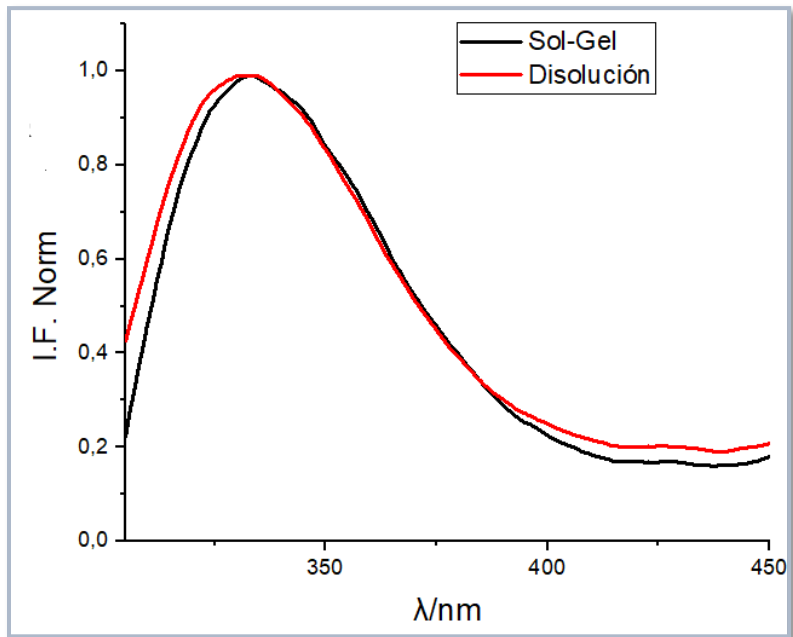


Figura 4.19. Espectros normalizados de emisión de fluorescencia de la lacasa en disolución e inmovilizada en matrices sol-gel.

A continuación, se estudió la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada en sol-gel. Al realizar la rampa de desnaturalización, se observó que la enzima inmovilizada exhibe una estabilidad térmica ligeramente inferior a la determinada en disolución. Mientras que en disolución la desnaturalización de la enzima comienza alrededor de 60°C, en el sol-gel este proceso se adelanta comenzando aproximadamente entre 45°C y 50°C, donde se empieza a observar una disminución de la señal. De nuevo debido a la elevada resistencia de la lacasa, la curva de desnaturalización no es sigmoideal y aunque la señal decrece con la temperatura, no llega a observarse el final del proceso (Figura 4.20) lo que indicaría que, en el rango estudiado, la enzima no llega a desplegarse completamente como ya ocurriera en disolución.

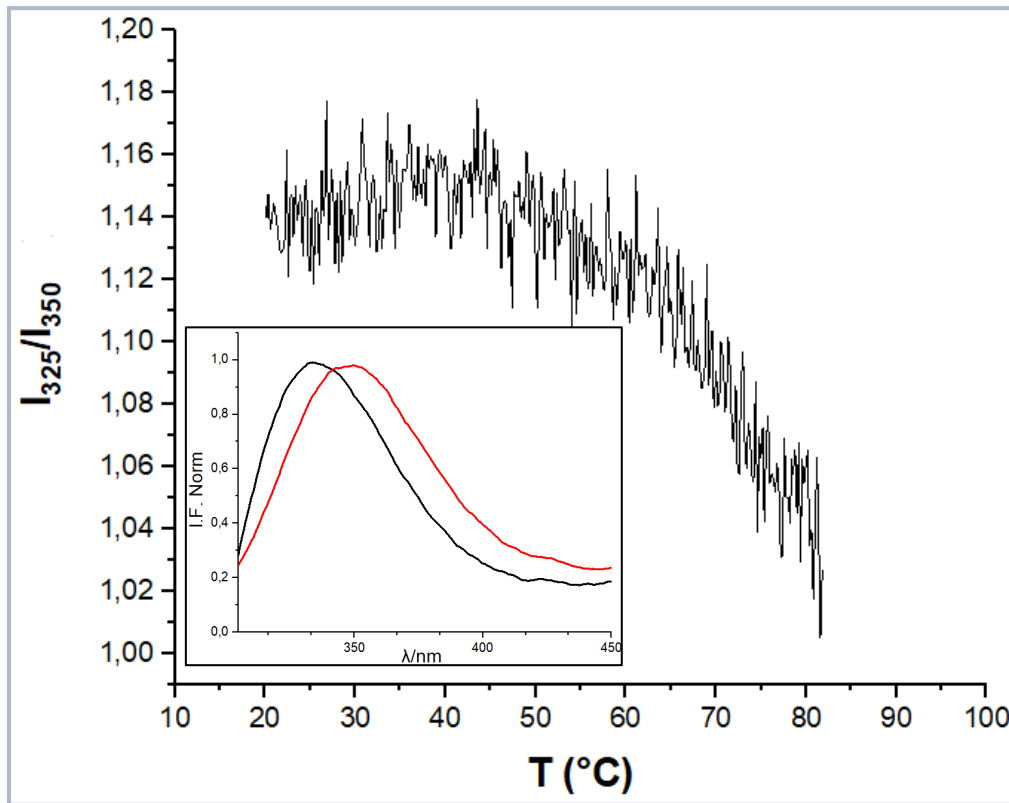


Figura 4.20. Curva de desnaturalización térmica de la lacasa inmovilizada en matrices sol-gel. Inserto: espectros de emisión normalizados recogidos a 20°C antes y después de la desnaturalización.

Los espectros de emisión de la lacasa en sus estados nativo y desnaturalizado, obtenidos tras realizar el barrido de temperaturas, fueron recogidos a 20°C y se muestran en el inserto junto a la rampa de desnaturalización. Como ya sucediera en disolución, tras el calentamiento el espectro de la enzima se encuentra desplazado hacia el rojo, indicando que no consigue recuperar su estructura nativa, por lo que el proceso de desnaturalización sigue siendo irreversible.

4.4.4 Ensayos de actividad de la lacasa en matrices sol-gel

Después de que la lacasa fue inmovilizada con éxito dentro de la matriz sol-gel, se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.6.3 de Materiales y Métodos. Estos ensayos se realizaron a dos temperaturas distintas para verificar que la enzima mantiene su actividad dentro de la matriz sol-gel y para evaluar cómo esta actividad varía con la temperatura.

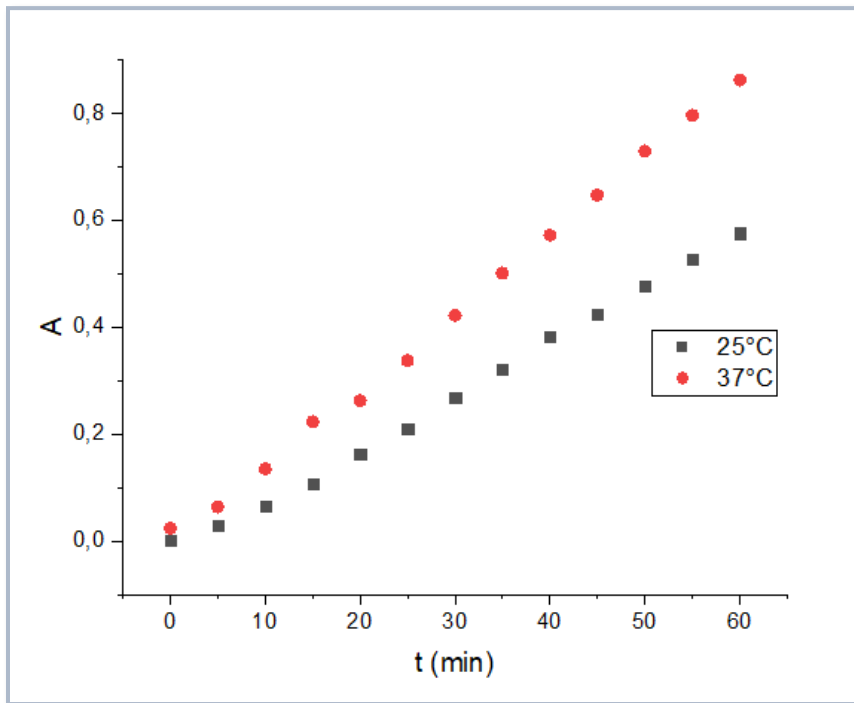


Figura 4.21. Variación en la absorbancia de disoluciones conteniendo el sustrato ABTS y lacasa inmovilizada en matrices sol-gel a 25°C y a 37°C durante 60 minutos.

La variación en la absorbancia determinada con el tiempo a ambas temperaturas se representa en la figura 4.21. Los resultados indican que la lacasa mantiene su actividad en la matriz sol-gel, aunque a un nivel inferior al observado en disolución. Esto podría deberse a varios motivos, como por ejemplo a una baja difusión por parte del sustrato, debido a las restricciones difusionales impuestas por la matriz o, a una menor disponibilidad de sitios activos de la enzima, ya que dependiendo de cómo quede atrapada la enzima en el poro, podría suceder que el sitio activo quede bloqueado e imposibilite la unión del sustrato. La diferencia en la curvatura inicial entre ambas temperaturas es evidente desde los primeros instantes del ensayo, y la tendencia de incremento en la velocidad, observado como un incremento en la pendiente con el aumento de la temperatura, sugiere que la enzima retiene sus propiedades termofílicas.

Por otra parte, se realizaron estudios de estabilidad de la lacasa inmovilizada en sol-gel. Se prepararon 6 matrices sol-gel bajo las mismas condiciones que el ensayo previo, y se almacenaron en nevera a 4°C e hidratados con tampón fosfato 50 mM pH 7. La actividad enzimática se midió semanalmente.

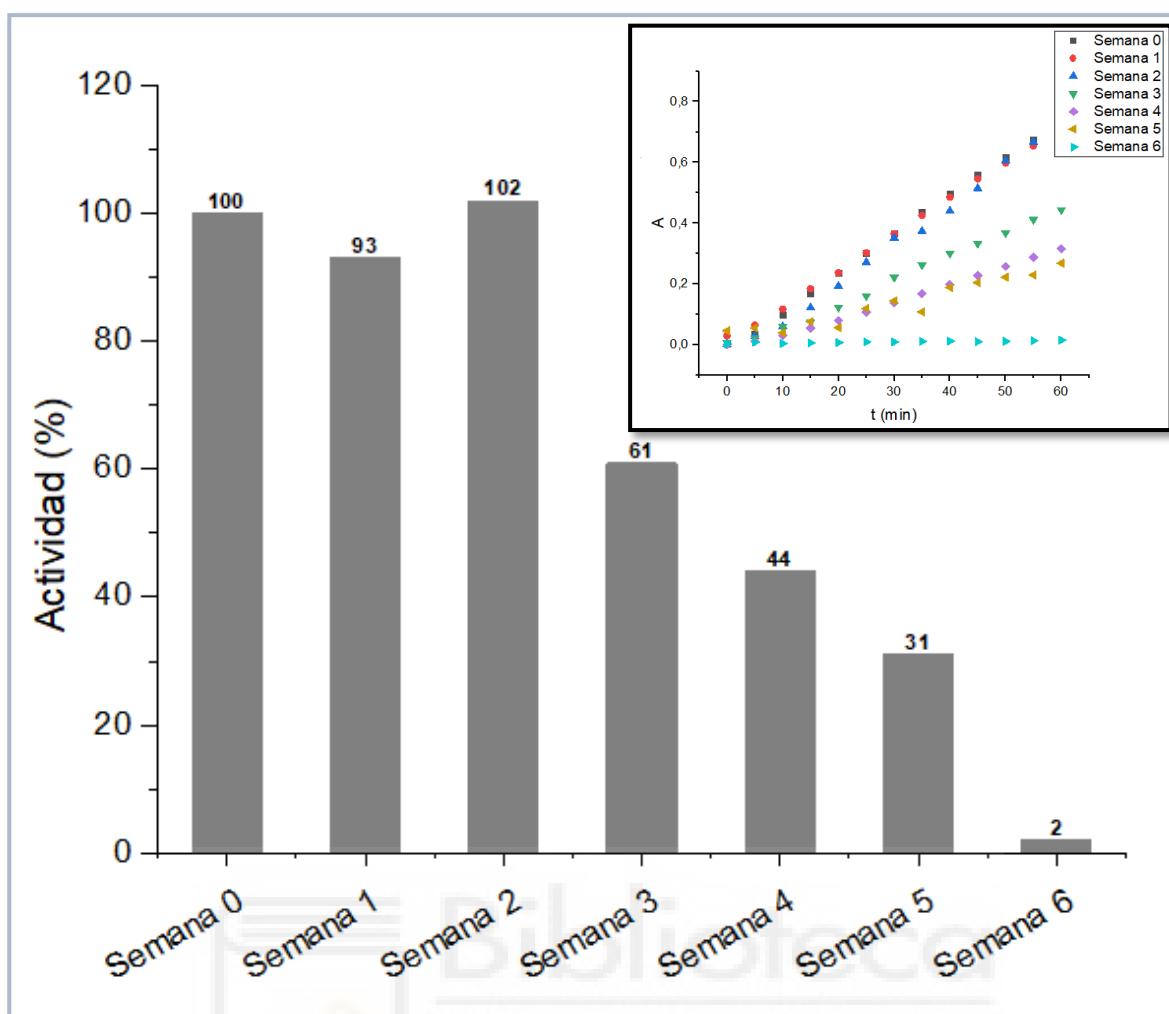


Figura 4.22. Representación de la actividad enzimática de la lacasa con el paso del tiempo. Inserto: Pendientes iniciales.

En la figura 4.22 se representa el porcentaje de actividad residual de la lacasa, calculado a partir de las pendientes iniciales de las cinéticas. Tras un mes, la enzima retiene algo menos del 50% de su actividad inicial, con niveles de actividad prácticamente indetectables en la semana 6. Aunque a corto plazo la inmovilización proporcione cierta estabilidad a la enzima, con el paso del tiempo esta se degrada significativamente. El inserto de la figura muestra las pendientes de las cinéticas obtenidas a partir de los monolitos usados para el estudio de estabilidad. Durante los primeros 14 días, la actividad catalítica de la lacasa permanece prácticamente inalterada, lo que sugiere que la estructura de la enzima se mantiene estable. Después de este periodo, la actividad comienza a disminuir gradualmente.

4.4.5 Coinmovilización

Finalmente, se realizaron ensayos de actividad de la lacasa tras su inmovilización junto a AuNPs en la matriz sol-gel para estudiar las. Las matrices híbridas se generaron diluyendo 70 μL de la disolución madre de AuNPs en 280 μL de enzima. A esta mezcla se le añadieron 350 μL de la solución de sílice coloidal obtenida siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.3 de Materiales y Métodos y se dejó polimerizar durante 48h en nevera a 4°C. El ensayo de actividad se realizó a temperatura ambiente conforme al procedimiento detallado en la sección 3.6.3 de Materiales y Métodos.

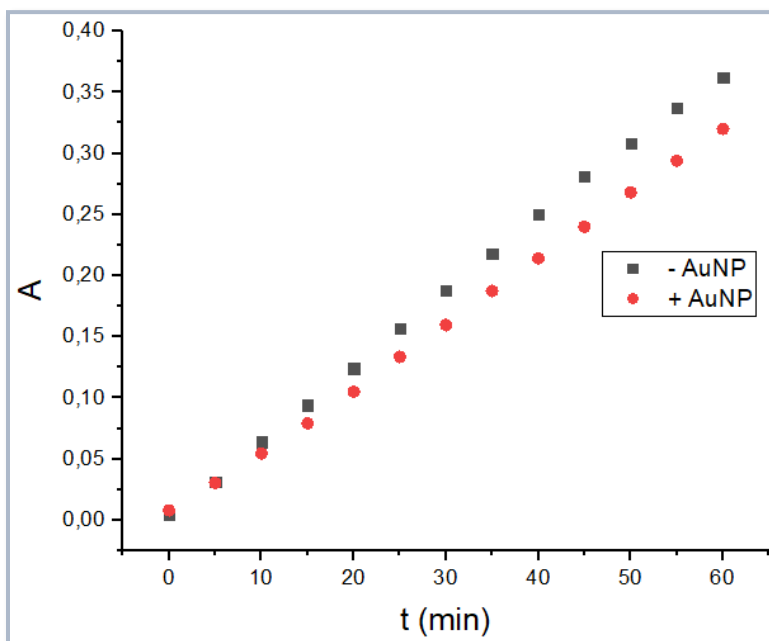


Figura 4.23. Pendientes de las cinéticas de la lacasa inmovilizada en matrices sol-gel en presencia y en ausencia de AuNPs durante 60 minutos.

Los resultados de las cinéticas obtenidas se representan en la figura 4.23. Estos resultados preliminares sugieren que la lacasa consigue mantener su actividad catalítica tras la coinmovilización junto a las AuNPs en la matriz sol-gel, aunque se puede apreciar una ligera reducción de la velocidad en presencia de las AuNPs, tal y como sucediera en disolución. Estudios previos revelaron que, en presencia de nanopartículas, las enzimas podrían llegar a adsorberse a la superficie de la nanopartícula llegando a alterar su estructura conformacional causando una pérdida de actividad, cada vez más pronunciada conforme aumenta el diámetro de la partícula [62, 67, 68].

5. Conclusiones y Perspectivas futuras

Los materiales desarrollados pretenden sentar las bases de la futura obtención de plataformas biocatalíticas inmovilizando otras enzimas de interés ambiental o comercial en las matrices fototérmicas sintetizadas que puedan ser activadas debido al calentamiento inducido por la irradiación de nanopartículas plasmónicas (AuNPs).

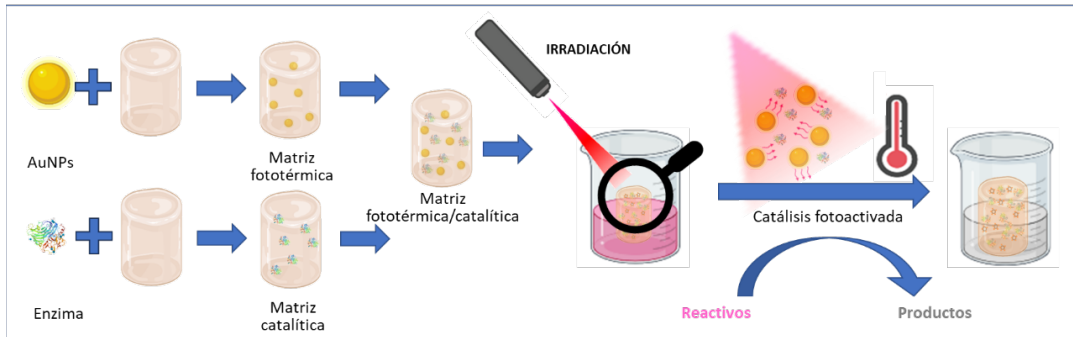


Figura 5.1. Representación esquemática del desarrollo de una plataforma biocatalítica activada mediante la irradiación de nanopartículas plasmónicas (AuNPs).

Tras un extenso análisis de todos los resultados obtenidos en el presente trabajo de Fin de Máster, se llegaron a las siguientes conclusiones:

1. El recubrimiento de AuNPs con los polímeros PDADMACI y PVP consiguió mantener la estabilidad de las nanopartículas en agua MQ modificando su carga superficial, pero sin producir cambios sustanciales en el tamaño o posición del plasmón. Por el contrario, en medios tamponados, solo las AuNPs recubiertas con PVP permanecieron estables.
2. La inmovilización ex-situ de AuNPs en hidrogeles basados en acrilatos y acrilamidas no resultó efectiva. Sin embargo, la síntesis in-situ dentro del hidrogel, al igual que la inmovilización de AuNPs en las matrices sol-gel, sí permitió obtener hidrogeles nanocompuestos. Los resultados de la conversión fototérmica confirman que las AuNPs dentro de las matrices mantienen su capacidad de incrementar la temperatura del entorno que las rodea tras la irradiación del plasmón.
3. La enzima en disolución muestra una notable estabilidad térmica, manteniendo su actividad catalítica hasta los 70°C. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de los espectros y la rampa de desnaturalización, indican que el proceso de desnaturalización es irreversible y se inicia alrededor de los 60°C.
4. La inmovilización de lacasa en matrices inorgánicas de sílice no afectó su estructura tridimensional, aunque los resultados de la desnaturalización térmica indican un inicio más temprano (45-50°C) del proceso de desnaturalización en comparación con la enzima en disolución. La presencia de lacasa en los hidrogeles basados en acrilatos y acrilamidas fue

confirmada indirectamente a través de estudios de swelling, debido a la interferencia de la hidroquinona en los ensayos de fluorescencia. Sin embargo, la actividad enzimática dentro de las matrices sol-gel e hidrogel es considerablemente menor que en disolución, probablemente debido a restricciones difusionales impuestas por las redes poliméricas.

5. Se observó una ligera interferencia por parte de las AuNPs en la actividad enzimática de la lacasa en disolución, que también se manifestó tras su coinmovilización en las matrices sol-gel. Sin embargo, la afectación de la registrada es mínima y no supone una limitación para el desarrollo de la futura plataforma multifuncional.

Proyección futura

- Desarrollo de métodos alternativos para la eliminación de la hidroquinona en los hidrogeles orgánicos empleando resinas específicas. De este modo se podría proceder con la identificación de la lacasa utilizando técnicas no invasivas como la fluorescencia.
- Optimización de la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles: Para mejorar la aplicabilidad de estos hidrogeles híbridos, es necesaria la identificación de procesos que permitan controlar esta característica. Estudiar las interacciones de distintos medios con las cadenas poliméricas de los hidrogeles, con el objetivo de reducir la repulsión o, el efecto de la concentración del entrecruzante podrían ser alternativas interesantes.
- Caracterización de AuNPs sintetizadas in situ mediante la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). El uso de esta técnica permitiría obtener información más detallada sobre la morfología, distribución y tamaño de las AuNPs dentro de las matrices.
- Realizar la coinmovilización de la lacasa y AuNPs en hidrogeles tras la optimización del proceso de caracterización de la lacasa y obtener el control sobre la capacidad de hinchamiento del hidrogel.
- Evaluación de la actividad enzimática bajo irradiación de AuNPs a 520 nm con el fin de estudiar si la generación de calor por parte de las AuNPs puede potenciar la actividad catalítica de la lacasa.

6. Bibliografía

1. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F.: The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine, (2020)
2. Malik, S., Muhammad, K., Waheed, Y.: Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry, (2023)

3. Xu, C., Lei, C., Hosseinpour, S., Ivanovski, S., Walsh, L.J., Khademhosseini, A.: Nanotechnology for the management of COVID-19 during the pandemic and in the post-pandemic era. *Natl Sci Rev.* 9, (2022). <https://doi.org/10.1093/nsr/nwac124>
4. Szczyglewska, P., Feliczak-Guzik, A., Nowak, I.: Nanotechnology—General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles, (2023)
5. Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S.M.: Risks of Nanotechnology to Human Life. In: *Interface Science and Technology*. pp. 323–336. Elsevier B.V. (2019)
6. Jain, S., Kumar, N., Tahir, M., Garg, S.: Nanoparticle synthesis, characterization and applications. In: *The Impact of Nanoparticles on Agriculture and Soil*. pp. 13–40. Elsevier (2023)
7. Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S.M., Sajjadi, M., Issaabadi, Z.: Applications of Nanotechnology in Daily Life. In: *Interface Science and Technology*. pp. 113–143. Elsevier B.V. (2019)
8. Ealias, A.M., Saravanakumar, M.P.: A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Institute of Physics Publishing (2017)
9. Joudeh, N., Linke, D.: Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists, (2022)
10. Jo, D.H., Kim, J.H., Lee, T.G., Kim, J.H.: Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases, (2015)
11. Khan, I., Saeed, K., Khan, I.: Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, (2019)
12. Kumari, S., Sarkar, L.: A Review on Nanoparticles: Structure, Classification, Synthesis & Applications. *JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH*. 65, 42–46 (2021). <https://doi.org/10.37398/jsr.2021.650809>
13. Kumari, S., Raturi, S., Kulshrestha, S., Chauhan, K., Dhingra, S., Andrés, K., Thu, K., Khargotra, R., Singh, T.: A comprehensive review on various techniques used for synthesizing nanoparticles, (2023)
14. Jain, S., Kumar, N., Tahir, M., Garg, S.: Nanoparticle synthesis, characterization and applications. In: *The Impact of Nanoparticles on Agriculture and Soil*. pp. 13–40. Elsevier (2023)
15. Oliveira, A.E.F., Pereira, A.C., Resende, M.A.C., Ferreira, L.F.: Gold Nanoparticles: A Didactic Step-by-Step of the Synthesis Using the Turkevich Method, Mechanisms, and Characterizations. *Analytica*. 4, 250–263 (2023). <https://doi.org/10.3390/analytica4020020>
16. Lu, K.Q., Quan, Q., Zhang, N., Xu, Y.J.: Multifarious roles of carbon quantum dots in heterogeneous photocatalysis, (2016)
17. Liu, Z., Liang, X.J.: Nano-carbons as theranostics, (2012)
18. Kalimuthu, K., Cha, B.S., Kim, S., Park, K.S.: Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review, (2020)
19. Yeh, Y.C., Creran, B., Rotello, V.M.: Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology, (2012)
20. Kveton, F., Blsakova, A., Kasak, P., Tkac, J.: Glycan nanobiosensors, (2020)
21. Rau, L.R., Huang, W.Y., Liaw, J.W., Tsai, S.W.: Photothermal effects of laser-activated surface plasmonic gold nanoparticles on the apoptosis and osteogenesis of osteoblast-like cells. *Int J Nanomedicine*. 11, 3461–3473 (2016). <https://doi.org/10.2147/IJN.S108152>

22. Cruz, D.A., Rodríguez, M.C., López, J.M., Herrera, V.M., Orive, A.G., Creus, A.H.: NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y PLASMONES DE SUPERFICIE: UNA RELACIÓN PROFUNDA METALLIC NANOPARTICLES AND SURFACE PLASMONS: A DEEP RELATIONSHIP.
23. Bharadwaj, K.K., Rabha, B., Pati, S., Sarkar, T., Choudhury, B.K., Barman, A., Bhattacharjya, D., Srivastava, A., Baishya, D., Edinur, H.A., Kari, Z.A., Noor, N.H.M.: Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as beneficial prospect for cancer theranostics, (2021)
24. Wang, C., Astruc, D.: Nanogold plasmonic photocatalysis for organic synthesis and clean energy conversion, (2014)
25. Rau, L.R., Huang, W.Y., Liaw, J.W., Tsai, S.W.: Photothermal effects of laser-activated surface plasmonic gold nanoparticles on the apoptosis and osteogenesis of osteoblast-like cells. *Int J Nanomedicine*. 11, 3461–3473 (2016). <https://doi.org/10.2147/IJN.S108152>
26. Brahmachari, G.: Biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis, and industrial applications—an overview. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis, and Industrial Applications, Second Edition*. pp. 1–10. Elsevier (2023)
27. Robinson, P.K.: Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*. 59, 1–41 (2015). <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
28. Uçak, İ., Afreen, M.: Enzymes. In: *Nutraceutical and Functional Food Components*. pp. 537–571. Elsevier (2022)
29. Enzymes and Energetics 4 CONTENTS.
30. McDonald, A.G., Tipton, K.F.: Enzyme nomenclature and classification: the state of the art, (2023)
31. Robinson, P.K.: Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*. 59, 1–41 (2015). <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
32. Beilen, J.B. van, Li, Z.: Enzyme technology: An overview, (2002)
33. Shradha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., Kumar, A.: Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications, (2011)
34. Wang, H., Tang, L.X., Ye, Y.F., Ma, J.X., Li, X., Si, J., Cui, B.K.: Laccase immobilization and its degradation of emerging pollutants: A comprehensive review, (2024)
35. Ernst, H.A., Jørgensen, L.J., Bukh, C., Piontek, K., Plattner, D.A., Østergaard, L.H., Larsen, S., Bjerrum, M.J.: A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. *PLoS One*. 13, (2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206589>
36. Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C.E., Herrera De Los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M.C.N., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A.: Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation, (2019)
37. Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M.: Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediat J*. 3, 1–26 (1999). <https://doi.org/10.1080/10889869991219163>
38. Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkotazka, A., Paszczyński, A.: Laccase properties, physiological functions, and evolution, (2020)
39. Carabajal, M., Perullini, M., Jobbágy, M., Ullrich, R., Hofrichter, M., Levin, L.: Removal of Phenol by Immobilization of *Trametes versicolor* in Silica-Alginate-Fungus Biocomposites and Loofa Sponge. *Clean (Weinh)*. 44, 180–188 (2016). <https://doi.org/10.1002/clen.201400366>

40. Gaitan, I.J., Medina, S.C., González, J.C., Rodríguez, A., Espejo, Á.J., Osma, J.F., Sarria, V., Alméjiga-Díaz, C.J., Sánchez, O.F.: Evaluation of toxicity and degradation of a chlorophenol mixture by the laccase produced by *Trametes pubescens*. *Bioresour Technol.* 102, 3632–3635 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.040>
41. Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M.: Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry.* 43, 169–178 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.11.009>
42. Singh, R.K., Tiwari, M.K., Singh, R., Lee, J.K.: From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes, (2013)
43. 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.* 24, (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24032672>
44. Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.Á., Moldes, D.: Recent developments and applications of immobilized laccase, (2013)
45. Liu, D.-M., Chen, I.-W.: ENCAPSULATION OF PROTEIN MOLECULES IN TRANSPARENT POROUS SILICA MATRICES VIA AN AQUEOUS COLLOIDAL SOL±GEL PROCESS.
46. Carrera-Figueiras, C., Pérez-Padilla, Y., Alejandro Estrella-Gutiérrez, M., G. Uc-Cayetano, E., Antonio Juárez-Moreno, J., Avila-Ortega, A.: Surface Science Engineering through Sol-Gel Process. In: *Applied Surface Science*. IntechOpen (2019)
47. Sennakesavan, G., Mostakhdemin, M., Dkhar, L.K., Seyfoddin, A., Fatihhi, S.J.: Acrylic acid/acrylamide based hydrogels and its properties - A review, (2020)
48. Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J.: A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, (1951)
49. Instruments, M.: Zetasizer Nano User Manual MAN0485 Issue 1.1 April 2013 English. (2007)
50. Li, D., Kagan, G., Hopson, R., Williard, P.G.: Formula weight prediction by internal reference diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY). *J Am Chem Soc.* 131, 5627–5634 (2009). <https://doi.org/10.1021/ja810154u>
51. Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F.M.N., Jones, A.: High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. pp. 4439–4451. Royal Society (2010)
52. King, B.M., Fiegel, J.: Zwitterionic Polymer Coatings Enhance Gold Nanoparticle Stability and Uptake in Various Biological Environments. *AAPS Journal.* 24, (2022). <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00652-3>
53. Schneider, G., Decher, G.: Functional core/shell nanoparticles via layer-by-layer assembly. Investigation of the experimental parameters for controlling particle aggregation and for enhancing dispersion stability. *Langmuir.* 24, 1778–1789 (2008). <https://doi.org/10.1021/la7021837>
54. Rostek, A., Mahl, D., Epple, M.: Chemical composition of surface-functionalized gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research.* 13, 4809–4814 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0456-2>
55. Koczur, K.M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., Skrabalak, S.E.: Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions.* 44, 17883–17905 (2015). <https://doi.org/10.1039/c5dt02964c>

56. Safo, I.A., Werheid, M., Dosche, C., Oezaslan, M.: The role of polyvinylpyrrolidone (PVP) as a capping and structure-directing agent in the formation of Pt nanocubes. *Nanoscale Adv.* 1, 3095–3106 (2019). <https://doi.org/10.1039/c9na00186g>
57. Zuber, A., Purdey, M., Schartner, E., Forbes, C., Van Der Hoek, B., Giles, D., Abell, A., Monro, T., Ebendorff-Heidepriem, H.: Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method. *Sens Actuators B Chem.* 227, 117–127 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.12.044>
58. Dortez, S., González, M.C., Crevillen, A.G., Escarpa, A.: Gold nanostructure-related non-plasmon resonance absorption band as a fingerprint of ortho-alkyl substituted phenolic compounds. *Microchemical Journal.* 171, (2021). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106788>
59. Haiss, W., Thanh, N.T.K., Aveyard, J., Fernig, D.G.: Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem.* 79, 4215–4221 (2007). <https://doi.org/10.1021/ac0702084>
60. Chan, J.C., Zhang, B., Martinez, M., Kuruba, B., Brozik, J., Kang, C.H., Zhang, X.: Structural studies of Myceliophthora Thermophila Laccase in the presence of deep eutectic solvents. *Enzyme Microb Technol.* 150, (2021). <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109890>
61. López-Cruz, J.I., Viniegra-González, G., Hernández-Arana, A.: Thermostability of native and pegylated Myceliophthora thermophila laccase in aqueous and mixed solvents. *Bioconj Chem.* 17, 1093–1098 (2006). <https://doi.org/10.1021/bc0503465>
62. Aricov, L., Precupas, A., Tudose, M., Baltag, D., Trică, B., Sandu, R., Leonties, A.R.: Trametes versicolor laccase activity modulated by the interaction with gold nanoparticles. *Environ Res.* 237, (2023). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116920>
63. Newman, J.D.S., Blanchard, G.J.: Formation of gold nanoparticles using amine reducing agents. *Langmuir.* 22, 5882–5887 (2006). <https://doi.org/10.1021/la060045z>
64. Tan, N.P.B., Lee, C.H., Chen, L., Ho, K.M., Lu, Y., Ballauff, M., Li, P.: Facile synthesis of gold/polymer nanocomposite particles using polymeric amine-based particles as dual reductants and templates. *Polymer (Guildf).* 76, 271–279 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.09.015>
65. Ramírez-Ayala, M.F., Herrera-González, A.M., Trejo-Carbajal, N., Guerrero, A.L., Vargas-Ramírez, M., García-Serrano, J.: One-step synthesis and stabilization of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles with an ion-exchange polymer contained amide and carboxylic acid functional groups. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 647, (2022). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129069>
66. Galal Ibrahim, A.: Synthesis, Characterization, Swelling Studies and Dye Removal of Chemically Crosslinked Acrylic Acid/Acrylamide/N,N-Dimethyl Acrylamide Hydrogels. *American Journal of Applied Chemistry.* 4, 221 (2016). <https://doi.org/10.11648/j.ajac.20160406.12>
67. Wu, Z., Zhang, B., Yan, B.: Regulation of enzyme activity through interactions with nanoparticles, (2009)
68. Shang, W., Nuffer, J.H., Dordick, J.S., Siegel, R.W.: Unfolding of ribonuclease a on silica nanoparticle surfaces. *Nano Lett.* 7, 1991–1995 (2007). <https://doi.org/10.1021/nl070777r>