



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

INMOVILIZACIÓN DE LISOZIMA SOBRE NANOPARTÍCULAS FOTOTÉRMICAS: AUMENTO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TRAS IRRADIACIÓN LÁSER

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2026

Autor: Tadeo Strada Rodriguez

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Felipe Hornos Adán
Rocío Esquembre Tomé

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
1.ANTECEDENTES.....	5
2.INTRODUCCIÓN	6
2.1. Contextualización y marco teórico	6
2.2. La nanotecnología como posible solución.....	8
2.3. Nanopartículas	9
2.4. Tipos de inmovilización	11
2.5. Variación de la actividad enzimática con la temperatura	13
2.6. Lisozima como enzima modelo	14
3.OBJETIVOS	15
3.1. Objetivos Generales.....	15
3.2. Objetivos Específicos	15
4.MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Limpieza de material de vidrio con agua regia.....	16
4.2. Preparación de buffer HEPES pH 7 100 mM	16
4.3. Síntesis de Nanopartículas de Platino (NP-Pt)	16
4.4. Caracterización de las NP-Pt	17
4.4.1. Determinación de la concentración de NP-Pt por residuo seco.....	17
4.4.2. Tamaño y Carga (DLS y Potencial Zeta).....	18
4.4.3. Espectro absorbancia	18
4.4.4. Irradiación de las NP-Pt a 520 y 808 nm	19
4.5. Modificaciones superficiales	19
4.5.1. Recubrimiento con Polietilenimina (PEI).	20
4.5.2. Activación con Glutaraldehído (GA) e inmovilización de Lzm.....	20
4.6. Preparación y cuantificación de la proteína.	21
4.7. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de Lzm ($q_{\text{máx}}$)	21
4.8. Monitorización de la actividad enzimática en función de la temperatura ..	23

4.8.1. Preparación del sustrato bacteriano.....	23
4.8.2. Evaluación de la actividad catalítica de Lzm a diferentes temperaturas.	24
4.8.3. Ensayos de actividad catalítica de Lzm inmovilizada sobre NP-Pt@PEI con y sin irradiación láser a 808 nm	25
5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1. Caracterización de nanopartículas de platino (NP-Pt).....	26
5.2. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de Lzm sobre NP-Pt	27
5.3. Caracterización NP-Pt funcionalizadas con PEI (NP-Pt@PEI).....	28
5.4. Inmovilización de Lisozima sobre NP-Pt@PEI	30
5.5. Inmovilización de Lzm sobre NP-Pt@PEI mediada por glutaraldehído	31
5.6. Variación de actividad catalítica de la lisozima (Lzm) en función de la temperatura	31
5.7. Evaluación catalítica del nanohíbrido (NP-Pt@PEI@Lzm)	32
6.CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS	34
6.1. Conclusiones.....	34
6.2. Proyección futura.....	34
7.BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

La acumulación de residuos plásticos en los ecosistemas marinos requiere de estrategias de biorremediación innovadoras. El uso de enzimas que degraden el plástico en combinación con distintos tipos de nanopartículas es un avance prometedor para el tratamiento y remediación de aguas contaminadas. En este contexto, el presente Trabajo de Fin de Grado propone el desarrollo de un nanohíbrido fototérmico-enzimático capaz de generar calor localizado bajo irradiación láser, consiguiendo un aumento en la actividad de la enzima inmovilizada. Para ello, se sintetizaron nanopartículas de platino (NP-Pt) funcionalizadas con polietilenimina (PEI) y activadas con glutaraldehído para la inmovilización covalente de una enzima modelo (lisozima). Los resultados demostraron que la excitación del plasmón superficial localizado a 808 nm de las NP-Pt genera un efecto fototérmico, que aumenta en 21 °C la temperatura local, lo que hace incrementar significativamente la actividad catalítica de la enzima inmovilizada, tras el mismo tiempo de incubación con el sustrato. Se consiguió degradar un 43 % más que la enzima inmovilizada que no ha sido irradiada. Este nanohíbrido confirma un mecanismo sinérgico que abre nuevas vías hacia la degradación de plásticos u otros contaminantes en aguas contaminadas.

Palabras clave: Biorremediación, nanopartículas de platino, efecto fototérmico, inmovilización de enzimas, lisozima, irradiación láser.

1. ANTECEDENTES

El uso masivo de polímeros sintéticos derivados del petróleo como es el caso del plástico ha derivado en una crisis medioambiental significativa donde los métodos tradicionales no son suficientes.

En este contexto, las enzimas con capacidad de degradar polímeros ofrecen una alternativa potencialmente interesante a la hora de resolver este problema. Algunas de las principales enzimas son las serinas hidrolasas como cutinasas, lipasas y carboxilesterasas (1) que hidrolizan los enlaces ésteres de las cadenas poliméricas del plástico volviéndolas inestables y por tanto degradándolas. El descubrimiento de la bacteria *Ideonella sakaiensis* supuso un avance microbiológico importante, ya que demostró que el microorganismo puede asimilar PET gracias a dos enzimas, la PETasa y la MHETasa, descomponiéndolo finalmente en ácido tereftálico y etilenglicol (2), dos monómeros inocuos.

Paralelamente al desarrollo de microorganismos degradadores de plásticos, se están estudiando materiales con propiedades físicas únicas, las nanopartículas. En este sentido, se han desarrollado distintas estrategias de inmovilización sobre nanopartículas con la finalidad de mejorar la estabilidad de las enzimas y su actividad, además de permitir una reutilización de estas. Por ejemplo, se han inmovilizado variantes de enzimas PETasa covalentemente a una nanopartícula de óxido de hierro recubierto de una capa de sílice ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$). Este nanobiocatalizador demostró una excelente actividad catalítica en condiciones extremas. Además, estos nanohíbridos pueden reciclarse magnéticamente manteniendo hasta el 50 % de la actividad catalítica tras 10 ciclos de reciclaje (3)

Otro significativo desarrollo, fue la inmovilización covalente de la enzima *Ka* PETasa en un gel de sílice mediante glutaraldehído. La enzima inmovilizada presentó una estabilidad 4 o 5 veces superior a temperaturas cercanas a los 75 °C que la enzima libre, además de mantener su actividad catalítica durante más tiempo a temperaturas elevadas (4).

Entre la diversidad de nanopartículas, destacan las nanopartículas metálicas por su resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR, por sus siglas en inglés,

Localized Surface Plasmon Resonance) (5) que permite la transferencia de calor focalizado, la excelente conductividad térmica y electrónica, además de sus resistencias mecánicas (6), lo que hace que se empleen las nanopartículas metálicas como candidatas para acelerar la reacción catalítica al elevar la temperatura (7).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Contextualización y marco teórico

El plástico es un polímero orgánico sintético derivado de combustibles fósiles como el petróleo, conformado por una larga cadena hidrocarbonada de elevado peso molecular que aporta las características de material ligero, económico, resistente y fácil de manipular (8). Algunos de los polímeros más abundantes y elaborados son el PET (tereftalato de polietileno), PE (polietileno), PP (polipropileno), PVC (policloruro de vinilo) y el PS (poliestireno) (9).

Sin embargo, estas mismas propiedades lo hacen un material en constante y elevada producción, que cada vez se encuentra más presente en ambientes naturales, lo que supone un gran problema por su difícil degradación.

Se calcula que al año se producen aproximadamente más de 400 millones de toneladas, y si esta tendencia continua, alcanzaremos los 902 millones de toneladas para el año 2050 según un estudio de Dokl, M. y col. (10).

Según el informe de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) del 22 de febrero de 2022, en las últimas dos décadas se ha multiplicado por dos los residuos plásticos, de los cuales apenas el 9 % se recicla mundialmente (11). El resto se deposita en vertederos sin ningún control y comienza a filtrarse al medio ambiente a través del suelo y el agua.

En otro análisis de '*Plastic Europe*' del año 2020, se estableció que tan solo un 35 % del plástico posconsumo era reciclado y que poco a poco sigue creciendo. Sin embargo, el reciclaje continúa bajo, pues un 65 % del plástico europeo termina contaminando el medio ambiente (12).

El plástico, al igual que otros residuos generados por el ser humano, cada vez están más presentes en nuestras vidas, y ante esta problemática de desechos existen 4 formas de gestionarlo convencionalmente, según el estudio de David Lazarevic y col. (13).

En primer lugar, tenemos el reciclaje mecánico, donde el plástico es transformado en otros nuevos productos tras un proceso de limpieza, trituración y fundición. Otro método es el reciclaje químico, donde se modifica la estructura química de los plásticos mediante craqueo, gasificación o despolimerización para ser reutilizados (14). La incineración de materiales plásticos excesivamente contaminados es uno de los últimos escalones de reciclaje debido a su gran contaminación de gases tóxicos. Estos plásticos se incineran en hornos especializados que alcanzan temperaturas entre 850 y 1000 °C que generan calor y electricidad (15). Por último, los vertederos son instalaciones acondicionadas para el almacenaje de residuos que no pueden reciclarse y por tanto, se almacenan bajo tierra o en la superficie evitando que alcancen áreas comprometidas como océanos, montañas o playas (16).

Entre los restos plásticos, existen unas pequeñas partículas con tamaños inferiores a 5 mm, que han recibido la reciente atención de los científicos al encontrarse dentro del sistema humano. En la revisión de Doroftei y col. (9) se demostró el efecto dañino principalmente en la fertilidad. En experimentos con ratas y peces cebra, demostraron efectos tóxicos en las gónadas por muerte celular (apoptosis), disrupciones hormonales y estrés oxidativo. Además, se advierte del traspaso de los microplásticos a través de la placenta y en la leche materna, que puede transmitirse al feto y bebé. En humanos, los presentes microplásticos también han evidenciado alteraciones en el semen y la fertilidad que comprometen las generaciones venideras (17).

Se demuestra, por tanto, que los actuales métodos de reciclaje, tanto mecánicos como químicos, son insuficientes para revertir este problema (18), pues conllevan un enorme gasto energético, generan gases tóxicos a la atmósfera (19) y la acción sobre los microplásticos puede llegar a ser limitada a causa de

las dimensiones. Es por eso que surge la nanotecnología como nueva línea de investigación para remediar el actual problema medioambiental (Fig. 1).

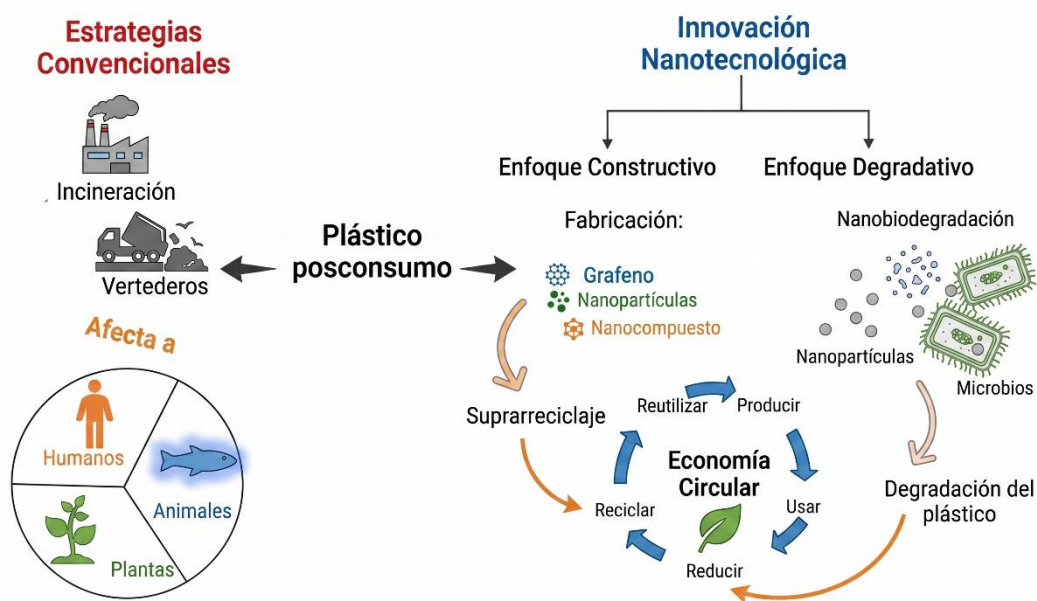


Figura 1. Esquema comparativo entre gestión de residuos tradicional y el desarrollo de nanotecnología degradadora de plásticos tras el consumo. Figura adaptada de Kandpal, A. y col. (20).

2.2. La nanotecnología como posible solución

La nanotecnología es la ciencia que tiene la capacidad de trabajar con materiales comprendidos entre 1 y 100 nm. Está siendo desarrollada por muchos científicos actuales para resolver algunos de los problemas más críticos de la sociedad, como en campos relacionados con la salud, en terapias contra el cáncer (21), en biosensores (22), en sistemas de administración de fármacos (23), en imágenes para el MRI (24), así como en campos relacionados con el medio ambiente (25) o energías renovables (26). Para la síntesis de nanomateriales existen principalmente dos formas:

Top-Down (De arriba hacia abajo) el cual consiste en fragmentar un material hasta la escala nanométrica tiene limitaciones a la hora de sintetizar tamaños regulares y extremadamente pequeños. Las principales técnicas son la molienda mecánica, el electrohilado, la litografía, la evaporación térmica, la ablación láser o el 'sputtering' (27).

Bottom-up (De abajo hacia arriba) es la síntesis opuesta, que sintetiza nanomateriales a partir del autoensamblaje y crecimiento de materia más pequeños como átomos y moléculas. Algunos métodos son el CVD (Deposición química de vapor), la síntesis solvotermal e hidrottermal, la coprecipitación o el solgel (28).

Algunas de las características que hacen que los nanomateriales tengan un elevado interés, son su elevada área superficial, la excelente conductividad térmica y eléctrica, unas propiedades ópticas únicas, su actividad antimicrobiana y características mecánicas excelentes que permiten modificar las propiedades de los materiales donde se unen formando nanocompuestos con propiedades únicas (27).

2.3. Nanopartículas

Debido a los últimos avances en la nanotecnología, se han descubierto nuevas nanopartículas y métodos que permiten la degradación de plásticos empleando sus particulares características. Dentro de las nanopartículas más estudiadas nos encontramos con:

- Nanopartículas TiO_2

Es una nanopartícula fotocatalizadora utilizada ampliamente debido a su estabilidad, baja toxicidad y bajo coste, sin embargo, solo la luz ultravioleta de corta longitud estimula su transición electrónica (27).

Cuando la nanopartícula absorbe luz solar, un electrón de la banda de valencia salta a la banda de conducción, dejando un electrón libre (e^-) y un espacio cargado positivamente (h^+) que generan radicales reactivos de oxígeno (ROS) que atacan a las cadenas hidrocarbonadas, volviéndolas inestables (29).

- Nanopartículas de silicio (SiO_2)

Las nanopartículas de sílice tienen la característica de presentar una superficie mesoporosa que permite adsorber y encapsular contaminantes como metales pesados, orgánicos, patógenos o microplásticos en su matriz (30).

- Nanopartículas de plata (Ag)

La plata es conocida por su carácter antibacteriano, antifúngico y antiviral que les otorga a las nanopartículas una actividad desinfectante usada principalmente en el sector ambiental al demostrar su efectividad contra microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* que pueden encontrarse en aguas contaminadas (25).

- Nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

Modificando la superficie de estas nanopartículas magnéticas pueden volverse hidrofóbicas y en contacto con los microplásticos se adhieran entre sí. Este método aporta al plástico un carácter magnético artificial que permite ser eliminado mediante un campo magnético externo (31).

- Nanopartículas metálicas

Estas nanopartículas están compuestas de metales como por ejemplo Pt, Au, Cu, Co, Pd, Zn, entre otros. Debido al tamaño nanométrico, los materiales reciben unas propiedades térmicas, electrónicas, ópticas, mecánicas, electromagnéticas y químicas excepcionales que los metales macroscópicos carecen. Este trabajo está centrado concretamente en las propiedades térmicas (32).

Cuando una nanopartícula metálica es incidida por fotones de la misma frecuencia que la de sus electrones que se encuentran oscilando, se produce una excitación colectiva, en la superficie de la nanopartícula, la denominada resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) (Fig. 2). A continuación, los electrones tras chocarse entre sí y perder energía vuelven a su estado de relajación, transfiriendo el exceso de energía a la nanopartícula en picosegundos. El resultado es un incremento de temperatura localizada (33,34).

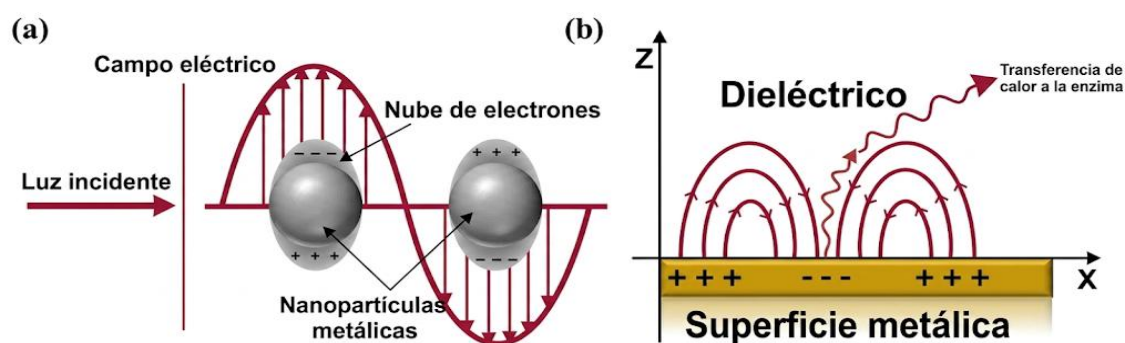


Figura 2. Mecanismo de excitación plasmónica y transferencia fototérmica a la enzima. **a)** Excitación y resonancia de plasmón localizada (LSPR). **b)** Transmisión dieléctrica y transferencia térmica. Figura adaptada de Bayal M y col. (35).

Basándonos en esta cualidad de las nanopartículas metálicas, se busca inmovilizar una enzima sobre la superficie para que tras una irradiación láser, se produzca un incremento de temperatura localizado que catalice a la enzima inmovilizada (36) y poder así aumentar la velocidad degradativa de las cadenas poliméricas de los plásticos (33,34).

2.4. Tipos de inmovilización

La inmovilización de enzimas permite la fijación de una enzima a un soporte específico con la finalidad de estabilizar la proteína ante posibles cambios externos, así como permitir su reutilización y la recuperación del medio. Estas características pueden ser utilizadas en diferentes sectores, como el médico, el alimentario, el textil, el farmacéutico o en el tratamiento de aguas residuales (37). Para ello existen distintos métodos:

Adsorción física

Supone la técnica más simple y económica, establecida por interacciones físicas débiles como las fuerzas de Van der Waals o interacciones electrostáticas (38). La principal ventaja que presenta es que mantiene la actividad enzimática intacta al no alterar su estructura química ni su centro activo (39). Para lograr una inmovilización electrostática, la enzima deberá presentar carga neta opuesta a la superficie. Este tipo de interacción presenta la desventaja de que es muy sensible a cambios de pH, fuerzas iónica y temperatura (40), lo que provocaría la desorción de la enzima (41).

Unión covalente

La unión covalente destaca por ofrecer una gran estabilidad química al formar enlaces irreversibles entre los grupos funcionales de la enzima y la superficie del soporte. Debido a esto, es uno de los métodos favoritos para la síntesis de nanohíbridos expuestos a una actividad fototérmica ya que garantiza que la enzima se mantenga anclada a la nanopartícula.

Para lograr este tipo de inmovilización, se puede emplear el glutaraldehído (GA), que es un reactivo bifuncional que actúa como puente entre la nanopartícula y la enzima. Para ello la nanopartícula requiere una previa funcionalización exponiendo grupos amino sobre la superficie para llevar a cabo la formación del enlace imina entre dicho amino y el grupo aldehído del GA (Fig. 3 a-b) (42). Del mismo modo que se forma el enlace imina entre la superficie y el GA, lo hará con los grupos amino de la enzima, quedando inmovilizada covalentemente sobre la superficie (Fig. 3c). Esta forma de inmovilización podría inducir un cambio conformacional en la proteína si afectase al centro activo de la misma, lo que podría derivar en una menor actividad (40).

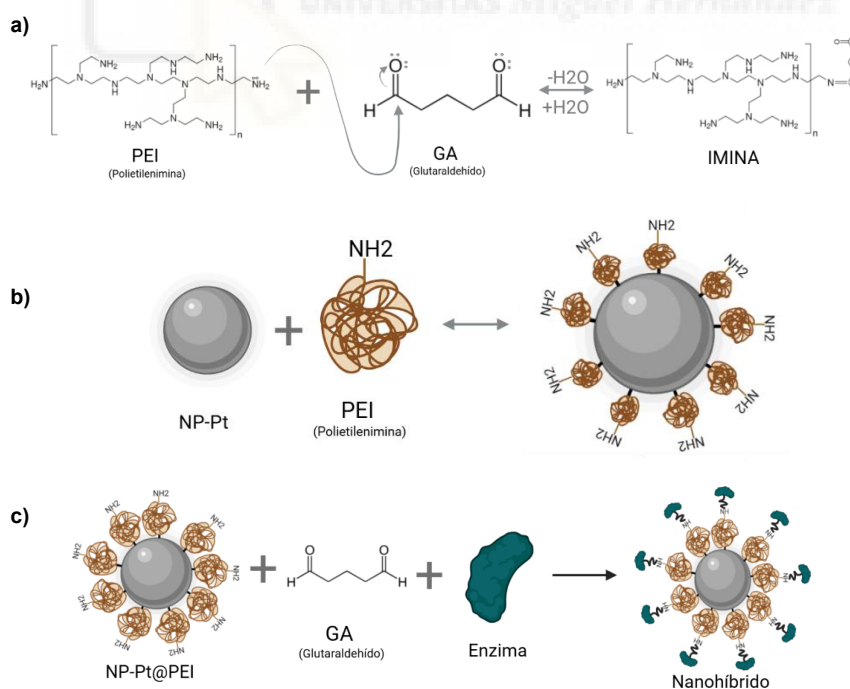


Figura 3. a) Esquema sintético sobre la formación del enlace covalente entre grupos amino de PEI y glutaraldehído (en agua). b) Esquema representativo de la funcionalización de NP-Pt con PEI para formar NP-Pt@PEI en tampón HEPES 10 mM pH 7. c) Esquema representativo sobre la unión de NP-Pt@PEI con el GA y la enzima formando el nanohíbrido.

Encapsulación

Consiste en el atrapamiento físico de la enzima dentro de una red polimérica o matriz porosa (como hidrogeles o sol-geles) de la nanopartícula. Sin embargo, el soporte puede llegar a ser tanto beneficioso como contraproducente. Por un lado, protege a la enzima encapsulada, sin embargo, puede dificultar la interacción entre la enzima y el sustrato debido a la menor superficie activa libre de la enzima que permite la unión (40,43).

Entrecruzamiento (*Cross-linking*)

Este método se basa en la formación de uniones intermoleculares fuertes entre enzimas mediante reactivos bifuncionales, creando estructuras insolubles de alta resistencia. Los agregados de enzimas entrecruzadas (CLEAs), por sus siglas en inglés (*CrossLinked Enzyme Aggregates*) son interesantes porque no requiere de un soporte (*carrier-free*) (43). Esta inmovilización reduce el posible desprendimiento de la enzima al mantener una alta estabilidad mecánica. Aunque las grandes redes pueden inducir una pérdida parcial de la actividad intrínseca y disminuir así la movilidad y difusión.

2.5. Variación de la actividad enzimática con la temperatura

La temperatura es uno de los factores más determinantes a la hora de medir la velocidad de reacción y actividad de las enzimas. La respuesta enzimática viene dada por la ecuación de Arrhenius la cual justifica que un aumento en la temperatura aumenta el número de moléculas que superan la barrera de activación. Sin embargo, no solo existen dos fases, aceleramiento catalítico o desnaturalización térmica, sino que hay un estado de equilibrio competitivo donde se intercalan ambos estados de activación máxima e inactivación por desnaturalización (44).

Esta relación entre temperatura y actividad no es lineal, sino que sigue una curva en forma de campana donde el punto más alto corresponde con la temperatura óptima, momento donde la actividad de la enzima es máxima. A partir de ese punto, la actividad comienza a decaer debido a la desnaturalización que sufre la misma. En un estudio de MF Kabir, y col. (45) se analizaron las distintas

actividades a temperaturas crecientes progresivas hasta alcanzar la temperatura óptima. Algunos ejemplos del estudio son la α -galactosidasa; la cual presenta un pico de máxima actividad a 57,6 °C. La enzima incrementa su actividad de forma proporcional hasta el punto de máxima eficiencia. Otro ejemplo es la sacarasa, que logra su mayor rendimiento a 53,4 °C observándose que, por debajo de esta temperatura, la velocidad de reacción era inferior. Un último modelo enzimático es la pectinasa donde la temperatura óptima es de 49,4°C. En esta temperatura se reduce el tiempo necesario para romper los enlaces poliméricos en la pectina, catalizando su actividad.

2.6. Lisozima como enzima modelo

La lisozima descubierta por Alexander Fleming en 1922 con una estructura tridimensional demostrada en 1965 mediante rayos X, supone uno de los ejemplos más usados en la biotecnología. La lisozima extraída de la clara de huevo (HEWL) es una proteína globular compuesta por una cadena de 129 aminoácidos y un peso molecular de 14,3 kDa conformado por cinco hélices α , una lámina β de tres cadenas y varias estructuras y giros β . Su estabilidad térmica y estructural se encuentran estabilizadas por cuatro enlaces disulfuro. Una de las características más relevantes de la lisozima es su elevado punto isoeléctrico (pI), situado en torno a 10,7, que determina una carga superficial positiva cuando se trabaja a pH por debajo de su punto isoeléctrico, y permite interacciones electrostáticas con sustratos de carga negativa (46).

La característica que permite usar esta lisozima como modelo es su actividad antimicrobiana que hidroliza los enlaces glicosídicos entre el N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina degradando la pared celular bacteriana (47). Teniendo en cuenta todas estas particularidades, se propone en este Trabajo de Fin de Grado el uso de esta enzima modelo para el diseño, experimentación y desarrollo del nanohíbrido. Para ello se propone inmovilizar la lisozima de forma covalente sobre una nanopartícula de platino recubierta con PEI y activada con GA (NP-Pt@PEI@Lzm) con la intención de demostrar que mediante la irradiación láser de 808 nm se produce un calentamiento localizado que permite aumentar su actividad catalítica, además de poder recuperar la enzima al estar soportada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Generales

Sintetizar, caracterizar y evaluar un nano-híbrido fototérmico-enzimático para conseguir un aumento de la actividad enzimática tras irradiación mediante luz láser. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

3.2. Objetivos Específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de Pt (NP-Pt) recubiertas con polietilenimina (PEI) (NP-Pt@PEI).
2. Caracterizar el efecto fototérmico de NP-Pt y NP-Pt@PEI mediante irradiación con luz láser a 520 y 808 nm.
3. Inmovilizar lisozima sobre las NP-Pt@PEI mediante interacción electrostática y covalente.
4. Determinar la actividad catalítica de la lisozima en función de la temperatura.
5. Evaluar la actividad catalítica del nanohíbrido tras irradiación láser a 808 nm.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Limpieza de material de vidrio con agua regia

Previo a la síntesis de las nanopartículas de platino se llevó a cabo una limpieza exhaustiva del material de vidrio donde se realizaría la síntesis. Para ello se preparó una disolución de agua regia (HCl: HNO₃, 3:1) y se introdujo en el matraz de síntesis, junto con el imán que se utilizaría para homogeneizar. Se dejó 24 horas en la campana extractora de gases y finalmente se lavó y se dejó secar.

4.2. Preparación de buffer HEPES pH 7 100 mM

Para la preparación de 50 mL de tampón HEPES 100 mM a pH 7,0, se determinó la proporción teórica de sus especies ácida y básica ($pK_a = 7,47$) mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

Sabiendo que la concentración total de especies debe ser de 0,1 M. Una vez obtenida la cantidad a pesar de la especie ácida y básica, ambos reactivos se disolvieron en 45 mL de agua milli-Q bajo agitación magnética constante. Una vez homogeneizada la disolución, se ajustó el pH exactamente a 7,0 mediante la adición gota a gota de disoluciones diluidas de HCl o NaOH, empleando un pH-metro previamente calibrado. Finalmente, la mezcla se enrasó con agua milli-Q en un matraz aforado de 50 mL.

4.3. Síntesis de Nanopartículas de Platino (NP-Pt)

La síntesis de nanopartículas de platino se llevó a cabo mediante el uso de PVP de 10.000 de peso molecular, como agente estabilizador. Para ello, 150 mg de PVP se disolvieron en 50 mL de agua milli-Q y se introdujeron en un matraz redondo de 100 mL. A continuación, se añadieron 400 µL de ácido cloroplatínico (H₂PtCl₆ al 8 % v/v) y la disolución se calentó en un baño de aceite a 90 °C. Cuando se alcanzó la temperatura se añadieron 22 mL de etanol al 96 % (v/v) que actuó como agente reductor, reduciendo el Pt⁴⁺ a Pt⁰ dando lugar a la formación de las nanopartículas.

Esta mezcla se mantuvo a una temperatura y agitación constante durante 24 horas, observándose un claro viraje de un tono amarillento a un negro homogéneo y opaco, indicando la formación de nanopartículas de platino. Tras 24 horas se retiró el matraz del baño de aceite y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su manipulación. Una vez atemperada la disolución, se eliminaron los precursores que no habían reaccionado mediante centrifugación a 4925 g durante 15 minutos, asegurándonos que se produce la decantación para eliminar el sobrenadante. Posteriormente se añadió agua milli-Q y se repitió durante 3 veces para asegurar la eliminación total del exceso de precursores sobrantes.

4.4. Caracterización de las NP-Pt

4.4.1. Determinación de la concentración de NP-Pt por residuo seco.

Para ello, se perforó la tapa de tres tubos Eppendorf de 2 mL, se numeraron y se pesaron en una balanza analítica para registrar su masa inicial (m_0).

A continuación, se añadieron 500 μ L de nanopartículas, previamente sonicadas, en cada tubo. Las muestras se incubaron en un termobloque a 95 °C durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, los tubos con el residuo seco resultante se pesaron para obtener la masa final (m_f). La concentración de nanopartículas se determinó por la diferencia de masas, calculando el promedio de las tres muestras, mediante la siguiente ecuación:

$$[NP - Pt] = \frac{m_f - m_0}{V}$$

Donde:

- m_f = Masa final del tubo con residuo (mg)
- m_0 = Masa inicial del tubo vacío (mg)
- V = Volumen de la muestra (mL)

Tras el pesaje por triplicado del residuo seco, la concentración de las nanopartículas de platino desnudas recién sintetizadas fue de 0,5 mg/mL. Este valor se tomó como referencia para los procedimientos posteriores de recubrimiento y funcionalización y así calcular las cantidades de PEI necesarias para la funcionalización.

4.4.2. Tamaño y Carga (DLS y Potencial Zeta)

Se determinó el tamaño hidrodinámico y el potencial zeta de las nanopartículas tras cada etapa de modificación superficial. Para ello, las muestras se diluyeron en agua milli-Q en una proporción 1:10 para evitar interferencias ópticas por una concentración excesiva.

Para las mediciones de tamaño mediante dispersión de luz dinámica (DLS), se transfirió 1 mL de la suspensión diluida a una cubeta de poliestireno desechable. Las lecturas se realizaron a una temperatura constante de 25 °C, configurando en el software del equipo un índice de absorción para el platino de 4,160.

Para la determinación del potencial zeta, se introdujeron 700 µL de la suspensión diluida en una celda de capilar doble para potencial Z, manteniendo los mismos parámetros descritos anteriormente.

4.4.3. Espectro absorbancia

Para caracterizar las propiedades ópticas de las nanopartículas de platino sintetizadas y monitorizar sus posteriores modificaciones superficiales, se registró su espectro de absorbancia en un rango 400 hasta los 1000 nm. Las mediciones se llevaron a cabo empleando un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 1603, utilizando cubetas de poliestireno con un paso óptico de 1 cm.

Antes de cada medición, se realizó el blanco, un calibrado utilizando agua milli-Q. Las muestras se diluyeron adecuadamente en una proporción 1:20 en agua milli-Q para garantizar que la señal de absorbancia se mantuviera dentro del rango de detección lineal del equipo (entre 0,1 y 1 unidades de absorbancia). Estas medidas se llevaron a cabo tras cada etapa de funcionalización con el fin de observar el impacto de las modificaciones en el perfil de absorción. La

comparación entre nanopartículas desnudas y recubiertas con PEI permitió determinar el comportamiento óptico y el rango de mayor eficiencia para la captación energética.

4.4.4. Irradiación de las NP-Pt a 520 y 808 nm

Con el propósito de evaluar la capacidad de las nanopartículas de platino para convertir la energía lumínica en energía térmica (efecto fototérmico), se realizaron ensayos de irradiación láser controlado.

Para ello, se emplearon dos fuentes láser con longitudes de onda diferentes: una en la región visible de 520 nm y otra en la región del infrarrojo con una longitud de onda de 808 nm. El experimento consistió en introducir 1 mL de la muestra de nanopartículas y otro mililitro de agua en una cubeta de poliestireno bajo agitación magnética para asegurar una temperatura homogénea en toda la muestra. Previamente al análisis, debemos asegurarnos de que todas las muestras a comparar parten de una absorbancia igual antes de ser irradiadas.

Para la monitorización de la temperatura, se introdujo una sonda en la disolución con cuidado de no coincidir con la trayectoria del láser para evitar el calentamiento localizado en el sensor y garantizar que la temperatura registrada corresponde con la temperatura real de la disolución.

La disolución fue sometida a irradiación durante un tiempo de 10 minutos empleando una potencia de láser de 1200 mW. Los datos de temperatura fueron registrados con un *“Adquisidor de datos con sonda interna de temperatura y humedad LOG210”*. El registro de los datos permitió determinar el incremento de temperatura y su carácter fototérmico.

4.5. Modificaciones superficiales

Se llevaron a cabo funcionalizaciones en la superficie de las nanopartículas de platino para cambiar su carga y generar puntos de anclaje (grupos amino) que permitieran la inmovilización posterior de la enzima.

4.5.1. Recubrimiento con Polietilenimina (PEI)

Para la preparación de la disolución de polietilenimina (PEI), se disolvieron 500 mg de PEI en 20 mL de agua milli-Q. Se ajustó el pH a 7 mediante la adición gota a gota de HCl y se enrasó con agua milli-Q hasta un volumen final de 25 mL, obteniendo una concentración final de 20 mg/mL. A continuación, se mezclaron las nanopartículas de platino con la disolución de PEI en un tubo Falcon, estableciendo una relación de masa PEI 20:1, tomando como referencia la concentración calculada previamente por residuo seco. La mezcla se mantuvo en agitación continua en una noria durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 4925 *g* durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante para eliminar el exceso de PEI. Para el lavado, el pellet se resuspendió en 10 mL de agua milli-Q, se sonicó hasta su completa homogeneización y se centrifugó nuevamente a 4925 x *g* durante 15 minutos. Este ciclo de lavado se repitió un total de tres veces. Finalmente, se caracterizó el tamaño de partícula y el potencial zeta de la muestra resultante.

4.5.2. Activación con Glutaraldehído (GA) e inmovilización de Lzm

Se activaron los grupos amino de las nanopartículas recubiertas con PEI mediante el uso de glutaraldehído (GA). Para ello, la dispersión de nanopartículas se diluyó en proporción 1:5 con agua milli-Q. A continuación, se transfirieron 300 μ L de esta dilución a un tubo Eppendorf y se añadieron cantidades crecientes de GA al 25 % (v/v) consiguiendo concentraciones finales de 0,5 %, 2,5 % y 12,5 % (v/v). La mezcla se incubó a 4 °C durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de reacción, la muestra se purificó mediante tres ciclos de lavado para eliminar el GA que hubiese quedado en exceso. Cada ciclo consistió en una centrifugación a 4925 *g* durante 15 minutos, la eliminación del sobrenadante y la posterior resuspensión del pellet en agua milli-Q mediante sonicación.

Una vez lavadas las NP-Pt@PEI con GA, se añadió la lisozima (Lzm) y se dejó incubar durante 24 h. A continuación, se volvieron a centrifugar y a lavar con

agua milli-Q para eliminar la posible Lzm que no hubiese quedado inmovilizada. Obtenidos los nanohíbridos, se evaluaron sus actividades catalíticas.

4.6. Preparación y cuantificación de la proteína

Se preparó una disolución acuosa de proteína con una concentración teórica aproximada de 1 mg/mL. Para ello, se disolvieron 10 mg de proteína en 10 mL de agua milli-Q, manteniendo la mezcla bajo agitación magnética por 15 minutos a temperatura ambiente.

Para determinar la concentración real, se midió el espectro de absorbancia de la disolución desde 400 a 240 nm utilizando un espectrofotómetro “UV-Vis Shimadzu 1603” y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Previamente a la medición, la muestra original se diluyó en agua milli-Q en una proporción de 1:5. La concentración se calculó aplicando la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{280} \cdot b \cdot c$$

Donde:

- A = Absorbancia de la muestra a 280 nm (donde absorben los grupos aromáticos)
- ϵ_{280} = Coeficiente de extinción de la Lzm ($2,325 \text{ (mg} \cdot \text{mL)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- b = Paso óptico de la cubeta (1 cm)
- c = Concentración real de la proteína (mg/mL)

4.7. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de Lzm ($q_{\text{máx}}$)

A partir de la isoterma de Langmuir, se asume la adsorción de una proteína, P, a una superficie (partícula sólida o recubierta por polímeros, etc.), siendo la isoterma representada por la siguiente ecuación:

$$q = \frac{m_{\text{prot}}}{m_{\text{NP}}} = \frac{K \cdot [P]}{1 + K \cdot [P]} \cdot q_{\text{máx}} = \frac{[P]}{K_D + [P]} \cdot q_{\text{máx}}$$

Donde se describe la situación en la que la proteína P se encuentra en equilibrio con la otra proteína adsorbida sobre la superficie S:



Uno de los parámetros de mayor interés, es obtener cuánta proteína se une, o adsorbe sobre la superficie ($q_{\text{máx}}$). Para no determinar la isoterma completa, una alternativa es trabajar en condiciones saturantes ($[P] \gg K_D$), de forma que el equilibrio se encuentre totalmente desplazado hacia la derecha y podamos considerar estequiométrica la cantidad de proteína total y adsorbida.

En estas condiciones: Además, si $P \gg K_D$

$$q = \frac{m_{\text{prot}}}{m_{\text{NP}}} = \frac{[P]}{K_D + [P]} \cdot q_{\text{máx}} \approx \frac{[P]}{[P]} \cdot q_{\text{máx}} = q_{\text{máx}}$$

Despejando,

$$(m_{\text{prot}})_{\text{adsorbida}} = q_{\text{máx}} \cdot m_{\text{NP}}$$

donde m_{NP} es la masa de nanopartícula presente en la dispersión. Teniendo en cuenta que conocemos la cantidad total de proteína que contiene la muestra,

$$(m_{\text{prot}})_{\text{total}} = (m_{\text{prot}})_{\text{adsorbida}} + (m_{\text{prot}})_{\text{disolución}}$$

Operando y sustituyendo en la ecuación anterior, se obtiene:

$$(m_{\text{prot}})_{\text{disolución}} = (m_{\text{prot}})_{\text{total}} - q_{\text{máx}} \cdot m_{\text{NP}}$$

Dividiendo por el volumen de la muestra,

$$[P]_{\text{disolución}} = [P]_{\text{total}} - q_{\text{máx}} \cdot [NP]$$

Por tanto, si preparamos una serie de muestras en las que se mantiene constante la concentración de proteína total, $[P]_{\text{total}}$, y añadimos concentraciones crecientes de nanopartícula, la concentración de proteína en el sobrenadante disminuirá linealmente con la cantidad de nanopartícula añadida. Esto se recoge como ejemplo en la Figura 4, donde la pendiente de la correlación será igual a $-q_{\text{máx}}$, siendo en este caso de 0,34 mg de proteína por mg de nanopartícula.

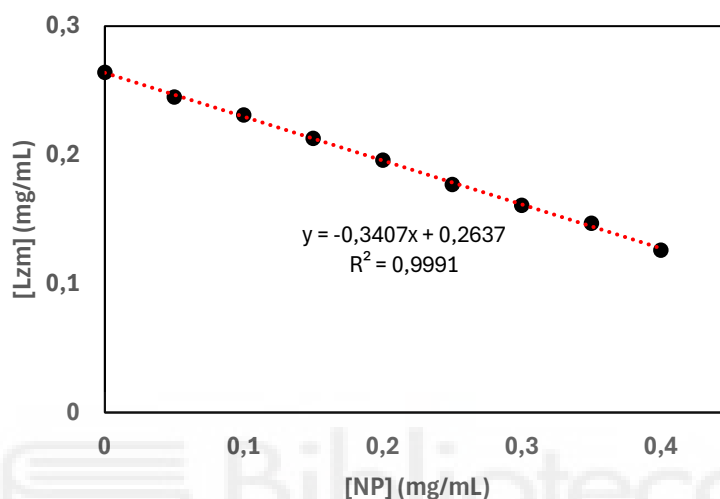


Figura 4. Ejemplo de representación para determinar el valor de $q_{\text{máx}}$ de Lzm sobre una nanopartícula.

Para obtener este parámetro de forma experimental, se incubaron una serie de tubos de 2 mL en los que se pone una cantidad creciente de NP-Pt o NP-Pt@PEI y una cantidad constante de Lzm en buffer HEPES 10 mM pH 7 con un volumen final de 1 mL para lograr una buena homogenización. Tras incubación en continua agitación, las nanopartículas fueron decantadas mediante centrifugación durante 15 min a 12100 g. Una vez separadas de la disolución el sobrenadante fue cuantificado igual que en el apartado 4.6, obteniendo finalmente una representación análoga a la de la Fig. 4.

4.8. Monitorización de la actividad enzimática en función de la temperatura

4.8.1. Preparación del sustrato bacteriano

Se preparó una suspensión de sustrato bacteriano ajustando su concentración para garantizar una densidad óptica inicial constante en todos los ensayos de

actividad. Para ello, se resuspendió una masa aproximada de 0,015 mg del sustrato en 100 mL de buffer HEPES preparado anteriormente. La concentración final de la suspensión se ajustó espectrofotométricamente antes de cada medición, realizando las diluciones pertinentes hasta alcanzar un valor de absorbancia entre 0,7-0,8 a 450 nm.

4.8.2. Evaluación de la actividad catalítica de Lzm a diferentes temperaturas

Para el ensayo cinético, se introdujeron en una cubeta de cuarzo provista de agitación magnética, 500 μ L de tampón HEPES 100 mM y 300 μ L de la suspensión bacteriana, obteniendo una dispersión óptica (absorbancia) inicial de 0,7-0,8 como se ha mencionado anteriormente. Se inició el registro en el equipo y, tras la primera lectura, se añadieron rápidamente 200 μ L de la disolución de proteína, a una concentración de 0,125 mg/mL, homogeneizando la disolución con la punta de la micropipeta. La disminución de la densidad óptica que corresponde a la lisis bacteriana, se registró de forma continua, (Fig. 5). Este procedimiento completo se repitió incrementando progresivamente la temperatura del sistema de reacción en intervalos de 3 a 6 $^{\circ}$ C, controlada mediante un Peltier, acoplado al equipo, partiendo de temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura final máxima de 50 $^{\circ}$ C. Todos los ensayos cinéticos se realizaron por triplicado para cada punto de temperatura.

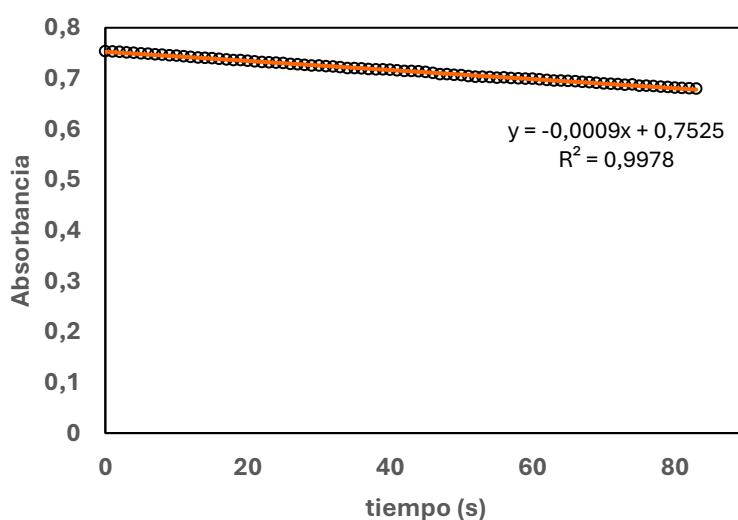


Figura 5. Ejemplo de cinética de degradación bacteriana para una temperatura de 33,6 $^{\circ}$ C.

4.8.3. Ensayos de actividad catalítica de Lzm inmovilizada sobre NP-Pt@PEI con y sin irradiación láser a 808 nm

Previo al proceso de irradiación, se determinó la absorbancia inicial de la mezcla (tampón y sustrato bacteriano) mediante espectrofotometría UV-Vis, verificando que la densidad óptica (absorbancia) fuese superior a 0,8 para tener en cuenta la posterior dilución al añadir las NP-Pt@PEI@Lzm.

A continuación, la mezcla se transfirió a una cubeta de plástico, se introdujo en el sistema de irradiación y se sometió a irradiación láser cuya longitud de onda fue de 808 nm, con una potencia de 1200 mW, durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo de irradiación, se determinó la dispersión óptica (absorbancia) de la disolución tras los 10 minutos de irradiación, y a las 24 h.

Se monitorizó el decaimiento de la dispersión óptica de la misma preparación con el nanohíbrido pero sin irradiación.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de nanopartículas de platino (NP-Pt)

Tras la síntesis de las nanopartículas de platino (NP-Pt) se procedió a la caracterización de estas mediante DLS del diámetro hidrodinámico (Fig. 6 a) y de su carga superficial, siendo esta de -18 ± 4 mV. El hecho de que tengan carga negativa hace que sobre su superficie se puedan inmovilizar enzimas mediante interacción electrostática, ya que podrían adsorberse enzimas que presenten carga superficial positiva. En cuanto al tamaño, se obtuvo de $201,2 \pm 0,2$ nm el cual hizo que trabajar con las nanopartículas fuese sencillo ya que podían ser recuperadas mediante centrifugación. Como se observa en la Fig. 6 b, presentaron un continuo de absorción entre 400 y 1000 nm, lo que hace que pudieran irradiarse tanto con luz visible (520 nm) como luz infrarroja (808 nm), permitiendo el calentamiento local mediante irradiación, resultados que pueden verse en la Fig. 6 c-d.

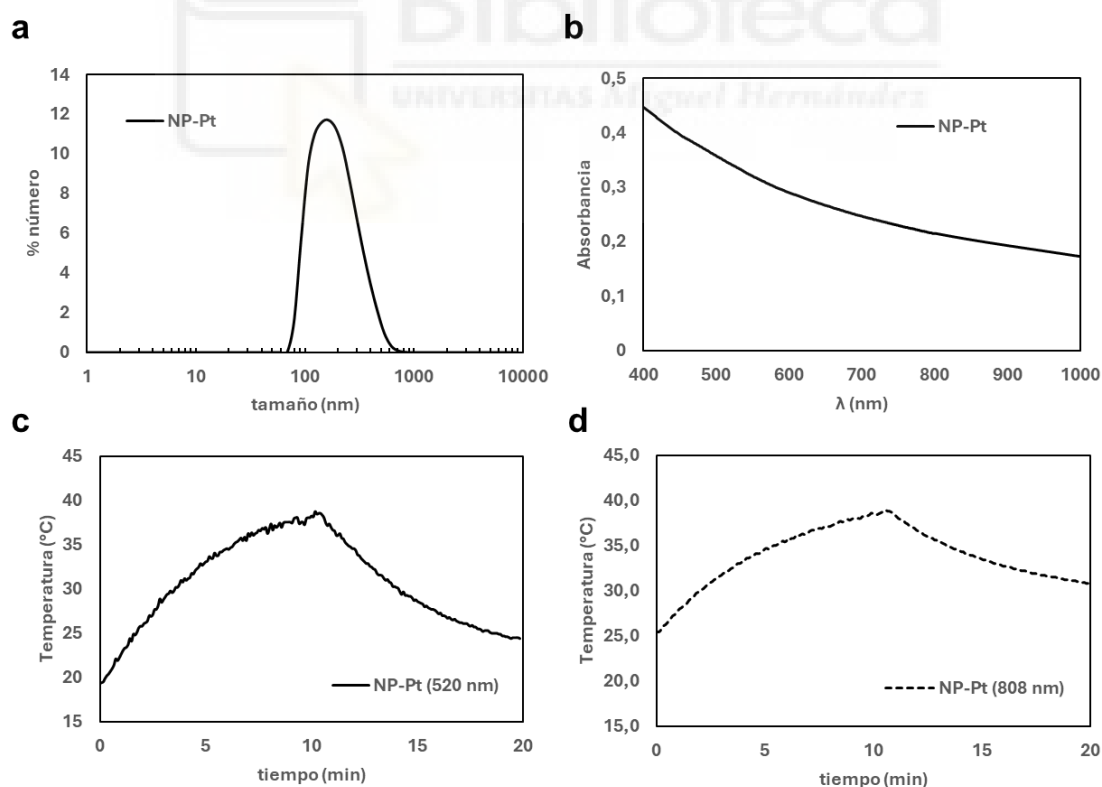


Figura 6. Caracterización de Nanopartículas de platino (NP-Pt). **a)** Tamaño medido por DLS **b)** espectro de absorción, **c)** respuesta fototérmica de las nanopartículas al ser irradiadas durante 10 minutos con luz láser a 520 nm o **d)** luz láser a 808 nm.

Al irradiar con luz láser una disolución de las NP-Pt a 520 nm durante 10 minutos se consiguió un incremento de temperatura de 19,5 °C (llegando a los 39 °C). En cambio, cuando se irradió a 808 nm, el incremento fue de 13,5 °C, lo que se relaciona directamente con la menor absorbancia que presentan las NP-Pt a 808 nm. Si se quisiese un mayor aumento de temperatura, se podría irradiar un mayor tiempo, ya que como se observa en la Fig. 6c-d, la temperatura final no ha llegado a saturación. Al aumentar la temperatura local donde se encuentra la enzima inmovilizada, permitirá que la actividad enzimática aumente (como ya se ha hablado en el apartado 2.5), y por tanto que la cinética de degradación de la pared bacteriana, en el caso de la Lzm, aumente. Esto sería trasladable a una enzima específica para el caso de microplásticos u otros contaminantes.

5.2. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de Lzm sobre NP-Pt

Dada la carga superficial de la nanopartícula, es posible inmovilizar sobre ella enzimas cuya carga sea opuesta. De esta forma se llevó a cabo la caracterización de la inmovilización por adsorción de la lisozima (Lzm, pI ~10,7) a pH 7, donde la enzima adquiere carga positiva y la nanopartícula presenta carga negativa. El resultado de la inmovilización de la Lzm sobre las NP-Pt se observa en la Fig. 7.

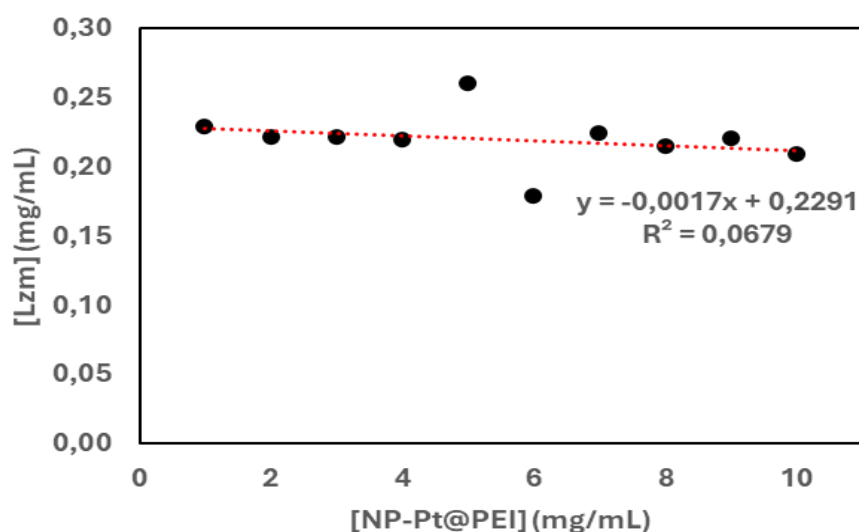


Figura 7. Determinación de la capacidad máxima de inmovilización ($q_{\text{máx}}$) de Lzm sobre NP-Pt en tampón HEPES 10 mM pH 7.

Como se observa en la Fig. 7, la concentración de lisozima en el sobrenadante disminuye linealmente a medida que aumenta la concentración de NP-Pt. Como se ha explicado en materiales y métodos, la pendiente corresponde con la capacidad máxima de inmovilización de la Lzm sobre las NP-Pt, siendo de 1,7 μg de Lzm por mg de NP-Pt. A pesar de que la Lzm pueda ser unida sobre la superficie, esta podría desorberse si, por ejemplo, en el medio se encuentra una elevada concentración de sales, lo que supondría un aumento de la fuerza iónica, y por consiguiente una disminución en la afinidad de la enzima por la superficie, desencadenando una desorción y pérdida de la enzima (no podría ser reutilizada). Además, se suma que el aumento de la temperatura hace que la movilidad enzimática aumente, pudiendo provocar también la desorción de la enzima (48). Por esto, se optó por una inmovilización covalente mediada por glutaraldehído, un entrecruzante que permite unir la enzima sobre la nanopartícula mediante formación de enlaces iminas con los grupos amino (Fig. 3-a). Para que esto fuese posible, la NP-Pt se funcionalizó con polietilenimina (PEI) de 25.000 Da, la cual tiene un porcentaje elevado de grupos amino primarios quedando expuestos a la superficie y sobre los cuales se podría llevar a cabo la unión covalente (Fig. 3).

5.3. Caracterización NP-Pt funcionalizadas con PEI (NP-Pt@PEI)

Una vez funcionalizadas las NP-Pt con PEI, se llevó a cabo la medida de tamaño y potencial Z. En cuanto al diámetro hidrodinámico (Fig. 8-a línea roja) se observó que se produjo un aumento con respecto a la NP-Pt, pasando a los $271,0 \pm 0,3$ nm, unos 70 nm más, tamaño que se debe a ese recubrimiento con el PEI. Además, el valor del potencial Z tras el recubrimiento fue de $+ 42 \pm 5$ mV por lo que la carga superficial pasó a ser positiva, confirmando el efectivo recubrimiento de nuestras NP-Pt con PEI. Tras la purificación de dichas NP-Pt@PEI se recogió el espectro de absorción (Fig. 8-b línea roja) donde se observó prácticamente el mismo espectro en el rango de 400 a 1000 nm con respecto a las NP-Pt (Fig. 8-b línea negra). A pesar de que el espectro es prácticamente superponible ya que el polielectrolito usado es un polímero no conjugado y por tanto no va a absorber luz, la capacidad fototérmica de las nanopartículas al tener el PEI sí

que cambia (Fig. 8c-d). Teniendo en cuenta que, para monitorizar el calentamiento fototérmico de ambas nanopartículas, tanto NP-Pt como NP-Pt@PEI presentan la misma absorbancia a 520 nm como a 808 nm, ahora se produce un mayor incremento de temperatura al irradiar a 808 nm (21 °C, alcanzando una temperatura máxima de 43,7 °C) en comparación con la irradiación a 520 nm (14,3 °C). Este hecho se puede relacionar con un aumento de la eficiencia de conversión fototérmica cuando está presente el polielectrolito con carga positiva, ya que permite una mayor penetración del agua, lo que hace posible un mejor acoplamiento térmico entre las vibraciones de la superficie y el agua, dando lugar a una conductividad térmica más elevada en comparación con la capa superficial aniónica de la NP-Pt que presenta cuando no se ha funcionalizado con PEI (49).

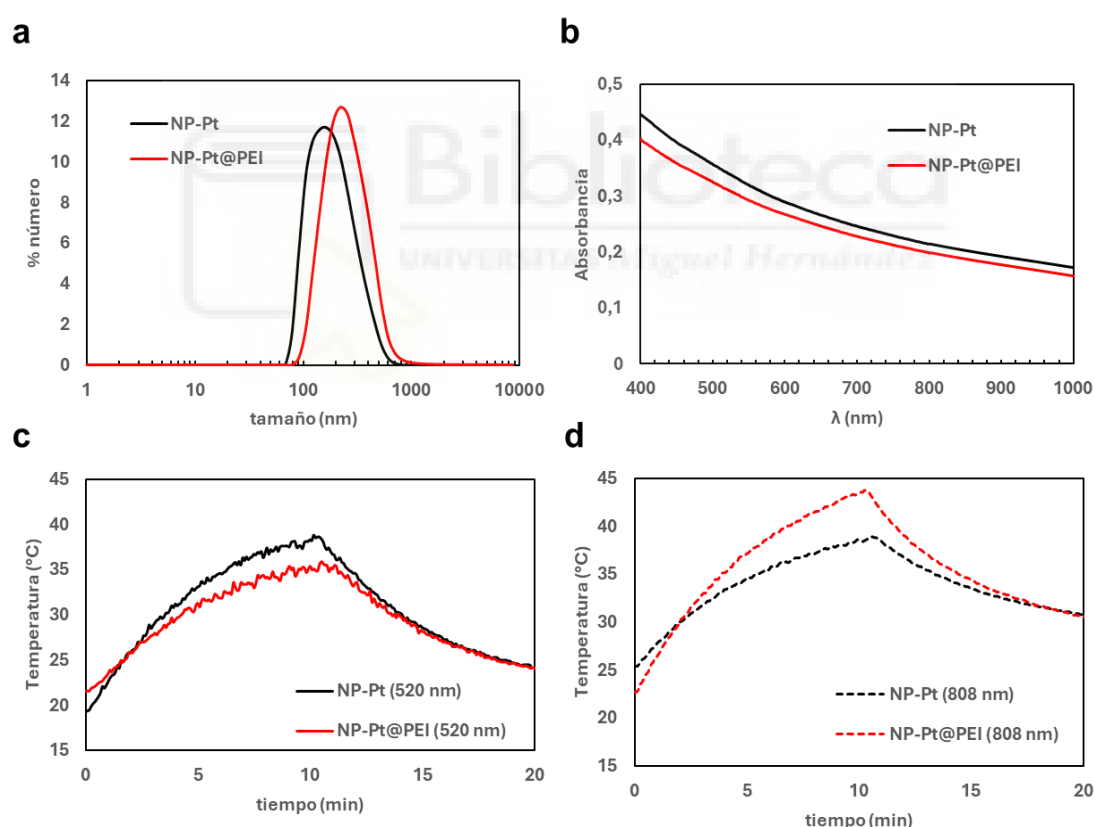


Figura 8. Caracterización de Nanopartículas de platino recubiertas con PEI (NP-Pt@PEI) (línea roja). **a)** Tamaño medido por DLS **b)** espectro de absorbancia, **c)** respuesta fototérmica de las nanopartículas al ser irradiadas durante 10 minutos con luz láser a 520 nm o **d)** luz láser a 808 nm. Se muestran con línea negra los resultados de NP-Pt para una mejor comparativa.

5.4. Inmovilización de Lisozima sobre NP-Pt@PEI

Tras el recubrimiento de nanopartículas con PEI, se procedió a optimizar el proceso de inmovilización de la enzima sobre las NP-Pt@PEI. Dado que buscamos una inmovilización covalente, para descartar que la Lzm pueda adsorberse sobre la superficie por interacción electrostática, se determinó la capacidad de inmovilización por interacción electrostática que tienen las NP-Pt@PEI a pH 7 en 10 mM HEPES. Los resultados se muestran en la Fig. 9.

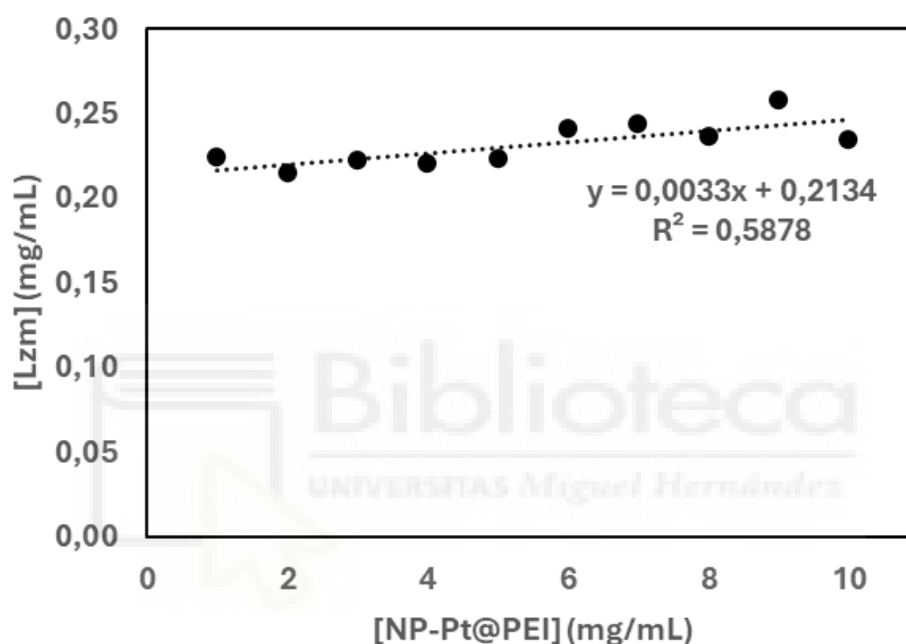


Figura 9. Determinación de la capacidad máxima de inmovilización ($q_{\text{máx}}$) de Lzm sobre NP-Pt@PEI en tampón HEPES 10 mM pH 7.

Al representar la concentración de Lzm frente a la concentración de NP-Pt@PEI, la correlación que se obtuvo fue lineal, pero en este caso con pendiente positiva, lo cual indica que la Lzm no se adsorbió sobre la superficie, puesto que tal y como se monitoriza, a medida que aumenta la concentración de NP-Pt@PEI, la concentración de Lzm aumenta en el sobrenadante, indicando que no queda unida a la superficie de la nanopartícula. El hecho de que la pendiente sea positiva es debido a que, al centrifugar una mayor concentración de nanopartículas, puede quedar una pequeña parte en el sobrenadante, aumentando la dispersión, y haciendo que la concentración de Lzm pueda ser sobreestimada.

5.5. Inmovilización de Lzm sobre NP-Pt@PEI mediada por glutaraldehído

Teniendo en cuenta que, sobre las NP-Pt@PEI no es posible la inmovilización por adsorción, se incubaron las NP-Pt@PEI con distintas concentraciones de GA para entrecruzar la Lzm con la nanopartícula. Como se observa en la Fig. 10, la concentración de 12,5 % (v/v) resultó en una mayor cantidad de enzima inmovilizada, puesto que presenta una mayor actividad catalítica. Como se ha mencionado anteriormente, y como podemos ver en el control en la Fig. 10, al no poner GA, la enzima no se inmoviliza y por tanto no presenta actividad. A medida que aumentamos la concentración de GA, el % de actividad aumenta, lo que se relaciona con la cantidad de enzima inmovilizada.

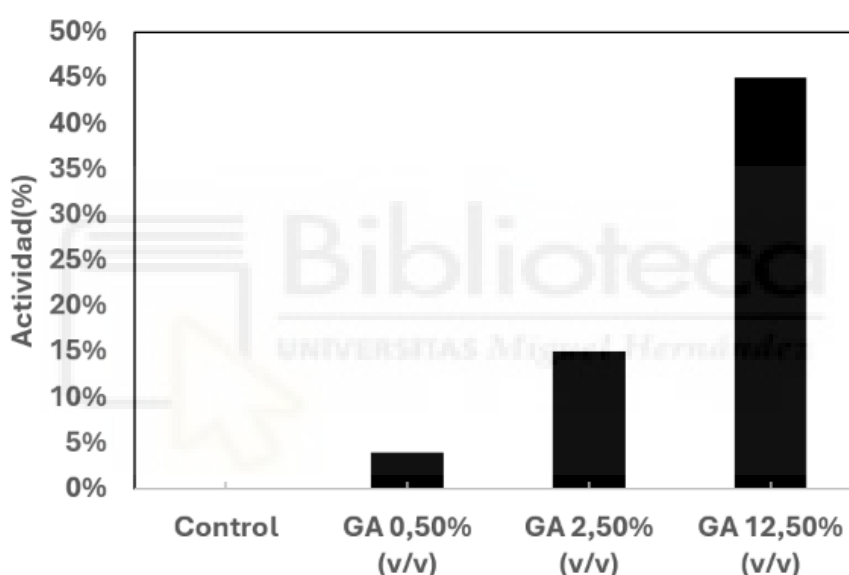


Figura 10. Actividad enzimática de Lzm a 1 mg/mL tras incubación con NP-Pt@PEI previamente activadas y lavadas con distintas concentraciones de Glutaraldehído (GA).

Por tanto, se determinó la concentración de 12,50% (v/v) de GA como concentración óptima para la inmovilización de la Lzm sobre la NP-Pt@PEI.

5.6. Variación de actividad catalítica de la lisozima (Lzm) en función de la temperatura

Como se ha introducido, la actividad enzimática aumenta con la temperatura. Por este motivo, se monitorizó cual era la temperatura óptima de la Lzm donde su actividad enzimática fuese más elevada, registrando su actividad a varias temperaturas (entre 22 y 47 °C). Los resultados se recogen en la Fig. 11, donde

se observa que a medida que aumenta la temperatura, de 22 °C a 42 °C hay un aumento progresivo de la actividad enzimática, siendo la temperatura de 40 °C la que mayor actividad relativa presenta (un 40 % más).

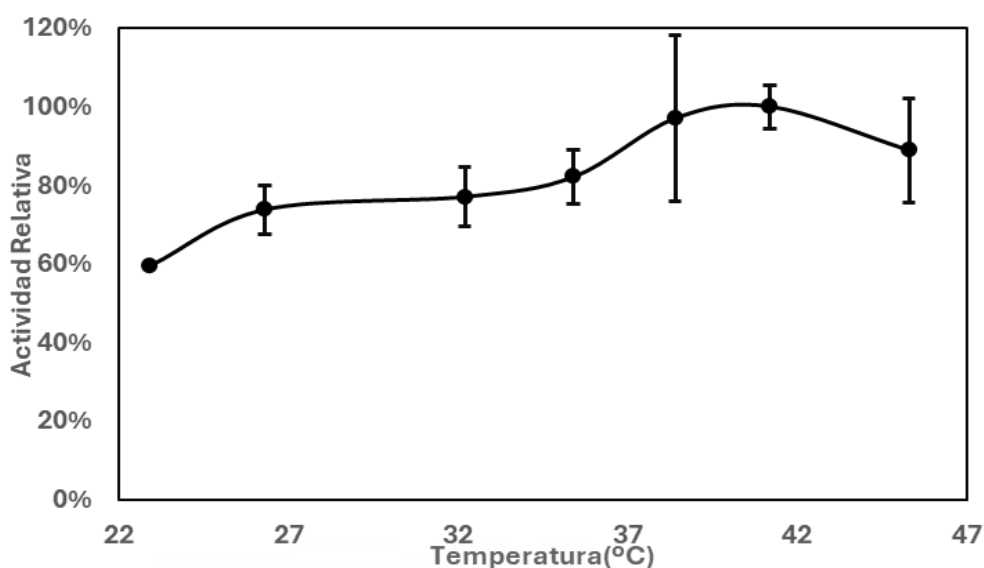


Figura 11. Variación de la actividad catalítica relativa de la Lzm en función de la temperatura. El experimento ha sido repetido por triplicado usando medio buffer HEPES pH 7.

A partir de aquí, la actividad empieza a decaer, por lo que de estos resultados podemos extraer que la enzima será más activa si podemos alcanzar temperaturas alrededor de los 42 °C, pero que no debemos superar dicha temperatura ya que el efecto obtenido es el contrario. Esto podría indicar que, a partir de temperaturas por encima de los 45 °C, el centro activo de la proteína podría verse alterado por cambios conformacionales que puedan influir en la lisozima.

5.7. Evaluación catalítica del nanohíbrido (NP-Pt@PEI-GA@Lzm)

Teniendo en cuenta los resultados de máxima actividad de la Lzm (Fig. 11), y considerando que al irradiar las NP-Pt@PEI con luz láser a 808 nm se consigue un aumento térmico hasta los 44 °C, por lo que utilizaremos esta longitud de onda para probar la actividad de la Lzm. Para llevar a cabo esta evaluación, se compara la actividad catalítica del nanohíbrido tanto irradiado como sin irradiar,

midiendo la absorbancia tras la irradiación durante 10 min y a las 24 h (Fig. 12).

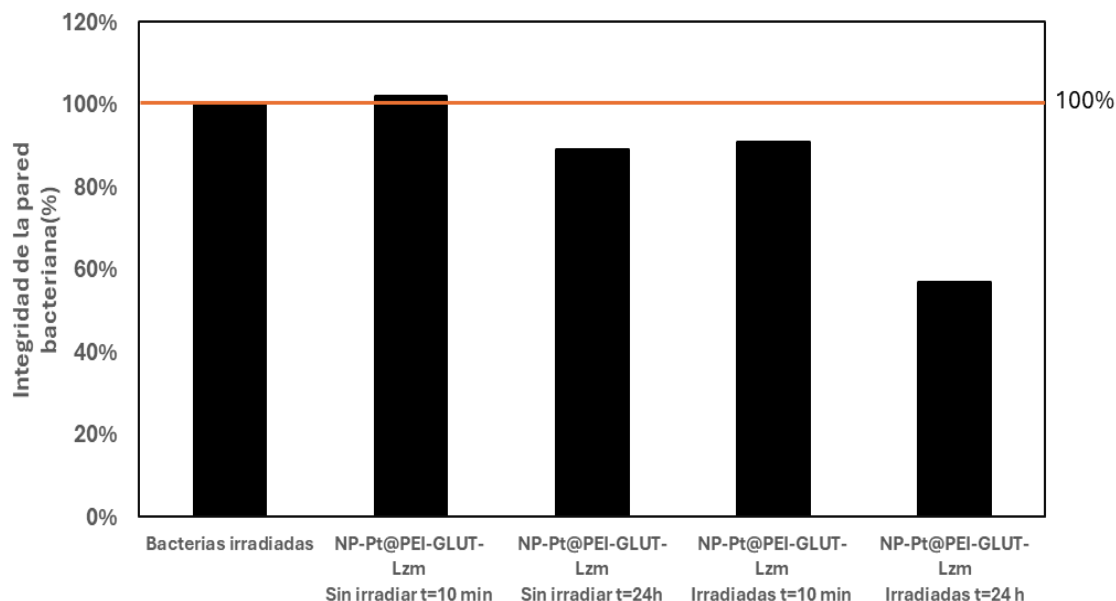


Figura 12. Evaluación de la integridad de la pared bacteriana en presencia del nanohíbrido NP-Pt@PEI-GA@Lzm bajo irradiación a 808 nm durante 10 minutos, a diferentes tiempos, tras irradiar (10 min) y a las 24 h.

Como se puede observar, tras irradiación a 808 nm, la pared bacteriana no sufre cambios en su integridad, manteniendo el 100 %, por lo que si hay degradación en los ensayos posteriores será producida por la enzima, descartando el posible efecto de la propia irradiación. Si se evalúa el nanohíbrido, NP-Pt@PEI-GA@Lzm, sin irradiación, se observa que a los 10 minutos la integridad de la pared permanece igual que el control, y que sólo se produce la degradación del 10 % tras el paso de 24 horas (la Lzm esta activa, aunque la concentración es tan pequeña que la velocidad de degradación es lenta). Esta cinética de degradación aumenta al irradiar previamente la disolución que contiene el nanohíbrido durante 10 min con luz láser a 808 nm. Tan solo a los 10 minutos conseguimos el mismo resultado que el de 24 h sin irradiación, aproximadamente un 9 % de la pared bacteriana ha sido degradada. Si finalmente evaluamos la actividad tras 24 h, la integridad de la pared ha bajado hasta el 57 %, lo cual confirma el efecto sinérgico que supone el irradiar la nanopartícula para aumentar la actividad catalítica de la enzima. Por lo tanto, sería un buen método para aplicación a enzimas con interés en degradación de plásticos u otros

contaminantes, sobre los que se puede aumentar su actividad catalítica si son inmovilizados sobre nanopartículas fototérmicas.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

6.1. Conclusiones

- Hemos desarrollado unas NP-Pt de 200 nm de diámetro hidrodinámico, las cuales han sido fácilmente funcionalizadas con polietilenimina (PEI) (NP-Pt@PEI), ya que tras el recubrimiento se ha evidenciado un cambio de carga superficial, de -18 mV a $+42$ mV, además de un aumento de tamaño hasta los 270 nm.
- Las NP-Pt@PEI han demostrado tener un buen efecto fototérmico tras la irradiación con luz láser, tanto a 520 nm como a 808 nm, aunque se ha conseguido un mayor incremento al irradiar con 808 nm ($\Delta T = 21$ °C)
- Sobre las NP-Pt@PEI, ha sido posible la inmovilización covalente mediante el uso de glutaraldehído (GA) con la lisozima, siendo de 12,5 % (v/v) la concentración óptima. Además, el hecho de estar inmovilizada no afecta a la actividad enzimática de la lisozima.
- Se ha confirmado que la actividad enzimática, en este caso, se ve aumentada hasta una temperatura de unos 42 °C.
- La actividad catalítica de la enzima soportada sobre las NP-Pt@PEI tras ser irradiada ha resultado lograr la sinergia buscada entre el efecto fototérmico (con el consecuente aumento de la temperatura) y la mayor actividad catalítica lograda. Se ha demostrado que tras irradiación del nanohíbrido se consigue un 40 % más de degradación de la pared bacteriana que si no hay dicha irradiación.

6.2. Proyección futura

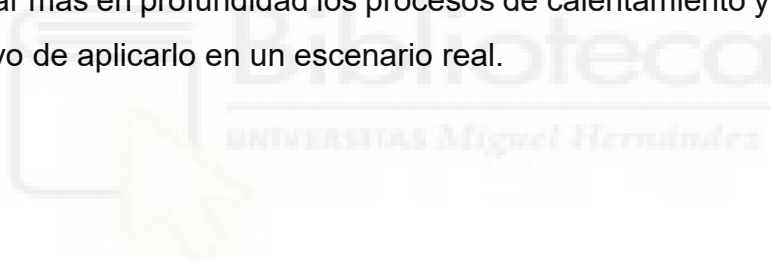
Tras presentar estos resultados se plantean posibles líneas de desarrollo para futuras investigaciones para completar este sistema y aplicarlo a nivel industrial. En primer lugar, se propone aplicar enzimas como son la PETasa o las serinas hidrolasas que degradan plásticos en vez de una lisozima degradadora de

paredes bacterianas. Esto permitiría trasladarlo hacia la degradación de microplásticos u otros contaminantes.

Por otro lado, se podrían acoplar estos métodos sobre otras nanopartículas magnéticas, para que, además, de llevar a cabo la catálisis de ciertos sustratos, se consiguiese un reciclaje continuo de los nanohíbridos mediante el uso campos magnéticos externos.

Se plantea también el diseño de sistemas con varias enzimas distintas inmovilizadas sobre la misma nanopartícula de platino. La finalidad sería conseguir un nanohíbrido multifuncional capaz de llevar a cabo catálisis simultáneas como es la degradación de microplásticos y otros contaminantes de interés.

Finalmente se propone evaluar la estabilidad a largo plazo mediante ciclos de irradiación repetidos con el fin de determinar la vida media del nanohíbrido y poder analizar más en profundidad los procesos de calentamiento y enfriamiento con el objetivo de aplicarlo en un escenario real.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Din SU, Kalsoom, Satti SM, Uddin S, Mankar S V., Ceylan E, et al. The Purification and Characterization of a Cutinase-like Enzyme with Activity on Polyethylene Terephthalate (PET) from a Newly Isolated Bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* PRS8 at a Mesophilic Temperature. *Applied Sciences* (Switzerland). 2023 Mar 1;13(6):3686. doi:10.3390/APP13063686/S1
2. Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. 2016 Mar 11;351(6278):1196–9. doi:10.1126/SCIENCE.AAD6359 PubMed PMID: 26965627.
3. Zhai K, Pal T, Liu Z, Lin X, Men Y, Chen J. Immobilization of PETase on Magnetic Nanoparticles Enhances Their Stability and Activity for Efficient Degradation of Polyethylene Terephthalate. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2025 Dec 17;17(50):67519–28. doi:10.1021/ACSAMI.5C15692 PubMed PMID: 41329610.
4. Ç Aloğ Lu Susamaz B, Kerimak-O'ner, N, Ece N, Faki V, Arslan LC, Yildirim D, et al. Design of Functionalized Silica Immobilization of PETase from *Kibdelosporangium aridum*: Comparison of Glyoxyl and Glutaraldehyde Strategies for PET Depolymerization. *ACS Omega*. 2026 May 12;11(18):27002–14. doi:10.1021/ACSOMEGA.6C00584
5. Pinzón DLS, Lourenço DB, Balbino TA, Rodrigues TS. Photoactive Nanomaterials Containing Metals for Biomedical Applications: A Comprehensive Literature Review. *Processes* 2025, Vol 13, Page 2978. 2025 Sep 18;13(9):2978. doi:10.3390/PR13092978
6. Università Degli Studi Di Teramo. Is this Nano? Is this Nano? [Internet]. 2025 [cited 2026 May 20];1. Available from: https://elearning.unite.it/pluginfile.php/365029/mod_resource/content/1/metal%20nanoparticles%2025-26.pdf
7. Xing C, Cai H, Kang D, Sun W. Photothermal Catalysis: An Emerging Green Approach to Upcycling Plastic Waste. *Advanced Energy and Sustainability Research*. 2023 Oct 1;4(10):2300015. doi:10.1002/AESR.202300015;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
8. ¿Qué son los plásticos? - ANAIP [Internet]. [cited 2026 May 13]. Available from: <https://anaip.es/los-plasticos/que-es-el-plastico/>
9. Doroftei B, Savuca A, Cretu AM, Maftei R, Anton N, Ilea C, et al. Microplastics and human fertility: A comprehensive review of their presence in human samples and reproductive implication. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2025 Sep 15;303:118939. doi:10.1016/J.ECOENV.2025.118939 PubMed PMID: 40876190.
10. Dokl M, Copot A, Krajnc D, Fan Y Van, Vujanović A, Aviso KB, et al. Global projections of plastic use, end-of-life fate and potential changes in consumption, reduction, recycling and replacement with bioplastics to

2050. *Sustain Prod Consum*. 2024 Nov 1;51:498–518. doi:10.1016/J.SPC.2024.09.025
11. Pillai J. Managing plastic waste – What emerging economies like India can learn from developed nations. *Reinforced Plastics*. 2021 Dec 1;65:S8–11. doi:10.1016/J.REPL.2021.04.011
 12. Plásticos: datos relevantes 2022 • Plastics Europe [Internet]. [cited 2026 May 14]. Available from: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>
 13. Lazarevic D, Aoustin E, Buclet N, Brandt N. Plastic waste management in the context of a European recycling society: Comparing results and uncertainties in a life cycle perspective. *Resour Conserv Recycl*. 2010 Dec 1;55(2):246–59. doi:10.1016/J.RESCONREC.2010.09.014
 14. Reciclado Químico en España: Apostando por un futuro circular - Plastics Europe ES [Internet]. [cited 2026 May 14]. Available from: <https://plasticseurope.org/es/knowledge-hub/reciclado-quimico-en-espana-apostando-por-un-futuro-circular/>
 15. Othman MR, Anpalagam SK, Jafary NF. Modeling and Analysis of Clinical #amp;amp; Municipal Waste Incineration Process using Aspen Plus. *Computer Aided Chemical Engineering*. 2023 Jan 1;52:101–6. doi:10.1016/B978-0-443-15274-0.50017-2
 16. Sistemas de tratamiento [Internet]. [cited 2026 May 14]. Available from: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/domesticos/gestion/sistema-tratamiento/default_antigua.html
 17. Priya AK, Muruganandam M, Imran M, Gill R, Vasudeva Reddy MR, Shkir M, et al. A study on managing plastic waste to tackle the worldwide plastic contamination and environmental remediation. *Chemosphere*. 2023 Nov 1;341:139979. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.139979 PubMed PMID: 37659517.
 18. Las doce razones por las que no funciona el reciclaje de plástico | RETEMA [Internet]. [cited 2026 May 19]. Available from: <https://www.retema.es/actualidad/las-doce-razones-por-las-que-no-funciona-el-reciclaje-de-plastico>
 19. Europa solo recicla el 30% de sus casi 26 millones de toneladas de residuos de plástico [Internet]. [cited 2026 May 13]. Available from: <https://www.residuosprofesional.com/europa-reciclaje-residuos-plastico/>
 20. Kandpal A, Singh A, Jain D, Upadhyay SK, Siddiqui AJ, Sharma K, et al. Managing plastic waste with nanotechnology: current sustainability prospects. *Nanotechnology for Environmental Engineering* 2023 8:4. 2023 Oct 13;8(4):1015–31. doi:10.1007/S41204-023-00346-5
 21. Garcia-Peiro JI, Sancho-Albero M, Miguel S, Mosseri A, Hornos F, Contreras-Montoya R, et al. Evolving Platinum-Copper Nanostructures for

Enhanced Photothermal Therapy and Controlled Copper Release in Cancer Therapy. Adv Funct Mater. 2025 Dec 1;35(52):e02999. doi:10.1002/ADFM.202502999

22. Martínez-Baquero R, Martínez-Tomé MJ, Gómez J, Esquembre R, Mateo CR. Pancreatic Lipase in Eutectogels as Emerging Materials: Exploring Their Properties and Potential Applications in Biosensing. *Biosensors (Basel)*. 2025 Sep 1;15(9):615. doi:10.3390/BIOS15090615/S1 PubMed PMID: 41002354.
23. Afzal O, Altamimi ASA, Nadeem MS, Alzarea SI, Almalki WH, Tariq A, et al. Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications. *Nanomaterials* 2022, Vol 12, Page 4494. 2022 Dec 19;12(24):4494. doi:10.3390/NANO12244494 PubMed PMID: 36558344.
24. Estelrich J, Sánchez-Martín MJ, Busquets MA. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int J Nanomedicine*. 2015 Mar 6;10(1):1727–41. doi:10.2147/IJN.S76501 PubMed PMID: 25834422.
25. Guerra FD, Attia MF, Whitehead DC, Alexis F. Nanotechnology for Environmental Remediation: Materials and Applications. *Molecules* 2018, Vol 23, Page 1760. 2018 Jul 18;23(7):1760. doi:10.3390/MOLECULES23071760 PubMed PMID: 30021974.
26. Elezz MA, Aboeleneen NM, Abd-ElMonem NM, Sorour FH. A comprehensive review: Functional nanomaterials for renewable energy: Innovations, applications, and sustainable strategies. *Next Materials*. 2025 Oct 1;9:101001. doi:10.1016/J.NXMATE.2025.101001
27. Baig N, Kammakakam I, Falath W, Kammakakam I. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater Adv*. 2021 Mar 29;2(6):1821–71. doi:10.1039/D0MA00807A
28. Khan ZUH, Khan A, Chen Y, Shah NS, Muhammad N, Khan AU, et al. Biomedical applications of green synthesized Nobel metal nanoparticles. *J Photochem Photobiol B*. 2017 Aug 1;173:150–64. doi:10.1016/J.JPHOTOBIO.2017.05.034 PubMed PMID: 28582711.
29. Bertagna Silva D, Marques AC. TiO₂-based photocatalytic degradation of microplastics in water: Current status, challenges and future perspectives. *Journal of Water Process Engineering*. 2025 Apr 1;72:107465. doi:10.1016/J.JWPE.2025.107465
30. Mandpe A, Jagwani D, Shah MP, editors. *Nanotech Solutions for Industrial Wastewater [Internet]*. 2025;Advances in Wastewater Research. doi:10.1007/978-981-96-6879-3
31. Grbic J, Nguyen B, Guo E, You JB, Sinton D, Rochman CM, et al. Magnetic Extraction of Microplastics from Environmental Samples Citation (published version) Grbic [Internet]. doi:10.1021/acs.estlett.8b00671

32. Silva TA, Stefano JS, Janegitz BC. *Sensing Materials: Nanomaterials. Encyclopedia of Sensors and Biosensors, First Edition, Four Volume Set.* 2023 Jan 1;212–30. doi:10.1016/B978-0-12-822548-6.00023-6
33. Baffou G, Cichos F, Quidant R. *Applications and challenges of thermoplasmonics.* Nat Mater. 2020;19(9). doi:10.1038/s41563-020-0740-6
34. Chen Y, Hu B, Liu L, Wang X, Qi Z, Zhang J, et al. *Self-enhanced copper-doped Prussian blue nanoplatform for amplifying enzyme-like activity and photothermal effects.* Int J Pharm. 2026 May 15;126983. doi:10.1016/J.IJPHARM.2026.126983
35. Chandran N, Bayal M, Pilankatta R, Nair SS. *Tuning of Surface Plasmon Resonance (SPR) in Metallic Nanoparticles for Their Applications in SERS.* Progress in Optical Science and Photonics. 2021;16:39–66. doi:10.1007/978-981-16-5367-4_4/TABLES/1
36. Eğılmez Hİ, Haspolat E. *Temperature-Dependent Parameters in Enzyme Kinetics: Impacts on Enzyme Denaturation.* Fundamental Journal of Mathematics and Applications. 2024 Dec 31;7(4):226–35. doi:10.33401/FUJMA.1517334
37. Maghraby YR, El-Shabasy RM, Ibrahim AH, Mohamed H, Azzazy ES. *Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications [Internet].* Vol. 8. 2023;8:5184–96. doi:10.1021/acsomega.2c07560
38. Pourhakkak P, Taghizadeh A, Taghizadeh M, Ghaedi M, Haghdoust S. *Fundamentals of adsorption technology.* Interface Science and Technology. 2021 Jan 1;33:1–70. doi:10.1016/B978-0-12-818805-7.00001-1
39. Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. *Enzyme immobilization by adsorption: A review.* Adsorption. 2014 Jun 27;20(5–6):801–21. doi:10.1007/S10450-014-9623-Y/FIGURES/5
40. Santiago A., Cabo C, Pérez É, Cotutores E, Barat JM, Héctor B, et al. *UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL (ETSIAMN) Nuevos métodos y soportes para la inmovilización de enzimas.*
41. Atmar A, Zeinab R. *Xylanase extraction from clarified rumen fluid by modified magnetic Nano-particles.* International Journal of Advanced and Applied Sciences. 2014;1(7):44–51.
42. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials.* 3 Biotech. 2012;3(1):1. doi:10.1007/S13205-012-0071-7 PubMed PMID: 28324347.
43. Sheldon RA, Van Pelt S. *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how †.* Chem Soc Rev. 2013;42:6223. doi:10.1039/c3cs60075k
44. Daniel RM, Danson MJ, Eisenthal R, Lee CK, Peterson ME. *The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications.*

- Extremophiles*. 2008 Jan;12(1):51–9. doi:10.1007/S00792-007-0089-7 PubMed PMID: 17849082.
45. Kabir MF, Ju LK. On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochemistry*. 2023 Jul 1;130:734–46. doi:10.1016/J.PROCBIO.2023.05.031
 46. Hou L, Liu X, Wang Z, Pan R, Huang G, Dai X. Hen egg white lysozyme as a functional building block: structural features, assembly behavior, and emerging food applications. *Trends Food Sci Technol*. 2026 Mar 1;169:105521. doi:10.1016/J.TIFS.2025.105521
 47. Hou L, Liu X, Wang Z, Pan R, Huang G, Dai X. Hen egg white lysozyme as a functional building block: structural features, assembly behavior, and emerging food applications. *Trends Food Sci Technol*. 2026 Mar 1;169:105521. doi:10.1016/J.TIFS.2025.105521
 48. Kiesel I, Paulus M, Nase J, Tiemeyer S, Sternemann C, Rüster K, et al. Temperature-Driven Adsorption and Desorption of Proteins at Solid–Liquid Interfaces. *Langmuir*. 2014 Mar 4;30(8):2077–83. doi:10.1021/LA404884A PubMed PMID: 24559398.
 49. Shrivastava R, Dube A. Effect of the polyelectrolyte coating on the photothermal efficiency of gold nanorods and the photothermal induced cancer cell damage. *IET Nanobiotechnol*. 2017 Dec 1;11(8):909–16. doi:10.1049/IET-NBT.2016.0132;WEBSITE:WEBSITE:IETRESEARCH;WGROU:STRIN G:PUBLICATION PubMed PMID: 29155389.