



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Bioconjugación enzimática de materiales nanoestructurados basados en paladio o platino como agentes para el control en el crecimiento tumoral

Enzymatic bioconjugation of palladium or platinum-based nanostructured materials as agents for the control of tumour

Autor/es

**Cecilia Allueva Álava**

Director/es

**Jesús Santamaría Ramiro**

Instituto de nanociencia y materiales de Aragón

Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente

Facultad de Ciencias / Universidad de Zaragoza

2021/2022

## Índice

1. Resumen .....	3
Abstract.....	3
2. Introducción.....	4
2.1. Contextualización: Situación actual del cáncer.....	4
2.2. Enzima L-Aminoácido oxidasa (LAAO) .....	5
2.3. Empleo de nanopartículas .....	6
2.4. Bioconjugación de nanopartículas.....	6
3. Objeto y planteamiento del trabajo .....	8
4. Resultados y discusiones .....	9
4.1. Caracterización de la enzima.....	9
4.1.1. Medida del punto isoelectrico (pI) de la enzima por DLS .....	9
4.2. Síntesis de nanopartículas (NPs) .....	9
4.3. Catálisis preliminares con la enzima.....	11
4.4. Estudios sobre la bioconjugación .....	12
4.4.1. Medida de la cantidad de enzima unida .....	12
4.4.2. Medida de la concentración del bioconjugado .....	13
4.5. Estudio cinético de la bioconjugación. Comparación entre enzima libre y enzima bioconjugada.....	14
5. Parte experimental. Técnicas y equipos utilizados.....	16
5.1. Materiales y métodos.....	16
5.1.1. Reactivos .....	16
5.1.2. Equipos.....	17
5.1.3. Protocolos .....	18
5.2. Resultados experimentales .....	20
5.2.1. Caracterización de la enzima .....	20
5.2.2. Catálisis preliminares con la enzima .....	22
5.2.3. Bioconjugación.....	23
5.2.4. Estudios sobre la bioconjugación.....	23
5.2.5. Estudio cinético del bioconjugado .....	26
6. Conclusiones .....	28
7. Bibliografía.....	29

## 1. Resumen

La bioconjugación enzimática de nanopartículas está alcanzando un gran interés dentro del área terapéutica del cáncer debido a las ventajas que presenta en comparación con las estrategias clásicas de conjugación. La hipótesis de partida consiste en que la bioconjugación enzimática de materiales nanoestructurados permite aprovechar la sinergia entre la actividad propia de las enzimas y la actividad catalítica que ofrecen determinadas nanoestructuras basadas en metales de cara a alterar el equilibrio ROS en líneas celulares, al ser dirigida de forma selectiva hacia un entorno tumoral, ofrece grandes posibilidades como terapia de control tumoral.

Este estudio evalúa la actividad de la enzima L-Aminoácido oxidasa en diferentes ensayos enzimáticos en los cuales dicha enzima ha sido bioconjugada con nanopartículas de platino. Las nanopartículas de platino han sido sintetizadas previamente tras la optimización de su protocolo de síntesis. Asimismo, se ha llevado a cabo la caracterización de la enzima en cuestión, de cara a obtener los parámetros adecuados para el diseño de los ensayos enzimáticos. Se ha realizado del mismo modo una optimización de los parámetros de reacción mediante el uso de técnicas como fluorimetría, UV-VIS o colorimetría mediante ácido bicinconínico. De esta forma se realiza una comparación mediante estudios cinéticos entre la actividad catalítica de la enzima en estado libre y la enzima unida a las nanopartículas a diferentes pH.

**Palabras clave:** Bioconjugación, nanopartículas, enzima, estudio cinético, catálisis.

## Abstract

Enzymatic bioconjugation of nanoparticles is achieving great interest within the therapeutic area of cancer due to the benefits shown in comparison with those offered by classic strategies of conjugation. The starting hypothesis stands that the enzymatic bioconjugation of nanostructured materials allows taking advantage from a synergy between both enzymatic activity and catalytic activity from certain metal-based nanostructures capable of disturbing ROS balance within cellular lines, which guided in a selective manner towards a tumour environment, offers great possibilities as a tumoral control therapy.

This study evaluates the activity of the enzyme L-Amino acid oxidase in different enzymatic assays in which the enzyme has been bioconjugated with platinum nanoparticles. Platinum nanoparticles have been synthesized previously following a previously optimized protocol of synthesis. Several enzyme characterization studies have also been carried out so that appropriate parameters have been extracted in order to design further enzymatic assays. In the same way, an optimization of the reaction parameters has been carried out through the use of techniques such as fluorimetry, UV-VIS or colorimetry using biconchonic acid. In this way, a comparison between the catalytic activity of the enzyme in the free state and the enzyme bound to the nanoparticles at different pH is performed through different kinetic studies.

**Keywords:** Bioconjugation, nanoparticles, enzyme, kinetic studies, catalytic activity

## 2. Introducción

### 2.1. Contextualización: Situación actual del cáncer

En la actualidad, existen muchas estrategias para el tratamiento del cáncer entre las que se incluyen la quimioterapia, la radioterapia, la cirugía y la más reciente, la inmunoterapia. Pese a los avances producidos en las últimas décadas en el campo de la terapia contra el cáncer, son necesarias más estrategias que se usen como alternativas a las ya conocidas o como complementarias.<sup>1</sup>

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generalmente producidas en las reacciones de la cadena respiratoria que ocurren en la mitocondria. Existen varios tipos de ROS como el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y el radical hidroxilo que son producidos como resultado de la reducción de moléculas de oxígeno. Normalmente los ROS son eliminados o detoxificados por el sistema antioxidante celular, ya que los ROS son capaces de modificar diferentes componentes esenciales como son las proteínas y los lípidos, dando lugar a una disfunción en el metabolismo en el que están implicadas estas moléculas. Una excesiva acumulación de ROS en el sistema lleva al fallo del sistema antioxidante, lo que da lugar al denominado estrés oxidativo. Pese a que el peróxido de hidrógeno es menos reactivo en comparación con otros ROS, es capaz de difundir a través de la membrana celular lo que produce un daño en la célula y sus orgánulos.<sup>2</sup>

Las células cancerígenas tienen una actividad metabólica superior a la normal y por ello la cantidad de especies ROS generadas es excepcionalmente alta. Algunas células cancerígenas secuestran especies ROS para impulsar ciertos procesos biológicos que favorecen la proliferación, invasión, metástasis y resistencia a la quimioterapia. Debido a la importancia del equilibrio de especies ROS en la célula, una de las formas más sencillas de acabar con las células cancerígenas es introducir niveles altos de ROS. La inducción del estrés oxidativo en la célula cancerígena es una de las estrategias utilizadas para el tratamiento anticancerígeno, ya que la liberación de peróxido de hidrógeno y otras especies como el ion superóxido, altera el balance de ROS de las células cancerígenas, induciendo su muerte.<sup>2</sup>

Este aumento en los niveles de ROS en la célula se puede lograr aumentando la producción de ROS *in situ* en la célula introduciendo especies ROS exógenas o agotando el sistema antioxidante que se deshace estas especies ROS.<sup>2</sup>

Comúnmente se utiliza la quimioterapia para interferir y alterar toda la maquinaria regulatoria en el interior de la célula cancerígena. Otro ejemplo de terapia que introduce ROS exógenos es la terapia fotodinámica<sup>2</sup>, que consiste en administrar de forma dirigida sensores fotosensibles en la zona del tumor y posteriormente iluminar el tumor con luz a una longitud de onda específica para activar dichos sensores.<sup>3</sup>

En la investigación de terapias contra el cáncer uno de los principales mecanismos de acción es el uso de sustancias de origen natural con habilidad para producir la apoptosis de la célula. Sin embargo, debido a la capacidad de las células cancerígenas para generar mecanismos propios para evitar la apoptosis, esta estrategia puede dar lugar a una progresiva resistencia a los potenciales agentes anticancerígenos.<sup>1</sup>

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se ha propuesto el estudio de la enzima L-amino oxidasa que presenta una selectividad hacia cierto tipo de membranas celulares con

una composición con un tipo de fosfolípido presente en células cancerígenas, de este modo la liberación de peróxido se puede hacer de forma dirigida hacia regiones localizadas. <sup>2</sup>

## 2.2. Enzima L-Aminoácido oxidasa (LAAO)

L-aminoácido oxidasa es una enzima oxidoreductasa dependiente del dinucleótido de flavina y adenina (FAD) que cataliza la desaminación oxidativa de L-aminoácidos con una estereoespecificidad muy estricta, para dar como resultado  $\alpha$ -ceto ácidos y ion amonio. La forma reducida del dinucleótido de flavina y adenina (FADH<sub>2</sub>) se oxida (a FAD) en presencia de oxígeno molecular, produciendo peróxido de hidrógeno. LAAO es uno de los componentes principales del veneno de la serpiente, cuya acción consiste en consumir los aminoácidos esenciales disponibles y se unirse a la superficie de la célula generando una alta concentración local de peróxido de hidrógeno. <sup>4</sup>

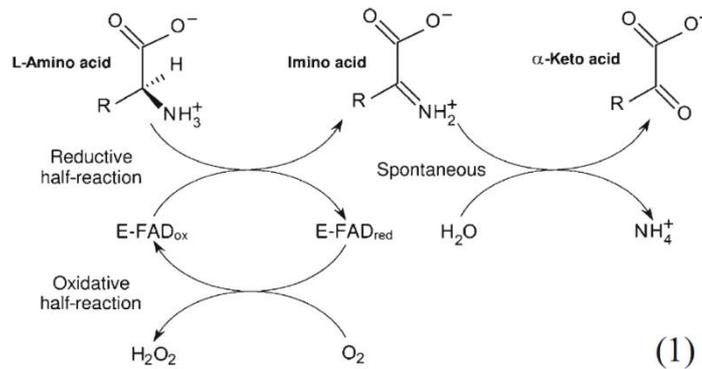


Figura 1. Esquema de la reacción catalizada por LAAO

Algunos aminoácidos esenciales que agota esta enzima, como por ejemplo el ácido aspártico pueden actuar como metabolitos limitantes en el crecimiento tumoral debido a que forman parte de la cadena transportadora de electrones, por lo que la disponibilidad de aspártico u otros aminoácidos implicados en ciclos celulares puede ser utilizada en terapias contra el cáncer. <sup>5</sup>

La enzima L-amino oxidasa es producida por diferentes organismos desde bacterias, algas u hongos hasta insectos, algunos mamíferos, moluscos y ciertas especies de serpientes. Los venenos de las especies *Viperidae*, *Crotalinae* y *Elapidae* tienen altos niveles de LAAO. Las LAAO que provienen de venenos de serpiente (SvLAAO) presentan un dominio que consiste en un pliegue en la unión del dinucleótido con otras enzimas, que requiere la presencia de FAD como cofactor. Normalmente LAAOs existen como homodímeros lo que contribuye en parte al efecto citotóxico del veneno de las serpientes. Existe un amplio rango de efectos biológicos atribuidos a la actividad de la LAAO tales como la activación/inhibición de la agregación de las plaquetas, hemorragias y edemas. Por otro lado, su facilidad para reconocer L-aminoácidos, hace a la enzima ideal en el procesamiento de mezclas racémicas. <sup>2</sup>

La habilidad de la LAAO para discriminar entre dos enantiómeros diferentes reside en la arquitectura del sitio activo que se basa en la existencia de tres interacciones de unión entre el sustrato y el sitio activo en una sola dirección. <sup>4</sup>

### **2.3. Empleo de nanopartículas**

El prefijo “nano- “se refiere a aquellos materiales en los cuales al menos una de sus dimensiones está en la escala de 1-100 nm.<sup>6</sup>

Existen numerosos métodos de administración de medicamentos dentro de un organismo. Entre ellos está la vía oral, transdérmica, transepitelial o intravenosa como ejemplo. Todos estos métodos pueden ser mejorados mediante el uso de nanoestructuras como vehículos para estos medicamentos que permiten dirigir más efectivamente el principio activo reduciendo los efectos secundarios. Así, la nanotecnología juega un importante papel en el futuro de las terapias oncológicas, desarrollando una nanomedicina capaz de disminuir tanto las dosis necesarias para lograr la eficacia como incrementar los índices terapéuticos y la seguridad de los fármacos administrados. El propósito de las nanopartículas en nanomedicina es ofrecer un diagnóstico lo más preciso y rápido posible para así, poder ofrecer un tratamiento efectivo lo antes posible y evitando en la medida de lo posible los efectos secundarios. La nanotecnología además de fines terapéuticos también puede tener fines diagnósticos. Existen diferentes nano recipientes como pueden ser los producidos a partir de nanopartículas poliméricas, liposomas, nanopartículas magnéticas y nanoestructuras de carbono.<sup>6</sup>

Los estudios en nanomedicina han logrado nuevos mecanismos para la lucha contra el cáncer basados en la terapia dirigida. Bloqueando las rutas implicadas en el desarrollo del cáncer se puede alterar el curso natural de la enfermedad y, al mismo tiempo ofrecer un índice terapéutico mejor respecto a los agentes citotóxicos tradicionales como por ejemplo los usados en quimioterapia. <sup>6</sup>

La terapia anticancerígena dirigida ha de cumplir una serie de requisitos. Los anticancerígenos han de ser liberados en las células cancerígenas intentando tener una pérdida de actividad mínima. El medicamento ha de ser capaz de matar de forma selectiva las células cancerígenas preservando las sanas. La liberación del medicamento tiene que ser controlada de forma que solo afecte al tumor. La mayoría de los tumores tienen un tamaño de entre 380 y 780 nm por lo tanto las nanopartículas tienen que ser de un menor tamaño para poder alcanzar el tumor. Con esta terapia se consigue disminuir la dosis de quimioterapia que tradicionalmente es usada.<sup>6</sup>

### **2.4. Bioconjugación de nanopartículas.**

La nanotecnología ha tenido un gran impacto en el desarrollo de las nanobiocatálisis ya que estos sistemas aumentan la actividad y la estabilidad de las catálisis enzimáticas. Las catálisis enzimáticas son más favorables que las catálisis químicas debido a su alta enantio y regioselectividad. De la misma forma, ya que no son necesarias condiciones extremas de temperatura o presión, la catálisis enzimática evita dañar los compuestos. Estas ventajas suponen grandes oportunidades en el uso de reacciones catalizadas enzimáticamente, ya sea en el ámbito farmacéutico o industrial. Sin embargo, uno de los problemas a los que se enfrenta la catálisis enzimática es la baja actividad de las enzimas en disolventes orgánicos, lo que produce mezclas heterogéneas de reacción que llevan a la agregación de la enzima. Una enzima agregada es incapaz de acceder a un sustrato molecular lo que compromete seriamente este tipo de catálisis. De esta forma, un método que facilite la dispersión o solubilización de la biocatálisis en disolventes orgánicos ayudaría a la actividad catalítica de estos sistemas. Una estrategia conocida para lograr este fin es la bioconjugación de nanopartículas con enzimas. <sup>7</sup>

Mediante la conjugación de enzimas a nanopartículas hidrofóbicas se amplía su ámbito de actuación a nuevos disolventes. Además, las enzimas bioconjugadas han mostrado un incremento de su estabilidad respecto del empleo de enzimas libres, además de facilitar su separación del medio de reacción y su reutilización manteniendo su actividad catalítica.<sup>8</sup>

Las nanopartículas necesitan ser funcionalizadas con algún tipo de componente biológico que facilite el proceso de interacción con un ambiente fisiológico. En un principio, la bioconjugación de nanopartículas permitiría que cualquier componente biológico lo suficientemente homogéneo se uniera de forma reproducible a una nanopartícula. Desgraciadamente, todavía no se ha llegado a este punto y la bioconjugación continúa siendo un área activa de estudio.<sup>9</sup>

Las principales estrategias de unión de bioconjugación de nanopartículas son: la unión mediante fuerzas electrostáticas, uniones no covalentes y uniones covalentes. Estas estrategias tienen serias limitaciones debido a la falta de estabilidad de las enzimas y su corto periodo de vida (ya que son catalizadores) que hace complicada su puesta en práctica. Debido a esto, se está desarrollando una alternativa conocida como química bioortogonal que ofrece ciertas ventajas respecto a las técnicas clásicas, por aprovechar la propia química presente en el metabolismo celular para el desarrollo *in situ* de especies con acción terapéutica.<sup>9</sup>

Para ser funcionalizadas las nanopartículas necesitan unirse con enzimas o con aceptores del sustrato. Las nanopartículas no se unen en un solo punto a la enzima si no que forman múltiples uniones. Estas reacciones de unión se suelen llevar a cabo *in vitro* lo que es beneficioso porque el sustrato todavía no tiene que ser permeable a la membrana celular. Otro beneficio de realizar estas reacciones *in vitro* es la habilidad de combinar distintos métodos de unión para generar una partícula multifuncional. La unión entre nanopartícula y sustrato se hace de dos maneras, en la primera de ellas la nanopartícula está unida al sitio donde se unirá el sustrato o directamente al propio sustrato de manera que la enzima modifica el sustrato unido para señalar el sitio de unión de la nanopartícula. En el segundo método la nanopartícula está unida a una enzima covalentemente y de forma irreversible se modifica para atraer al sustrato.<sup>9</sup>

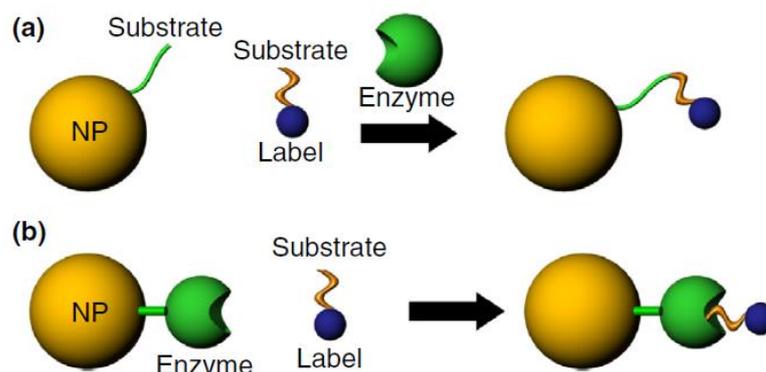


Figura 2. Esquema de estrategias de unión nanopartícula-enzima

En definitiva, el uso de materiales nanoestructurados para la inmovilización y estabilización de enzimas ha demostrado ser muy eficiente no solo ayudando a estabilizar la actividad enzimática si no también desarrollando otras propiedades ventajosas que resultan en sistemas biocatalíticos muy eficientes. Por lo tanto, es de esperar que este campo de estudio siga en desarrollo con muy buenas perspectivas de futuro.<sup>8</sup>

### 3. Objeto y planteamiento del trabajo

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) tiene como objetivo principal desarrollar nuevos materiales nanoestructurados capaces de combinar la especificidad enzimática y la selectividad con el comportamiento de las nanopartículas como nanozimas. Asimismo, pretende estudiar la actividad catalítica de estos nuevos materiales bioconjugados y comparar esta actividad frente a la enzima libre. Con este objetivo se realizarán experimentos de optimización de las condiciones a las que se llevará a cabo la experimentación. Igualmente, durante el transcurso del TFG se pretende utilizar diferentes técnicas analíticas que al final de este deben ser dominadas. Se realizará un análisis de los datos obtenidos en la práctica y se sacarán las conclusiones.

## 4. Resultados y discusiones

### 4.1. Caracterización de la enzima

#### 4.1.1. Medida del punto isoeléctrico (pI) de la enzima por DLS

Para realizar la bioconjugación de la enzima LAAO y las nanopartículas de platino es necesario conocer el punto isoeléctrico de la enzima. Las nanopartículas de platino tienen carga negativa y para que se una la enzima es necesario que ésta esté cargada positivamente. Teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de la enzima, podemos variar el pH de modo que la enzima adquiera carga positiva. Las siguientes medidas se han obtenido siguiendo el protocolo de medida por dispersión dinámica de la luz del anexo 8.3.

El punto isoeléctrico de la enzima es aquel en el que el potencial Z (la carga neta de la proteína) es cero. Al representar los potenciales obtenidos a distintos pH y obtener el punto de corte con el eje de abscisas se obtiene el pH al que la enzima tiene carga 0.

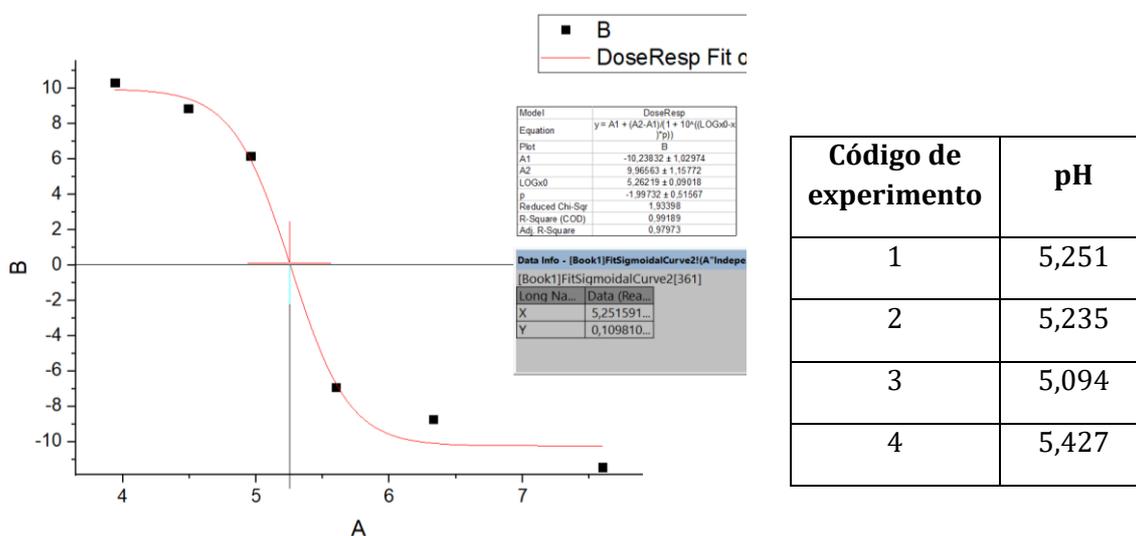


Figura 3. Representación del punto isoeléctrico

El valor del pH que se obtiene en los 4 experimentos se encuentra en torno a 5, el punto isoeléctrico de la enzima es 6,01 teóricamente<sup>10</sup>, por ello el pH que se utilizará para realizar las bioconjugaciones estará por debajo de estos valores para que la enzima tenga carga positiva.

### 4.2. Síntesis de nanopartículas (NPs)

La síntesis de nanopartículas se realizó siguiendo el protocolo de síntesis descrito en el apartado 5.1.3.1. Dicha síntesis se realizó tras una optimización del proceso buscando las mejores características de las nanopartículas, tal como se describe.

Los experimentos codificados como 1,2,3 se hicieron en paralelo y en las mismas condiciones, pero cada síntesis tardó un tiempo distinto en generar sus nanopartículas. Todos los recipientes donde tuvo lugar la reacción se mantuvieron en una caja evitando la exposición a la luz y a la temperatura ambiente del laboratorio. En el experimento número 3 las nanopartículas se generaron muy rápidamente, pero la gran mayoría se quedó adherida a la superficie del bote en el que se sintetizaron haciendo que la concentración de nanopartículas resultante fuera muy baja. En el experimento número 2 pasó lo mismo,

pero tardaron un día más en sintetizarse las nanopartículas, la disolución no era homogénea y las nanopartículas se agregaban y caían al fondo del bote, denotando un crecimiento superior al deseado. La síntesis número 1 tardó un tiempo excesivo en formar las nanopartículas y la concentración obtenida fue excesivamente baja al igual que en los otros dos casos anteriores. Al ser una síntesis hecha en paralelo resulta extraña la diferencia en los tiempos de síntesis.

*Tabla 1. Síntesis de nanopartículas*

<b>Código de experimento</b>	<b>Concentración</b>	<b>Días</b>	<b>Diámetro</b>
Experimento 1	0,91 mg/mL	7 días	143,6 nm
Experimento 2	0,49 mg/mL	4 días	-
Experimento 3	0,65 mg/mL	3 días	-
Experimento 4	4,26 mg/mL	2 días	211,2 nm
Experimento 5	4,93 mg/mL	2 días	210,9 nm
Experimento 6	4,68 mg/mL	2 días	204,3 nm
Experimento 7	8,77 mg/mL	5 días	193,6 nm
Experimento 8	3,37 mg/mL	5 días	182,4 nm

A diferencia de las tres síntesis anteriores, que se llevaron a cabo en tres botes pequeños de cristal en paralelo, los experimentos 3,4 y 5 se realizaron en un solo bote grande y una vez se produjo la síntesis se dividió en tres lotes separados para llevar a cabo un lavado. Dicho bote fue puesto inicialmente a una temperatura controlada en la estufa y después se llevó a temperatura ambiente. La síntesis se realizó con mayor rapidez que la anterior y la concentración de nanopartículas aumentó, pero todavía no era la concentración necesaria para realizar la bioconjugación.

Los experimentos 7 y 8 se llevaron a cabo también en paralelo, pero con la diferencia de que el experimento 7 se puso a temperatura controlada de 25 °C en la estufa y el experimento 8 se dejó a temperatura ambiente. Ambas síntesis se produjeron al mismo tiempo, pero hay una clara diferencia entre las concentraciones. En el caso del experimento 8 las nanopartículas también quedaron adheridas a las paredes del bote, por ello su menor concentración.

Debido a que los experimentos 2 y 3 tenían una concentración muy baja de nanopartículas, no se midieron los tamaños de estas. En el resto de los casos se midieron los tamaños de las nanopartículas y se obtuvieron valores entre 180 y 210 nm. Los tamaños son demasiado grandes todavía, pero se pueden utilizar para realizar la bioconjugación. La necesidad de tamaños de nanopartículas entorno a 70nm de tamaño es debido a que al recubrirlas con enzima su tamaño global aumentará, y la mayoría de los tumores tienen un tamaño de entre 380 y 780 nm por lo tanto las nanopartículas tienen que ser de un menor tamaño para poder alcanzar el tumor.<sup>6</sup>

En el caso del experimento número 7 como es el que tiene una concentración mayor también se midió el tamaño de las nanopartículas por TEM obteniéndose las siguientes

imágenes que corroboran en cierta medida el tamaño de nanopartículas obtenidos por DLS:

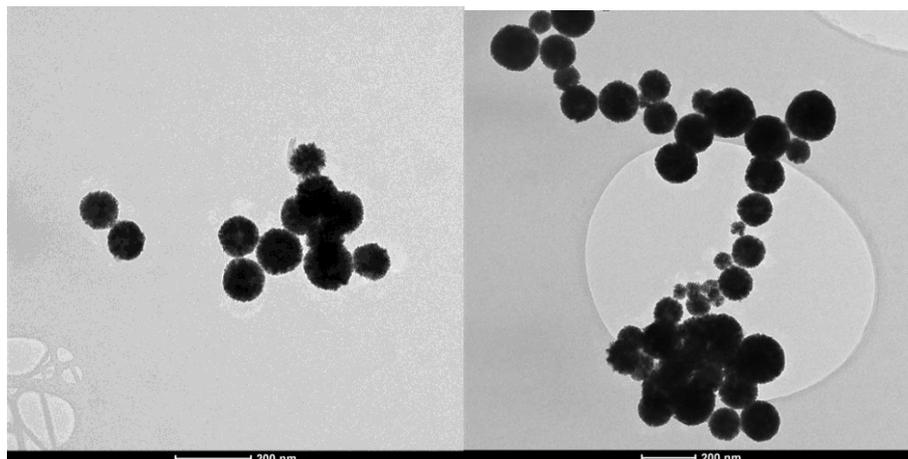


Figura 4. Fotografía TEM nanopartículas

#### 4.3. Catálisis preliminares con la enzima

Una vez se determinaron las condiciones óptimas de la enzima; se procedió a realizar un estudio de la actividad cinética de la enzima. Se quiere medir la disminución de la concentración de aminoácido respecto al tiempo en presencia de la enzima LAAO, los aminoácidos utilizados fueron aspártico y glutámico. En el apartado 5.2.2. Tabla 10 se pueden ver las condiciones a las que se realizó cada catálisis. Los resultados de dichas catálisis se encuentran representados en el anexo 8.9.

Se realizaron un total de cinco catálisis en las cuales se cambiaron varios parámetros. Los parámetros que se cambiaron a lo largo de la experimentación fueron: Volumen total de reacción, concentración de enzima, concentración de sustrato, concentración de ácido clorhídrico, aporte de FAD y método de agitación. De cara a optimizar los ensayos cinéticos, se aumentó la cantidad de sustrato con respecto a los ensayos previamente descritos. Cabe reseñar que las muestras que se recogen durante la reacción se toman sobre de ácido clorhídrico, para desnaturalizar la enzima y detener la catálisis a los tiempos deseados. El último cambio que se realizó en el experimento 5 y llevó a tener las condiciones óptimas para la catálisis, fue realizar el experimento cinético en el *Thermo-Shaker* en lugar de en la estufa con agitación. Una de las posibles razones de que la catálisis no funcionara correctamente podía ser que no hubiese una mezcla correcta entre los reactivos que intervienen en la catálisis (entre ellos, el acceso al oxígeno), lo que se confirmó al realizar la catálisis en este termobloque agitador. También se disminuyó el volumen total de la catálisis, a fin de favorecer el intercambio de gases, y de esta manera el acceso de oxígeno en la reacción. En el último experimento se añadió FAD que funciona como agente oxidante, que es cofactor de la enzima, obteniendo así resultados favorables.

El método de análisis desarrollado para glutámico, según el protocolo descrito en el apartado 5.1.3.3. es mucho más eficiente para glutámico que para aspártico, por lo que los ensayos posteriores se centraron en este sustrato.

Todos estos cambios en las variables llevaron a la optimización de las condiciones en las que posteriormente se llevaría a cabo la catálisis con la bioconjugación de platino y enzima.

#### 4.4. Estudios sobre la bioconjugación

Se realizaron dos bioconjugaciones en total considerando cada una de ellas condiciones distintas, tal como se describe a continuación

La primera bioconjugación se llevó a cabo a dos pH diferentes: una a pH 7,4 empleando un *buffer* fosfato (PBS) y a pH 4,5 con un *buffer* de ácido acético/acetato. También se realizó en paralelo un control negativo consistente en nanopartículas sin aporte de enzima. Visualmente la bioconjugación a pH 4,5 presentaba restos de nanopartículas adheridos al tubo, por lo que se decidió bajar el pH a 4 en la siguiente bioconjugación, buscando una carga neta positiva mayor en la enzima.

La segunda bioconjugación se llevó a cabo a pH 7,4 (empleándose un *buffer* de PBS) como a pH 4. Pero para este segundo caso, se ha considerado no solo un *buffer* de ácido acético/acetato, sino también otro de ácido cítrico/citrato con la intención de evaluar la influencia en la bioconjugación. Asimismo, se ha llevado a cabo un experimento control negativo en paralelo. En este caso visualmente ya no se apreciaban restos adheridos en las paredes de la bioconjugación realizada en *buffer* de acético/acetato. Sin embargo, sí que se observan partículas adheridas a las paredes en el caso de la bioconjugación llevada a cabo en *buffer* de cítrico/citrato.

##### 4.4.1. Medida de la cantidad de enzima unida

La cantidad de enzima unida a las nanopartículas se calculó por diferencia entre la masa total de enzima añadida inicialmente y la masa total de enzima en el sobrenadante y en los sucesivos lavados. Se utilizaron tres técnicas distintas para este cálculo.

Tabla 2. Medida de la cantidad de enzima unida

Número de bioconjugación	Muestra	UV-VIS (mg)	Fluorímetro (mg)	BCA (mg)
1	pH=7,4 (PBS)	0,043	0,210	0,430
	pH=4,5 (Acético/Acetato)	0,099	0,392	0,443
2	pH=7,4 (PBS)	0,112	0,086	0,156
	pH=4 (Acético/Acetato)	0,216	0,056	0,196
	pH=4 (Cítrico/Citrato)	0,285	0,083	0,177

Por fluorimetría no se puede medir la concentración de enzima en el *pellet* debido a que las nanopartículas producen efecto *quenching* imposibilitando la medida.

Como se puede observar en los resultados de la primera bioconjugación, el valor de enzima unida a las nanopartículas varía mucho de una técnica a otra por lo que los resultados no aportan información válida.

En la segunda bioconjugación se observa que los valores de enzima unida a las nanopartículas son muy pequeños, lo que indicaría que apenas se ha producido unión.

Como técnica alternativa a la fluorescencia, se propone la espectrofotometría de absorción UV-VIS, obteniendo como se puede ver en los resultados de la tabla 2 en la primera bioconjugación no hay una unión reseñable entre la enzima y la nanopartícula, mientras que en la segunda bioconjugación si muestran una diferencia notable entre la masa total de enzima y la masa total del sobrenadante. Esto querría decir que la enzima que no está ni en el sobrenadante ni en los lavados se encontraría en el *pellet* bioconjugada con las nanopartículas.

Otra técnica alternativa utilizada fue el método del ácido bicinconínico (BCA), al igual que con las dos técnicas anteriores la primera bioconjugación no ofreció resultados satisfactorios, mientras que en la segunda se observa una coherencia entre las medidas realizadas mediante espectrofotometría de UV-VIS, indicando unión de la enzima con las nanopartículas.

#### 4.4.2. Medida de la concentración del bioconjugado

Una vez realizada la bioconjugación es necesario medir la concentración obtenida del bioconjugado.

*Tabla 3. Medida de la concentración del bioconjugado*

<b>Código de muestra</b>	<b>Nombre de muestra</b>	<b>Peso inicial (mg)</b>	<b>Volumen añadido (µL)</b>	<b>Peso final (mg)</b>	<b>Concentración (mg/ml)</b>
1	pH=7,4 PBS	208,699	25	208,918	9,09
2	pH=7,4 PBS	209,868	50	210,339	
3	pH=4,5 Acético/Acetato	207,030	25	207,264	9,89
4	pH=4,5 Acético/Acetato	208,823	50	209,344	
5	Control negativo	209,318	25	209,566	10,07
6	Control negativo	207,025	50	207,536	
7	pH=4,5 Cítrico/Citrato	207,224	25	207,258	1,37
8	pH=4,5 Cítrico/Citrato	207,153	50	207,222	

Como se puede observar en los experimentos con PBS y acetato la concentración es en torno a 10 mg/mL, teniendo en cuenta que la concentración de las nanopartículas añadidas fue 8,77 mg/mL. Se observa el aspecto opaco de los dos bioconjugados. Sin embargo, en los ensayos de la bioconjugación empleando un tampón ácido cítrico/citrato

la disolución generada es translúcida y se observa un precipitado en el fondo de la disolución. Esto puede ser debido, a que el ácido cítrico puede actuar como reductor en la reacción de formación de nanopartículas (actuando sobre el ácido cloroplatínico), al igual que lo hacía el ácido ascórbico, haciendo de tal forma que la reacción de formación de las nanopartículas continúe y estas se hagan más grandes favoreciendo que precipiten. En consecuencia, la concentración de bioconjugado obtenida empleando un *buffer* cítrico/citrato fue 1,37 mg/mL; una concentración muy baja en comparación con las del resto de los bioconjugados.

#### 4.5. Estudio cinético de la bioconjugación. Comparación entre enzima libre y enzima bioconjugada

Se realizó un estudio cinético de la reacción de oxidación de aminoácidos catalizada por producto obtenido a partir del procedimiento de la “bioconjugación 1” y en paralelo se realizó un estudio cinético empleando la enzima libre, para poder comparar los resultados obtenidos en las mismas condiciones. Este ensayo se llevó a cabo tanto en presencia como en ausencia de FAD, que actúa como agente oxidante y capta electrones implicados en la reacción. Los resultados de este estudio cinético fueron no concluyentes debido a que las muestras no se tomaron sobre una cantidad adecuada de ácido clorhídrico, cuya finalidad es desnaturar la enzima y detener así la reacción en el momento de toma de muestra. Como ya se explica en el apartado 4.3 tras una serie de experimentos se optimizó cantidad de ácido clorhídrico necesaria para lograr esta detención de la reacción.

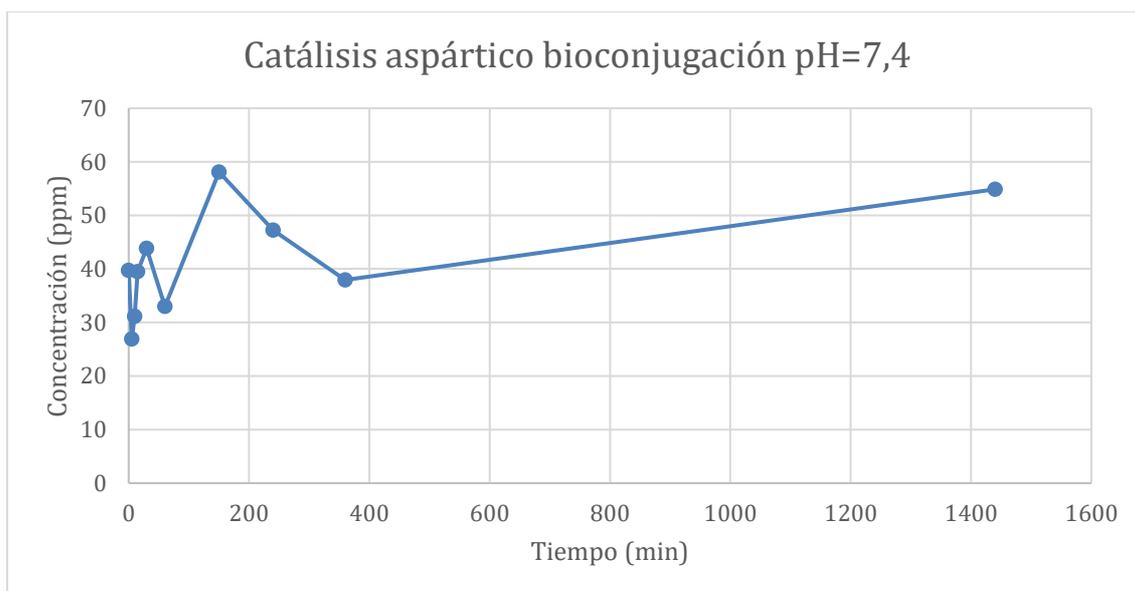


Figura 5. Catálisis bioconjugación 1, experimento 1.2.

Tras la optimización de las condiciones se realizó un estudio cinético empleando el bioconjugado 2 obtenido, como catalizador para poder comparar resultados. En este caso los resultados obtenidos si fueron favorables mostrando unos mejores resultados las catálisis con aporte de FAD. En el siguiente gráfico se puede observar como la concentración de sustrato disminuye en mayor medida haciendo presencia del poder oxidante aportado por FAD. Se observa que sin el aporte de FAD la cantidad de sustrato apenas varía.

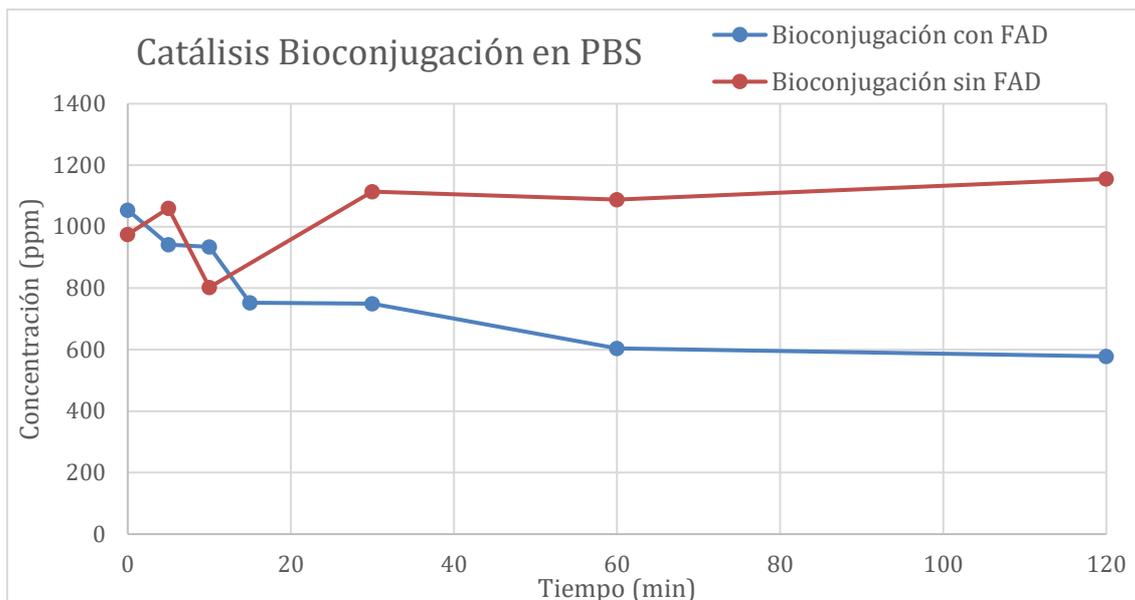


Figura 6. Catálisis bioconjugación en PBS

Lógicamente, la enzima libre muestra mayor actividad que la enzima bioconjugada, tal como se deduce de la mayor velocidad de eliminación de sustrato con el tiempo. En el caso del control negativo se observa cómo se esperaba que no hay una disminución reseñable del sustrato.

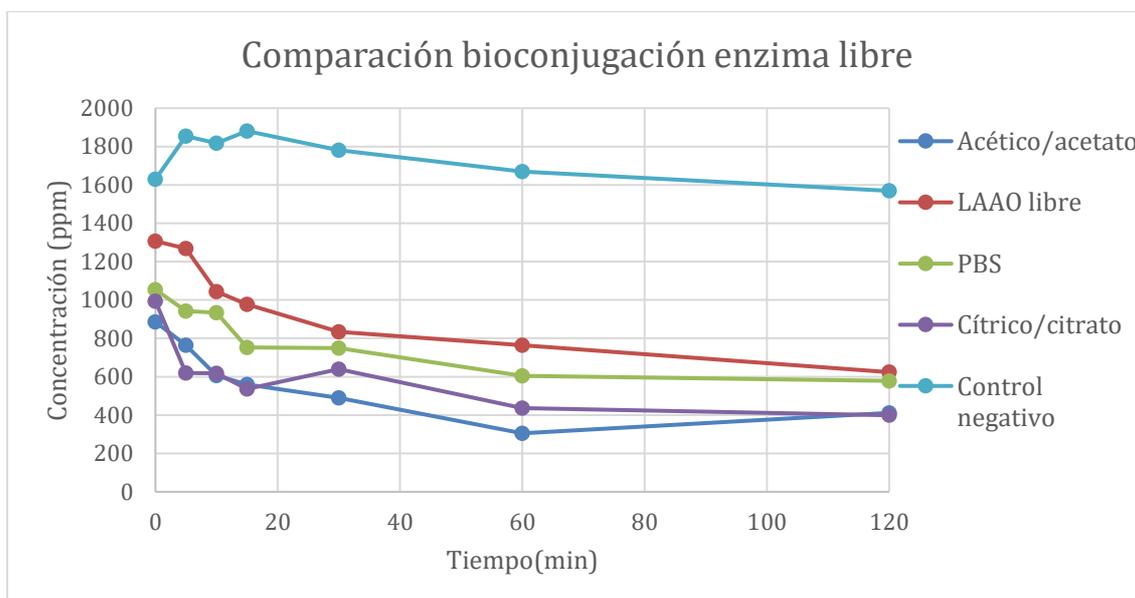


Figura 7. Comparación de actividades

Tras obtener estos resultados favorables se procedió a calcular los parámetros cinéticos propios de la cinética enzimática de Michaelis-Menten: velocidad máxima, constante de afinidad de Michaelis-Menten y el número de recambio para cada uno de los estudios enzimáticos.

Tabla 4. Constantes cinéticas

Muestra	Km (ppm)	Vmax (ppm/min)	Kcat (min <sup>-1</sup> )
LAAO libre	5,614	0,021	1,651 · 10 <sup>-5</sup>
PBS	5,715	0,022	2,129 · 10 <sup>-5</sup>
Acético/acetato	11,107	0,098	1,120 · 10 <sup>-4</sup>
Cítrico/citrato	13,174	0,186	1,878 · 10 <sup>-4</sup>

La constante de Michaelis-Menten muestra la afinidad de la enzima por un sustrato, cuanto menor es el valor, mayor es la afinidad<sup>11</sup>. En este caso la menor constante es la de la enzima libre por lo que es la más afín al ácido glutámico.

## 5. Parte experimental. Técnicas y equipos utilizados

### 5.1. Materiales y métodos

#### 5.1.1. Reactivos

Tabla 5.1.. Reactivos (I)

Reactivos	Casa comercial	Características
L-Aminoácido oxidasa <i>Crotalus adamanteus</i>	Sigma-Aldrich	≥4,0 Unidades/mg proteína; Suspensión acuosa; 0,7 mL; 7,2 mg proteína/mL; 7,8 unidades/mg proteína; Solubilidad en agua: 1,0 mg/mL; Concentración: ≥5 mg/mL
Tampón salino de fosfato <i>Phosphate-Buffered Saline (PBS)</i>	Gibco	Formato en pastilla, pH 7,2-7,6
Ácido cloroplátnico	Sigma-Aldrich	MW: 409,81 g/mol; Densidad: 1,05 g/mL
Ácido ascórbico	Sigma-Aldrich	MW: 176,12 g/mol, pH:1,0-2,5; formato en polvo
Pluronic F-127	Sigma Life Science	Concentración micelar crítica: 950-1000 ppm Formato: Polvo
L- Ácido Aspártico	European Pharmacopoeia	MW:133,1 g/mol
L-Ácido Glutámico	Sigma-Aldrich	MW:147,13 g/mol; mp:205°C
Flavín adenín dinucleótido (FAD)	Sigma- Aldrich	MW:829,51 g/mol
Ácido Acético	Sigma-Aldrich	MW 60,05 g/mol; 99-100 %

Tabla 6.2.. Reactivos (II)

Reactivos	Casa comercial	Características
Acetato de sodio trihidrato	PRS Panreac	MW: 136,08 g/mol
Ácido Cítrico	Sigma-Aldrich	192,12 g/mol; mp: 153-159 °C; ≥99,5 %
Citrato de sodio	Sigma-Aldrich	MW: 294,10 g/mol
Ácido Clorhídrico (HCl)	VWR chemicals BDH	37 %; Densidad 1,18 kg/l; 36,46 g/mol
Ácido nítrico (HNO <sub>3</sub> )	VWR chemicals BDH	65 %, Densidad 1,40 Kg/l; 63,01 g/mol
Lactulosa	European Pharmacopoeia	MW: 342,30 g/mol
Acetonitrilo	VWR chemicals BDH	Filtrado con filtros de 0.2 μm con nitrógeno; Densidad: 0,78 kg/l; ≥99.9 %

### 5.1.2. Equipos

Tabla 7.1. Equipos (I)

Equipos	Casa comercial	Características	Uso
Centrífuga Falcon	Thermo Fisher Scientific	Velocidad máxima: 15200 rpm; Frecuencia: 60 Hz	Centrifugación y lavado de nanopartículas.
Centrífuga Eppendorf	IBX instruments MC15K series	Velocidad máxima: 15000 rpm; Exactitud: ±20 rpm	Centrifugación y lavado de bioconjugación.
HPLC (detector PDA, detector QDa, Quaternary Solvent Manager)	Waters Acquity UPLC class	Frecuencia de datos: 80 Hz; Longitud de onda: 190 a 500 nm; Presión máxima: 15000 psi	Medida y análisis de las catálisis. Determinación cuantitativa de metabolitos
Columna HPLC	Waters	BEH Amide 1,7 μm; 2.1 x 100 mm; Rango de temperatura: 4°C a 90°C	Medida y análisis de las catálisis.

Tabla 8.2. Equipos (II)

Equipos	Casa comercial	Características	Uso
Medidor de pH	Mettler Toledo	Intervalo de medición de pH: -2 a 20; Exactitud de pH: $\pm 0,002$	Medida del pH de los <i>buffers</i> .
UV-VIS	Shimadzu Modelo: UV-2600i	Rango de medida: 220 a 1400 nm	Medida concentración de enzima libre.
Fluorímetro	Perkin Elmer LS 55	Rango de excitación: 200-800 nm; Rango de emisión: 200-900 nm; Reproducibilidad: $\pm 0,5$ nm	Medida de concentración de enzima libre.
BCA Protein Assay Kit (Ensayo de ácido bicinónico)	Thermo Fisher Scientific	Rango de medida: 20 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ ; Absorbancia: 562 nm	Medida de concentración de enzima libre.
Balanza	Radwag	Max: 5 g; Min: 0,1 mg; $d=1 \mu\text{g}$ ; $e=1 \text{ mg}$ ; T-5 g	Medida del peso por diferencia de la síntesis de nanopartículas.
Analizador por dispersión dinámica de la luz (DLS)	Brookhaven Instruments Corporation	Modelo: 90 Plus Particle Size Analyzer; Rango 0,3 nm-6 $\mu\text{m}$	Medida del tamaño y del potencial Z de las nanopartículas. Medida del punto isoeléctrico de la enzima.
Estufa	Memmert	Rango de temperatura: $+18^{\circ}\text{C}$ - $50^{\circ}\text{C}$ ; Precisión: 0,1	Secado de muestra y acondicionamiento de la catálisis.
Thermo-Shaker	Biosan	Rango de temperatura: $+4^{\circ}\text{C}$ - $100^{\circ}\text{C}$ ; $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$	Acondicionamiento de las catálisis.

### 5.1.3. Protocolos

#### 5.1.3.1. Protocolo síntesis de nanopartículas

Se preparan tres botes de cristal de 15 mL para realizar la síntesis simultánea de tres lotes de nanopartículas en paralelo. Los botes de cristal han de ser nuevos para evitar la

nucleación de las nanopartículas entorno a restos de otras sustancias presentes en el bote. Se coge un tubo Falcon de 15 mL y se pesan 40 mg de Pluronic F-127 por cada síntesis. El Pluronic F-127 es el polímero que se utiliza en esta síntesis, sirve como centro de nucleación de las nanopartículas. De cara a la preparación de tres síntesis simultáneamente, se pesan 120 mg que se disuelven en 10,5 mL de agua miliQ.

Se toma un segundo tubo Falcon donde se pesan 70 mg de ácido ascórbico por cada síntesis de nanopartículas (210 mg en total). Se disuelven en 2 mL de agua miliQ por síntesis, 6 mL de nanopartículas en total por cada bote de síntesis. Se sonicen tanto la disolución de ácido ascórbico como la de Pluronic F-127 evitando la formación de burbujas, hasta que completa su disolución.

En los botes previamente preparados de vidrio se añaden primero 3,5 mL del polímero Pluronic F-127. A continuación, se añaden 500 µL del precursor de platino, ácido cloroplatínico manteniendo los recipientes directamente de la nevera. Por último, se añaden 2 mL de ácido ascórbico que actúa como agente reductor en la síntesis.

El volumen final de la síntesis es de 6 mL por bote. Se sonica la mezcla de reacción durante un instante y se guarda de modo que no tenga contacto con la luz solar. Se deja incubando hasta que el medio de reacción se torne desde un color amarillo a un color negro oscuro, evidenciando que se ha producido la correcta formación de las nanopartículas. El tiempo aproximado de síntesis es de 2 días hasta la obtención de las nanopartículas. De cara a controlar adecuadamente el tamaño de partícula, es necesario evitar tiempos de incubación demasiado largo que producirían nanopartículas de un tamaño demasiado grande. El tamaño de las nanopartículas ha de estar en torno a 70 µm.

Una vez se ha producido el cambio de color se procede a lavar las nanopartículas. Se transfieren del bote de vidrio a un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugan a 7000 rpm durante 10 minutos. Una vez centrifugadas se retira el sobrenadante y se añaden 10 mL de agua miliQ al *pellet*. Se vuelve a centrifugar a 7000 rpm durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 1 mL de agua miliQ y se transfiere a un Eppendorf de 1 mL.

Tras esto, se procede a calcular la concentración de nanopartículas en la síntesis. Este cálculo se realiza por gravimetría. Se taran previamente unos recipientes metálicos y se apuntan sus masas. El cálculo se realiza por duplicado, de forma que de una misma síntesis se añaden respectivamente 25 µl y 50 µl en diferentes recipientes tarados. Se introducen los recipientes en la estufa a 100 °C y se dejan hasta el día siguiente. Una vez se ha evaporado el disolvente en el que se encontraban las nanopartículas se vuelve a realizar el pesado en balanza analítica. Al realizar la resta entre el pocillo inicial y el final y dividiendo entre el volumen que añadimos de disolución, se obtiene la concentración la síntesis de las nanopartículas. Se calcula la media entre ambas medidas.

#### 5.1.3.2. Protocolo bioconjugación de nanopartículas

En la bioconjugación unimos las nanopartículas previamente sintetizadas con la enzima en este caso L-amino oxidasa. La unión se produce por adsorción debido a que la enzima tiene carga positiva mientras que las nanopartículas están cargadas negativamente al pH de trabajo.

Se realizan experimentos, el primero a pH 7,4 con tampón fosfato (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS), por ser este el pH fisiológico. El segundo a pH 4,5 (por debajo del punto isoelectrónico de la enzima) de modo que la carga global será negativa, empleando un

tampón ácido acético/acetato. El último de los experimentos será un control negativo al cual no se le habrá añadido enzima.

La concentración de las nanopartículas empleadas en el ensayo será 0,5 mg/mL y la de la enzima 0,5 mg/mL en un volumen total de 2 mL. Con la concentración de nanopartículas calculada previamente, se sabe el volumen de nanopartículas que hay que añadir para tener esa concentración.

Se añade el volumen calculado de nanopartículas y el de enzima en cada uno de los *buffers* y se deja durante un día entero en agitación y en una estufa a 37°C.

Una vez se ha producido la bioconjugación se lleva la muestra a la centrífuga. Se centrifugan cada una de las muestras a 8000 rpm durante 10 minutos. De este modo se separa el sobrenadante del *pellet*. Se guarda el sobrenadante obtenido para realizar experimentos posteriormente y se procede a lavar el *pellet*. Se realizan dos lavados de los cuales se guardará también el sobrenadante. Finalmente, se resuspende el *pellet* en agua miliQ y se guardan estas muestras en la nevera. En el sobrenadante tendremos la enzima no retenida mientras que en el *pellet* tendremos el bioconjugado.

#### 5.1.3.3. Protocolo de toma de muestra

La actividad de la enzima se mide siguiendo la cinética de esta respecto a dos aminoácidos, en este caso aspártico y glutámico. La reacción se prepara en un Eppendorf, uno para el aspártico y otro para el glutámico, se añaden 200 µL de aminoácido a concentración 5000 ppm y 780 µL de PBS. La reacción se va a llevar a cabo a temperatura controlada de 37 °C y con agitación.

La catálisis se realiza en un transcurso de 24 horas cogiendo los siguientes tiempos: 0 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 150 minutos, 240 minutos, 360 minutos y 24 horas. Se prepara un Eppendorf para cada tiempo añadiendo 980 µL de una disolución 20:1 de agua: ácido clorhídrico. El ácido clorhídrico es necesario para desnaturalizar la enzima y parar la reacción.

Antes de añadir la enzima se toma una muestra que corresponde al tiempo 0 de la reacción. Después se añaden 20 µL de la enzima LAAO a concentración 0,1 mg/mL y se comienza a contar el tiempo. Por cada tiempo se cogen 20 µL de muestra y se vierten en un Eppendorf parando así la reacción al tiempo indicado. Para la medida de las muestras es necesario preparar una recta de calibrado siguiendo el protocolo de medida por UPLC del anexo 8.10.

Después es necesario filtrar las muestras con un filtro de nylon de 0.22 micras para evitar la entrada de partículas sólidas en el HPLC, se transfieren las muestras a viales para poder analizarlas en el HPLC.

## 5.2. **Resultados experimentales**

### 5.2.1. Caracterización de la enzima

En primer lugar, es necesario establecer las características óptimas de la enzima a utilizar, en este caso LAAO. Para ello se realizaron una serie de experimentos para determinar los parámetros más favorables para bioconjuguar la enzima.

### 5.2.1.1. Medida del punto isoeléctrico (pI) de la enzima por DLS

Se prepararon 6 muestras de enzima a concentración 0,1 mg/mL, cada muestra a un pH distinto. Se utilizaron *buffer* de ácido acético/acetato a 0,01 M a pH 3'94, 4'49 y 4'96. *Buffer* de ácido cítrico/citrato a 0,01 M a pH 5,60 y 6,33 y *buffer* PBS a 0,01 M para el pH 7,6.

Tabla 9. Medida del punto isoeléctrico

pH	pI experimento 1	pI experimento 2	pI experimento 3	pI experimento 4
3,94	11,357	15,808	10,308	7,470
4,49	11,850	3,600	8,852	5,736
4,96	9,494	4,895	6,154	4,334
5,60	-3,040	-5,320	-6,924	-8,174
6,33	-6,115	-6,200	-8,726	-15,058
7,60	-5,384	-8,233	-11,446	-15,166

El valor del pH que se obtiene en los 4 experimentos se encuentra en torno a 5, el punto isoeléctrico de la enzima es 6,01 teóricamente por ello el pH que se utilizará para realizar una de las bioconjugaciones será por debajo de estos valores para que la enzima tenga carga positiva. Se ha calculado el valor medio de los cuatro experimentos obteniendo un punto isoeléctrico aproximado de la proteína de 5,252.

## 5.2.2. Catálisis preliminares con la enzima

La catálisis se realiza siguiendo los pasos del protocolo de catálisis explicado previamente en el punto 5.1.3.3. Antes de llegar a las cantidades presentadas en el protocolo se hicieron varios experimentos variando las condiciones hasta llegar a las óptimas. Los resultados de estas catálisis preliminares se pueden consultar en el anexo 8.9.

Tabla 10. Condiciones catálisis previas

<b>Código de experimento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Concentración de enzima</b>	<b>Concentración aminoácidos (Aspártico o glutámico)</b>	<b>Volumen</b>	<b>Disolvente H<sub>2</sub>O: HCl</b>
Experimento 1	37°C en estufa	0,2 mg/mL a partir de un stock de 5 mg/ml	1000 ppm a partir de un stock de 5000 ppm	300 µL PBS VT= 0,5 mL	1000:5
Experimento 2	37°C en estufa	0,2 mg/mL a partir de un stock de 5 mg/ml	200 ppm a partir de un stock de 1000 ppm	600 µL PBS VT= 1 mL	1000:5
Experimento 3	37°C en estufa	0,2 mg/mL a partir de un stock de 5 mg/ml	200 ppm a partir de un stock de 1000 ppm	600 µL PBS VT= 1 mL	1000:5
Experimento 4	37°C en Estufa	0,1 mg/mL a partir de un stock de 10 mg/ml	1000 ppm a partir de un stock de 5000 ppm	790 µL PBS VT= 1 mL	20:1
Experimento 5	37°C en Thermo-Shaker	0,1 mg/mL a partir de un stock de 10 mg/ml	1000 ppm a partir de un stock de 5000 ppm	100 µL PBS + 250 µL FAD (5mM) VT= 0,5 mL	20:1

### 5.2.3. Bioconjugación

Las bioconjugaciones se realizaron en las siguientes condiciones de temperatura y pH.

Tabla 11. Parámetros bioconjugación

Número de bioconjugación	Temperatura	pH	Buffer	Volumen total (mL)	Concentración Nanopartículas (mg/mL)
Bioconjugación 1	37°C en estufa	4'5 y 7'4	Acético/Acetato y PBS	2	8,77
Bioconjugación 2	37°C en estufa	4 y 7'4	Acético/Acetato, Cítrico/citrato y PBS	2	8,77

### 5.2.4. Estudios sobre la bioconjugación

#### 5.2.4.1. Medida de la concentración de la cantidad de enzima unida

A continuación, se muestran los valores de enzima unida a las nanopartículas obtenidos mediante fluorimetría, espectrometría UV-VIS y colorimetría con ácido bicinónico.

Tabla 12. Estudio de la cantidad de enzima unida en la bioconjugación 1

Número de bioconjugación	Código de muestra	Nombre de muestra	UV-VIS (mg/mL)	Fluorimetría (mg/mL)	BCA (mg/mL)
1	1	Stock enzima inicial	1,047	1,047	1,047
	2	Sobrenadante pH=7'4 PBS	1,004	0,790	0,570
	3	Sobrenadante pH=4'5 Acético/acetato	0,903	0,608	0,557
	4	Sobrenadante Control negativo	0,017	-0,047	-0,004
	5	Lavado pH=7'4 PBS	0,045	-0,032	0,019
	6	Lavado pH=4'5 Acético/acetato	0,045	-0,034	0,018
	7	Lavado Control negativo	-0,034	-0,053	-0,007

Tabla 13. Estudio de la cantidad de enzima unida en la bioconjugación 2

Número de bioconjugación	Código de muestra	Nombre de muestra	UV-VIS (mg/mL)	Fluorimetría (mg/mL)	BCA (mg/mL)
2	8	Stock enzima inicial	0,556	0,591	0,572
	9	Sobrenadante pH=7'4 PBS	0,444	0,505	0,416
	10	Sobrenadante pH=4 Acético/acetato	0,340	0,535	0,376
	11	Sobrenadante pH=4 Cítrico/citrato	0,271	0,508	0,395
	12	Sobrenadante Control negativo	-0,103	0,075	0,020
	13	Lavado pH=7'4 PBS	-0,059	0,058	0,022
	14	Lavado pH=4 Acético/acetato	-0,053	0,053	0,037
	15	Lavado pH=4 Cítrico/citrato	-0,069	0,068	0,039
	16	Lavado Control negativo	0,051	0,051	0,018

#### 5.2.4.2. Medida del tamaño y potencial Z del bioconjugado

Previamente se había realizado un estudio del tamaño de las nanopartículas sin bioconjugar por DLS y por TEM. Las nanopartículas utilizadas en la bioconjugación tenían un tamaño de 193,6 nm. Una vez realizada la bioconjugación se realizaron medidas por DLS de las nanopartículas bioconjugadas a los distintos *buffers* de trabajo.

Tabla 14. Estudio del tamaño y potencial Z bioconjugación 1

Nanopartículas	Síntesis 5 (nm)	Control negativo (nm)	pH=7,4 (nm)	pH=4,5 (nm)
1	202,2	1332,9	2711,7	1115,6
2	198,8	1136,9	3771,6	4060,8
3	191,3	2064,2	2004,8	2287,8
4	189,1	3230,2	4157,9	3619,8
5	186,8	417,9	1006,4	2733,5
<b>Media tamaño</b>	193,6	1941,1	2730,5	2763,5
1	-23,1	-40,8	-25,5	-25,4
2	-26,7	-38,0	-31,6	-25,2
3	-30,0	-43,4	-32,8	-23,7
4	-32,8	-41,4	-32,9	-24,9
5	-29,9	-41,0	-31,4	-26,4
<b>Media potencial z</b>	-28,5	-40,9	-30,8	-25,1

Tabla 15.1. Estudio del tamaño bioconjugación 2

NPs	Síntesis 5 (nm)	Control negativo (nm)	pH=7,4 (nm)	Acetato/Acético (nm)	Citrato/Cítrico (nm)
1	202,2	1122,6	252,7	400,9	2223,9
2	198,8	564,3	266,1	372,8	2416,2
3	191,3	392,6	281,3	463,6	1157,7
4	189,1	649,5	309,6	385,1	742,4
5	186,8	433,6	316,5	371,4	603,8
<b>Media tamaño</b>	193,6	632,5	285,2	398,8	1428,8

Tabla 15.2. Estudio del potencial Z bioconjugación 2

NPs	Síntesis 5 (nm)	Control negativo (nm)	pH=7,4 (nm)	Acético/Acetato (nm)	Citrato/Cítrico (nm)
1	-23,1	-22,0	5,8	-1,1	-3,9
2	-26,7	-21,9	4,1	0,3	-2,2
3	-30,0	-24,3	2,6	0,6	-1,0
4	-32,8	-23,0	4,0	-0,6	-5,5
5	-29,9	-22,7	3,1	-0,2	-5,3
<b>Media potencial z</b>	-28,5	-22,8	3,9	-0,2	-3,6

Cada medida se realiza 5 veces y se obtiene el resultado final mediante la media de esos 5 resultados.

En la primera bioconjugación se obtienen tamaños de partícula demasiado grandes, mientras que en la segunda bioconjugación todas las partículas tienen tamaños razonables excepto en el caso de las partículas bioconjugadas en *buffer* cítrico/citrato, que como ya se ha explicado previamente puede ser debido a su capacidad reductora que afecta a las nanopartículas.

Del mismo modo en la segunda bioconjugación se aprecia un aumento del potencial Z lo que indica que la nanopartícula se ha recubierto con la enzima que está cargada positivamente.

#### 5.2.5. Estudio cinético del bioconjugado

El estudio cinético del bioconjugado se realizó en las siguientes condiciones obtenidas mediante la experimentación en las catálisis previas, donde se alcanzaron las condiciones óptimas de reacción. Se realizaron experimento en ausencia y en presencia de FAD para comprobar cómo afecta el aporte de electrones del cofactor FAD a la cinética de la reacción.

Tabla 16. Condiciones del estudio cinético de la bioconjugación 1

Número de bioconjugación	Condiciones generales	Código de experimento	Nombre de muestra
Bioconjugación 1	Temperatura: 37°C en estufa V <sub>t</sub> =1 ml Disolvente 1000 µl H <sub>2</sub> O en 5 µl de HCl Concentración de aminoácido (aspártico/glutámico) 200 ppm a partir de un stock de 1000 ppm Concentración enzima: 0,1 mg/ml	1.1	Control negativo
		1.2	Bioconjugado con PBS a pH=7,4
		1.3	Bioconjugado con ácido acético a pH=4,5
		1.4	Enzima libre LAAO
		1.5	Bioconjugado con PBS a pH=7,4 con FAD
		1.6	Bioconjugado con ácido acético a pH=4,5 con FAD
		1.7	Enzima libre LAAO con FAD
Bioconjugación 2	Temperatura: 37°C en Thermo-Shaker V <sub>t</sub> =500 µL Disolvente 20 ml H <sub>2</sub> O en 1 ml de HCl Concentración enzima: 0,1 mg/ml Concentración de aminoácido (glutámico) 1000 ppm a partir de un stock de 5000 ppm	2.1	Control negativo
		2.2	Bioconjugado con PBS a pH=7,4
		2.3	Bioconjugado con ácido acético a pH=4,5
		2.4	Bioconjugado con ácido cítrico a pH=4,5
		2.5	Enzima libre LAAO
		2.6	Bioconjugado con PBS a pH=7,4 con FAD
		2.7	Bioconjugado con ácido acético a pH=4,5 con FAD
		2.8	Bioconjugado con ácido cítrico a pH=4,5 con FAD
		2.9	Enzima libre LAAO con FAD

## 6. Conclusiones

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado era el de desarrollar nuevos materiales nanoestructurados capaces de combinar la especificidad enzimática y la selectividad con el comportamiento de las nanopartículas como nanozimas. Por este motivo a lo largo de la experimentación se ha llegado a las siguientes conclusiones.

Se ha optimizado un protocolo de síntesis para obtener nanopartículas basadas en platino, buscando la reproducibilidad mediante el estudio de las variables: Temperatura, tiempo de síntesis y recipiente de síntesis, obteniéndose, de este modo nanopartículas útiles para su uso en bioconjugaciones posteriores y de tamaño adecuado para el estudio.

Se ha realizado un estudio completo de caracterización de la enzima teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- Punto isoeléctrico: 5,25
- Fluorescencia: Longitud de onda de excitación 380 nm y slit de 7,5.
- Dependencia al pH
- Capacidad catalítica

Se han desarrollado protocolos de análisis y técnicas instrumentales dirigidas al desarrollo de este trabajo. A saber, fluorimetría, espectrometría UV-VIS, colorimetría con ácido bicinónico, cromatografía de alta resolución y medida de dispersión dinámica de la luz y se han obtenido calibrados de las técnicas mencionadas.

Se ha desarrollado una técnica de análisis basada en cromatografía de alta resolución (UPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) que ha permitido realizar el seguimiento de los aminoácidos implicados.

Se han optimizado las condiciones de bioconjugación de las nanopartículas sintetizadas con la enzima estudiada LAAO, obteniendo como resultado que la bioconjugación a pH 7,4 en *buffer* PBS es la más afín al sustrato. Del mismo modo también se ha demostrado la importancia del cofactor FAD con su aporte de electrones en la reacción, obteniendo así mejores resultados catalíticos en presencia de FAD. También es digno de mencionar las propiedades agregantes del *buffer* de ácido cítrico/citrato, que provocaban la precipitación de las nanopartículas dificultando su bioconjugación y posterior estudio cinético.

En el transcurso de este trabajo también se han adquirido hábitos y disciplina propias del trabajo en el laboratorio, incluyendo la búsqueda bibliográfica de información, la discusión y crítica de resultados y conclusiones, el trabajo en equipo y la presentación y defensa de resultados.

Este trabajo se ha centrado en los primeros pasos de una investigación más grande del estudio de terapias alternativas contra el cáncer, la cual tiene todavía mucho camino por recorrer.

## 7. Bibliografía

- (1) Nikodijevic, D. D.; Jovankic, J. V.; Cvetkovic, D. M.; Andelkovic, M. Z.; Nikezic, A. G.; Milutinovic, M. G. L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 2021, 910, 9, Article. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174466.
- (2) Tan, K. K.; Bay, B. H.; Gopalakrishnakone, P. L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. *Toxicon* 2018, 144, 7-13. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.01.015.
- (3) Chen, W.; Zhang, J. Photodynamic therapy for treating cancers, by providing luminescent nanoparticle and photosensitizer, and an excitation source capable of exciting the luminescent nanoparticle to excite the photosensitizer for photodynamic therapy. US2007218049-A1.
- (4) Pollegioni, L.; Motta, P.; Molla, G. l-Amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013, 97 (21), 9323-9341, Review. DOI: 10.1007/s00253-013-5230-1.
- (5) Garcia-Bermudez, J.; Baudrier, L.; La, K.; Zhu, X. G.; Fidelin, J.; Sviderskiy, V. O.; Papagiannakopoulos, T.; Molina, H.; Snuderl, M.; Lewis, C. A.; et al. Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nature Cell Biology* 2018, 20 (7), 775-+, Article. DOI: 10.1038/s41556-018-0118-z.
- (6) Werengowska-Cieciewicz, K.; Wisniewski, M.; Terzyk, A. P.; Furmaniak, S. The Chemistry of Bioconjugation in Nanoparticles-Based Drug Delivery System. *Advances in Condensed Matter Physics* 2015, 2015, 27, Review. DOI: 10.1155/2015/198175.
- (7) Ge, J.; Yang, C.; Zhu, J. Y.; Lu, D. A. N.; Liu, Z. Nanobiocatalysis in Organic Media: Opportunities for Enzymes in Nanostructures. *Topics in Catalysis* 2012, 55 (16-18), 1070-1080. DOI: 10.1007/s11244-012-9906-z.
- (8) Kim, J. B.; Grate, J. W.; Wang, P. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology* 2008, 26 (11), 639-646. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.07.009.
- (9) Walper, S. A.; Turner, K. B.; Medintz, I. L. Enzymatic bioconjugation of nanoparticles: developing specificity and control. *Current Opinion in Biotechnology* 2015, 34, 232-241, Review. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.04.003.
- (10) ExpASy. [https://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool1?X2JCV5@noft@average](https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool1?X2JCV5@noft@average) (accessed Jun 17, 2022).
- (11) Enzimas. Cinética enzimática. <https://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz3.htm> (accessed Jun 20, 2022).