



LIPASA PANCREÁTICA EN MEDIOS NO
CONVENCIONALES:
CARACTERIZACIÓN Y POSIBLES
APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER REALIZADO POR:
RAÚL MARTÍNEZ BAQUERO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y
BIOINGENIERÍA
2022/2023
(UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE)

TUTORA: DRA. CARMEN REYES MATEO MARTÍNEZ
COTUTORA: DRA. MARIA JOSÉ MARTÍNEZ TOMÉ

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA SANITARIA DE ELCHE

DEPARTAMENTO DE AGROQUÍMICA
Y MEDIO AMBIENTE

ÁREA DE QUÍMICA – FÍSICA

Dña Carmen Reyes Mateo Martínez, Catedrática del área de Química Física del Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“LIPASA PANCREÁTICA EN MEDIOS NO CONVENCIONALES: CARACTERIZACIÓN Y POSIBLES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

RAÚL MARTÍNEZ BAQUERO

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 20 de junio de 2023

Fdo: Firmado por CARMEN REYES MATEO MARTINEZ -
NIF:05383200G el día 20/06/2023 con un
certificado emitido por ACCVCA-120 ACCV

Resumen

El agua es el medio natural de las biomoléculas. Sin embargo, la incorporación de proteínas en medios no naturales ofrece interesantes ventajas para el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas. Entre estos medios no convencionales se encuentran los disolventes eutécticos profundos (DES) o los entornos confinados, donde las biomoléculas quedan retenidas en poros de tamaño nanométrico.

Comprender la estructura, estabilidad térmica y función de las biomoléculas en estos entornos es esencial para optimizar sus posibles aplicaciones. En el presente trabajo se ha estudiado el comportamiento de la enzima lipasa pancreática en tres tipos de DES y en un hidrogel basado en acrilato. Para ello se investigó la estabilidad conformacional de la enzima, a partir de su fluorescencia intrínseca, y se exploró su actividad catalítica, mediante ensayos colorimétricos. Así mismo, se llevó a cabo la inhibición de la actividad usando el fármaco comercial Orlistat para estudiar la generación de un sistema que permita el cribado de fármacos dirigidos al tratamiento de la obesidad.

Los resultados muestran que combinaciones de DES y agua son capaces de aumentar hasta 2.5 veces la capacidad catalítica de la enzima además de estabilizarla térmicamente. Por otro lado, la inmovilización en el hidrogel facilita la manipulación y almacenamiento de la enzima y permite la detección de inhibidores.

Palabras clave

Lipasa Pancreática (PL), Disolventes eutécticos profundos (DES), Hidrogeles basados en acrilato, Estabilidad conformacional y actividad catalítica de PL, Orlistat

Summary

Water is the natural medium for biomolecules. However, the incorporation of proteins in non-natural media offers interesting advantages for the development of new biotechnological applications. Among these unconventional media are deep eutectic solvents (DES) or confined environments, where biomolecules are retained in nanometer-sized pores.

Understanding the structure, thermal stability, and function of biomolecules in these environments is essential to optimize their potential applications. In the present work, the behavior of pancreatic lipase enzyme in three types of DES and in an acrylate-based hydrogel was studied. For this purpose, the conformational stability of the enzyme was investigated, based on its intrinsic fluorescence, and its catalytic activity was explored by means of colorimetric assays. Inhibition of the activity was also carried out using the commercial drug Orlistat to study the generation of a system that allows the screening of drugs for the treatment of obesity.

The results show that combinations of DES and water can increase up to 2.5 times the catalytic capacity of the enzyme in addition to thermally stabilizing it. On the other hand, immobilization in the hydrogel facilitates the handling and storage of the enzyme and allows the detection of inhibitors.

Keywords

Pancreatic Lipase (PL), Deep Eutectic Solvents (DES), Acrylate-based Hydrogels, Conformational stability and catalytic activity of PL, Orlistat

Índice

Resumen.....	5
Palabras clave.....	5
Summary.....	6
Keywords.....	6
Índice.....	7
1. Introducción y antecedentes.....	9
1.1 La lipasa pancreática.....	9
1.2 Aplicaciones de las lipasas.....	13
1.2.1 Aplicaciones industriales.....	13
1.2.2 Búsqueda de inhibidores para el tratamiento de la obesidad.....	15
1.3 Medios no convencionales para biomoléculas.....	17
1.3.1 Disolventes eutécticos profundos (DES).....	17
1.3.2 Hidrogeles.....	21
2. Objetivos.....	23
3. Procedimiento experimental.....	25
3.1 Materiales.....	25
3.1.1 Reactivos químicos.....	25
3.1.2 Reactivos para la preparación de DES.....	25
3.1.3 Reactivos para la preparación de hidrogeles.....	25
3.1.4 Tampones.....	26
3.1.5 Disolventes.....	26
3.1.6 Kit para la cuantificación de [PPL].....	26
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Métodos de preparación.....	27
3.2.2 Métodos de caracterización.....	29
4. Resultados y Discusión.....	33
4.1 Estabilidad conformacional de la PPL en diferentes medios.....	33
4.1.1 Tampón.....	33
4.1.2 DES.....	36
4.1.3 Hidrogel.....	38
4.2 Actividad catalítica de la PPL en diferentes medios.....	40
4.2.1 Tampón.....	40
4.2.2 DES.....	41
4.2.3 Hidrogel.....	48
4.3 Estudios de inhibición de la PPL en diferentes medios.....	50
4.3.1 Tampón.....	50
4.3.2 DES.....	52
4.3.3 Hidrogel.....	53
5. Conclusiones y Perspectivas futuras.....	55
Bibliografía.....	57

1. Introducción y antecedentes

1.1 La lipasa pancreática

Las lipasas (E.C.3.1.) son enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas, más precisamente a la clase de las esterasas. A nivel fisiológico, juegan un papel importante en la digestión, absorción y metabolismo de los lípidos en el cuerpo humano y otros organismos. Además, poseen un gran potencial a nivel industrial, actuando como biocatalizadores en la síntesis y transformación de numerosos compuestos orgánicos.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, no solo en microorganismos y plantas, sino también en diversos tejidos y fluidos corporales. En el cuerpo humano, está presente principalmente en el páncreas, el intestino delgado, las glándulas salivales y el tejido adiposo entre otros. Su función es catalizar la hidrólisis de los enlaces éster presentes en sustratos tales como triglicéridos, fosfolípidos o ésteres de colesterol, descomponiéndolos en ácidos grasos y glicerol. Su especificidad de sustrato varía dependiendo de la lipasa en particular.

La reacción de hidrólisis sigue un mecanismo conocido como reacción enzimática de acilo que implica la formación de intermediarios tetraédricos (figura 1.1). El centro activo presenta un residuo de serina que es activado por la transferencia de un protón desde un residuo de aspartato y de histidina, provocando que el hidroxilo de la serina sea altamente nucleofílico. Estos tres residuos Asp-His-Ser conforman la triada catalítica de las lipasas.¹

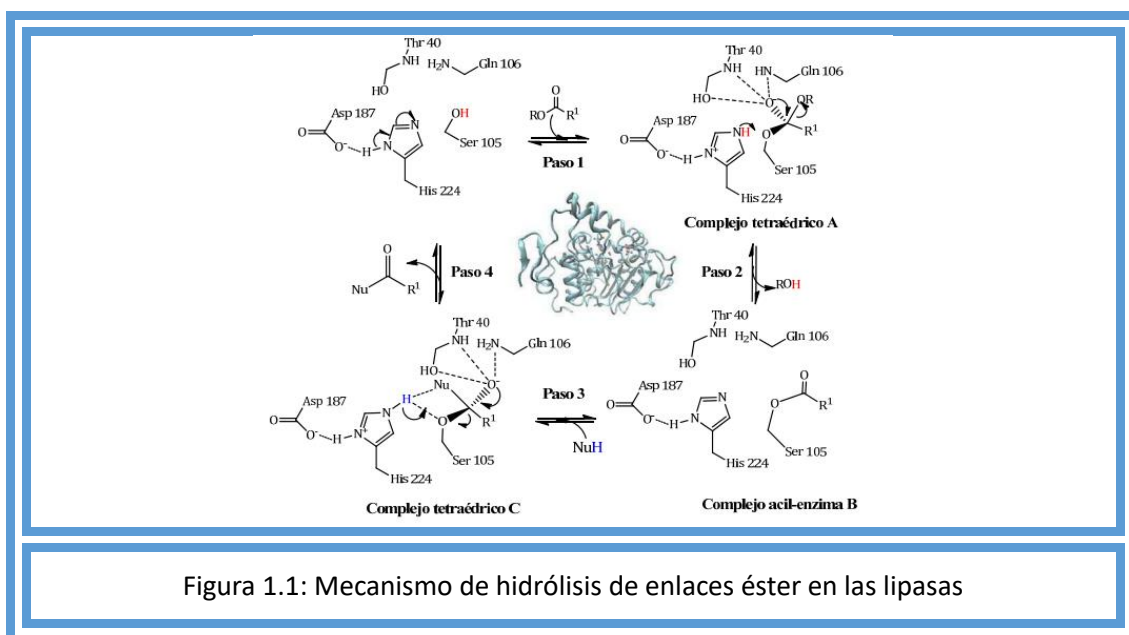


Figura 1.1: Mecanismo de hidrólisis de enlaces éster en las lipasas

Como se ha comentado anteriormente, las lipasas son esenciales para que se lleve a cabo de forma eficiente la digestión, absorción y metabolismo de los lípidos dietarios. En este proceso

complejo intervienen diversas lipasas, siendo una de las principales la lipasa pancreática (EC 3.1.1.3), cuya función permite la absorción de grasas y aceites en el intestino delgado para que el cuerpo pueda utilizar estos nutrientes.²

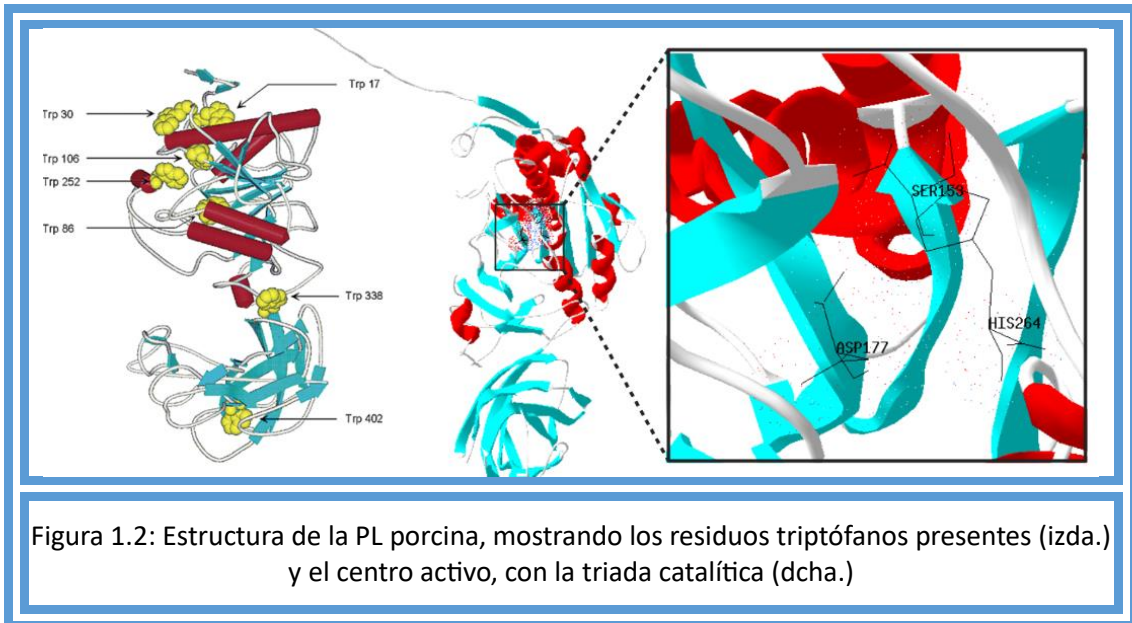
La lipasa pancreática (PL) se encuentra en la superficie de los enterocitos, las células que recubren el intestino delgado. Esta, se adhiere a la superficie de las gotas de lípidos y comienza a hidrolizar los enlaces éster de los triglicéridos, convirtiéndolos en ácidos grasos y monoglicéridos. Estos productos luego se transportan a través de la mucosa intestinal, se vuelven a esterificar en las células epiteliales intestinales, se empaquetan en quilomicrones y se transportan más hacia el torrente sanguíneo a través del sistema linfático.

La PL es soluble en agua y tiene una alta especificidad de sustrato, hidrolizando fundamentalmente ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Una de sus características principales es que no presenta casi actividad en medio acuoso si su sustrato natural está en estado monomérico. Sin embargo, cuando este se encuentra a una concentración por encima de su solubilidad y empieza a formar emulsiones, la lipasa aumenta su actividad. Esta activación, explicada con más detalle un poco más adelante, se produce mediante un fenómeno de adsorción inicial sobre la fase lipídica/acuosa y la reacción se produce en la interfase. Por lo tanto, la lipasa pancreática, al igual que otras muchas lipasas, necesita de una interfase hidrófoba/hidrofílica para llevar a cabo su actividad catalítica.

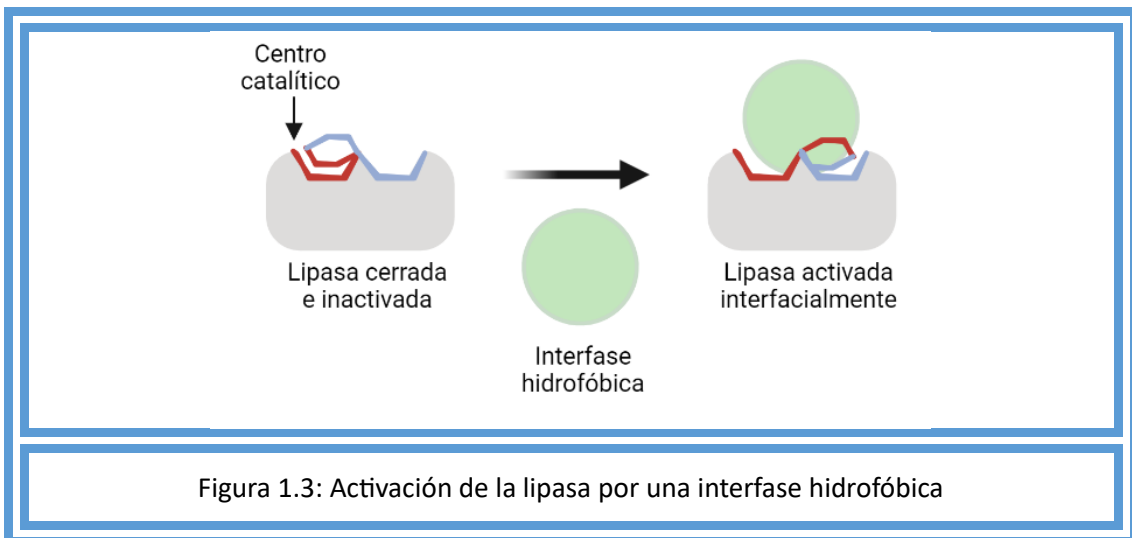
El entendimiento de la estructura y función de PL es posible gracias al conocimiento de su estructura tridimensional. Se trata de una proteína globular con un peso molecular de aproximadamente 45 kDa. Su estructura consiste en un núcleo hidrofóbico que consta de una región periférica de láminas β plegadas en barril y hélices α (figura 1.2). Está conformada por dos dominios distintos: un dominio N-terminal (residuos 1-336), que alberga el centro activo con la tríada catalítica Ser153-Asp177-His264, y un dominio C-terminal (residuos 337-449) que se acompleja con una coenzima cofactor denominada colipasa, que mejora la accesibilidad de los lípidos al sitio activo de la enzima.² Además, la proteína posee siete residuos triptófano que son responsables de su fluorescencia intrínseca, cinco de los cuales forman parte del dominio N-terminal, siendo el Trp30, localizado próximo al centro activo, el que más contribuye a la emisión total (figura 1.2 izda.). Cambios en esta señal fluorescente pueden correlacionarse con modificaciones en el estado conformacional de la PL, los cuales pueden estar muy ligados a su actividad.³

Sobre el centro activo de la lipasa se encuentra un subdominio móvil o tapadera, el cual es principalmente hidrofóbico por la parte expuesta al centro activo e hidrofílico en la superficie

externa. Esta estructura flexible, también conocida como “lid”, puede explicar la muy débil actividad de esta enzima en agua, ya que inicialmente (conformación cerrada), protege al centro activo de su entorno impidiendo el acceso del sustrato.⁴



Sin embargo, la presencia de una interfase lípido/agua, induce un cambio conformacional que desplaza a la “lid” (conformación abierta) y permite el libre acceso del sustrato al centro activo, y su posterior conversión, fenómeno conocido como activación interfacial (figura 1.3). En otras palabras, sólo las lipasas en conformación abierta muestran actividad catalítica. En medio acuoso, las lipasas se encuentran en equilibrio entre la conformación cerrada y la abierta lo que les permite tener cierto grado de actividad aún en ausencia de la interfase hidrofóbica. Aun así, la conformación abierta es más desfavorable energéticamente, prevaleciendo la cerrada.



Este comportamiento permite explicar el hecho de que las lipasas sean capaces de mantener o incluso mejorar su actividad en medios hidrofóbicos, como muchos disolventes orgánicos, donde la conformación abierta es la predominante, siempre que la capa de hidratación de la enzima no se afecte. Sin ella, la lipasa modificaría su conformación tridimensional, con la consiguiente pérdida de actividad catalítica.⁵

Además del disolvente, la cinética de apertura y cierre de la "lid" es también función de otros parámetros, como la temperatura o el pH del medio, de forma que un aumento de temperatura y un pH ligeramente alcalino, alrededor de 7-8, favorecen la conformación abierta de la enzima. Esto significa que la actividad de la enzima es más efectiva para digerir los lípidos cuando el pH del intestino delgado se encuentra en este rango, mientras que la digestión es mucho menos eficiente a pHs fuertemente alcalinos.

Existen diferentes metodologías que permiten medir la actividad de la PL. Entre las utilizadas históricamente destacan la tinción con Sudán III, titulación de ácidos grasos libres o el método de emulsión de aceite. Sin embargo, en la actualidad, la utilización de sustratos artificiales, como los ésteres de p-nitrofenilo, con la consiguiente cuantificación espectrofotométrica a 405-410 nm del p-nitrofenolato liberado, se considera una de las mejores soluciones debido a su especificidad, estabilidad, bajo precio y facilidad de uso (figura 1.4).

Si, además, el sustrato es ligeramente soluble en agua y de pequeño tamaño, como es el caso del acetato de p-nitrofenilo (p-NPacetato), las etapas del ensayo se facilitan todavía más, dado que el sustrato puede ser hidrolizado sin que medie una interfase hidrofóbica (no es necesaria la adición de detergentes al tampón de reacción). En cualquier caso, la elección del ensayo de actividad dependerá fundamentalmente del objetivo pretendido, que puede ser buscar y caracterizar nuevas lipasas, identificar inhibidores, aumentar la capacidad hidrolítica de la enzima, sintetizar compuestos, etc.

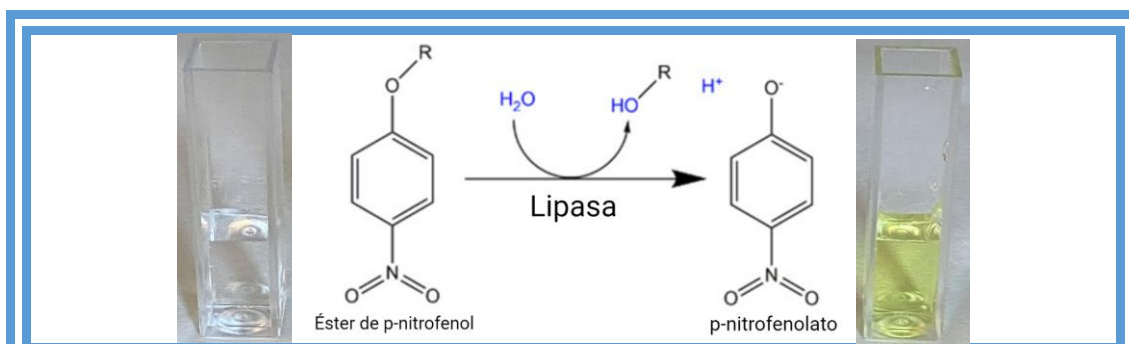


Figura 1.4: Ensayo colorimétrico de actividad de la lipasa, utilizando ésteres de p-nitrofenilo como sustratos

1.2 Aplicaciones de las lipasas

Las aplicaciones de las lipasas son múltiples debido a su gran especificidad, versatilidad, la amplia gama de reacciones que pueden catalizar y su buena estabilidad en diferentes medios de reacción. A nivel industrial, el potencial biotecnológico de las lipasas es enorme y son cada vez más empleadas en la industria química, alimentaria, agrícola o farmacéutica, para la formulación de detergentes, fabricación de papel, procesamiento de alimentos y síntesis de productos químicos finos y farmacéuticos, entre otras muchas aplicaciones.⁶ Además, en el caso concreto de la PL, esta enzima posee un potencial añadido ya que podría ser la principal diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades donde se ha visto que está implicada, como la hipertriacilgliceridemia y la obesidad.⁷

1.2.1 Aplicaciones industriales

La hidrólisis enzimática con lipasas presenta una serie de ventajas frente a la hidrólisis química convencional. Mientras que la hidrólisis química requiere altas temperaturas y presiones, la lipólisis enzimática ocurre a temperaturas y presiones ambientales más bajas. Esto conduce a ahorros de energía y materiales, así como a un proceso más seguro desde el punto de vista medioambiental. Además, la hidrólisis enzimática evita reacciones secundarias y la formación de productos no deseados, lo que reduce el costo de eliminación de subproductos. También permite la producción de ácidos grasos lábiles al calor que se descomponen en procesos convencionales.

En la industria, las lipasas se usaban fundamentalmente para fabricar ácidos grasos y jabón. La hidrólisis enzimática con lipasas fue utilizada ya en 1991 por empresas como Miyoshi Fat and Oil en Tokio, Japón. Se han patentado procesos que utilizan una mezcla de dos lipasas diferentes para hidrolizar los triglicéridos. Estas reacciones pueden realizarse con lipasas solubles en reactores tipo tanque agitado o con lipasas inmovilizadas en columnas. También se han patentado procesos que utilizan lipasas obtenidas del ricino para la hidrólisis de sebo animal y aceite de ricino, obteniendo ácidos grasos libres y productos de alto valor añadido.⁸

En la industria alimentaria, las lipasas son necesarias para añadir sabor y aroma a productos como el queso, la mantequilla, el chocolate y la confitería.⁹ También se utilizan en la producción de carne magra. Además, las lipasas se utilizan en el tratamiento de aguas residuales para eliminar la grasa de la superficie de los digestores aeróbicos, para limpiar tanques y tuberías y para tratar las aguas residuales de la producción de aceite de oliva.¹⁰

Las lipasas también se utilizan en medicina y farmacia, por ejemplo, para determinar triglicéridos y colesterol en muestras de sangre,¹¹ pero también en la industria cosmética para dar volumen al cabello y en productos para perder peso.¹²

Estas enzimas ampliaron enormemente su campo de aplicación, abriendo numerosas perspectivas para su uso, cuando se demostró que, en disolventes orgánicos, en ausencia prácticamente de agua, y en condiciones controladas, eran capaces de catalizar reacciones de esterificación (proceso inverso a la hidrólisis) y transesterificación, logrando así transformaciones que se asemejan a las termodinámicas. Una de las aplicaciones más destacadas es la producción de ésteres por esterificación de alcoholes y ácidos grasos. Se han realizado estudios con lipasas de diferentes orígenes para la esterificación de ácido láurico con diversos alcoholes en disolventes orgánicos. Estos ésteres se utilizan en las industrias de alimentos, perfumes y cosméticos.¹³

Las lipasas también se pueden utilizar en la síntesis de polímeros como poliésteres y policarbonatos, ofreciendo beneficios como un mejor control sobre la estructura del polímero y la capacidad de realizar polimerizaciones que son difíciles de lograr con métodos tradicionales. Igualmente, la esterificación catalizada por lipasa también permite la producción de ésteres a partir de ácidos grasos y azúcares, que actúan como emulsionantes alimentarios. Estos productos están patentados y tienen excelentes propiedades nutricionales. Siguiendo con el campo alimentario, las reacciones de transesterificación de las lipasas son ampliamente utilizadas en la modificación de grasas y aceites, permitiendo obtener productos de alto valor añadido. Un ejemplo son los lípidos estructurados, que son grasas modificadas con propiedades físicas, nutritivas y funcionales específicas para uso alimentario.¹⁴

Además de las aplicaciones alimentarias, las lipasas encuentran utilidad en la industria farmacéutica debido a su estereoespecificidad, donde se emplean para la resolución de mezclas racémicas y la síntesis de principios activos, vitaminas, herbicidas y plaguicidas. También se destacan en la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales, convirtiéndolos en ésteres metílicos u otros alcoholes de cadena corta.¹⁵

En resumen, las lipasas, gracias a su carácter polivalente, tienen un gran potencial en el campo de la síntesis, y cada vez se abren nuevas perspectivas de uso. Para todas estas aplicaciones, es requisito indispensable que las enzimas estén inmovilizadas. Esta inmovilización permite incrementar la estabilidad, la reutilización, la operación continua y la posibilidad de mejorar el control de las reacciones, con objeto de que el proceso sea rentable económicamente. Existe una amplia gama de materiales que se pueden utilizar con este fin y tanto la selección adecuada

de este material como la técnica a aplicar en el proceso de inmovilización se consideran un reto crucial en este campo.¹⁶

Por otro lado, muchas de las aplicaciones de síntesis catalizadas por lipasas utilizan disolventes orgánicos volátiles. El empleo masivo de estos disolventes ha generado un continuo deterioro ambiental. En este sentido, la búsqueda y empleo de disolventes no acuosos sostenibles o “verdes”, preferencialmente procedentes de fuentes renovables, y que puedan ser totalmente recuperados y reutilizados es una interesante alternativa de uso que está siendo muy investigada en los últimos años.¹⁷ Sin embargo, aunque la lipasa pancreática, en concreto la porcina (PPL), es una de las más utilizadas en las reacciones de biotransformación, al ser más barata y más accesible comercialmente que otras lipasas de origen microbiano y animal, apenas se ha investigado su comportamiento en medios no convencionales.¹⁸

1.2.2 Búsqueda de inhibidores para el tratamiento de la obesidad.

Muchos de los nuevos fármacos desarrollados en las últimas décadas han sido diseñados para que actúen directamente sobre dianas macromoleculares específicas, cuya bioactividad es patógena o, al menos, está asociada con la patología que se pretende tratar. Entre las macromoléculas específicas que pueden actuar como dianas terapéuticas, las enzimas ocupan una posición prominente, dado que su papel catalítico es esencial en muchos procesos fisiológicos. Los fármacos pueden actuar sobre la enzima activándola o inhibiéndola, siendo esto último lo más habitual. La utilización de inhibidores adecuados puede producir acumulación del sustrato de la enzima o una reducción de los productos generados. Ambos efectos resultan interesantes desde un punto de vista terapéutico o diagnóstico.¹⁹

En la actualidad una de las enfermedades crónicas con mayor incidencia en el mundo es la obesidad, que está asociada con una variedad de problemas de salud graves como enfermedades cardíacas, diabetes tipo 2, presión arterial alta, enfermedades hepáticas y algunos tipos de cáncer.²⁰ Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2020 había más de 650 millones de adultos obesos en todo el mundo, lo que representa aproximadamente el 13 % de la población adulta mundial y el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso. Además, la obesidad infantil también ha aumentado significativamente en los últimos años, lo que plantea preocupaciones para la salud a largo plazo de la población mundial.

La obesidad también puede tener un impacto significativo en los sistemas de atención médica, ya que puede aumentar el costo y la carga de enfermedades crónicas relacionadas con ella.²¹ Esto puede ser particularmente problemático en países con sistemas de atención médica y

recursos limitados, lo que significa que la obesidad puede tener un impacto desproporcionado en las comunidades más vulnerables.

El primer paso en el tratamiento de la obesidad es una dieta saludable y equilibrada combinada con el ejercicio físico. Cuando éstos han fallado puede utilizarse el tratamiento farmacológico como apoyo de los anteriores. Una de las aproximaciones terapéuticas más interesantes para la obesidad es inhibir la actividad de la enzima PL cuya función se ha descrito en la primera parte de la Introducción. Actualmente, se dispone de diversos fármacos para tratar la obesidad, pero sólo existe uno en el mercado que pertenece a la categoría de inhibidores de la PL y está aprobado por la *Food and Drug Administration (FDA)*: el Orlistat. Este fármaco ejerce su actividad terapéutica en el lumen del estómago y del intestino delgado mediante la formación de un enlace covalente con la serina del centro activo de la PL. Como consecuencia, la enzima no puede hidrolizar los triglicéridos de la dieta a ácidos grasos libres absorbibles y monoglicéridos, por lo que se excretan sin digerirse. Al disminuir la ingesta de grasas, se reduce la cantidad de calorías que consume una persona y, en última instancia, se promueve la pérdida de peso.²² Sin embargo, a pesar de la efectividad del fármaco, se sabe que el Orlistat, además de tener un precio elevado, inhibe otras enzimas, lo que provoca efectos secundarios gastrointestinales indeseables que limitan su uso clínico actual. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos inhibidores que presenten menores efectos colaterales y que, además, sean rentables y seguros.

La identificación de nuevos inhibidores de la PL se puede realizar utilizando métodos de cribado virtual de compuestos tanto de origen natural como sintéticos. Sin embargo, los ensayos que permiten monitorizar la actividad de esta enzima y evaluar la capacidad inhibitoria de los compuestos seleccionados suelen ser laboriosos y representan un alto coste económico y de tiempo de realización, dado que incluyen varias etapas y no son reutilizables. Además, la baja solubilidad en agua de los sustratos enzimáticos y de los potenciales inhibidores dificulta los ensayos.

Una de las alternativas a estos ensayos convencionales que pueden mejorar sus limitaciones es la utilización de biosensores enzimáticos. Estos dispositivos, versátiles y de bajo coste, son capaces de monitorizar la actividad de una enzima de forma sencilla y, con un diseño adecuado, permitir el cribado de un gran número de muestras al mismo tiempo.²³ Para ello, la enzima debe estar inmovilizada en un soporte y acoplarse a un transductor, generalmente óptico o electroquímico. Este requisito es uno de los más complicados a la hora de desarrollar biosensores, ya que el proceso de inmovilización puede modificar el estado conformacional de

la enzima, afectando su actividad. Además, la matriz inmovilizadora puede dificultar la llegada del sustrato o los potenciales inhibidores al centro activo, impidiendo que la enzima ejerza su función. Es por ello que antes de desarrollar un biosensor de estas características es necesario estudiar primero el comportamiento de la enzima en medios no convencionales diferentes del acuoso, que la mantengan confinada y alteren lo menos posible su conformación y actividad.

1.3 Medios no convencionales para biomoléculas

El medio acuoso es el ambiente natural de las biomoléculas. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la incorporación de células o proteínas en medios no naturales ofrece interesantes ventajas para el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas.

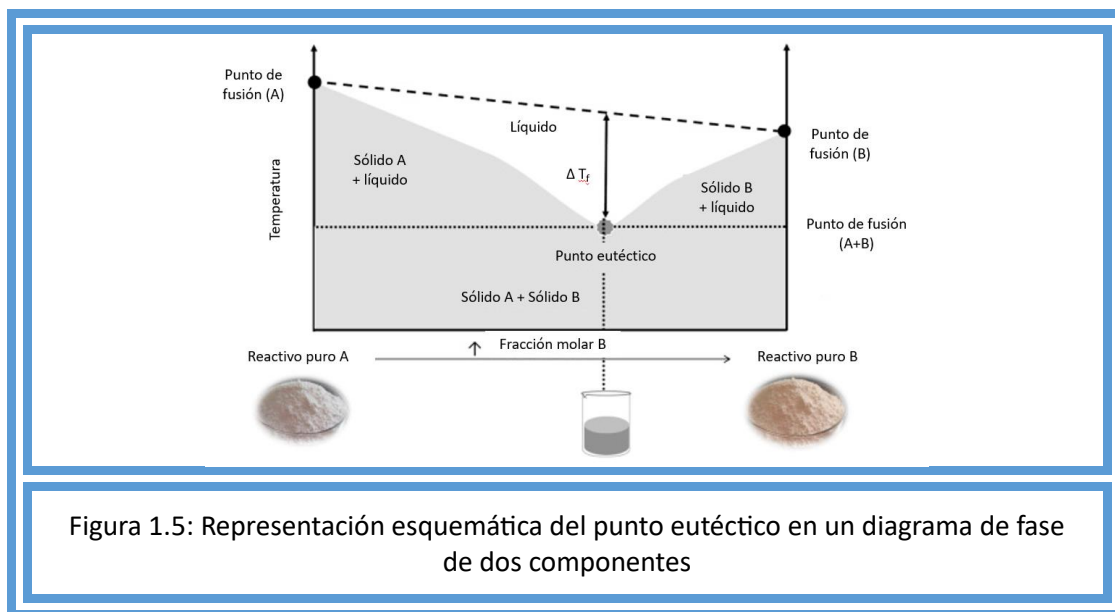
Entre estos medios no convencionales podemos destacar los fluidos supercríticos, los líquidos iónicos, los disolventes eutécticos profundos (DES) y los ambientes confinados. El conocer la estructura y función de las biomoléculas en estos ambientes, así como sus propiedades dinámicas y su estabilidad cinética y térmica son fundamentales a la hora de optimizar sus posibles aplicaciones.

En este trabajo de fin de máster, nos hemos centrado fundamentalmente en los dos últimos ambientes: DES y medios confinados y hemos estudiado el comportamiento de la PL en ellos, en concreto, en mezclas eutécticas con diferentes concentraciones de agua y en hidrogeles biocompatibles con alta capacidad de hinchamiento.

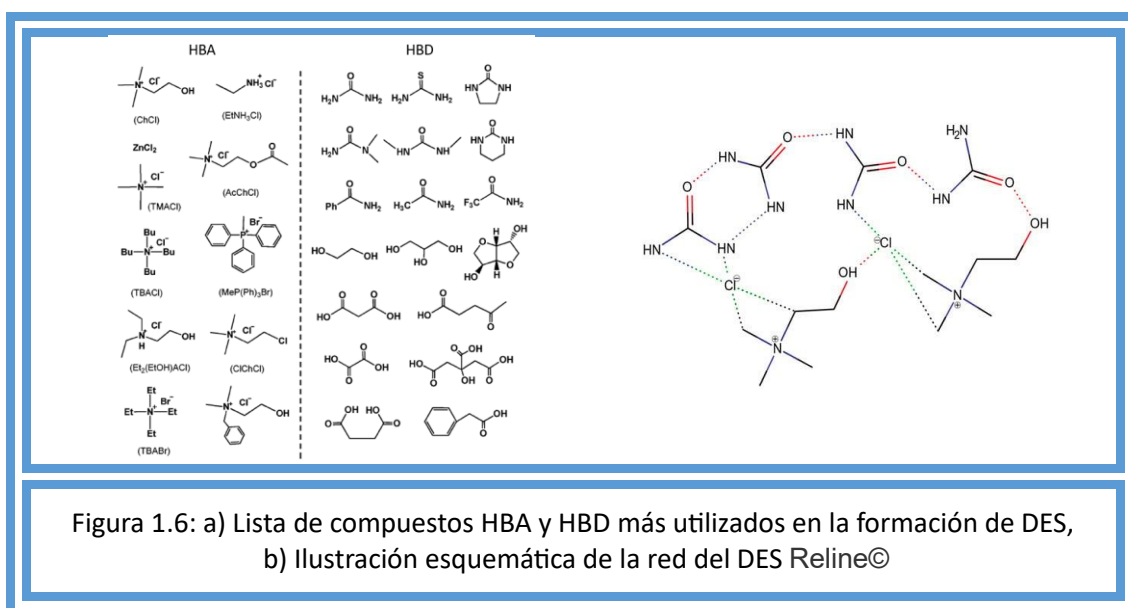
1.3.1 Disolventes eutécticos profundos (DES)

Un disolvente eutéctico es una mezcla líquida de dos o más componentes que, cuando se mezclan en proporciones específicas, adquiere propiedades únicas y un punto de fusión más bajo que cada uno de los componentes individualmente.

Esto es debido a que uno de los componentes es un donador (HBD) y el otro un aceptor (HBA) de protones, por lo que entre ellos pueden establecer puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno son más fuertes que las fuerzas dipolo-dipolo y las fuerzas de dispersión, lo que permite la formación de disolventes eutécticos con puntos de fusión más bajos.²⁴ Las mezclas tienen estructuras de coordinación molecular específicas que reducen la cohesión de los componentes individuales. Como resultado, la energía de enlace es más baja y decrece la temperatura de fusión (figura 1.5).²⁵



Los DES se estudian y utilizan en una variedad de aplicaciones, como síntesis orgánica, extracción de metales, producción de biocombustibles y fabricación farmacéutica. Una de las principales ventajas es su capacidad para disolver una amplia variedad de compuestos, tanto polares como no polares. Además, tienen una alta estabilidad térmica y química, no son volátiles y son respetuosos con el medio ambiente.²⁶ Entre sus inconvenientes destaca la alta viscosidad de la mayoría de ellos, que dificulta el tiempo de disolución de los compuestos, así como su movilidad. Se pueden crear disolventes eutécticos con distintas características dependiendo el compuesto donador y el compuesto aceptor de hidrógenos que elijamos. Entre los aceptores y donadores de hidrógenos más empleados o estudiados, encontramos los mostrados en la figura 1.6 a.²⁷



Uno de los DES más estudiados y utilizados como solvente en procesos químicos y biotecnológicos es el formado a partir de cloruro de colina y urea (Col-Urea), comercialmente conocido como Reline©⁹(figura 1.6 b). El cloruro de colina es un compuesto de amonio cuaternario utilizado en la síntesis de lípidos y la regulación de la función celular, que a temperatura ambiente se encuentra en estado sólido. La urea, a su vez, es un compuesto orgánico utilizado en la síntesis de proteínas y la regulación de la presión osmótica celular, que también es un sólido a temperatura ambiente. La combinación de estos dos compuestos en una proporción adecuada da como resultado un líquido viscoso, que permite la disolución y estabilización de numerosos productos. La formación de este DES ha sido estudiada en profundidad, encontrando que tanto el cloruro de colina como la urea sufren cambios estéricos. La estructura planar (sp²) de la urea (en el cristal) se convierte en tetragonal (sp³), y el anión cloruro de colina se desplaza ligeramente, lo que disminuye el impedimento estérico del movimiento torsional de los grupos metilo. Estos dos efectos combinados conducen a la formación de la red de enlaces de hidrógeno en la estructura del DES Reline©. Por lo tanto, cabe suponer que un comportamiento similar está presente en otros DES orgánicos.²⁸

Los DES formados a partir de cloruro de colina y glicerol (Col-Gly) y a partir de cloruro de tetrametilamonio y glicerol (TMAC-Gly) también se han estudiado ampliamente, sobre todo el primero de ellos, para diversas aplicaciones biotecnológicas.¹⁰ El glicerol es un compuesto orgánico utilizado como fuente de carbono y energía en la síntesis de lípidos y la regulación del metabolismo celular. La combinación de cloruro de colina y glicerol en la solución eutéctica Col-Gly permite también la disolución y estabilización de muchos tipos de moléculas y biomoléculas. Además, este líquido eutéctico exhibe propiedades físicas y químicas únicas, tales como: una alta capacidad de disolución, baja viscosidad y alta estabilidad térmica, que lo convierten en un medio ideal para una variedad de procesos biotecnológicos. En cuanto al TMAC-Gly, el TMAC es un compuesto de amonio cuaternario que se utiliza como fuente de nitrógeno en la regulación de la síntesis de proteínas y la función celular. La combinación de este compuesto con glicerol en el eutéctico TMAC-Gly permite igualmente la disolución y estabilización de diferentes tipos de moléculas y tiene una viscosidad menor que la del Col-Urea.

Los DES, principalmente el Col-urea y el Col-Gly, se han establecido como candidatos potenciales para la incorporación de enzimas, lo que ha dado lugar a una cantidad sustancial de trabajo en el área.²⁹ Además de su carácter sostenible antes mencionado, los DES ofrecen un entorno suave, con enlaces de hidrógeno, en el que las proteínas pueden permanecer estables y funcionales. Curiosamente, las diferentes combinaciones de precursores utilizadas para preparar DES también abren la posibilidad de ajustar las características del disolvente, con el

objetivo de diseñar racionalmente el medio para aplicaciones particulares. Así, el microambiente proteico puede modificarse y optimizarse mediante cambios en la composición del disolvente. Estos cambios pueden dar lugar a un equilibrio de las interacciones intermoleculares entre el disolvente y los aminoácidos de la proteína (electrostática, enlace de hidrógeno, Van der Waals) diferentes de los que ocurren en agua, lo que resulta en una variedad de estructuras, conformación y dinámica de la proteína, que pueden mejorar su función.³⁰

Otro aspecto interesante de los DES es su compatibilidad con medios acuosos, ya que la adición de agua a los DES permite ajustar las propiedades fisicoquímicas del disolvente. A pesar de que se podría pensar que una mezcla de DES y agua simplemente forma una disolución acuosa de los diferentes componentes, llegando a romper el eutéctico, las interacciones entre el agua y el DES son inherentemente mucho más complejas. Así, se ha demostrado que la adición de agua no solo ofrece la posibilidad de ajustar las propiedades macroscópicas del sistema (por ejemplo, disminuyendo la viscosidad), sino también las interacciones moleculares que se producen entre el disolvente y las biomoléculas. Por lo tanto, el uso de DES hidratados aumenta las posibilidades en términos de solvatación de proteínas, interacciones proteína-disolvente y, por lo tanto, el comportamiento de las proteínas.³¹

Estos sistemas de proteínas en DES tienen muchas aplicaciones, como son la estabilización térmica, la conservación, la crioprotección, la solubilización de biomacromoléculas, la administración de fármacos, o la catálisis enzimática. Por lo tanto, el entendimiento del comportamiento de las proteínas en DES es uno de retos de muchos investigadores y tiene el potencial de impulsar el desarrollo de nuevas tecnologías.

En cuanto a las lipasas, se ha demostrado que su inclusión en un DES puede mejorar significativamente su actividad y estabilidad, y por tanto sus aplicaciones. Por ejemplo, se demostró utilizando la lipasa de *Candida antártica*, que la presencia de DES en agua aumentaba la actividad y el rendimiento de obtención de productos con respecto a la obtenida únicamente en agua o en DES puro.³²

La PL es conocida por su baja termoestabilidad y actividad limitada en medios acuosos, por lo que su incorporación en DES puede ser muy beneficiosa, ampliando sus potenciales aplicaciones sin necesidad de usar disolventes orgánicos. La disolución de PL en la solución eutéctica también puede mejorar la capacidad de la enzima para catalizar la hidrólisis de lípidos de cadena larga, al mejorar la solubilidad de estos sustratos. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, existen muy pocos trabajos en los que se haya incorporado PL en DES y solo hemos encontrado un estudio reciente que demuestra el uso de una solución eutéctica de quitosano y citrato, como medio de

extracción de la enzima. La PL extraída con eutéctico mostró una actividad enzimática significativamente mayor y fue estable durante más tiempo que la lipasa extraída con medio acuoso.³³

1.3.2 Hidrogeles

Otro ejemplo de materiales no convencionales son los hidrogeles, materiales poliméricos porosos tridimensionales compuestos por un alto contenido en agua y una red polimérica reticulada. El grado de reticulación y los grupos funcionales de las cadenas poliméricas influyen en propiedades como la rigidez, el índice de hinchamiento, el grado de transparencia y la procesabilidad del material. Estas estructuras suelen sintetizarse a partir de polímeros naturales hidrófilos, polímeros sintéticos o sus precursores monoméricos, mediante métodos de reticulación químicos (enlaces covalentes) o físicos. Los hidrogeles reticulados químicamente poseen una integridad física, una resistencia química y una estabilidad mecánica mucho mayores que los hidrogeles físicos, y pueden permitir ciclos reversibles de hinchamiento-deshinchamiento en agua, recuperando su forma y masa originales sin comprometer sus propiedades mecánicas.

Las interesantes propiedades de estos materiales los hacen aptos para una gran variedad de aplicaciones. Por ejemplo, la capacidad de hincharse y contraerse en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, como la temperatura, el pH y la salinidad, hace posible incorporar fármacos en hidrogeles y controlar su liberación. Existen otras aplicaciones en campos tan diversos como la regeneración de tejidos, los cultivos celulares tridimensionales, la ingeniería ambiental, o la fabricación de lentes de contacto.^{34,35}

El uso de hidrogeles para la inmovilización de enzimas ha atraído gran atención en los últimos años, dado que son capaces de alojar un gran número de enzimas proporcionando un microambiente favorable para diversas reacciones bioquímicas, y permitiendo la difusión de sustratos, inhibidores y productos de reacción a través de ellos. Los hidrogeles actúan como barreras físicas que protegen a estas entidades biológicas de condiciones adversas como cambios bruscos de temperatura y fluctuaciones en el pH ambiental. También, facilitan su manipulación y en muchos casos permiten su reutilización, por lo que son de gran utilidad en biocatálisis y en el desarrollo de biosensores.³⁶

La inmovilización de las enzimas en hidrogeles entrecruzados químicamente presenta ventajas adicionales, ya que estos materiales, además de poder hincharse en presencia de agua, pueden ser secados sin que la capa de hidratación que rodea la enzima se vea afectada. Esto permite una mejor conservación de la enzima, de forma que esta mantendrá su actividad cuando los

hidrogeles sean rehidratados. Los hidrogeles pueden ser secados en estufa y el xerogel resultante puede ser en muchos casos almacenado a temperatura ambiente y cortado en pequeñas porciones que pueden ser rehidratadas para realizar determinaciones in situ.

Entre los hidrogeles reticulados químicamente destacan los basados en acrilatos y acrilamidas por su facilidad de preparación, biocompatibilidad, alto grado de hinchamiento y transparencia.³⁷ Este tipo de hidrogeles es utilizado en el presente trabajo, como medio para inmovilizar la PL. En concreto se utiliza el hidrogel AETA-MBA formado por la reacción de dos monómeros, cloruro de [2-(acrililoxi)etil]trimetilamonio (AETA) y N, N'-metilenbis(acrilamida) (MBA). AETA es un monómero catiónico hidrófilo con un grupo funcional cuaternario de cloruro de trimetilamonio que imparte una carga positiva y atrae los iones negativos presentes en el agua. MBA, a su vez, es un monómero bifuncional hidrofóbico que actúa como agente entrecruzante que sirve para conectar las cadenas AETA en una red polimérica tridimensional. La combinación de estos dos monómeros en presencia de un fotoiniciador (LiTPO), en solución acuosa, provoca una reacción de polimerización en cadena para formar el hidrogel AETA-MBA (figura 1.7).³⁸

Recientemente el grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo ha desarrollado un biosensor óptico y otro electroquímico, ambos desechables, inmovilizando la enzima fosfatasa alcalina (ALP) en un hidrogel de este tipo para la detección de fosfato en agua, un inhibidor competitivo de la ALP, de una manera rápida, sencilla y barata.^{39,40} Dados los interesantes resultados obtenidos, los hidrogeles basados en AETA parecen una buena opción para inmovilizar la lipasa pancreática, ya que podrían mejorar su estabilidad y reutilización en procesos industriales, además de servir como plataforma de detección en la búsqueda de potenciales fármacos antidiabéticos.

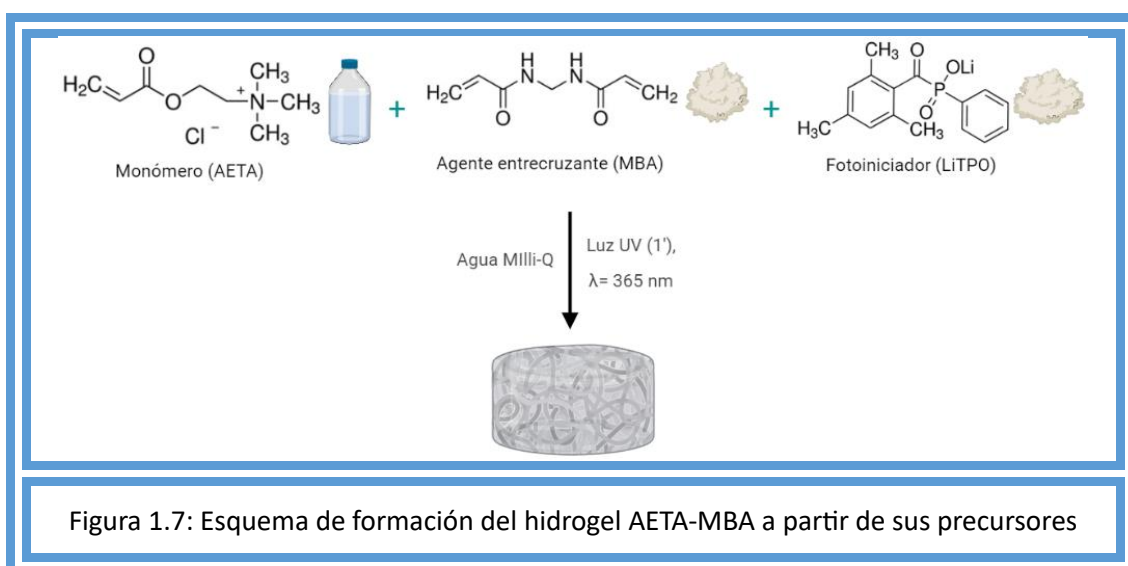


Figura 1.7: Esquema de formación del hidrogel AETA-MBA a partir de sus precursores

2. Objetivos

El objetivo fundamental de este trabajo de fin de máster se centra en la caracterización de la lipasa pancreática en diversos medios no convencionales ya que estos entornos pueden generar la posibilidad de implementar mejoras en diversos sectores dentro del ámbito sanitario y del ámbito industrial, tal y como se ha presentado en la Introducción.

Para conseguir este fin, se llevarán a cabo una serie de objetivos específicos que permitan cumplir con el objetivo general, siendo los objetivos específicos

- **Caracterización de la estabilidad conformacional de PL en tampón, DES e hidrogel mediante fluorimetría y dicroísmo circular.**

Se comparará la desnaturalización térmica de PL en tampón y en distintos disolventes eutécticos, gracias al estudio de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de PL y a la polarización de la luz dependiente de las estructuras secundarias de la proteína. Además, se llevará a cabo la inmovilización de PL en hidrogel, se estudiará la capacidad de hinchamiento de este medio y se comparará la estabilización térmica en esta red porosa tridimensional con el tampón.

- **Determinación de la actividad catalítica de PL en tampón, DES e hidrogel.**

Se determinará la capacidad hidrolítica de PL mediante estudios colorimétricos de formación de p-NP en tampón y en medios no convencionales. Se llevarán a cabo estudios que permitan determinar variaciones en dicha actividad tras la exposición a condiciones térmicas desnaturalizantes, así como periodos medios y largos de tiempo que permitan correlacionar estabilidad conformacional con actividad.

- **Estudios de inhibición de PL en tampón, DES e hidrogel.**

Se investigará la influencia del Orlistat sobre la actividad catalítica de PL en diferentes ambientes que permita dilucidar el entorno óptimo para la enzima con el propósito de la generación futura de un biosensor basado en PL para el cribado de fármacos contra la obesidad

3. Procedimiento experimental

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos químicos

La lipasa pancreática utilizada en este estudio ha sido de origen porcino (PPL) y fue obtenida de la casa comercial Sigma-Aldrich (L3126-25G).

3.1.1.1 Sustratos

El paranitrofenil acetato (p-NPAcetato) empleado en los estudios de actividad de PPL mediante la formación de paranitrofenol (p-NP), fue obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich (N8130-5G).

El paranitrofenil palmitato (p-NPPalmitato) empleado en los estudios de actividad de PPL mediante la formación de p-NP, fue obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich (N2752-1G).

El Orlistat, empleado como inhibidor de PPL, fue obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich (O4139-25MG).

3.1.2 Reactivos para la preparación de DES

El cloruro de colina (Col), empleado como agente aceptor de puentes de hidrógeno, presente en los DES Col-Urea y Col-Gly se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich (C1879-500g).

El glicerol (Gly), empleado como agente donador de puentes de hidrógeno, presente en los DES Col-Gly y TMAC-Gly se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich (1.04095.0250).

El cloruro de tetrametilamonio (TMAC) empleado como agente aceptor de puentes de hidrógeno, presente en el DES TMAC-Gly se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich (8.22156.0250).

La urea, empleada como agente donador de puentes de hidrógeno, presente en el DES Col-Urea se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich (U5378-500G).

3.1.3 Reactivos para la preparación de hidrogeles

La solución de cloruro de [2-(acrililoiloxi)etil]trimetilamonio (AETA), usada como monómero en la formación de hidrogeles, se adquirió de la casa comercial Sigma-Aldrich (496146-200ML).

El N,N'-metilenbis(acrilamida) (MBA), usado como entrecruzante en la formación de hidrogeles, se adquirió de la casa comercial Sigma-Aldrich (146072-100G).

El fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LiTPO) usado como fotoiniciador en la formación de hidrogeles se adquirió de la casa comercial Sigma-Aldrich (900889-1G).

3.1.4 Tampones

Se emplearon dos tipos de tampones: tampón Tris HCl 100 mM a pH 8,2 y tampón 50 mM a pH 7,5 calibrados con un pHmetro (pH-Meter basic 20⁺ - Crison). Para ello se pesaron 1,576 g y 0,788 g de Tris HCl comprados a la casa comercial Sigma-Aldrich (10812846001). Cada uno se diluyó en 80 ml de agua Milli-Q, usando un equipo Milli-Q (Millipore), mientras se agitaba en un agitador magnético (M-500 – Darlab) durante 5 minutos y se ajustó el pH usando pellets de hidróxido de sodio de Sigma-Aldrich (795429-500G) añadiendo finalmente agua Milli-Q hasta completar 100 ml en matraz aforado.

El tampón Tris HCl 50 mM a pH 7,5 llevaba a su vez dodecilsulfato sódico (SDS), usado como tensioactivo aniónico, comprado en la casa comercial Sigma-Aldrich (L3771-25G) y Triton X-100, empleado como surfactante no iónico, adquirido en la casa comercial Sigma-Aldrich (T878-100ML). Para preparar el SDS se pesaron 0,018 g y para preparar el Triton X-100, 0,2 g. Este segundo tampón únicamente se utilizó para los experimentos de inhibición para permitir la disolución del p-NPPalmitato y el Orlistat.

3.1.5 Disolventes

El metanol, empleado como disolvente del Orlistat, se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich (1.06002.0500).

El cloroformo, empleado para eliminar impurezas de la AETA, se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich (1.02447.0500).

3.1.6 Kit para la cuantificación de [PPL]

Se adquirió a Thermo Scientific el Kit de ensayo de proteína BCA Pierce™ que contiene BCA reactivo A, BCA reactivo B y 10 ampollas de 1 ml de estándar de albúmina de suero de bovino (BSA) 2 mg/ml. Se siguió el propio protocolo indicado en el kit para la cuantificación real de PPL y que se detalla en el apartado de Métodos de caracterización.

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos de preparación

3.2.1.1 Preparación del stock de PPL

Se prepararon en tubos eppendorf disoluciones concentradas de PPL 1075 μM a partir de 103,2 mg en 2 ml de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,2 o 50 mM pH 7,5, dependiendo si se iba a utilizar el sustrato p-NPacetato o p-NPPalmitato. Se agitaron los eppendorf en un vórtex (Reax top – Heidolph) durante 30 segundos para resuspender la enzima completamente y después se centrifugaron durante 10 minutos a 6000 rpm (Cencom I – J.P Selecta). En cada caso, se recuperó el sobrenadante y se almacenó en nevera para su uso posterior.

3.2.1.2 Preparación de DES

Se prepararon tres DES distintos: Col-Urea (1:2), Col-Gly (1:2) y TMAC-Gly (1:2). Para ello se pesaron 11,6 g de cloruro de colina y 10 g de urea en el caso de Col-Urea, 11,31 g de cloruro de colina y 15 g de glicerol en el caso de Col-Gly y por último 5 g de cloruro de tetrametilamonio y 8,4 g de glicerol en el caso de TMAC-Gly. En cada caso, los precursores se agitaron magnéticamente en un vial en un baño a 60°C durante un máximo de 30 minutos hasta que se formó el disolvente eutéctico. Una vez formados, se retiraron los imanes y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior uso. La PPL no se pudo disolver en 100% DES debido a su alta viscosidad, por lo que se prepararon mezclas DES:Tampón en distintas proporciones.

3.2.1.3 Preparación de hidrogeles

Los hidrogeles se sintetizaron siguiendo el protocolo descrito en Alacid y col. (2023), mediante la fotopolimerización del monómero catiónico AETA, utilizando MBA como agente entrecruzante y LiTPO como fotoiniciador (figura 1.7 y figura 3.2).⁴⁰ Primero se eliminó la hidroquinona fluorescente que forma parte de las impurezas de AETA, mezclando en campana 1,5 ml de AETA con 1,5 ml de cloroformo. Tras esperar 1 minuto a que se separaran las dos fases, se retiraron 1,132 ml de AETA y se añadió 1 ml de agua Milli-Q. Tras agitación durante unos minutos, se cubrió el vial con papel de aluminio y se añadieron 2 mg de MBA. Se agitó y se añadieron entonces 4 mg de LiTPO. Tras dejar agitando 1 minuto, se recogió 1 ml de la mezcla con una jeringa desechable, la cual se dejó con una pequeña cavidad de aire en el extremo. Finalmente, se colocó bajo una lámpara de rayos UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) durante 1 minuto. Una vez polimerizado, se retiró de la jeringuilla el hidrogel cortando la punta de ésta con una cuchilla. Antes de poder usarlo, se realizaron 5 ciclos de lavado y secado consistentes en 3 enjuagues con 10 ml de agua Milli-Q, la adición de 5 ml de agua Milli-Q para que los absorba completamente

el hidrogel durante 2-3 horas (figura 3.1 dcha.) y un secado posterior en estufa a 45°C durante 48 horas hasta formar un xerogel (figura 3.1 izda.).



Figura 3.1: Imagen de un hidrogel seco (xerogel) (izda.) e hinchado (dcha.)

3.2.1.4 Inmovilización de PPL en hidrogeles

La inmovilización de la enzima PPL dentro del hidrogel se realizó siguiendo la estrategia conocida como inmovilización *ex-situ*.

En la inmovilización *ex-situ*, una disolución tamponada de PPL se pone en contacto con una fracción pesada de xerogel, preparado como se describe en el apartado anterior, hasta que toda ella es absorbida por la matriz, quedando la proteína incorporada en su interior (figura 3.2).

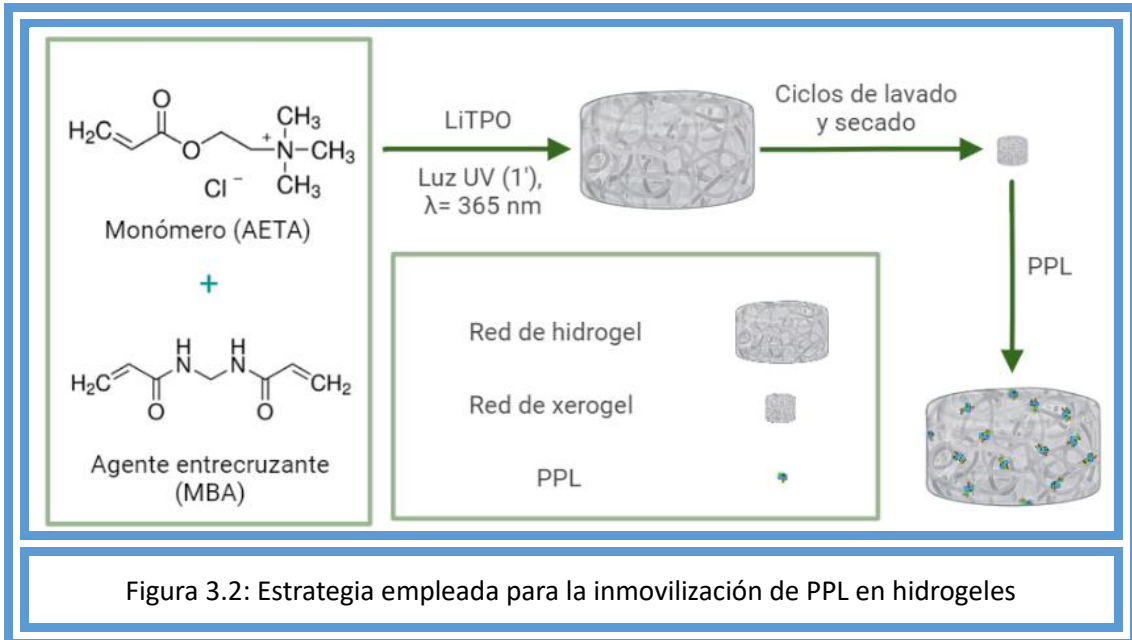


Figura 3.2: Estrategia empleada para la inmovilización de PPL en hidrogeles

3.2.2 Métodos de caracterización

3.2.2.1 Concentración real de proteína

Para determinar la concentración real de PPL en las disoluciones preparadas se usó el Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™. Este método combina la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu^+ utilizando el ácido bicinconínico. El complejo hidrosoluble formado de color púrpura absorbe a 562 nm de manera lineal con el incremento de proteína en un rango de 20-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Primero se prepararon una serie de diluciones de concentración conocida de la proteína BSA junto con la disolución de la muestra de PPL de concentración desconocida. Las absorbancias se midieron a 562 nm en un espectrofotómetro UV-2700 (Shimadzu). Una vez obtenida la recta patrón de BSA (figura 3.3), se calculó con ella la concentración real de PPL.

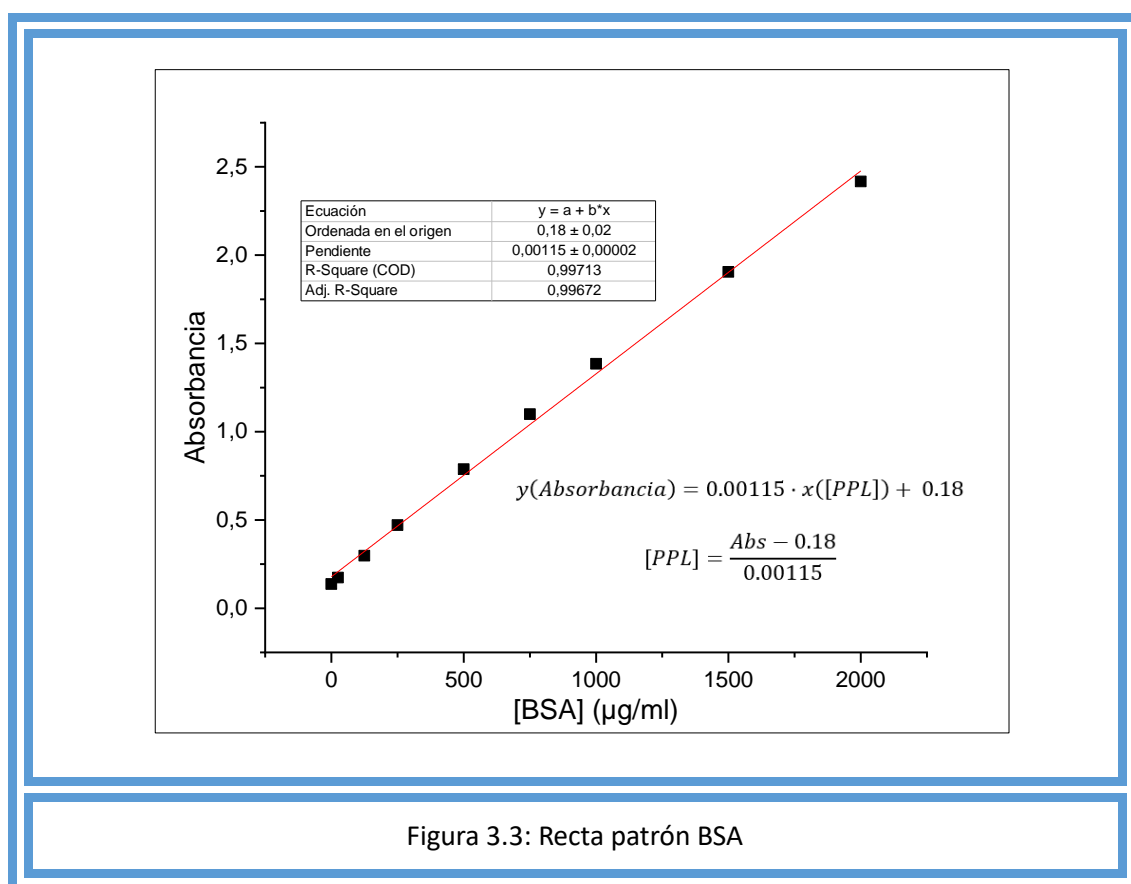


Figura 3.3: Recta patrón BSA

De esta forma, dos concentraciones nominales de 1075 y 100 μM resultaron ser de 339,14 y 23,97 μM . No obstante, en este trabajo se seguirán usando las concentraciones teóricas para los cálculos.

3.2.2.2 Caracterización de la estabilidad conformacional

- **Técnicas de fluorescencia**

Para la caracterización de la estabilidad conformacional de la proteína se recogieron espectros de fluorescencia, tanto en tampón como en DES e hidrogel, registrando su emisión desde 300 hasta 440 nm usando como longitud de onda de excitación 290 nm. Para ello las muestras se colocaron en cubetas de cuarzo de 10 x 10 mm y se usó un espectrofluorímetro PTI-QuantaMaster (PTI) que consta de un peltier integrado.

Para los experimentos de desnaturalización térmica se seleccionaron 3 velocidades distintas de calentamiento (2,5; 5 y 10°C/min). La temperatura de desnaturalización térmica de la PPL se obtuvo a partir de los cambios de forma y del desplazamiento del espectro de emisión de fluorescencia. Se representó el cociente entre la emisión a 335 y a 375 nm frente a la temperatura y a partir de la primera derivada se obtuvo la temperatura de desnaturalización. Además, se siguieron los cambios en la fluorescencia intrínseca de la PPL a concentraciones de proteína que variaron desde 5 a 20 µM.

- **Dicroísmo circular**

Para caracterizar la conformación de la proteína en tampón, se siguió el cambio en la estructura secundaria de PPL a una concentración de 25 µM en tampón en el ultravioleta cercano, usando un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco) acoplado a un peltier (PTC-423S/15 – Jasco). Las muestras se depositaron sobre cubetas de cuarzo de 1 cm x 0.1 cm. Para ello se recogieron espectros de dicroísmo circular en UV lejano entre 200 y 260 nm, a dos temperaturas, 20 y 85°C.

3.2.2.3 Actividad enzimática

- **Método colorimétrico**

Para determinar la actividad de la PPL se empleó un método colorimétrico ya citado en el apartado de Introducción, basado en la formación del producto de catálisis coloreado p-NP. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-2700 (Shimadzu) y la absorción de las muestras se midió a temperatura ambiente en cubetas de cuarzo de 1 cm x 1 cm. Se realizaron cinéticas de 15 minutos midiendo a intervalos de 0,2 minutos para estudiar la actividad de PPL en disolución y DES, y de 60-70 minutos para estudiarla en hidrogel. La absorbancia de la muestra se midió a una longitud de onda de 405 nm, que es el máximo de absorbancia del p-NP, usando como sustrato p-NPAcetato o p-NPPalmitato. También se realizaron espectros de absorción entre 240 y 450 nm al finalizar las cinéticas.

En el caso del p-NPAcetato, se prepararon stocks de 34,77 mM pesando 6,3 mg en 1 ml de metanol, que posteriormente se agitaron en el vórtex durante 1 minuto y se almacenaron en el

congelador hasta su uso. Alícuotas de estos stocks fueron diluidas en tampón, y de esta segunda disolución se pipetearon los volúmenes correspondientes hasta obtener una concentración de 30 μM en la muestra final.

En el caso de p-NPPalmitato, se prepararon stocks de 800 mM pesando 30,2 mg en 100 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 que además contenían 18 mg de SDS y 200 mg de Triton X-100 para facilitar su solubilidad. Primero se añadieron esos mg en 50 ml de tampón que fueron sonicados durante 15 minutos a 80°C (Ultrasons 1L – J.P Selecta) y después se añadieron los otros 50 ml de tampón. Esta disolución se almacenó en nevera y a partir de ella se pipetearon los volúmenes correspondientes hasta tener una concentración de 324 μM en la muestra final.

- **Determinación de parámetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ y K_{cat}**

Para determinar los parámetros cinéticos de la PPL en tampón y en mezclas tampón:DES se siguieron una serie de etapas. Primero se realizaron cinéticas de actividad con 30 μM de p-NPAcetato y distintas concentraciones de PPL.

A partir de las absorbancias se determinó la concentración de p-NP formado, utilizando un coeficiente de extinción de 18,5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 405 nm, y se representó en una gráfica este valor frente al tiempo. A partir de estos resultados se calculó la derivada en cada punto de la cinética, obteniendo la velocidad a ese tiempo dado. Además, se hizo la representación de la velocidad frente a la concentración de p-NPAcetato que aún no se había hidrolizado (sustrato remanente) y se ajustó a una cinética de Michaelis-Menten, utilizando la siguiente ecuación:

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]} \quad (3.1)$$

lo que permitió obtener las constantes K_m y $V_{\text{máx}}$ a cada concentración de PPL. K_m representa la concentración de sustrato a la cual la enzima muestra una actividad enzimática del 50%, mientras que $V_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima que alcanza una enzima cuando se satura con su sustrato.

Finalmente, se representó $V_{\text{máx}}$ frente a la concentración de PPL, ajustando los datos a una recta de cuya pendiente se obtuvo la constante catalítica k_{cat} . K_{cat} es una medida de la eficiencia catalítica de una enzima y representa el número máximo de reacciones de sustrato que la enzima puede catalizar por unidad de tiempo cuando está saturada con sustrato. Estos parámetros no se determinaron para la PPL en hidrogel.

- Estudios de inhibición

Para comprobar la capacidad del Orlistat como inhibidor de la actividad de la PPL, se realizaron cinéticas enzimáticas en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de Orlistat utilizando p-NPPalmitato como sustrato y tampón Tris pH 7,5 con SDS y Triton X-100. Estos últimos se usaron para facilitar la disolución tanto del sustrato como del inhibidor, altamente hidrofóbicos.

En primer lugar, se preparó un stock de Orlistat 34,77 mM pesando 8,62 mg en 0,5 ml de metanol que después se diluyó hasta tener un stock de 347,7 μ M en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 que se guardó en el congelador. A continuación, el p-NPPalmitato y el Orlistat se incubaron 5 min a 37°C, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se añadieron a la disolución de PPL, de forma que, en los 2 ml finales había una concentración de 83,3 μ M de PPL, 320 μ M de p-NPPalmitato y 22,2 μ M de Orlistat. También se utilizaron concentraciones de Orlistat de 19,3 μ M, 14,9 μ M y 9,7 μ M.

3.2.2.4 Determinación del grado de *swelling*

El grado de hinchamiento de los hidrogeles, o grado de *swelling* (SW) se determinó a partir de un hidrogel deshidratado (xerogel) en ausencia y en presencia PPL. Para ellos se cortaron trozos de xerogel de aproximadamente 0,07 g (0,3 cm de diámetro, 0,6 cm de longitud) realizando medidas de peso en una balanza (Serie SV-1000 – gram precision). Se sumergieron en 60 ml de agua milli-Q y se pesaron a las 24 horas y a las 48 horas. SW fue determinado aplicando la siguiente fórmula:

$$SW = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad (3.2)$$

Donde W_t es el peso del hidrogel a cada tiempo y W_0 es el peso inicial del hidrogel deshidratado (xerogel).

4. Resultados y Discusión

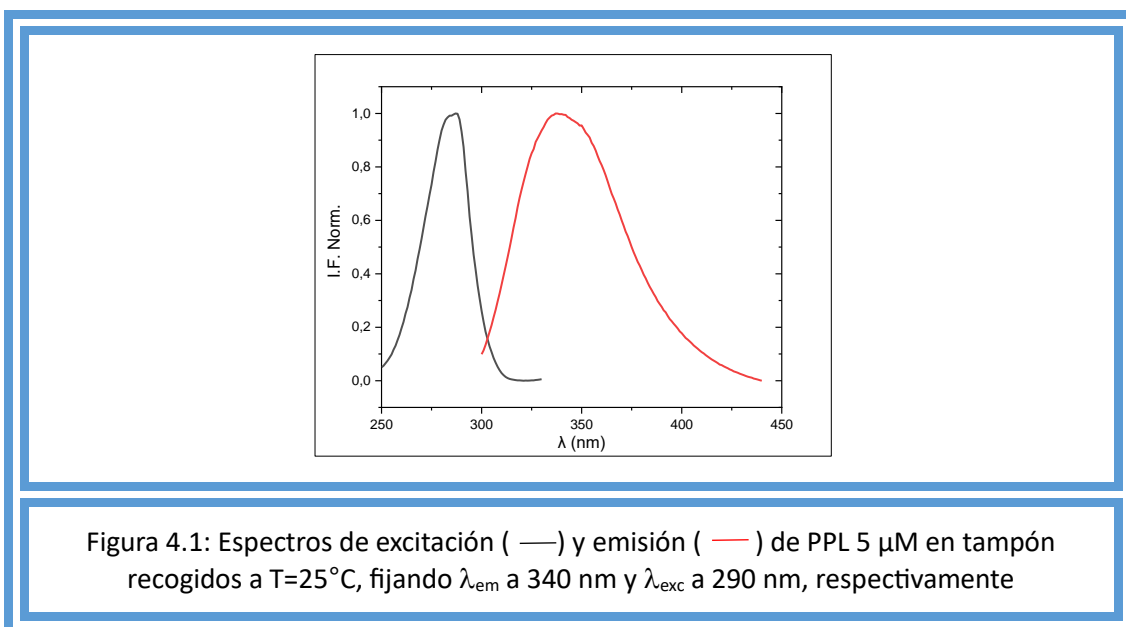
Siguiendo los objetivos del presente trabajo, a continuación, se muestran los resultados correspondientes al estudio de la estabilidad y actividad de la lipasa pancreática en diferentes medios, así como el análisis de sus potenciales aplicaciones. La lipasa pancreática que se ha utilizado es la procedente de porcino (PPL) por su alta homología con la humana y al ser más accesible comercialmente. Los resultados serán discutidos al mismo tiempo que se presentan con el fin de facilitar el seguimiento.

4.1 Estabilidad conformacional de la PPL en diferentes medios

4.1.1 Tampón

La estabilidad de la PPL en tampón se evaluó siguiendo los cambios en su fluorescencia intrínseca, la cual proviene mayoritariamente de los residuos triptófano y es altamente sensible a la polaridad del entorno. Por tanto, cambios en sus espectros de emisión nos informarán sobre el estado conformacional y los procesos de plegamiento/desplegamiento de la enzima.

Para ello, primeramente, se realizaron espectros de excitación y de emisión de PPL (5 μM) en tampón Tris pH 8,2, diluyendo disoluciones madre preparadas como se describe en el apartado 3.2.1.1 de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la figura 4.1.

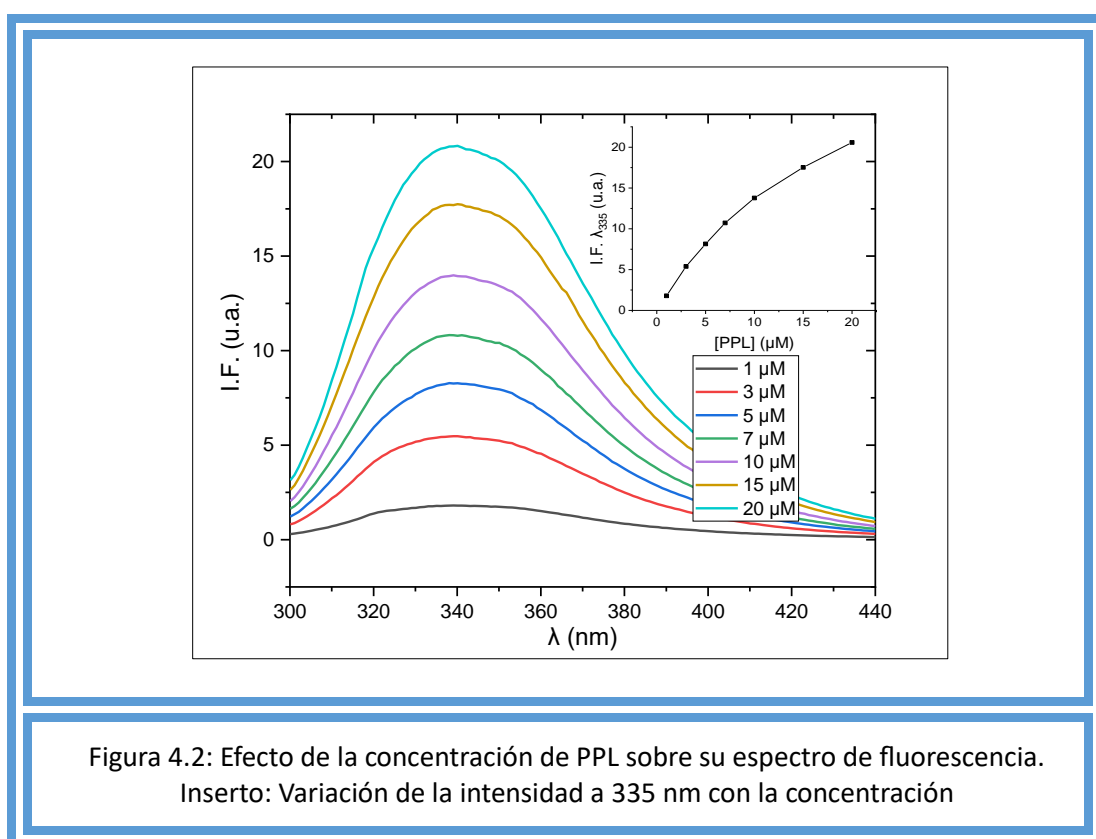


Como se puede observar en la figura 4.1, el espectro de excitación presenta un máximo en torno a 290 nm, característico de la absorción del triptófano, mientras que el de emisión tiene su máximo cerca de 335 nm. La posición y forma de este espectro coinciden con lo descrito

previamente en la bibliografía, confirmando que la enzima se encuentra en su conformación plegada y que sus triptófanos están relativamente expuestos al tampón.⁴¹

Antes de continuar con el estudio de estabilidad, se diseñó un experimento con objeto de conocer las concentraciones de proteína más adecuadas para realizar los siguientes experimentos de fluorescencia.

Para ello se prepararon disoluciones con concentraciones crecientes de PPL y se recogieron los espectros de emisión, representados en la figura 4.2. Como era de esperar, a medida que la concentración aumenta, la intensidad de fluorescencia crece. Sin embargo, al representar el máximo de emisión frente a dicha concentración se observó una pérdida de linealidad, sobre todo por encima de 10 μM de PPL. Con estos resultados determinamos un máximo de 10 μM para los estudios de estabilidad por métodos fluorimétricos.

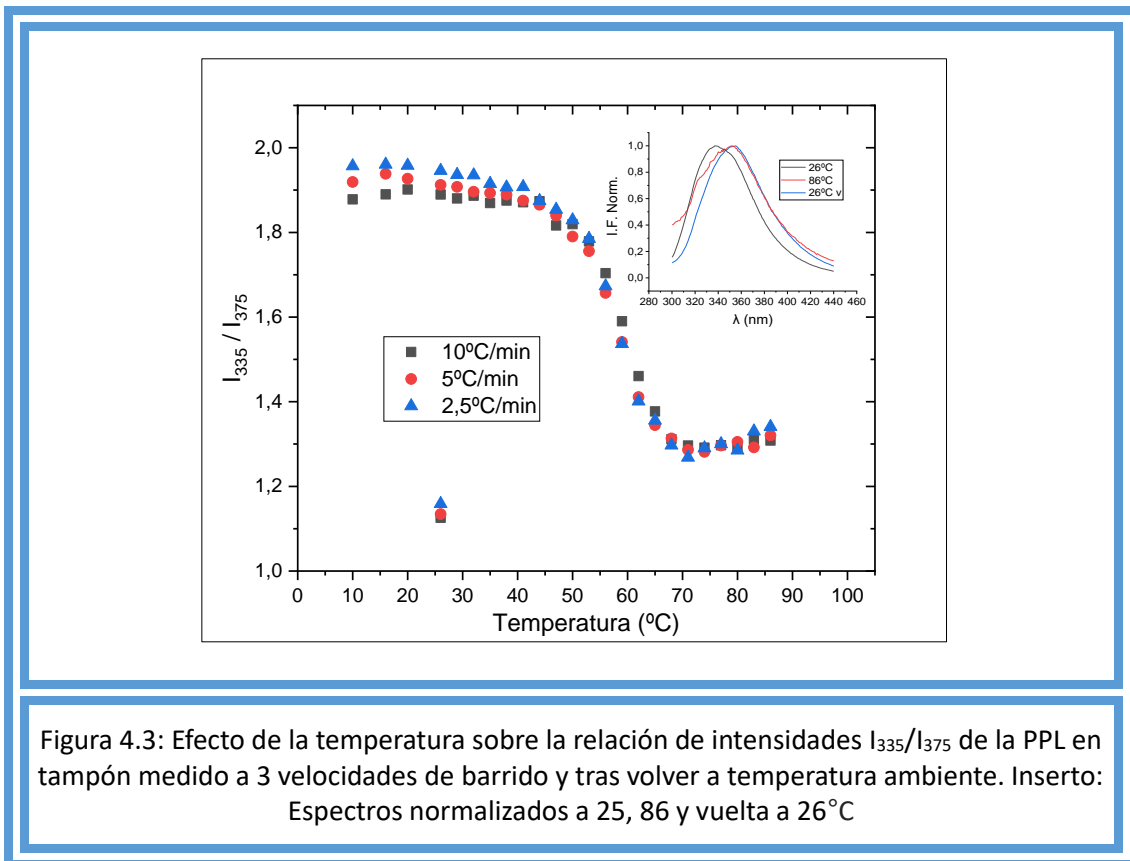


Una vez determinado el rango óptimo de concentración de PPL, se exploró como afectaba la temperatura a la fluorescencia intrínseca de la enzima, con el fin de obtener información sobre el mecanismo de desplegamiento de la misma y su estabilidad térmica.

En general, cuando una proteína se desnaturaliza, sus espectros de emisión se desplazan hacia el rojo, ya que los triptófanos quedan más expuestos al solvente. Por ello, una manera sencilla de seguir el desplegamiento es recoger los espectros en un intervalo de temperatura que incluya

la temperatura de desnaturalización T_m y representar en una gráfica, frente a la temperatura, el cociente entre las intensidades de emisión a 335 nm y a 375 nm, como se describe en Materiales y Métodos. Esta gráfica se muestra en la figura 4.3 para la PPL (5 μ M) en tampón. Los espectros se recogieron entre 10 y 86°C a tres velocidades de barrido: 2,5°C/min, 5,0°C/min y 10°C/min.

Además, en esa misma figura se compara el espectro de la PPL nativa a 26°C con el obtenido a 86°C y el recogido otra vez a temperatura ambiente una vez realizada la rampa de temperatura, con objeto de comprobar la posible reversibilidad del proceso de desplegamiento.



Los resultados sugieren que la proteína se desnaturaliza siguiendo un proceso de desplegamiento en dos estados, sin la presencia de intermedios aparentes. Este proceso sucede de forma bastante cooperativa a una $T_m \approx 58^\circ\text{C}$ y no es reversible, ya que al descender la temperatura la proteína desnaturalizada no recupera su estructura nativa (el espectro de emisión, desplazado hacia el rojo tras la desnaturalización no recupera su posición inicial al bajar la temperatura).

Se observa también que la velocidad de calentamiento no parece influir en el desplegamiento térmico, lo que indica que la cinética de desplegamiento es mucho más rápida que la velocidad de barrido.

Con el fin de confirmar los estados plegado y desplegado de la PPL, inducidos por la temperatura, se utilizó el dicroísmo circular como segunda técnica de caracterización. Esta técnica nos da información fundamentalmente sobre la estructura secundaria de las proteínas. Para ello preparamos una disolución 25 μM de PPL en tampón y se recogieron los espectros a 20°C y 85°C, como se describe en el apartado 3.2.2.2 de Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la figura 4.4, el espectro realizado a 20°C indica que las estructuras predominantes en PPL son las alfa hélices. Este espectro fue similar al descrito en la literatura.⁴²

En contraste, a 85°C el espectro cambió radicalmente, obteniéndose esencialmente un espectro donde la mayor contribución a la polarización de la luz se debe a estructuras desordenadas que confirman los resultados obtenidos por fluorescencia. Este espectro no se modificó al volver a temperatura ambiente, confirmando igualmente la irreversibilidad del proceso.

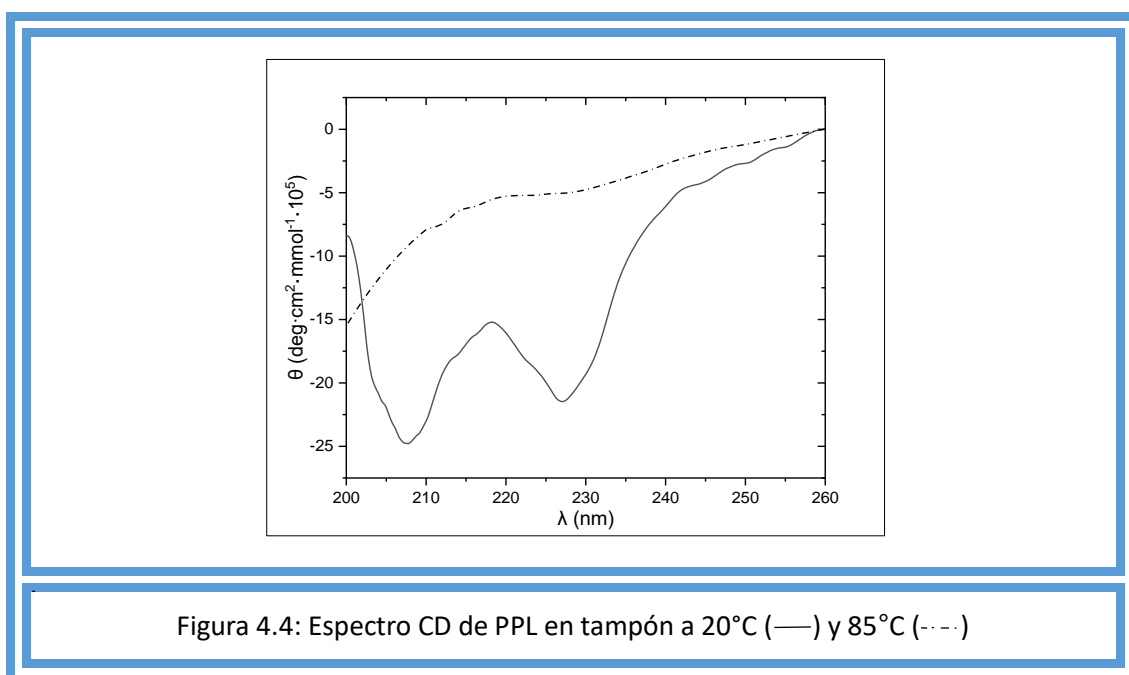


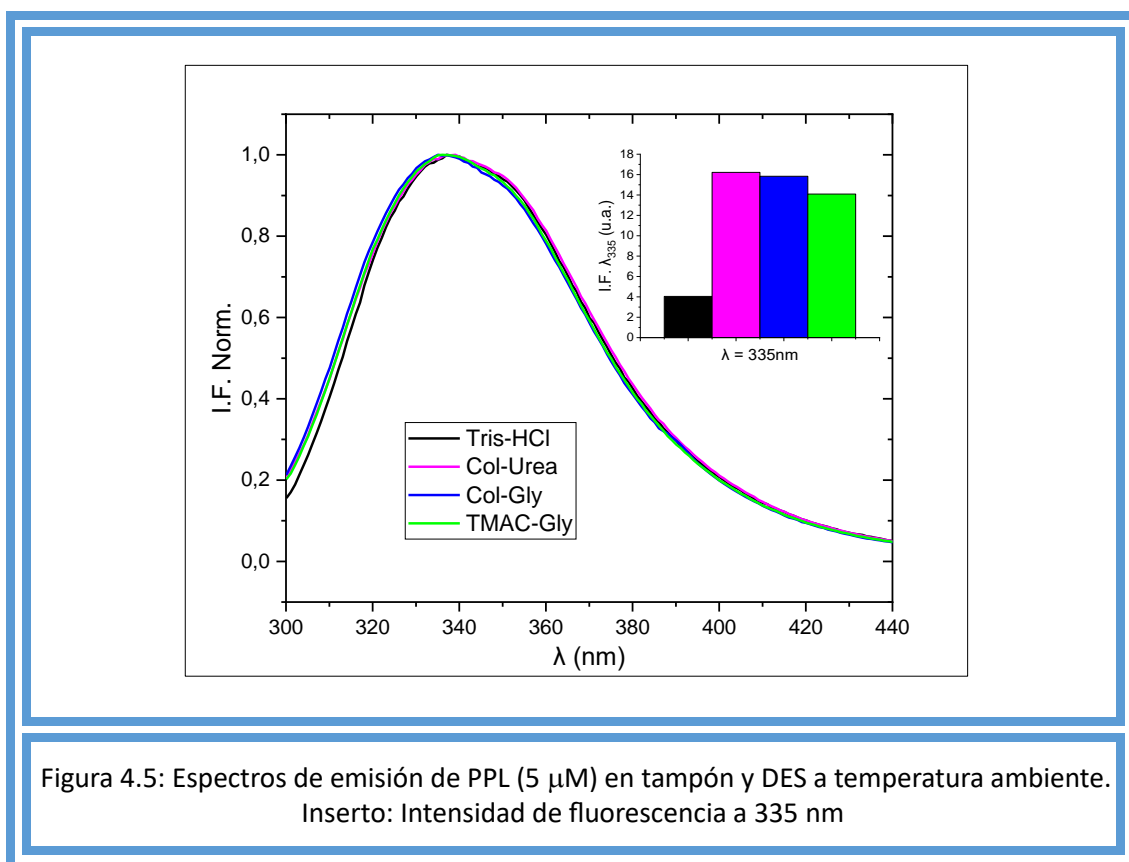
Figura 4.4: Espectro CD de PPL en tampón a 20°C (—) y 85°C (---)

4.1.2 DES

El estudio de estabilidad de la PPL en DES se llevó a cabo en tres disolventes diferentes descritos en Materiales y Métodos: Col-Urea, Col-Gly y TMAC-Gly. Como la mayoría de los DES, estos disolventes muestran una viscosidad muy elevada, por lo que es muy difícil disolver totalmente la proteína en ellos sin subir la temperatura, lo que puede dañar a la lipasa. Por ello, decidimos bajar la viscosidad mezclando el DES con agua, en una proporción 75% de DES y 25% de tampón, como se describe en otros trabajos.⁴³

En la figura 4.5 se representan los espectros de fluorescencia de la PPL disuelta en los tres DES y se compara con el obtenido en tampón. Como se puede observar, la forma y posición del espectro es muy similar, aunque no idéntica, en todos los medios analizados, lo que indica que la estructura nativa de la proteína también se mantiene en los DES, al menos a temperatura ambiente.

Hay que destacar que la intensidad de fluorescencia no fue similar en todos los casos, siendo aproximadamente cuatro veces superior en los DES, lo que podría indicar un desplazamiento de la conformación de la enzima hacia la forma abierta, como se ha sugerido en otros artículos.³

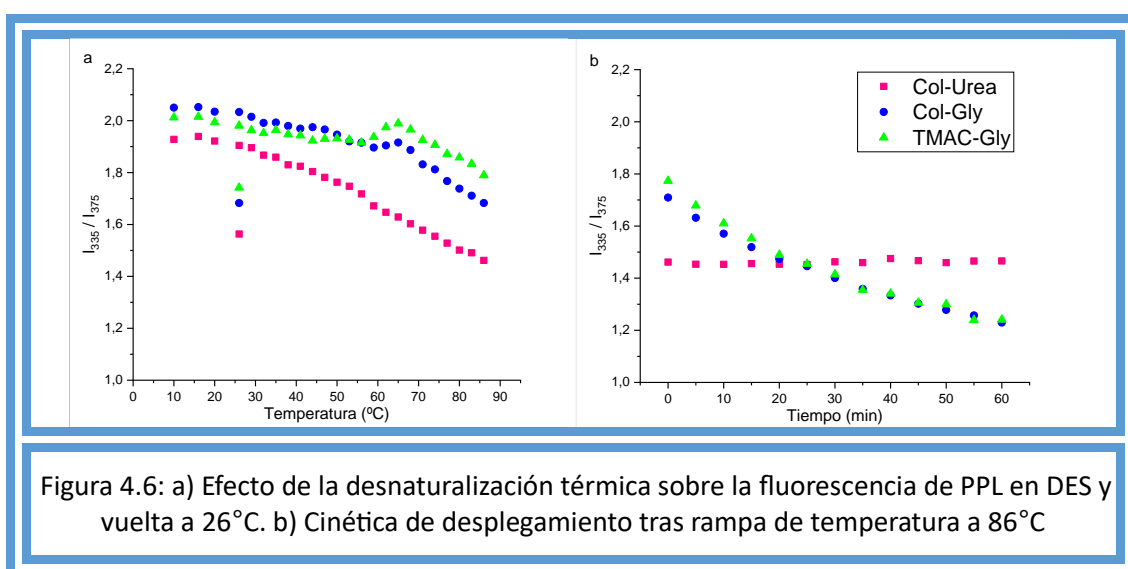


El estudio de desnaturalización térmica de la proteína en los DES se realizó en dos fases. Inicialmente se hizo un barrido de temperatura similar al de la figura 4.3, a una velocidad de 2,5°C/min (figura 4.6 a). El resultado mostró un comportamiento muy diferente al observado en tampón. En el caso de la Col-Urea parece que se pierde la cooperatividad en el desplegamiento y la PPL comienza ya a desplegar a partir de 30°C. Sin embargo, en los otros dos DES, la temperatura tiene un menor efecto sobre el desplegamiento, sugiriendo que tanto Col-Gly como TMAC-Gly, estabilizan la PPL.

Para confirmar esta hipótesis, al llegar a 86°C se siguió recogiendo la cinética de desnaturalización durante una hora sin cambiar la temperatura y se observó que en Col-Urea la

proteína había alcanzado su máximo desplegamiento tras el barrido, mientras que en Col-Gly y TMAC-Gly la PPL necesitó más de 60 minutos para desplegar completamente (figura 4.6 b). Además, el desplegamiento fue parcialmente reversible ya que la proteína volvió a recuperar parte de la fluorescencia inicial al bajar la temperatura. Este resultado indica que la cinética de desplegamiento es mucho más lenta en Col-Gly y TMAC-Gly que la velocidad de barrido, por lo que estos DES están estabilizando cinéticamente a la proteína. Este efecto estabilizador puede representar una importante ventaja a nivel industrial, ya que la proteína podría mantenerse catalíticamente activa a altas temperaturas.

Para confirmar estas hipótesis, se intentaron recoger los espectros de dicroísmo circular de la proteína en los diferentes medios, sin embargo, los espectros presentaron mucho ruido y no fue posible extraer conclusiones a partir de ellos.

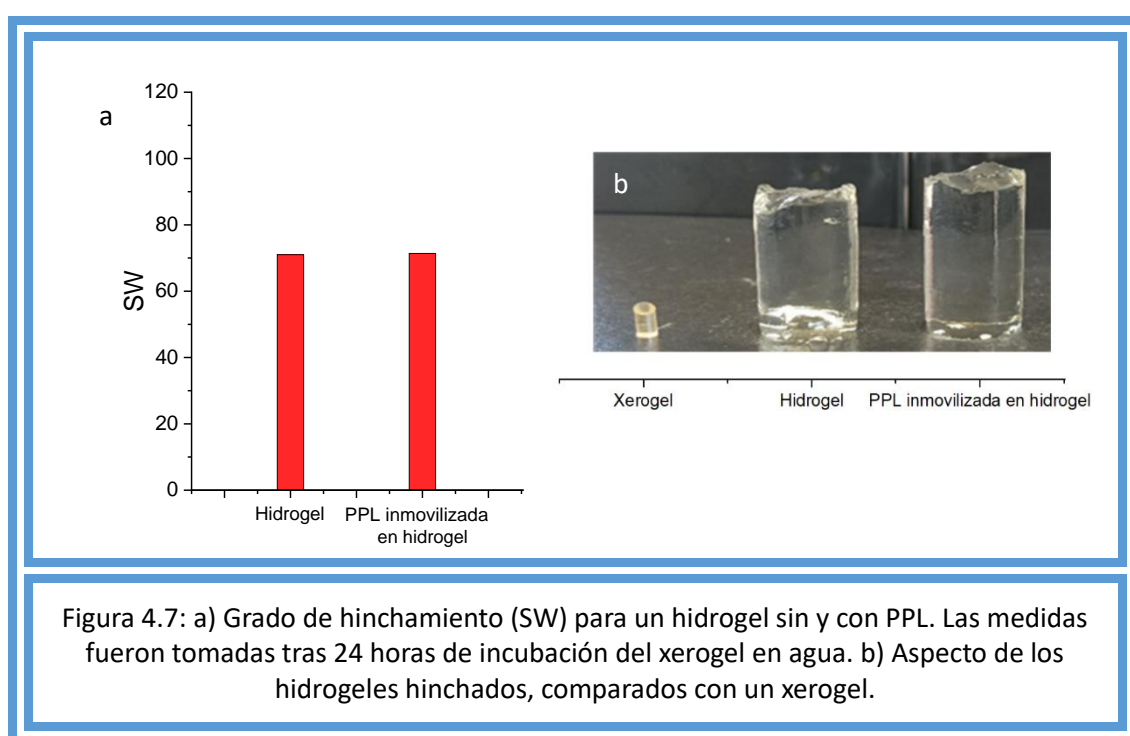


4.1.3 Hidrogel

Una vez explorado el comportamiento de la PPL en DES se procedió a hacer un estudio similar de la enzima en un hidrogel. A diferencia de los DES, la proteína en este medio está confinada en una matriz sólida, que facilita su manipulación y transporte. La inmovilización se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos (figura 3.2). El hecho de que para su preparación se parta de un hidrogel previamente preparado y deshidratado (xerogel), que se pone en contacto con la disolución enzimática hasta absorberla completamente, asegura que toda la proteína ha quedado atrapada en la matriz. Además, dado que el hidrogel está cargado positivamente y la enzima negativamente a pH 8.2 (su punto isoeléctrico es 5,18) se pueden establecer interacciones electrostáticas entre ambas estructuras.

Para demostrar que el hidrogel, con la proteína incorporada, preserva sus propiedades mecánicas, se deshidrataron dos porciones idénticas de hidrogel, una con y otra sin PPL, y se exploró la capacidad de hinchamiento o *swelling* de ambos. Para ello se siguió el protocolo descrito en Materiales y Métodos (ecuación 3.2) y los resultados se muestran en la figura 4.7.

Como se puede observar, el hidrogel aumentó enormemente su tamaño, mostrando una alta capacidad de hinchamiento, que no se vio afectada por la presencia de la enzima. Por tanto, el hecho de que puedan establecerse interacciones electrostáticas entre el hidrogel (cargado positivamente) y la PPL no parece afectar la capacidad de estiramiento de las cadenas poliméricas que conforman la red.

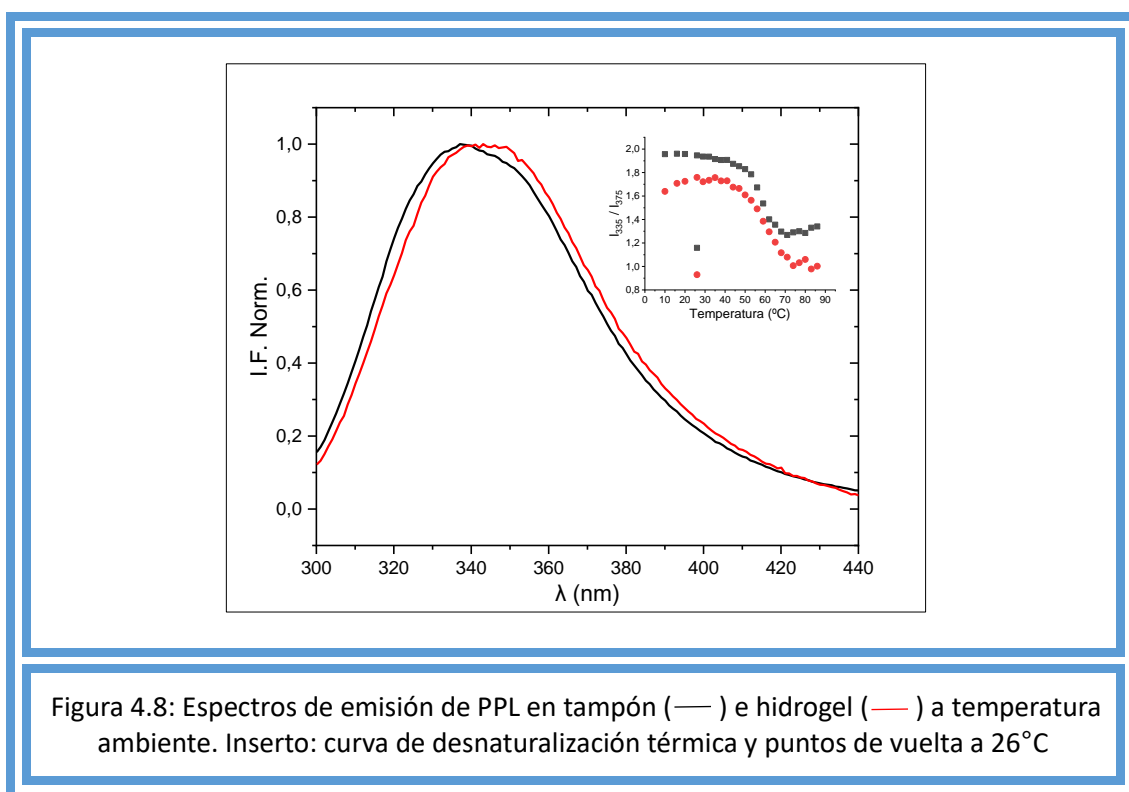


Tras esta caracterización se estudió la estabilidad conformacional de la PPL confinada. Las muestras de los hidrogel para los estudios de fluorescencia se prepararon como se describe en Materiales y Métodos, introduciendo un fragmento de hidrogel en una cubeta de fluorescencia y recogiendo los espectros de emisión a diferentes temperaturas. La figura 4.8 compara el espectro a temperatura ambiente con el obtenido en tampón.

Como se puede apreciar, hay un pequeño desplazamiento hacia el rojo que podría indicar un inicio de desnaturalización en la proteína. Sin embargo, cuando se representó la curva de desnaturalización (inserto en figura 4.8) se observó que, a diferencia de lo observado en los DES, el mecanismo de desplegamiento era muy similar al del medio acuoso, con $T_m \approx 58^\circ\text{C}$. Este resultado sugiere que la PPL se encuentra en los poros del hidrogel, en un ambiente que es

prácticamente similar al del tampón, aunque es posible que las interacciones electrostáticas con la red polimérica modifiquen ligeramente el entorno de los triptófanos más expuestos, de ahí el pequeño cambio observado en el espectro de emisión.

Al igual que ocurrió con DES, no fue posible hacer experimentos de dicroísmo circular de la proteína en este medio, ya que los precursores del hidrogel presentaban absorción en la región UV que interferían con las señales de la enzima.

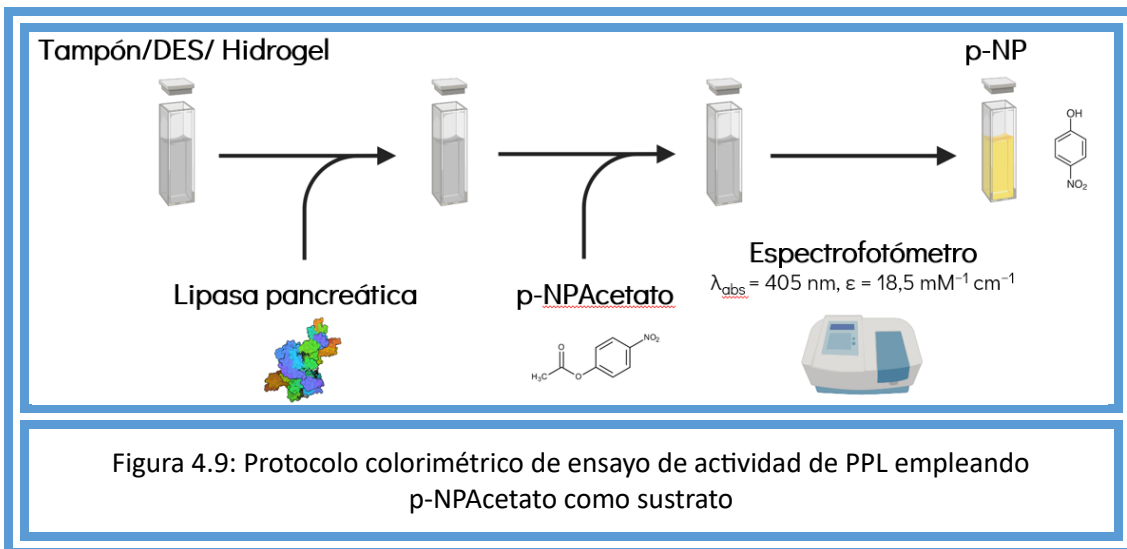


4.2 Actividad catalítica de la PPL en diferentes medios

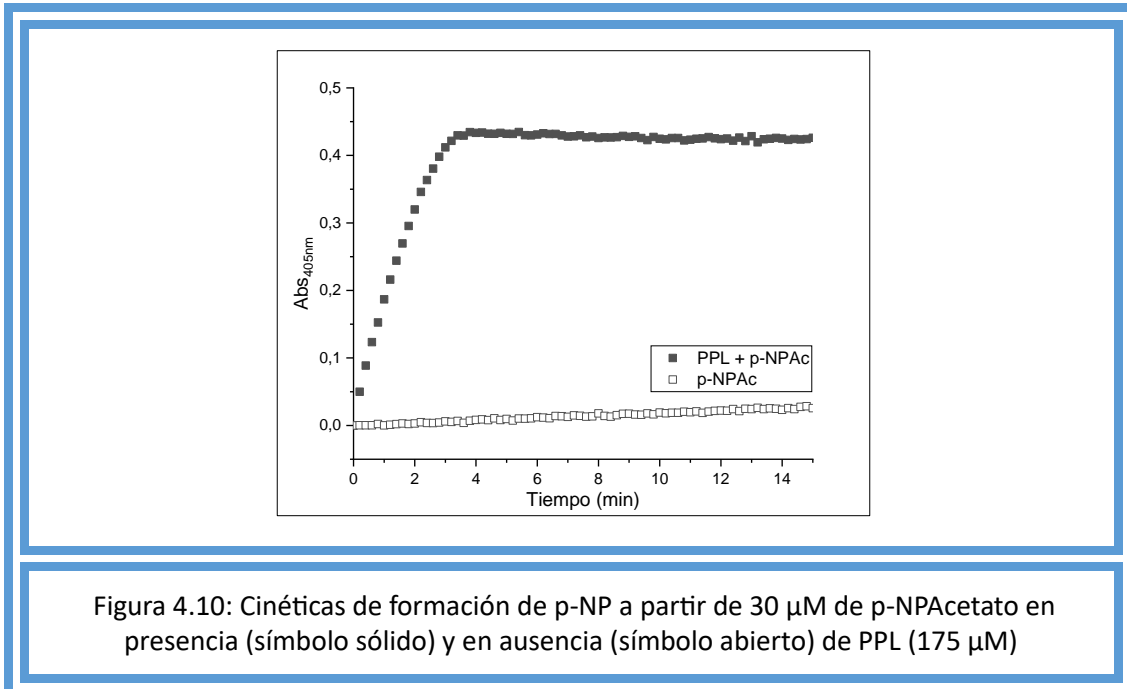
4.2.1 Tampón

Una vez se ha demostrado la estabilidad conformacional de PPL en distintos medios, es necesario explorar su actividad y compararla con la presentada en tampón. El protocolo seleccionado para ello fue el método colorimétrico descrito en Materiales y Métodos y mostrado en la figura 4.9.

Como primera opción, se eligió como sustrato el p-NPAcetato que no precisa de una interfase hidrofóbica para ser hidrolizado a p-NP. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.



El experimento se realizó primero en tampón. Se eligió una concentración alta de proteína (175 μM) y una concentración de sustrato de 30 μM y se siguió el aumento de absorbancia con el tiempo, midiendo a 405 nm. La cinética, representada en la figura 4.10, confirma que la enzima es activa, hidrolizando todo el sustrato en aproximadamente 4 minutos. La figura también muestra que en ausencia de la enzima también se hidrolizó una pequeña fracción de sustrato, aunque prácticamente despreciable, durante el tiempo que duró el experimento.



4.2.2 DES

A continuación, se realizó un experimento similar con la misma concentración de proteína disuelta en DES. El estudio se hizo únicamente en Col-Gly y TMAC-Gly, dado que la estabilidad

de la PPL en Col-Urea había dado resultados menos positivos. Inicialmente se utilizaron las mismas combinaciones que en los experimentos de fluorescencia, es decir mezclas con 75% de DES y 25% de tampón. Sin embargo, también se probaron otras combinaciones en las que se redujo la proporción de DES con respecto al agua con objeto de bajar la viscosidad, para que no se ralentizara demasiado la difusión del sustrato hasta el centro activo de la enzima. En concreto, además de la proporción 75:25, se exploraron la 50:50, 25:75 y 0:100 (tampón solo). Como control se recogió también la hidrólisis del p-NPacetato en ausencia de proteína. Los resultados para el Col-Gly se muestran en la figura 4.11. En las gráficas, los valores de absorbancia del eje “y” han sido transformados a porcentaje de p-NP formado, utilizando el coeficiente de extinción del p-NP, para visualizar mejor el rendimiento de obtención de los productos.

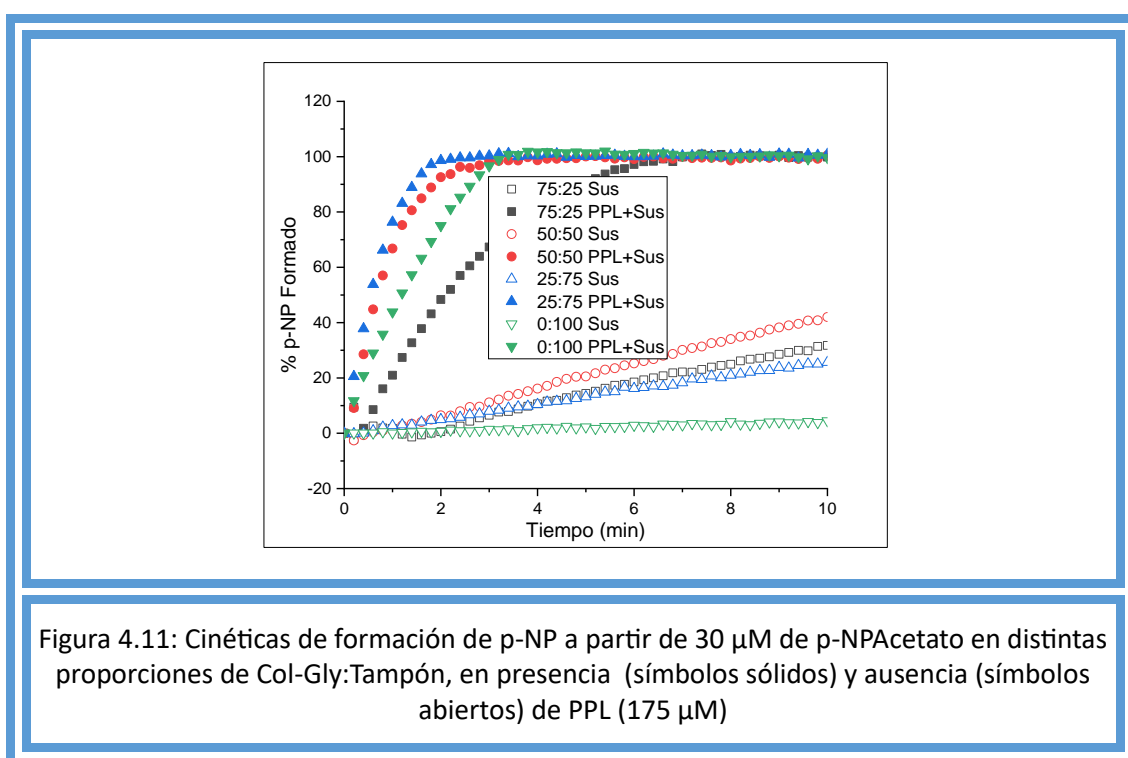


Figura 4.11: Cinéticas de formación de p-NP a partir de 30 µM de p-NPacetato en distintas proporciones de Col-Gly:Tampón, en presencia (símbolos sólidos) y ausencia (símbolos abiertos) de PPL (175 µM)

El resultado más sorprendente de la figura 4.11 es que la actividad de la PPL se ve afectada por las distintas combinaciones de DES y tampón. Así, la actividad es menor cuando hay una proporción mayor de DES, probablemente por las restricciones difusionales impuestas por la elevada viscosidad. Sin embargo, la proporción de DES 50:50 y sobre todo la 25:75 aumentan claramente la actividad de la enzima con respecto a la observada en el tampón.

También cabe destacar que la presencia de DES en el tampón, en ausencia de enzima, ejerce una cierta actividad catalítica, ya que hidroliza el p-NPacetato a mayor velocidad que lo hace el tampón, aunque en menor medida que la proteína.

La figura 4.12 muestra los resultados obtenidos para el TMAC-Gly. El comportamiento es muy similar al observado en Col-Gly. La actividad de la enzima aumenta en las proporciones de DES 50:50 y 25:75, con respecto a lo observado en tampón, mientras que la menor actividad se da cuando la proporción de DES aumenta al 75%. La única diferencia es que la actividad catalítica del TMAC-Gly es menor que la del Col-Gly, ya que en ausencia de la proteína la fracción de sustrato hidrolizado es más pequeña, lo que puede ser una ventaja en muchos casos, al prácticamente no competir con la reacción enzimática.

Hay que hacer notar que en las mezclas que contienen DES y agua, pueden desestabilizarse los enlaces de hidrogeno que se establecen entre los componentes de DES, de forma que si se aumenta mucho la proporción de agua llegará un momento en que lo que tendremos será una disolución de precursores en agua, más que un DES.⁴³ Algunos autores dicen que también se establecen complejos ternarios entre las moléculas de agua y los donadores y aceptores de hidrogeno, formándose un nuevo DES si las proporciones son adecuadas.⁴⁴ En cualquier caso, la realidad es que estas combinaciones son capaces de activar a la enzima.

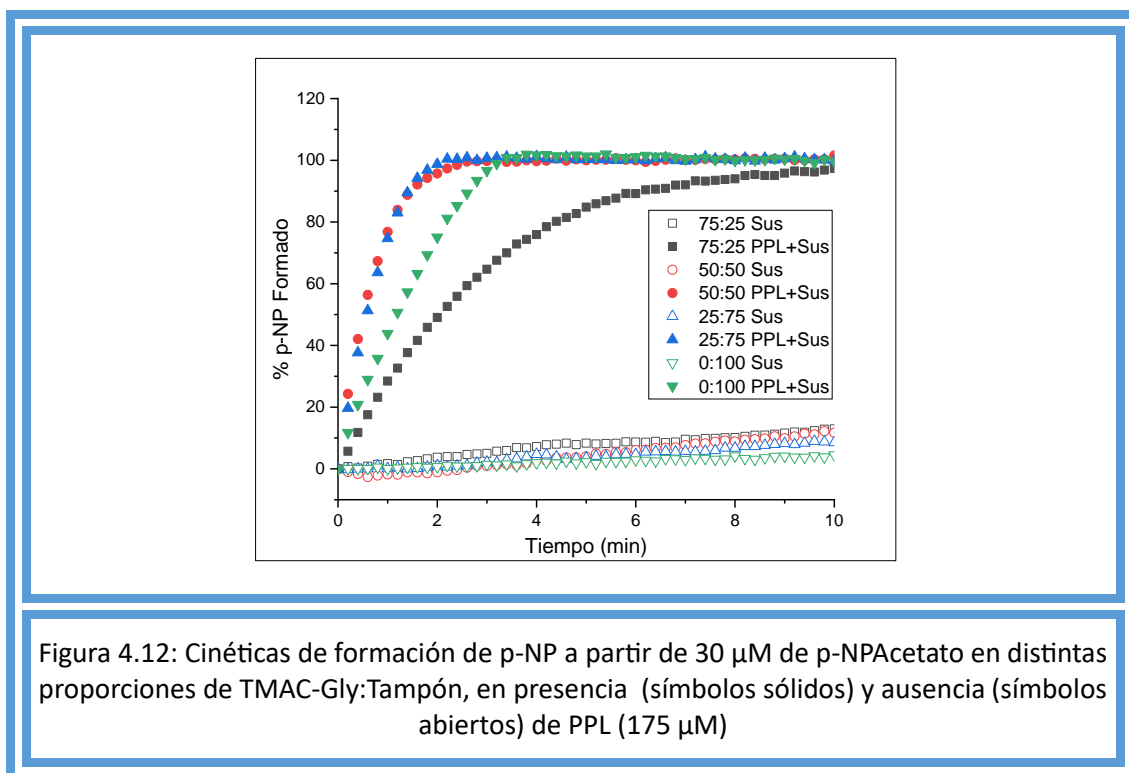
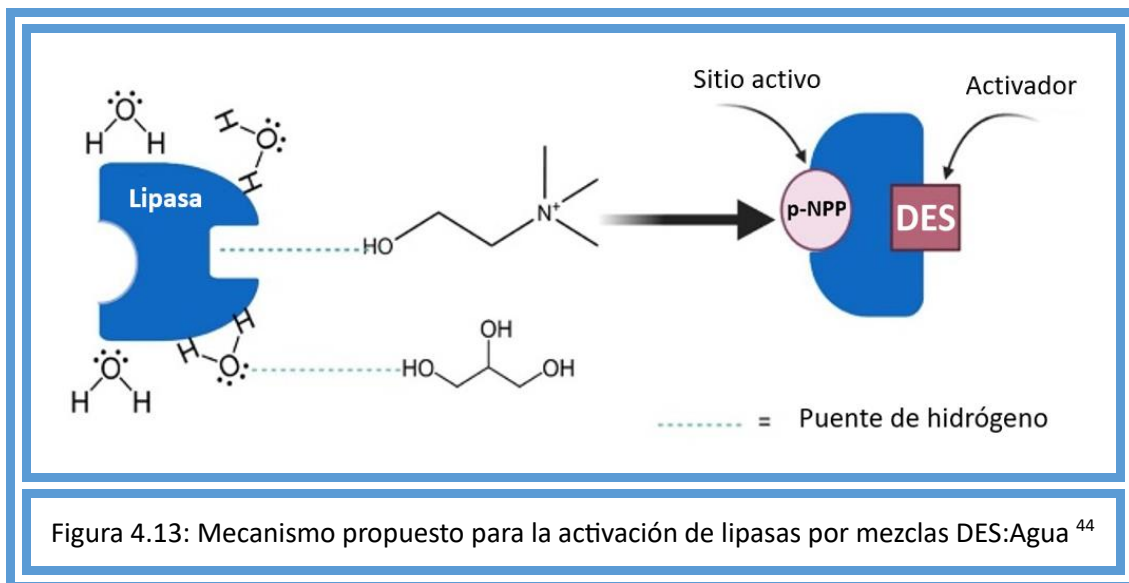


Figura 4.12: Cinéticas de formación de p-NP a partir de 30 μM de p-NPacetato en distintas proporciones de TMAC-Gly:Tampón, en presencia (símbolos sólidos) y ausencia (símbolos abiertos) de PPL (175 μM)

Un efecto similar al observado en estos experimentos ha sido descrito para otras lipasas distintas de la pancreática cuando se han disuelto en DES combinados con agua.⁴⁴ La hipótesis formulada en esos trabajos y que podría ser aplicable a la PPL es que los componentes del DES se unen a la enzima en un sitio distinto del centro activo, induciendo cambios conformacionales que desplazan el equilibrio hacia la conformación abierta de la lipasa (Ver figura 1.3 en la

Introducción), favoreciendo la reacción de catálisis. Un esquema que ilustra esta hipótesis se puede ver en la figura 4.13.



En vista de estos resultados tan interesantes decidimos cuantificar el aumento de actividad de la PPL en Col-Gly y TMAC-Gly, cuando se encuentran en una proporción de un 25%. Para ello se calculó la constante catalítica (k_{cat}), tal como se detalla en Materiales y Métodos. Con este fin, se recogieron cinéticas a diferentes concentraciones de PPL y una concentración fija de sustrato, tanto en tampón como en ambos DES.

La figura 4.14 muestra, como ejemplo, las cinéticas recogidas en tampón para una concentración 30 μ M de sustrato. La primera derivada de estas curvas nos permitió determinar las velocidades de hidrólisis para cada tiempo, así como trazar una nueva gráfica que representa dicha velocidad frente a la concentración de sustrato remanente (figura 4.15).

Ajustando esta gráfica a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 3.1), se pudieron determinar los valores de $V_{m\acute{a}x}$ para cada concentración de proteína, los cuales han sido representados en la figura 4.16, para los tres sistemas.

Los datos se ajustaron a una recta de cuya pendiente se ha obtenido la K_{cat} . Como se puede observar, este valor es similar en ambos DES, pero mucho mayor ($\approx 2,5$ veces) que el obtenido en tampón, confirmando la mayor eficiencia de la enzima cuando esta disuelta en mezclas DES:Tampón.

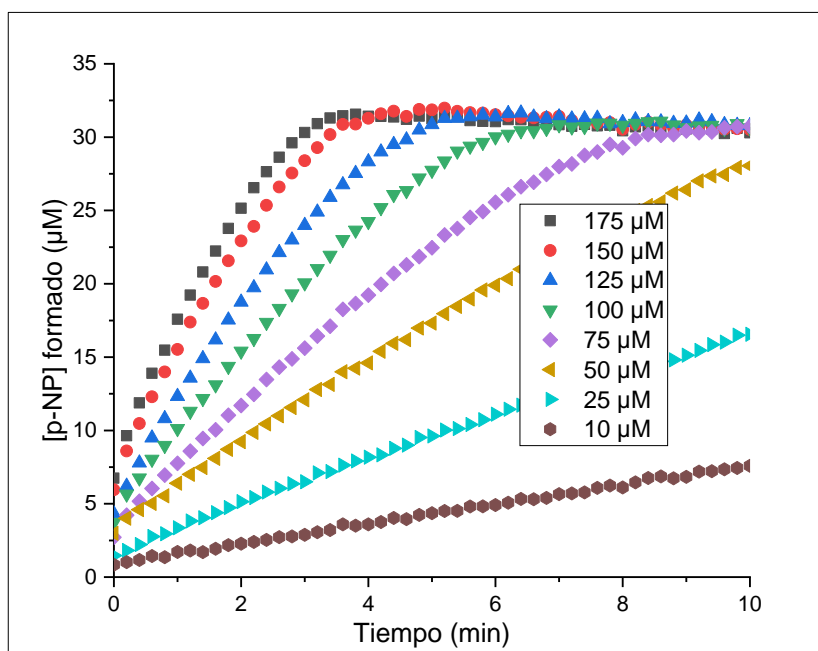


Figura 4.14: Cinéticas de formación de p-NP a partir de 30 μM de p-NPacetato y distintas concentraciones de PPL

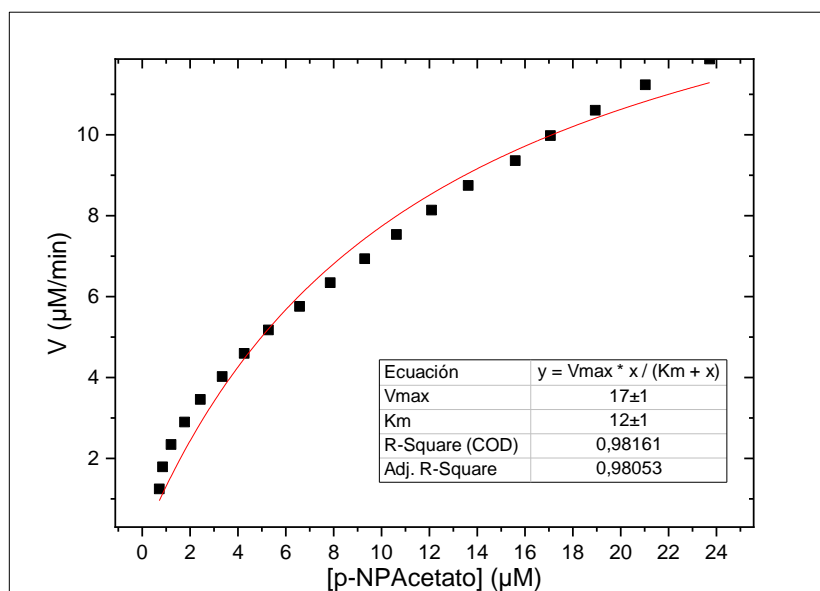
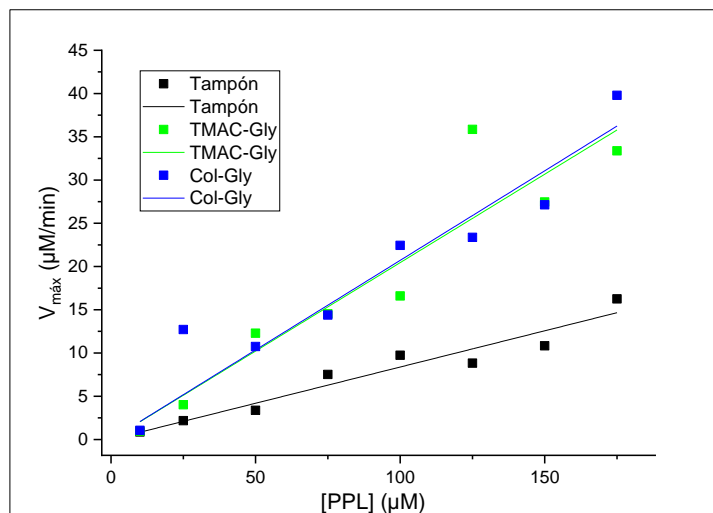


Figura 4.15: Representación de la velocidad de hidrólisis de p-NPacetato frente a la concentración de sustrato remanente para una concentración 175 μM de PPL en tampón. En rojo se muestra el ajuste de la curva a la ecuación de Michaelis-Menten



Disolvente	K_{cat} (min^{-1})		Estadística
	Valor	Error estándar	R^2 Ajustado
Tris-HCl	0.0838	0.0045	0.9775
TMAC-Gly (25%)	0.2045	0.0153	0.9567
Col-Gly (25%)	0.2071	0.0126	0.9713

Figura 4.16: Representación de $V_{m\acute{a}x}$ frente a la concentración de PPL para los tres sistemas estudiados y ajuste a una recta para la determinación de K_{cat}

Determinada la estabilidad conformacional y confirmado el aumento de actividad de PPL en Col-Gly y TMAC-Gly con respecto al tampón, es interesante conocer para potenciales aplicaciones biotecnológicas, como se afecta la actividad de la enzima en estos medios cuando se somete a diferentes condiciones, como un aumento de temperatura o el paso del tiempo.

Los estudios de estabilidad térmica de la PPL en los diferentes DES indicaron que tanto Col-Gly como TMAC-Gly estabilizaban a la enzima dado que ralentizaban enormemente el proceso de desplegamiento. Este resultado sugiere que, si sometemos durante cierto tiempo la proteína a una temperatura muy alta, por encima de su T_m , esta podría mantener su actividad en los DES, mientras que perdería una buena parte de ella en tampón. Para comprobar esta hipótesis se incubó previamente a la enzima durante 5 minutos a 80°C en tampón, Col-Gly y TMAC-Gly al 25% y a continuación, se llevó a temperatura ambiente y se añadió p-NPacetato ($30\ \mu\text{M}$), registrando su cinética de hidrólisis.

Los resultados se muestran en la figura 4.17 y se comparan con las cinéticas obtenidas a temperatura ambiente. Como se puede observar, la enzima prácticamente mantuvo su actividad tras la incubación en DES, logrando transformar todo el sustrato en unos 5 minutos. Sin

embargo, perdió buena parte de su actividad en tampón, debido a que su centro activo habrá quedado inactivo tras la desnaturalización térmica.

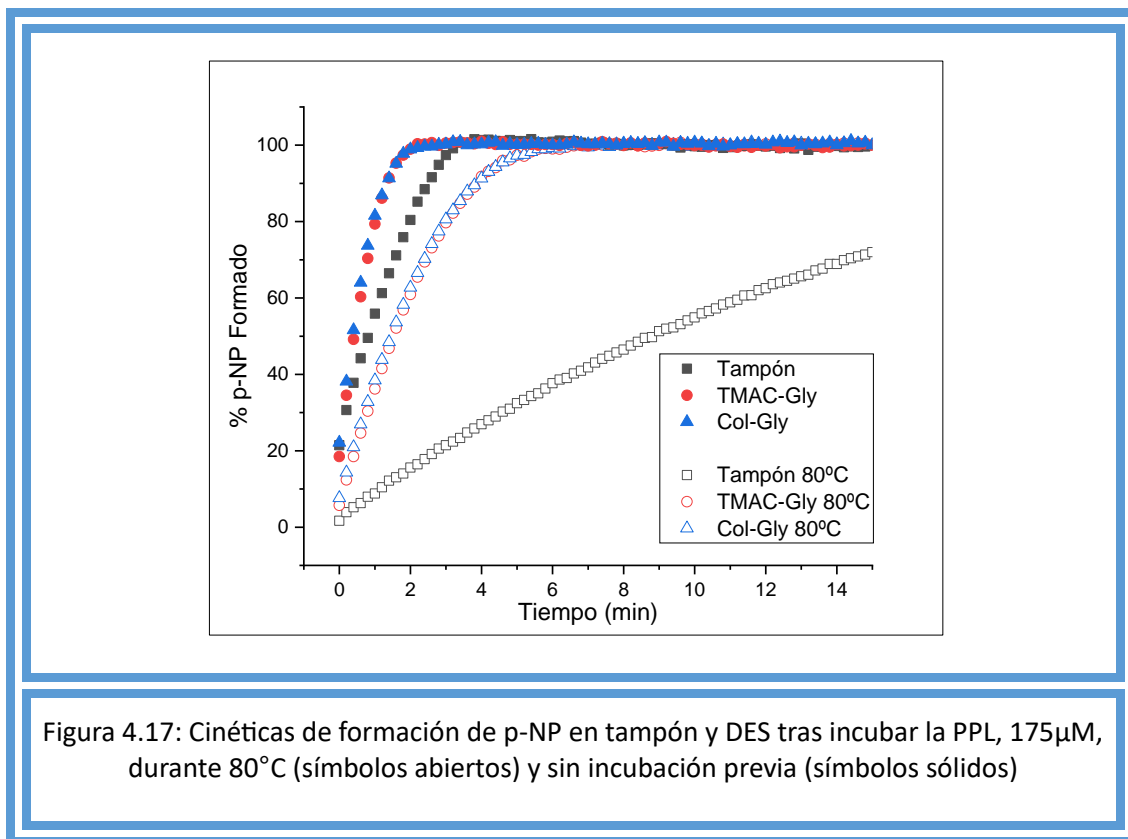


Figura 4.17: Cinéticas de formación de p-NP en tampón y DES tras incubar la PPL, 175 μ M, durante 80°C (símbolos abiertos) y sin incubación previa (símbolos sólidos)

Con estos resultados queda patente la estabilidad conformacional asociada a la actividad en DES que no se consigue en tampón y que a nivel industrial puede ser de gran relevancia.

Para aplicaciones industriales no solo resulta de interés el poder trabajar a altas temperaturas, sino que es fundamental que la enzima se mantenga estable el mayor tiempo posible. Por tanto, con objeto de estudiar el efecto del tiempo sobre la PPL en DES y en tampón se prepararon 3 disoluciones: una contenía PPL en tampón y las otras PPL en Col-Gly y TMAC-Gly, a la misma concentración (175 μ M). Cada una de estas disoluciones se separó en tres eppendorf, que se dejaron cerrados a temperatura ambiente en el laboratorio, expuestos a la luz. La actividad del primer eppendorf se analizó el mismo día de la preparación, mientras que en los otros dos se analizó tras 10 y 20 días de preparación.

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 4.18. Como se puede observar en la figura 4.18 b, la disolución que contenía tampón a los 20 días se encontraba contaminada, aparentemente por hongos, a diferencia de los eppendorfs que contenían Col-Gly y TMAC-Gly, por lo que no se pudo determinar su actividad. Por otro lado, los resultados muestran que la proteína en los DES solo perdió un poco de actividad tras 20 días de almacenamiento,

igualándose a la del tampón recién preparado, mientras que la PPL en tampón sí que vio bastante afectada su actividad tras 10 días de preparación.

Estos resultados vuelven a ser muy favorables para los disolventes eutécticos ya que no solo aumentan la actividad y estabilizan térmicamente a la PPL, sino que, además, la enzima es más estable a temperatura ambiente cuando está disuelta en ellos. Los DES podrían ejercer también una acción conservante, ya que la disolución tiene menos tendencia a sufrir contaminaciones.

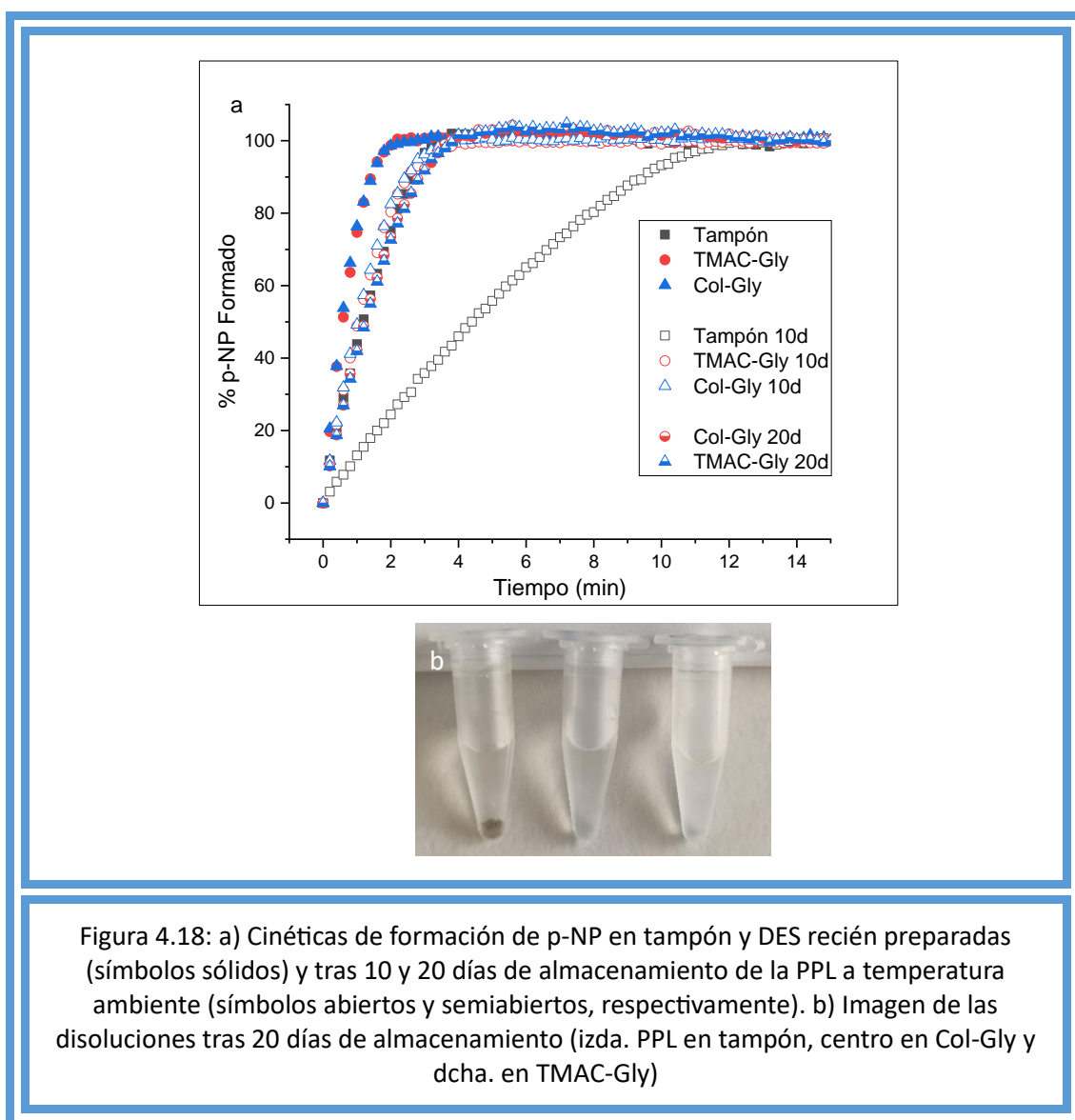


Figura 4.18: a) Cinéticas de formación de p-NP en tampón y DES recién preparadas (símbolos sólidos) y tras 10 y 20 días de almacenamiento de la PPL a temperatura ambiente (símbolos abiertos y semiabiertos, respectivamente). b) Imagen de las disoluciones tras 20 días de almacenamiento (izda. PPL en tampón, centro en Col-Gly y dcha. en TMAC-Gly)

4.2.3 Hidrogel

Para el estudio de la actividad de la PPL en hidrogel se utilizó el mismo protocolo colorimétrico de la figura 4.9, con la variación de que un fragmento de hidrogel con la enzima inmovilizada fue incorporado en la cubeta de absorción y a continuación se le añadió una disolución conteniendo el sustrato p-NP acetato, que fue totalmente absorbida por el hidrogel. Es por ello que las

cinéticas de actividad se recogen al mismo tiempo que el hidrogel se va hinchando, lo que provoca que estas curvas sean menos limpias que las obtenidas en disolución. La figura 4.19 recoge este experimento y lo compara con la cinética en tampón. Como se puede comprobar, la enzima inmovilizada sigue hidrolizando el sustrato, de forma que el hidrogel adquirió un color amarillento que confirmaba la transformación en p-NP.

Sin embargo, la reacción fue considerablemente más lenta que en tampón, de forma que en una hora no se había transformado completamente el sustrato. Un comportamiento similar ha sido descrito para otras proteínas, como la fosfatasa alcalina, inmovilizadas en un hidrogel, y se ha atribuido más que a una pérdida de actividad enzimática, a las restricciones difusionales impuestas por la red polimérica, que provocan que el sustrato tarde más tiempo en llegar al centro activo de la enzima.⁴⁰ El resultado por tanto lo consideramos positivo, ya que refleja que la enzima, tras ser inmovilizada mantiene su función.

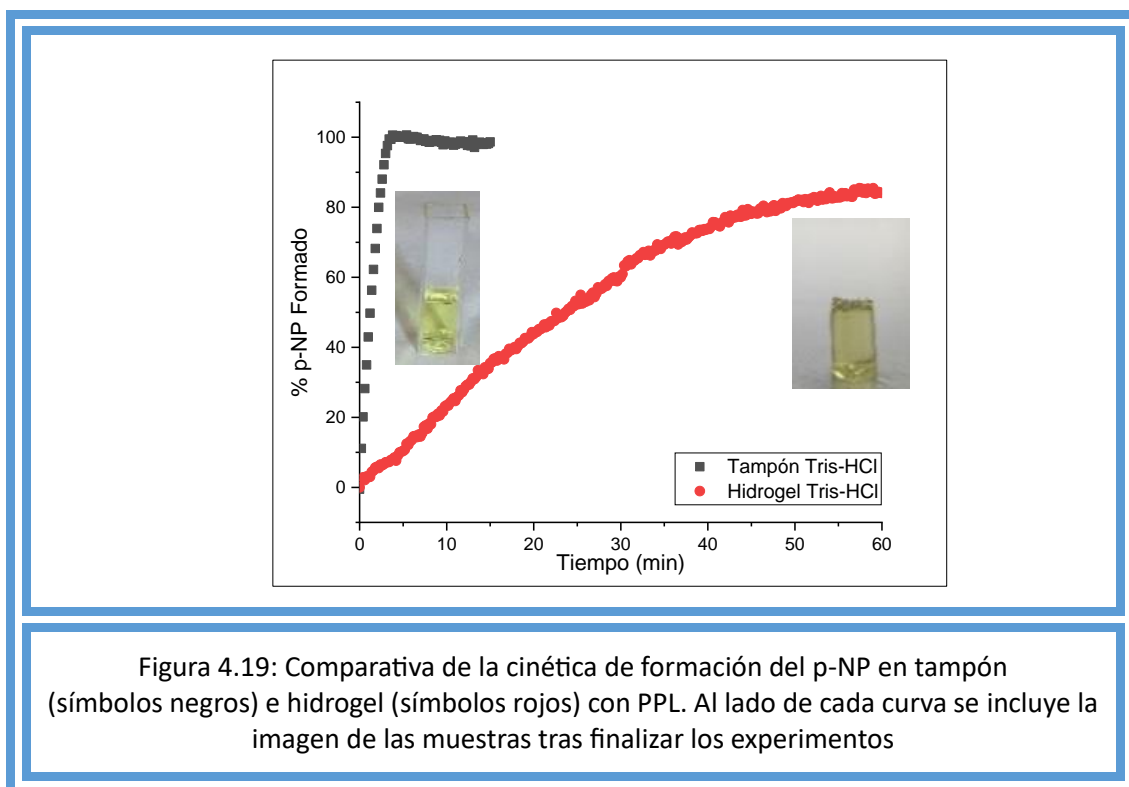
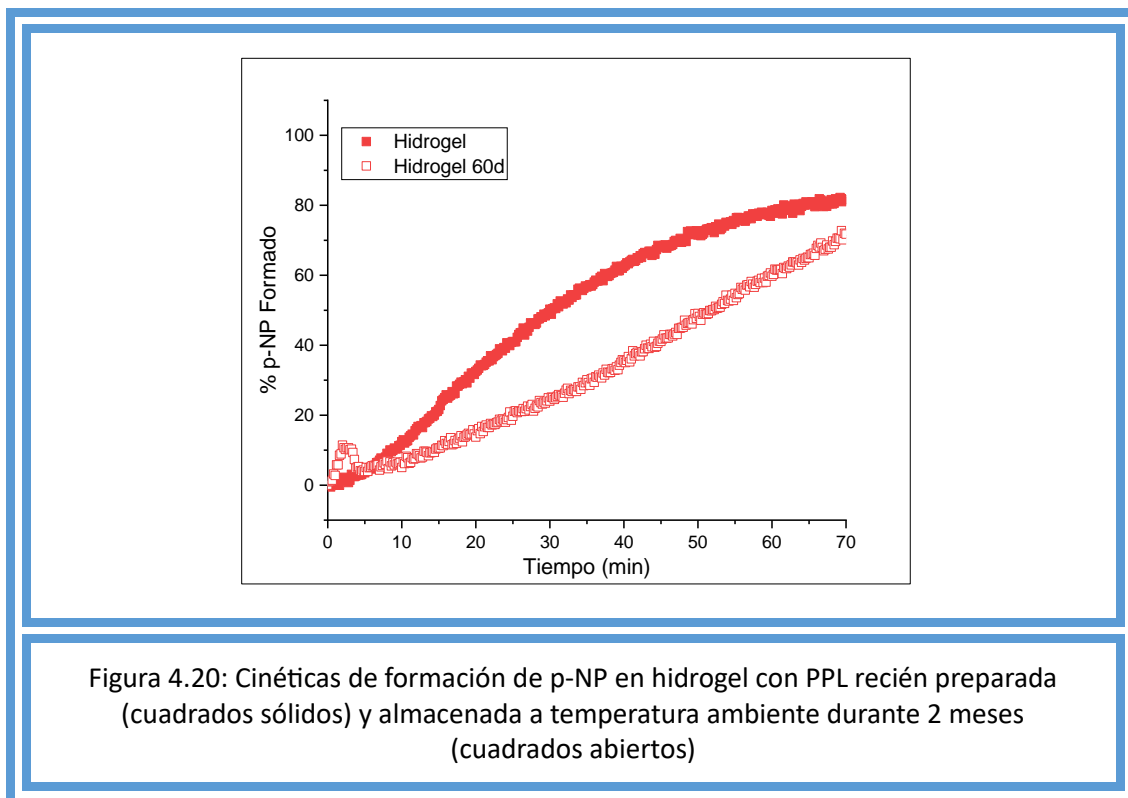


Figura 4.19: Comparativa de la cinética de formación del p-NP en tampón (símbolos negros) e hidrogel (símbolos rojos) con PPL. Al lado de cada curva se incluye la imagen de las muestras tras finalizar los experimentos

Dado que la cinética de la reacción se ve afectada por la lenta difusión del sustrato en el hidrogel, no se determinaron los parámetros cinéticos en este medio, ya que obtendríamos constantes catalíticas aparentes que no podrían ser directamente comparadas con la obtenida en tampón. Lo que si se llevó a cabo fue el estudio del efecto del tiempo sobre la actividad de la enzima inmovilizada. Para este experimento se inmovilizó la PPL en el hidrogel y se cortaron dos fragmentos idénticos. Al primero de ellos se le hizo el estudio cinético el mismo día de su

preparación, mientras que el segundo se dejó en la bancada del laboratorio durante dos meses, antes de analizar su actividad. Las curvas obtenidas se muestran en la figura 4.20. En ellas se puede apreciar como la enzima sigue siendo activa pasado los dos meses de inmovilización, aunque con una cierta pérdida de eficiencia con respecto al primer día.



Este resultado supone una importante ventaja con respecto a la enzima disuelta en tampón ya que, como se ha descrito anteriormente, en ese medio solo es capaz de permanecer activa los primeros días. Por tanto, la inmovilización en el hidrogel no solo facilita la manipulación y transporte de la proteína, sino que mejora sus condiciones de almacenamiento. Además, consideramos que estos resultados podrían ser optimizados si el hidrogel con la enzima inmovilizada es llevado a sequedad y transformado en xerogel. El bajo contenido de agua probablemente conservará mejor la proteína, como ya ha sido descrito para otras enzimas almacenadas en xerogeles, en donde se ha mantenido su actividad pasados 18 meses.⁴⁰

4.3 Estudios de inhibición de la PPL en diferentes medios

4.3.1 Tampón

Como se describió en la Introducción de este trabajo, además de aplicaciones a nivel industrial, la lipasa pancreática puede ser de gran utilidad en la búsqueda de fármacos antiobesidad, al ser

una diana terapéutica de esta patología. El desarrollo de biosensores que incorporen esta enzima y permitan detectar sus inhibidores es por tanto un desafío para muchos investigadores. Para explorar esta potencial aplicación, analizamos si se podía detectar inhibición enzimática en los diferentes medios estudiados, para lo cual seleccionamos como inhibidor el fármaco comercial Orlistat.

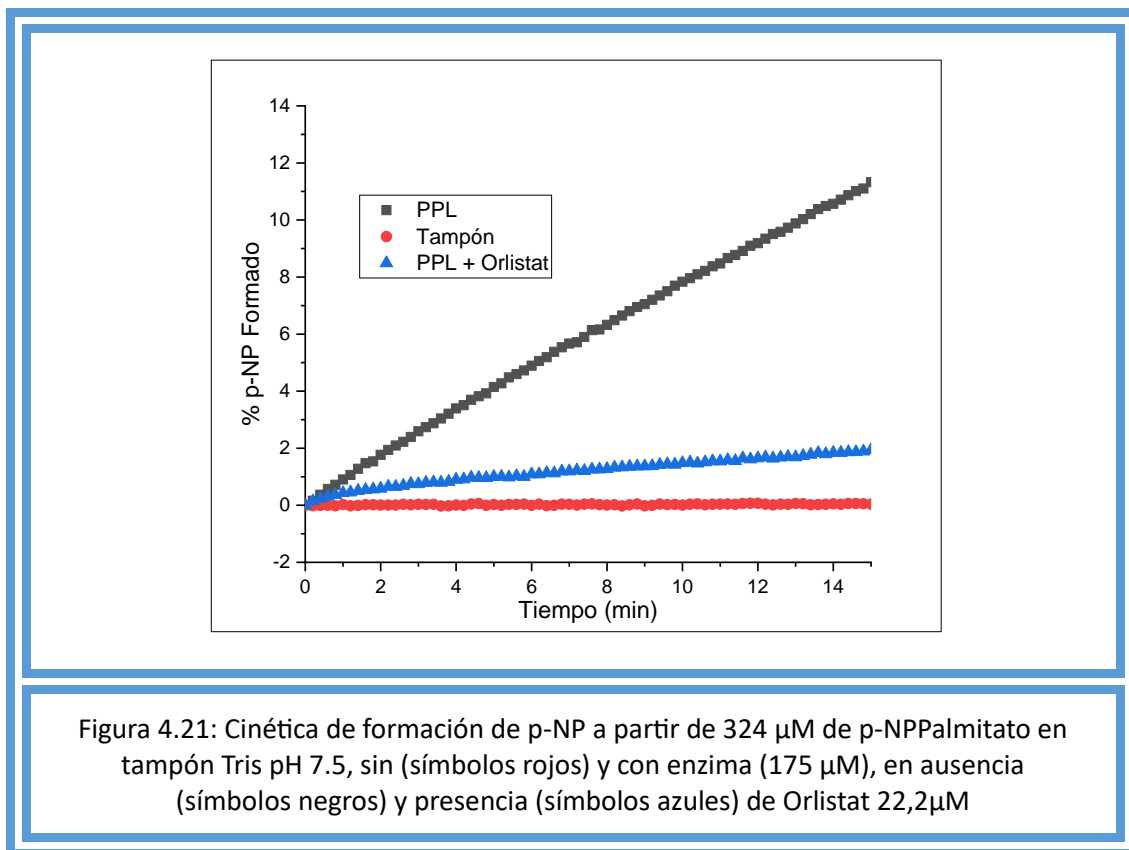
Primeramente, se realizaron experimentos en tampón, en condiciones similares a la de los ensayos de actividad descritos anteriormente, (30 μM de p-NPAcetato y 175 μM de PPL en tampón Tris pH 8,2). Se probaron distintas concentraciones de Orlistat, previamente disuelto en metanol, pero no se pudo demostrar la inhibición ejercida por el fármaco a ninguna de las concentraciones analizadas. Nosotros atribuimos este resultado a que el Orlistat es prácticamente insoluble en agua. Por esta razón, cuando a la disolución de enzima se le añade una alícuota de Orlistat disuelto en metanol, al entrar en contacto con el agua acaba precipitando.

Como se comentó en el apartado de Introducción, cuando la PPL se disuelve en agua se encuentra en una conformación cerrada que impide la llegada de moléculas hidrofóbicas a su centro activo y, por tanto, es inactiva. La hidrólisis del p-NPAcetato puede tener lugar, aunque la enzima esté cerrada, probablemente por el pequeño tamaño de la molécula y porque es parcialmente soluble en agua. Sin embargo, otros sustratos como los sustratos naturales de la enzima (triglicéridos) o sustratos artificiales tales como el p-nitrofenil laurato y p-nitrofenil palmitato (p-NPPalmitato) deben formar emulsiones para inducir la conformación abierta de la enzima. Por la misma razón, los inhibidores hidrofóbicos como el Orlistat, deberán también formar emulsiones para llegar a entrar en contacto con el centro activo y bloquearlo.

La formación de emulsiones y micelas se puede facilitar incorporando tensioactivos en el tampón. Teniendo todo esto en cuenta, se modificó el ensayo de actividad anterior utilizando otro tampón (Tris pH 7,5), que incluía SDS y Triton X-100 como tensioactivos. Además, se utilizó p-NPPalmitato el cual también se hidroliza a p-NP, pudiendo detectarlo colorimétricamente.

El protocolo que se siguió para el ensayo de inhibición se basa en el recientemente descrito por Jin y col.⁴⁵ Dicho protocolo utiliza una concentración muy alta de p-NPPalmitato (324 μM), el cual es incubado previamente con Orlistat, antes de ser añadido a la disolución de proteína, como se describe en Materiales y Métodos. La gráfica de la figura 4.21 recoge durante 15 minutos la cinética de formación del p-NP en ausencia y en presencia de Orlistat (22,2 μM). Como se puede apreciar, el efecto inhibitor del fármaco ya se detecta tras los primeros 2 minutos de reacción. Hay que remarcar que el porcentaje de formación del p-NP es muy bajo,

debido a la alta cantidad de sustrato utilizado en el experimento. Por eso las cinéticas presentan ese comportamiento lineal. En la figura también se incluye la cinética de hidrolisis del sustrato para una muestra sin Orlistat y sin proteína, demostrando que la hidrolisis espontánea del p-NPPalmitato es despreciable.



4.3.2 DES

Este mismo experimento se llevó a cabo para la PPL disuelta en mezclas DES-tampón, como las descritas anteriormente. Primero se probó un tampón sin tensioactivos, ya que supusimos que los DES serían capaces de disolver el Orlistat. Sin embargo, no obtuvimos ningún resultado concluyente. A continuación, se repitió el experimento incluyendo Triton X-100 y SDS en el tampón y de nuevo, los resultados no fueron reproducibles.

Para explicar este resultado, se hipotetizó que los DES, dada su alta capacidad de disolver compuestos hidrofóbicos, desestabilizan las emulsiones y micelas que contienen Orlistat y sustrato, de forma que no llega a producirse la interfase entre la micela y la enzima que permite la apertura del sitio catalítico. En cualquier caso, creemos que con un estudio en más profundidad podríamos encontrar las condiciones adecuadas para detectar inhibición enzimática en estos disolventes, por lo que no han sido descartados para este tipo de aplicación.

4.3.3 Hidrogel

Para los experimentos de inhibición de la PPL inmovilizada en hidrogeles se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente, utilizando el tampón que contenía los tensioactivos. Se cortaron dos fragmentos idénticos de hidrogel y se colocaron en sendas cubetas de absorción. A la primera cubeta se le añadió una disolución de p-NPPalmitato y a la segunda una disolución de p-NPPalmitato (324 μ M) y Orlistat (22,2 μ M).

Las disoluciones fueron absorbidas completamente por los hidrogeles mientras se recogía la cinética de la reacción de hidrólisis. Como se puede observar en la figura 4.22, en ausencia de Orlistat la reacción ya fue muy lenta, debido probablemente a la dificultad de las emulsiones y micelas de viajar a través de la red polimérica hasta alcanzar la proteína. Además, la cinética no siguió un comportamiento lineal, como el mostrado en tampón. A pesar de ello, el efecto inhibitor del Orlistat se detectó con claridad en los primeros minutos de la cinética. Este efecto se apreció incluso visualmente, ya que al terminar el experimento el tono amarillento de los hidrogeles fue diferente, siendo mucho más intenso el del hidrogel que no contenía Orlistat.

También se estudió la sensibilidad del ensayo a la presencia de Orlistat. Para este experimento se cortaron una serie de fragmentos idénticos de hidrogel con PPL y se incubaron con disoluciones que contenían concentraciones crecientes del fármaco, midiendo el valor de la absorbancia en el hidrogel tras 30 minutos de incubación. Los resultados se han representado en la figura 4.23 en forma de curva de calibrado. Como se puede apreciar, conforme aumenta la concentración de Orlistat, se forma menos producto, como consecuencia de la inhibición enzimática. La curva siguió un comportamiento prácticamente lineal y se ajustó a una recta.

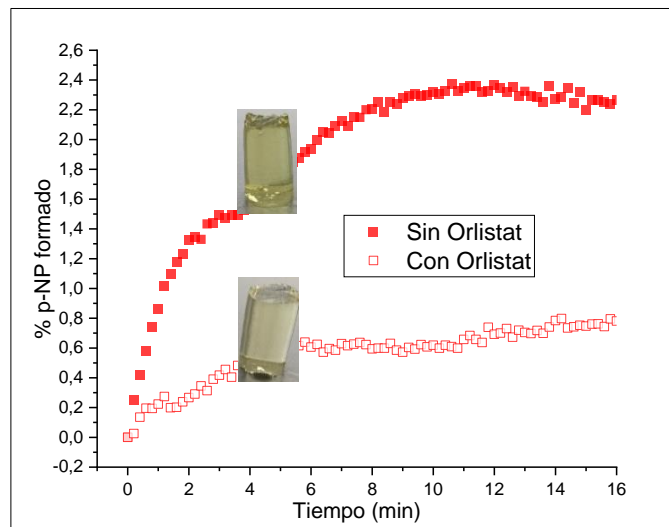


Figura 4.22: Cinética de formación p-NP a partir de p-NPPalmitato para un hidrogel con PPL, en ausencia (cuadrados rojos sólidos) y presencia (cuadrados rojos abiertos) de Orlistat, e imagen final de los hidrogel, tras la reacción

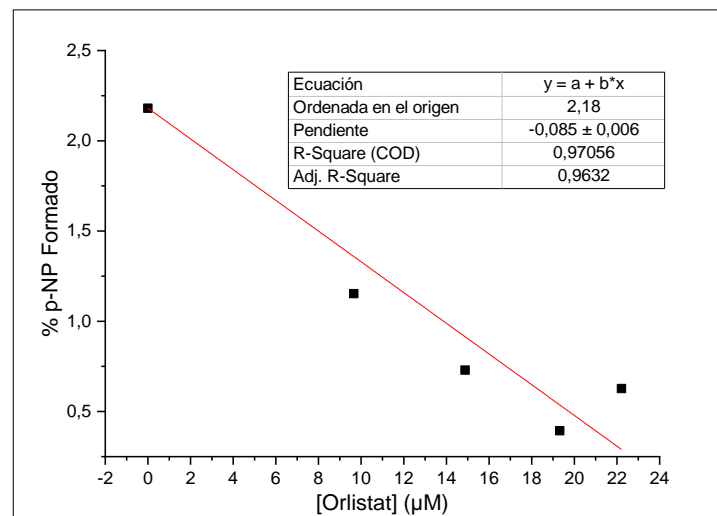


Figura 4.23: Recta de calibrado que representa la inhibición de la PPL en hidrogel en presencia de concentraciones crecientes de Orlistat

Estos resultados son muy interesantes ya que hemos conseguido inmovilizar una enzima, y mediante un ensayo colorimétrico, detectar la presencia de inhibidores. Por tanto, creemos que contamos con una plataforma que, tras ser optimizada, podría actuar como un biosensor enzimático para cribar potenciales fármacos antiobesidad.

5. Conclusiones y Perspectivas futuras

Tras analizar los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Máster, podemos concluir que:

1. La desnaturalización térmica de la PPL en tampón, medida a partir de los cambios en su fluorescencia intrínseca, parece seguir un modelo de desplegamiento en dos estados, con una $T_m \approx 58^\circ\text{C}$. El proceso es irreversible.
2. A temperatura ambiente, la incorporación de PPL en los disolventes eutécticos Col-Urea, Col-Gly y TMAC-Gly, así como la inmovilización en un hidrogel, no parece afectar la conformación de la enzima.
3. A partir del estudio de la desnaturalización térmica de la PPL en los diferentes medios se concluye que, a diferencia del disolvente Col-Urea, las mezclas Col-Gly y TMAC-Gly son capaces de estabilizar la enzima cinéticamente, por lo que han sido seleccionadas para los siguientes estudios. En el caso de enzima inmovilizada, el confinamiento no parece modificar el desplegamiento térmico, siendo muy similar al observado en tampón.
4. Los estudios de actividad de la PPL en tampón, en hidrogel y en diferentes proporciones de DES:tampón muestran una eficiencia catalítica 2,5 veces superior a la del tampón cuando la enzima está disuelta en mezclas con un 25% de DES. La actividad es considerablemente más lenta en el hidrogel, debido a las restricciones difusionales impuestas por la red polimérica.
5. La actividad de la PPL disuelta en mezclas con un 25% de DES se mantiene después de incubar la proteína a altas temperaturas, así como tras ser almacenada a temperatura ambiente durante varias semanas. Con estos resultados queda patente las ventajas de este medio con respecto al tampón, lo que a nivel industrial puede ser de gran relevancia.

6. La PPL inmovilizada en el hidrogel es capaz de mantenerse activa tras dos meses de almacenamiento a temperatura ambiente, mientras que en tampón su actividad solo pudo ser medida durante los 10 primeros días.

7. La actividad de la PPL inmovilizada dentro del hidrogel puede ser inhibida con el fármaco comercial Orlistat, permitiendo generar una recta de calibrado y dando lugar a la posibilidad de crear un biosensor para la búsqueda de fármacos contra la obesidad en el futuro.

Bibliografía

1. Castillo, E., Casas-Godoy, L. & Sandoval, G. Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity. *Biocatalysis* **1**, 178–188 (2016).
2. Ramos, P. *et al.* Time-Resolved Fluorescence Allows Selective Monitoring of Trp30 Environmental Changes in the Seven-Trp-Containing Human Pancreatic Lipase. *Biochemistry* **42**, 12488–12496 (2003).
3. Bourbon-Freie, A., Dub, R. E., Xiao, X. & Lowe, M. E. Trp-107 and Trp-253 Account for the Increased Steady State Fluorescence That Accompanies the Conformational Change in Human Pancreatic Triglyceride Lipase Induced by Tetrahydrolipstatin and Bile Salt. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 14157–14164 (2009).
4. Khan, F. I. *et al.* The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Front Bioeng Biotechnol* **5**, 247303 (2017).
5. Haque, N. & Prabhu, N. P. Lid dynamics of porcine pancreatic lipase in non-aqueous solvents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1860**, 2326–2334 (2016).
6. Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* **19**, 627–662 (2001).
7. Rajan, L., Palaniswamy, D. & Mohankumar, S. K. Targeting obesity with plant-derived pancreatic lipase inhibitors: A comprehensive review. *Pharmacol Res* **155**, 104681 (2020).
8. Enzymatic hydrolysis of beef tallow. (1987).
9. Lipasas en Quesos | Casa del Quesero. <https://casadelquesero.com/categoria-producto/insumos/lipasas/>.
10. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LIPASAS MICROBIANAS, UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE PARA LA UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES. *Vitae* **19**, 244–247 (2012).
11. Prueba de lipasa: Prueba de laboratorio de MedlinePlus. <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-de-lipasa/>.
12. Arturo Sánchez Martínez, D. ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO.

13. García Román, M. 1975-. *Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W : aplicación a formulaciones detergentes : tesis doctoral*. (Editorial Universidad de Granada, 2005).
14. Valenzuela B, A., Sanhueza C, J. & Nieto K, S. EL USO DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS EN LA NUTRICIÓN: UNA TECNOLOGÍA QUE ABRE NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL DESARROLLO DE PRODUCTOS INNOVADORES. *Revista chilena de nutrición* **29**, 106–115 (2002).
15. Navarro González, I. & Periago, M. J. Enzimas lipolíticas bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales. *Anales de Veterinaria de Murcia* **28**, (2012).
16. Ismail, A. R. & Baek, K. H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *Int J Biol Macromol* **163**, 1624–1639 (2020).
17. Sheldon, R. A. & Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem Rev* **118**, 801–838 (2018).
18. Mendes, A. A., Oliveira, P. C. & De Castro, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *J Mol Catal B Enzym* **78**, 119–134 (2012).
19. Robertson, J. G. Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 674–679 (2007).
20. Riesgos para la salud por el sobrepeso y la obesidad - NIDDK. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/control-de-peso/informacion-sobre-sobrepeso-obesidad-adultos/riesgos>.
21. Oliva, J., González, L., Labeaga, J. M. & Álvarez Dardet, C. Salud pública, economía y obesidad: el bueno, el feo y el malo. *Gac Sanit* **22**, 507–510 (2008).
22. CUATRECASAS, G. & FORMIGUERA, X. Recomendaciones para el uso clínico de orlistat en el control de la obesidad. *Endocrinología y Nutrición* **47**, 161–164 (2000).
23. Bachan Upadhyay, L. S. & Verma, N. Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review. <http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2012.713069> **46**, 225–241 (2013).
24. Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L. & Rasheed, R. K. Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc* **126**, 9142–9147 (2004).

25. Pena-Pereira, F. & De La Calle, I. Solvents and Eutectic Solvents. *Encyclopedia of Analytical Science* 184–190 (2019) doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14020-X.
26. Hansen, B. B. *et al.* Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem Rev* **121**, 1232–1285 (2021).
27. | Common structures of hydrogen bond donors and halide salts are... | Download Scientific Diagram. https://www.researchgate.net/figure/Common-structures-of-hydrogen-bond-donors-and-halide-salts-are-utilized-in-the_fig6_352182292.
28. Swebocki, T., Barras, A., Abderrahmani, A., Haddadi, K. & Boukherroub, R. Deep Eutectic Solvents Comprising Organic Acids and Their Application in (Bio)Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 8492 **24**, 8492 (2023).
29. Cao, J., Wu, R., Zhu, F., Dong, Q. & Su, E. Enzymes in nearly anhydrous deep eutectic solvents: Insight into the biocompatibility and thermal stability. *Enzyme Microb Technol* **157**, 110022 (2022).
30. Sanchez-Fernandez, A. & Jackson, A. J. Proteins in deep eutectic solvents: Structure, dynamics and interactions with the solvent. *Adv Bot Res* **97**, 69–94 (2021).
31. Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. & Choi, Y. H. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem* **187**, 14–19 (2015).
32. Durand, E. *et al.* Evaluation of deep eutectic solvent–water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chemistry* **15**, 2275–2282 (2013).
33. Wei, H., Wang, Q., Zhang, R., Liu, M. & Zhang, W. Efficient biodiesel production from waste cooking oil by fast co-immobilization of lipases from *Aspergillus oryzae* and *Rhizomucor miehei* in magnetic chitosan microcapsules. *Process Biochemistry* **125**, 171–180 (2023).
34. Sánchez-Cid, P., Jiménez-Rosado, M., Romero, A. & Pérez-Puyana, V. Novel Trends in Hydrogel Development for Biomedical Applications: A Review. *Polymers (Basel)* **14**, (2022).
35. Ho, T. C. *et al.* Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 2902 **27**, 2902 (2022).

36. Meyer, J., Meyer, L. E. & Kara, S. Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. *Eng Life Sci* **22**, 165–177 (2022).
37. Sennakesavan, G., Mostakhdemin, M., Dkhar, L. K., Seyfoddin, A. & Fatihhi, S. J. Acrylic acid/acrylamide based hydrogels and its properties - A review. *Polym Degrad Stab* **180**, 109308 (2020).
38. Naranjo, A. *et al.* Autonomous self-healing hydrogel with anti-drying properties and applications in soft robotics. *Appl Mater Today* **21**, 100806 (2020).
39. Alacid, Y., Quintero Jaime, A. F., Martínez-Tomé, M. J., Mateo, C. R. & Montilla, F. Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels. *Biosensors (Basel)* **12**, 698 (2022).
40. Alacid, Y., Martínez-Tomé, M. J., Esquembre, R., Herrero, M. A. & Mateo, C. R. Portable Alkaline Phosphatase–Hydrogel Platform: From Enzyme Characterization to Phosphate Sensing. *Int J Mol Sci* **24**, 2672 (2023).
41. Ramos, P. *et al.* Time-Resolved Fluorescence Allows Selective Monitoring of Trp30 Environmental Changes in the Seven-Trp-Containing Human Pancreatic Lipase†. *Biochemistry* **42**, 12488–12496 (2003).
42. Huang, R. *et al.* Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory effects of flavonoids from different citrus peel extracts: An in vitro study. *Food Chem* **326**, 126785 (2020).
43. Esquembre, R. *et al.* Thermal unfolding and refolding of lysozyme in deep eutectic solvents and their aqueous dilutions. *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**, 11248–11256 (2013).
44. Rashid, S. N. *et al.* Ternary glycerol-based deep eutectic solvents: Physicochemical properties and enzymatic activity. *Chemical Engineering Research and Design* **169**, 77–85 (2021).
45. Jin, P. *et al.* Screening and identification of lipase inhibitors extracted from *Dioscorea nipponica* Makino by UV–vis and HPLC coupled to UPLC-Q-TOF-MS/MS. *Int J Biol Macromol* **230**, 123427 (2023).