

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

Inmovilización de biomacromoléculas sobre materiales sólidos para su aplicación como biosensores.

Autor: Ismael Abed Benchekroune

Villaviciosa de Odón, junio 2022

Inmovilización de biomacromoléculas sobre materiales sólidos para su aplicación como biosensores.

El Instituto de Catálisis y Petroquímica es un centro de investigación dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), organismo dependiente del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MINECO) y activo en los campos de la química y la tecnología química, uno de los ocho campos de la ciencia e ingenierías en las que el CSIC desarrolla actividades de investigación.



Tutor externo: César Mateo González

Tutora interna: Sonia Moreno Pérez

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Concepto de biosensor, su necesidad de detectar de manera selectiva diferentes compuestos y biomacromoléculas	3
1.2. Soportes aptos para la inmovilización de biomacromoléculas	3
1.3. Diferentes biomacromoléculas que se pueden inmovilizar en un biosensor	4
1.3.1. Anticuerpos: Estructura y características como bioreceptores	5
1.4. Métodos de inmovilización para el biosensor	6
1.5. Inercia de los soportes para evitar falso positivo	9
1.6. Soportes comúnmente utilizados para la inmovilización	9
2. Objetivos	11
3. Metodología	12
3.1. Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada	12
3.1.1 Medida mediante el método de Bradford	12
3.2. Ensayos enzimáticos	12
3.2.1. Determinación de la actividad de β -galactosidasa	12
3.2.2. Determinación actividad de la peroxidasa de rábano (HRP).....	12
3.3. Determinación de la actividad biológica del anticuerpo	12
3.4. Determinación de la oxidación en soportes	12
3.4.1. Iodometría.....	12
3.5. Preparación soportes	13
3.5.1. Activación soportes de celulosa	13
3.5.2. Hidrolisis del soporte de celulosa.....	13
3.5.3. Oxidación del soporte de celulosa	13
3.5.4. Preparación de soporte de celulosa con Glutaraldehído	13
3.5.5. Preparación soporte de celulosa-IDA-CuSO ₄	13
3.5.6. Preparación soporte de Resina absorbente sintética: EC-EA2 con IDA- CuSO ₄	14
3.5.7. Preparación soporte celulosa-Catiónico	14
3.5.8. Preparación soporte celulosa IDA-ZnCl ₂	14
3.5.9. Preparación soporte celulosa Ácido poligalacturonico + 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.....	14
3.5.10. Oxidación del soporte de celulosa	14
3.5.11. Preparación soportes de agarosa con IDA-CuSO ₄	15
3.6. Inmovilización biomacromoléculas	15
3.6.1. Inmovilización BSA	15
3.6.2. Inmovilización β -galactosidasa	15
3.6.3. Inmovilización peroxidasa de rábano (HRP).....	16
3.6.4. Inmovilización anticuerpo Anti-salmonella	17

3.6.5.	Inmovilización Anticuerpo antiHRP	17
3.7.	Actividad biológica anticuerpo antiHRP	19
4.	<i>Resultados y Discusión</i>	21
4.1.	Caracterización del papel con medidas de oxidación y cuantificación de grupos epóxido	21
4.2.	Inmovilización BSA en soporte de celulosa	23
4.3.	Inmovilización de la β -galactosidasa en soporte de celulosa comercial.....	27
4.4.	Inmovilización peroxidasa.....	29
4.5.	Inmovilización Ac anti-salmonella en soporte de celulosa comercial.....	30
4.6.	Inmovilización anticuerpo antiHRP	31
4.7.	Actividad anticuerpo antiHRP	33
5.	<i>Conclusiones</i>	35
6.	<i>Bibliografía</i>	37

Resumen

Dentro del presente TFG se ha trabajado en diferentes aspectos para avanzar en este campo, se ha estudiado y caracterizado un soporte versátil, barato y fácil de activar como es la celulosa, en forma de papel comercial. Se ha podido observar como estos son soportes porosos y fibrosos con gran facilidad para ser activados, por lo que son excelentes candidatos para la inmovilización de biomacromoléculas, especialmente anticuerpos.

Se ha estudiado tanto la inmovilización, como la actividad de diferentes biomacromoléculas. En primer lugar, la inmovilización de una proteína pura y fácil de cuantificar como la proteína seroalbúmina bovina (BSA) dado que es la proteína que se usa como estándar en el método de medida de proteína. De este modo se pudo estudiar la capacidad de carga de proteína en los soportes siendo capaces de inmovilizar 0,177 mg de proteína /cm².

Posteriormente, se inmovilizaron diferentes enzimas para valorar la recuperación de actividad catalítica tras el proceso de inmovilización. Esta en general no fue satisfactoria para enzimas globulares, con recuperaciones nulas en todos los casos. Seguidamente, se ha procedido al estudio de la inmovilización de anticuerpos anti-salmonela y antiperoxidasa. La inmovilización sobre estos soportes demostró ser satisfactoria dado que en ambos casos se consiguió un buen porcentaje de inmovilización 89,5% y un 88% respectivamente, similar al obtenido utilizando como soportes de referencia la agarosa y resina acrílica. Además de esto, la actividad biológica de los anticuerpos antiperoxidasa fue similar a la obtenida con estos soportes de referencia.

Se han hecho pruebas preliminares de su posible utilización en sistemas de resonancia por radiofrecuencias obteniéndose excelentes resultados de detección de muestras con BSA inmovilizada incluso a concentraciones muy bajas 0,00457 mg/cm².

Abstract

Within the present TFG we have worked on different aspects to advance in this field, we have studied and characterized a versatile, cheap, and easy to activate support such as cellulose, in the form of commercial paper. It has been observed that these are porous and fibrous supports that are easily activated, making them excellent candidates for the immobilization of biomacromolecules, especially antibodies.

Both activation and immobilization of different biomacromolecules have been studied. Firstly, the immobilization of a pure and easy to quantify protein such as BSA since it is the protein used as standard in the protein measurement method. In this way, it was possible to study the protein loading capacity on the supports being able to immobilize 0,177 mg of protein /cm².

Subsequently, different enzymes were immobilized to assess the recovery of catalytic activity after the immobilization process. This was generally not satisfactory for globular enzymes with null recoveries in all cases. We then proceeded to study the immobilization of antibodies anti-salmonella and anti-peroxidase. Immobilization on these supports proved to be satisfactory since in both cases a good percentage of immobilization was achieved 89, 5% and 88% respectively similar to that obtained using agarose and acrylic resin as reference supports. In addition to this, the biological activity of the anti-peroxidase antibodies was similar to that obtained with these reference supports.

Preliminary tests of their possible use in radiofrequency resonance systems have been carried out, obtaining excellent results of detection of samples with immobilized BSA even at very low concentrations 0, 00457 mg/cm².

1. Introducción

1.1. Concepto de biosensor, su necesidad de detectar de manera selectiva diferentes compuestos y biomacromoléculas

Un biosensor es un dispositivo analítico que mide indirectamente la presencia y concentración de compuestos biológicos o químicos por la detección de productos de una reacción catalizada por un material biológico (anticuerpos, enzimas, microorganismos) incorporado al instrumento¹. Las interacciones biomoleculares registradas son capaces de producir una señal que es captada por el sensor y convertida en una señal cuantificable por el detector², otorgando al usuario una representación de la interacción selectiva y específica que ocurre entre los componentes unidos y los libres (analitos)^{3,4}.

Actualmente los biosensores se están convirtiendo en una herramienta indispensable, son utilizados en los controles de calidad de alimentos con el objetivo de detectar de fármacos o células⁵. Por otro lado, han adquirido un importante papel en el área del diagnóstico clínico, siendo útiles en este caso para obtención de valores séricos como, por ejemplo, de glucosa, lactato y ácido úrico entre otros. Su uso presenta numerosas ventajas ya que el análisis es muy sensible y la instrumentación necesaria es barata y sencilla^{1,5}.

Este aumento en la demanda por parte de la sociedad para análisis cada vez más sensibles en diferentes ámbitos (control ambiental, industrias alimentarias, industrias farmacéuticas...) ha provocado que los biosensores comiencen a emplearse como una técnica analítica alternativa a los métodos de análisis tradicionales, simplificando los procesos, reduciendo los costes y manteniendo una gran tasa de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad^{1,3,6}.

1.2. Soportes aptos para la inmovilización de biomacromoléculas

Podemos encontrar un amplio abanico de soportes para la inmovilizar biomacromoléculas, estos soportes presentan diferencias en tamaño, forma, densidad y porosidad. Diferenciamos dos categorías, los polímeros orgánicos tanto sintéticos (poliestireno, poliamidas, polimecratilos) como de origen natural (celulosa, almidón, dextranos, agarosa, agar-agar) y los soportes inorgánicos (óxidos de metales, vidrio no poroso, cerámicas, arena, yeso, carbón)^{5,6}.

Nuestra finalidad es utilizar como soporte materiales comerciales de celulosa para su uso en análisis clínicos,⁷ esto es debido a que la elección de nuestro soporte va a estar condicionada, necesitaremos materiales biodegradables, muy baratos, fáciles de activar para la detección de antígenos, manejables, que la inmovilización de la biomacromolécula en cuestión no disminuya la afinidad con el sustrato y que nos permita trabajar con un amplio intervalo de pH óptimo. La celulosa, es el polímero mas abundante, es un polisacárido formado por cadenas lineales de muchas unidades de D-glucosa con enlaces β (1 \rightarrow 4). El polímero de celulosa tiene grupos hidroxilo primarios que pueden activarse fácilmente mediante diferentes reacciones que permiten obtener soportes activados con diferentes grupos funcionales,^{8,9} y ya se ha usado como soporte en múltiples estudios para inmovilizar biomacromoléculas ^{7,10-14}.

1.3. Diferentes biomacromoléculas que se pueden inmovilizar en un biosensor

Los bioidentificadores para la detección de analitos pueden ser simples (enzimas, anticuerpos, oligonucleótidos, etc.) o más integrados y complejos como células, tejidos u organismos⁵.

En este trabajo, como primera aproximación se inmoviliza una proteína, en concreto la BSA, proteína seroalbúmina bovina, (Sigma Aldrich), como modelo para ver si se inmoviliza en el soporte, ya que es una proteína la cual se dispone pura, comercialmente certificada y presenta gran especificidad ⁶. El siguiente paso va a consistir en la inmovilización de enzimas, β -galactosidasa y la enzima peroxidasa de rábano (HRP), se elige esta enzima peroxidasa ya que se usa a nivel industrial y se ha estudiado mucho detalle^{6,15,16}. Tomándose como referencia en los ensayos enzimáticos, estas enzimas cuentan con actividad catalítica fácilmente medible y son muy activas para de este modo evaluar la viabilidad de este soporte para la inmovilización de las mismas y estudiar si se conserva dicha actividad catalítica⁷.

Y, por último, se inmovilizarán anticuerpos, y estudiamos si estos al inmovilizarse en el soporte de celulosa mantienen su actividad biológica. Más concretamente, se procederá a la inmovilización del anticuerpo anti-salmonella y del anticuerpo policlonal antiperoxidasa (antiHRP) producido en conejo. La selección del anticuerpo antiHRP como anticuerpo de muestra, fue en virtud de la actividad enzimática del antígeno de dicho anticuerpo, la peroxidasa (HRP). Por otra parte, la monitorización podía realizarse fácilmente con un ensayo espectrofotométrico y así, se pudo controlar la reacción antígeno-anticuerpo ⁶.

A continuación, se realizará una breve descripción de las propiedades y los posibles usos de los anticuerpos, ya que como hemos citado anteriormente, este será nuestro principal elemento de detección- reconocimiento.

1.3.1. Anticuerpos: Estructura y características como bioreceptores

Los anticuerpos, son glicoproteínas que tienen como característica principal una enorme sensibilidad y especificidad para el reconocimiento y unión frente al antígeno que les corresponde. Cada unidad la configuran 4 cadenas polipeptídicas, dos de las cuales se denominan cadenas pesadas, y las otras dos, cadenas ligeras y que van a unirse respectivamente entre ellas mediante enlaces de puentes disulfuro. El conjunto de las cuatro cadenas, tanto pesadas como ligeras, van a dar lugar a la formación de 3 dominios proteicos diferentes, distinguiéndose: Región Fc, (Fragmento cristalizante) que se corresponde con el fragmento que conformará la estructura base de la “Y” y otros dos dominios denominados fragmentos Fab, (Fragmento de unión al antígeno) estos, van a ser idénticos entre sí, y conformarán la estructura de los brazos de la “Y” (**Ilustración 1**)³ La región del anticuerpo que tiene función para reconocer el antígeno, es la región Fab, en la cual va ocurrir la interacción específica con una zona concreta situada sobre superficie del antígeno, a esta zona específica de unión antígeno-anticuerpo se la denomina epítipo. Por otro lado, la función efectora y reguladora de la inmunidad del anticuerpo se encuentra en la región Fc ⁶.

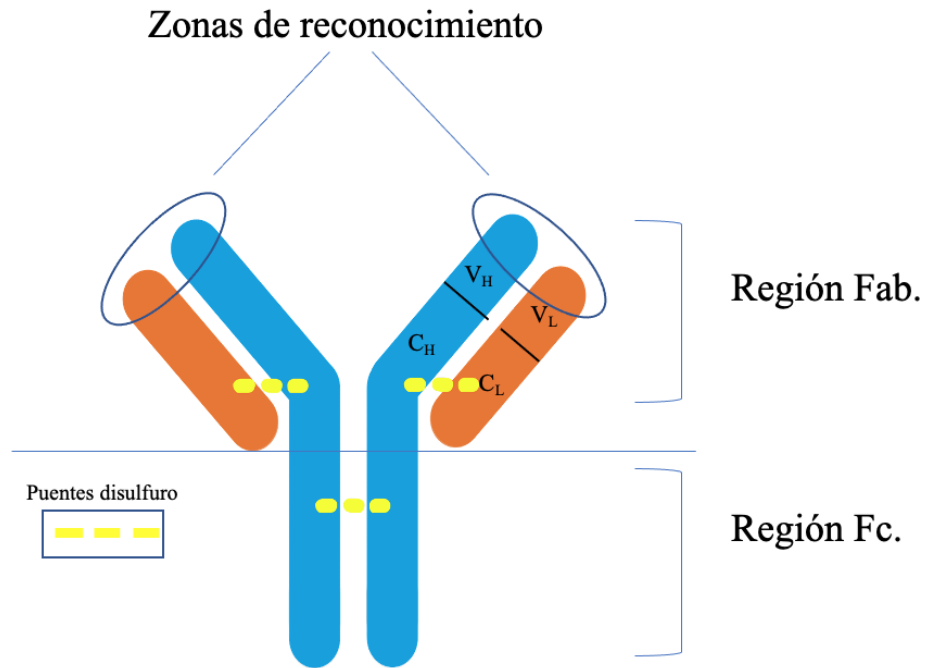


Ilustración 1. Representación esquemática de un anticuerpo IgG que consta de dos cadenas pesadas (azul) y ligeras (rojo). VH: Región variable de la cadena pesada, VL: Región variable de la cadena ligera, CH: Región constante de la cadena pesada, CL: Región constante de la cadena ligera. (Elaboración propia)

1.4. Métodos de inmovilización para el biosensor

Durante los últimos años, se han informado de numerosas estrategias para controlar la inmovilización de anticuerpos, dirigiendo la orientación, la estabilidad y la densidad de los anticuerpos unidos en diferentes plataformas de ensayo^{5,6}. Los anticuerpos pueden ser inmovilizados utilizando técnicas diferentes, que van a depender del soporte utilizado o de la interacción que ocurra entre la biomolécula y el soporte¹⁷.

Entre los métodos de inmovilización, se encuentran los métodos reversibles, caracterizados por la escisión del complejo biomolécula-analito al tiempo que se retiene la actividad de la biomolécula, y los métodos irreversibles, donde la fractura está asociada a la pérdida de actividad de la biomolécula y/o modificación de las características del soporte utilizado³.

Método de inmovilización reversible sobre soportes sólidos:

A) Adsorción:

Método consistente en la unión del anticuerpo de interés a un soporte inerte mediante interacciones débiles de tipo iónico, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals. Las ventajas que se destacan en este método son: Bajo coste,

sencillez a la hora de la preparación, la especificidad se mantiene constante. Las desventajas de este método son las siguientes dificultad para optimizar las variables que influyen en la adsorción, mecánicamente hablando, la estabilidad de los derivados obtenidos es baja, uniones débiles entre el soporte y el anticuerpo^{5,17}.

Método de inmovilización covalente

B) Unión covalente:

Permiten una unión irreversible normalmente orientada a una superficie, consiste en la activación de grupos químicos situados en el soporte de tal forma que ocurran ataques nucleófilos a los grupos funcionales del anticuerpo. Lo cierto es que tan sólo los aminoácidos con carácter hidrofílico quedarán expuestos hacia la cara externa del soporte y serán por ello, lo que intervengan en la formación de los enlaces de tipo covalente entre el anticuerpo y el soporte (Por ejemplo, lisina, cisteína, tirosina e histidina). Desde el punto de vista de la industria es el método de más interés. Las ventajas que se pueden destacar de este método son: El trabajo con los inmovilizados es sencillo y de fácil manipulación, no se ve alterada la carga del anticuerpo una vez inmovilizado, los enlaces de tipo covalente aumentan la resistencia de los inmovilizados frente a cambios externos del medio como la temperatura o el pH. Por otro lado, las desventajas de este método son las siguientes: Orientación aleatoria, modificación del sitio de unión al antígeno, unión a proteínas no específicas^{5,17}.

En el caso de la inmovilización para biosensores para su uso en diagnósticos clínico, los soportes utilizados serán desechables, no es necesaria una reutilización de los soportes con la biomacromolécula inmovilizada, es decir, nuestro objetivo principal aparte de buscar una estabilidad entre el anticuerpo y el soporte, es centrarnos en que se mantenga la actividad biológica de la biomacromolécula inmovilizada ya sea un anticuerpo, o una enzima para un uso industrial e inmovilizar el anticuerpo con una orientación concreta y uniforme como se indica en la imagen (**Ilustración 2**).

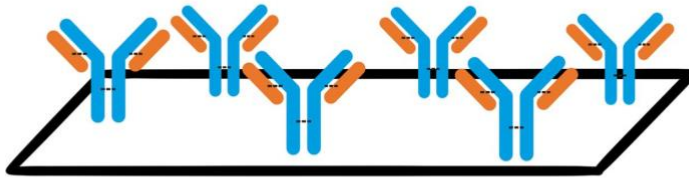


Ilustración 2. Inmovilización de anticuerpo con la orientación ideal, los sitios de unión al antígeno (Región Fab) expuestos al medio (Elaboración propia).

Múltiples estudios ^{6,18,19} han demostrado que los anticuerpos correctamente orientados, con su sitio de unión al antígeno, es decir, la región Fab, de forma que esta quede en su totalidad expuesta al medio, exhiben mayores capacidades para la unión al antígeno en comparación con los anticuerpos orientados al azar ^{6,17,20} **(Ilustración 3)**.

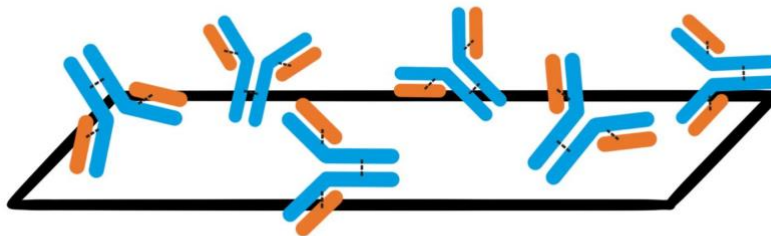


Ilustración 3. Inmovilización de anticuerpos en superficies sólidas con orientación aleatoria (Elaboración propia).

La inmovilización uniformemente orientada también proporciona una alta consistencia para la concentración, construcción de inmunosensores ¹⁷, minimiza los impedimentos estéricos ²¹ y facilita el reconocimiento del antígeno sin ningún obstáculo ¹⁵.

1.5. Inercia de los soportes para evitar falso positivo

Como se ha mencionado anteriormente, una correcta inmovilización del anticuerpo en el soporte es un paso clave en la preparación de inmunosensores. Por otro lado, es crítico que los soportes finales sean química y físicamente inertes,^{15,16} la interacción del analito debe ser exclusivamente a través de la afinidad con la biomacromolécula, en este caso, el anticuerpo, para evitar la adsorción inespecífica de componentes del medio que puedan reducir la sensibilidad del biosensor generando falsos positivos. Al mismo tiempo, el soporte debe ser inicialmente reactivo porque debería poder inmovilizar el anticuerpo⁶.

1.6. Soportes comúnmente utilizados para la inmovilización

Existen diferentes tipos de activación de los soportes pudiendo estos inmovilizar biomacromoléculas a través de diferentes grupos reactivos. De este modo en el laboratorio de biocatálisis se han desarrollado diferentes soportes tanto homo- como heterofuncionales capaces de inmovilizar proteínas a través de diferentes grupos reactivos^{15,22,23}, realizaremos comparaciones con distintos soportes tanto de agorasa como de resina absorbente sintética.

A nivel molecular, la celulosa está formada por grandes cadenas de glucosa unidas por enlace β -(1-4). A su vez estas cadenas están unidas a otras mediante puentes de hidrógeno. Teniendo en cuenta que el soporte está formado por cadenas de azúcar con grupos hidroxilo cercanos, este soporte podría activarse fácilmente por oxidación con peryodato de sodio (NaIO_4) para producir grupos aldehído^{9,22} capaces de inmovilizar proteínas a través de la zona rica en grupos amino reactivos y por lo tanto, obtener una inmovilización estable de los analitos⁹.

Por otro lado, estos soportes de celulosa se pueden activar con grupos epóxido en condiciones básicas con epiclorhidrina lo que permite obtener soportes con grupos epóxido y grupos diol provenientes de la hidrólisis en condiciones básicas de parte de los epóxidos durante el proceso de activación²². Los soportes de celulosa activados con grupos epóxido, pueden modificarse fácilmente a grupos que puedan adsorber proteínas a través de diferentes mecanismos⁹.

Estos epóxidos, como hemos comentado anteriormente, pueden ser derivatizados con diferentes reactivos bifuncionales como la epiclorhidrina, ácido iminodiacético, ácido p-aminofenil borónico, trietilamina, mercaptoetanol y metaperyodato de sodio²².

Por un lado, los soportes epóxido monofuncionales, estos soportes activados con epóxidos son matrices muy a tener en cuenta para realizar una inmovilización-

estabilización fácil de proteínas mediante unión covalente multipunto^{24,25}. Los grupos epóxidos tienen brazos espaciadores cortos y pueden reaccionar con muchos grupos nucleófilos presentes en la superficie de la proteína (por ejemplo, Lys, Cys, His.)²² y, de forma más lenta, con grupos carboxílicos⁶.

Además, los grupos epóxido son muy estables, lo que permite realizar incubaciones a largo plazo de enzimas inmovilizadas en condiciones alcalinas para obtener una unión covalente multipunto intensa^{26,27}. Se realizan activaciones monofuncionales con etilendiamina (EDA) y Glutaraldehído¹⁵. Se ha demostrado que es relativamente sencillo activar soportes aminados con glutaraldehído,²⁸ teniendo entre una o dos moléculas de glutaraldehído por grupo amino primario, facilitando la unión de proteínas.

En múltiples estudios se informa sobre las ventajas de inmovilización de biomacromoléculas sobre soportes de inmovilización convencionales a través de los grupos amino de la proteína utilizando glutaraldehído,^{15,16,29}.

Por otro lado, se realizan inmovilizaciones sobre soportes epóxido heterofuncionales, estos soportes permiten la inmovilización en condiciones flexibles, el único requisito es que la biomacromolécula sea adsorbida sobre soportes activados con los nuevos grupos^{6,30}. Así, la inmovilización se puede realizar a baja fuerza iónica de pH 4-10 activando distintos soportes, carboxi-epoxido, amino-epóxido, disulfuro-epoxido^{6,15,16,22,23,30} teniendo una amplia variedad de condiciones bajo las cuales se pueden usar.

El uso de soportes epóxido con un segundo grupo capaz de adsorber específicamente la proteína diana ha demostrado ser una herramienta muy útil para la purificación, inmovilización y estabilización de proteínas en un solo paso^{9,22}. Se han utilizado por lo tanto soportes de quelato metálico heterofuncionales: IDA-Cu²⁺ e IDA-Zn²⁺. Los soportes de celulosa-epóxido, se tratan con ácido inimodiacético (IDA) obteniendo un soporte aniónico el cual se puede tratar con diferentes sales metálicas como el Cu²⁺ o Zn²⁺.²² Los cuales presentan una gran interacción por las regiones de histidina de la biomacromolécula^{6,22}, los soportes activados con grupos amino tiene mayor afinidad por las regios con carga neta negativa, mientras que los soportes activados con compuestos carboxílicos presentan una elevada afinidad por regiones con una mayor carga positiva neta²².

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es la inmovilización de anticuerpos sobre soportes de celulosa u otros soportes para su aplicación como biosensores. Para ello se plantean una serie de subobjetivos:

- a) Se caracterizarán diferentes soportes comerciales de celulosa como son el papel comercial (folio) y un papel Whatman nº 2 con un tamaño de poro controlado.
- b) Utilización de estos soportes de celulosa para la inmovilización de diferentes biomacromoléculas. En principio se utilizará la proteína BSA dado que se dispone de suministro de proteína pura fácilmente medible ya que es la utilizada como estándar en la medida del método de Bradford. Estas preparaciones serán enviadas a la escuela técnica superior de ingeniería (ICAI) para estudios de detección utilizando un sistema de resonancia de radiofrecuencias.
- c) Uso de estos soportes con enzimas de alta actividad como la β -galactosidasa de *Novozymes* y la peroxidasa de rábano HRP para de este modo poder estudiar el efecto de los soportes en la actividad catalítica de una proteína.
- d) Inmovilización de anticuerpo sobre los soportes de celulosa activados comparados con otros soportes comerciales previamente utilizados. Para ello se utilizarán anticuerpo anti-salmonela y antiperoxidasa.
- e) Medida de la actividad biológica de los anticuerpos previamente inmovilizados. Para ello, se medirá la interacción antígeno-anticuerpo utilizando el anticuerpo antiperoxidasa.

3. Metodología

3.1. *Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada*

3.1.1 Medida mediante el método de Bradford

Se midió mediante el método de Bradford ³¹, usando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar para la recta de calibrado. Para determinar cuanta cantidad de proteína quedó unida a los soportes, se calculó la diferencia entre las concentraciones de proteínas contenidas en el sobrenadante al inicio y al término de la inmovilización.

3.2. *Ensayos enzimáticos*

3.2.1. Determinación de la actividad de β -galactosidasa

Para la enzima β -galactosidasa, se midió su actividad mediante espectrofotometría siguiendo el incremento de la absorbancia a 405 nm que sucede por la hidrólisis del orto-nitrofenil- β -galactósido (o-NPG). El medio de reacción utilizado fue 5 mM o-NPG, disuelto en 25 mM de tampón fosfato pH 7 a 25 °C ⁶.

3.2.2. Determinación actividad de la peroxidasa de rábano (HRP)

La actividad para la enzima peroxidasa (HRP) fue determinada con espectrofotometría siguiendo el incremento de la absorbancia a 430 nm. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) está actuando sustrato oxidante y ABTS como el reductor. Las condiciones experimentales fueron 1 mM ABTS y 1 mM H₂O₂ en fosfato de sodio 50 mM pH 6 y 25 °C ¹⁶.

3.3. *Determinación de la actividad biológica del anticuerpo*

A los soportes en los cuales hay anticuerpo antiHRP inmovilizado, se les ofrece la misma cantidad de moles de HRP. Una vez pasados 30 minutos, se midió el sobrenadante¹⁶ para determinar la actividad HRP y se comparó con el blanco medido en las mismas condiciones, de esta forma, se cuantificó cual fue el porcentaje de HRP unido al anticuerpo AntiHRP y el porcentaje de HRP unido al soporte¹⁶.

3.4. *Determinación de la oxidación en soportes*

3.4.1. Iodometría

La oxidación de los soportes las medimos mediante ensayo iodimetrico siguiendo la absorbancia a 450 nm. Las condiciones experimentales fueron 2 mg Yoduro de potasio (KI) 20 ml H₂O y Bicarbonato saturado (NaHCO₃) a 25 °C. La cantidad de soporte de

celulosa oxidada fue determinada por la diferencia entre agentes oxidantes en el sobrenadante al inicio de la oxidación y la concentración final de agentes oxidantes contenidos en el sobrenadante.

3.5. *Preparación soportes*

3.5.1. Activación soportes de celulosa

Muchos de los experimentos realizados requieren la activación previa del soporte (celulosa) esta activación con grupos Epóxidos requiere una mezcla de 3,73 gr. NaOH 1M, 50 ml H₂O, 12,5 ml Epiclorhidrina y 18,2 ml de Acetona. Se agitó la suspensión de forma suave la suspensión durante 22 horas y se lavó posteriormente con agua abundante²².

3.5.2. Hidrolisis del soporte de celulosa

Para hidrolizar el soporte que previamente activado añadimos ácido sulfúrico (H₂SO₄) 200 mM 50 ml H₂O, rotamos durante 1 hora y se lava con abundante agua²².

3.5.3. Oxidación del soporte de celulosa

Una vez tengamos el soporte hidrolizado, lo vamos a oxidar mediante peryodato de sodio (NaIO₄) 100 mM, 49,5 ml de H₂O, rotamos 15 horas y realizamos lavados con abundante agua²².

3.5.4. Preparación de soporte de celulosa con Glutaraldehido

En búsqueda de una mayor inmovilización de la proteína (BSA) se tratan las dos muestras tanto el folio normal como el papel Whatman nº 2 con Etilendiamina (EDA) 2M, 20 ml pH 10, 2 horas en rotación, posteriormente al mismo bote se añade Borohidruro de sodio (NaBH₄) 10 mg/ml y se procede a la rotación con el bote abierto 2 horas. Lavados con abundante agua destilada para finalmente añadir 1,5 ml de Glutaraldehido y 1,2 ml de Tampón fosfato 200 mM a pH 7¹⁵.

3.5.5. Preparación soporte de celulosa-IDA-CuSO₄

Se inmoviliza al papel de folio activado con ácido iminodiacético (IDA) 500 mM 20 ml pH 11. Al soporte aniónico tratado con IDA le añadimos 20 ml de CuSO₄ 10mM, rotación

suave durante 30 minutos y se lava con abundante H₂O. Obteniendo un soporte de quelato metálico²².

3.5.6. Preparación soporte de Resina absorbente sintética: EC-EA2 con IDA-CuSO₄

Se mide 1 gr de resina, esta se lava con abundante H₂O y se añaden 50 ml IDA 5M pH 11 y se procede a una rotación suave rotamos por 24 horas. A continuación, a 1 gr de resina con IDA se añaden 10 ml CuSO₄ 10 mM, rotación suave durante 30 minutos y lavados con abundante H₂O³⁰.

3.5.7. Preparación soporte celulosa-Catiónico

Se incuba el soporte de celulosa activado con grupos epóxidos con 20 ml de Trietilamina (TEA) 1M, rotación suave durante 22 horas y lavados con abundante H₂O²².

3.5.8. Preparación soporte celulosa IDA-ZnCl₂

Se inmoviliza al soporte aniónico tratado con IDA, Cloruro de Zinc (ZnCl₂) 10mM 20 ml H₂O, rotación suave durante 30 minutos y lavados con abundante H₂O. Obteniendo un soporte de quelato metálico²².

3.5.9. Preparación soporte celulosa Ácido poligalacturónico + 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

Se inmoviliza en el soporte el cual esta aminado (con EDA+ NaBH₄) con 1 gr de ácido poligalacturónico (PGA) diluido en 10 ml de H₂O, se ajusta el pH a 4,7 y a continuación, se añaden 100 mM 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (CDI), agitación suave durante 24 horas y se realizan lavados con abundante H₂O.

3.5.10. Oxidación del soporte de celulosa

Se oxidan los soportes de celulosa con NaIO₄, para ello se preparan 4 alícuotas con 4 cm² de folio comercial sin activar, folio activado²² y folio hidrolizado²², a cada uno de estos soportes se añaden 0,192 ml NaIO₄ 100 mM y 0,810 ml de H₂O para calcular grupos aldehído por cm² de papel. El número de grupos epóxido se cuantificó por la diferencia

en el consumo de peryodato entre el soporte hidrolizado y el soporte epóxido inicial.²² El consumo de peryodato se cuantificó mediante una Iodimetría. **Tabla 1**

3.5.11. Preparación soportes de agarosa con IDA-CuSO₄

Se mide 1 gr de agarosa, esta se lava con abundante H₂O y se añaden 50 ml IDA 5M pH 11 y se procede a una rotación suave por 24 horas. A continuación, a 1 gr de agarosa con IDA se añaden 10 ml CuSO₄ 10 mM, rotación suave durante 30 minutos y lavados con abundante H₂O ²².

3.6. *Inmovilización biomacromoléculas*

3.6.1. Inmovilización BSA

Se inmoviliza la BSA a diferentes concentraciones (0,005, 0,01, 0,03, 0,05) mg/ml en tampón bicarbonato 0,1M pH 10, en 1 cm² de folio convencional **Tabla 2** y en 1 cm² papel Whatman n° 2. **Tabla 3**

Se incuban dos soportes de celulosa de 1cm² activados con glutaraldehído¹⁵, este primer soporte se incubaba con una dilución de 30 µl de BSA en 970 µl de tampón fosfato de sodio 200 mM pH 7, mientras que el segundo soporte se incubaba con una dilución de 30 µl de BSA en 970 µl de tampón de bicarbonato de sodio 100 mM pH 10. **Tabla 2**

Se ofrece BSA a diferentes concentraciones (0,03, 0,05, 0,2) mg/ml en tampón bicarbonato de sodio 100 mM a pH 8,5 y un segundo ensayo, también con tampón de bicarbonato de sodio 100mM esta vez a pH 10, a 1 cm² de los soportes activados con IDA-Cu ²². **Tabla 2**

Se cuantifica el número de proteínas inmovilizadas mediante el Método de Bradford ³¹, midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm, se tomó un blanco en cada una de las diferentes concentraciones estudiadas y este se resta al sobrenadante obtenido del papel.

3.6.2. Inmovilización β-galactosidasa

Se diluyeron 5 µl de enzima (β-galactosidasa) con 8 ml de tampón de fosfato de sodio 25 mM pH 7 que se ofreció al soporte de celulosa oxidado con grupos aldehído. Por otro lado, 5 µl de enzima se diluyeron con 8 ml de tampón Bicarbonato de sodio 100 mM pH

8,5 y esta solución en cambio, fue ofrecida a 1 cm² de soporte de celulosa activada con IDA-Cu²². **Tabla 4**

Una vez se inmoviliza la enzima en un soporte de Cloruro de Cinc (ZnCl₂)²², diluyen 5 µl de enzima con 1,5 ml de tampón fosfato de sodio 250 mM pH 7. Las soluciones en este caso particular se dejaron agitando con hielo. **Tabla 4**

Se incubó 1 cm² de soporte activado con PGA con una solución en la cual se diluyeron 5 µl de enzima β-galactosidasa con 8 ml de tampón de fosfato de sodio 5 mM pH. **Tabla 4**

Todas las soluciones se dejaron agitando de forma suave a 25 °C. Fueron tomadas alícuotas del sobrenadante y de un blanco y se calculó la actividad enzimática a diferentes tiempos⁶, para ir siguiendo la cinética de inmovilización. **Tabla 4**

Una vez la enzima β-galactosidasa está unida a los diferentes soportes de celulosa **Tabla 4**, se procedió a medir la actividad enzimática,⁶ para ello se añadieron 5 ml del sustrato y 20 µl de H₂O₂ a lo equivalente a 1 mm² de soporte con la enzima inmovilizada, se puso en agitación suave con un imán a 25 °C y se tomaron medidas de la absorbancia a 405 nm. Los tiempos de medición se tomaron a los 5, 10, 15 y 20 minutos.

3.6.3. Inmovilización peroxidasa de rábano (HRP)

Se ofrecieron a 1 cm² de soporte de celulosa activado con IDA y a un segundo soporte de celulosa activado con IDA-Cu,²² 5 µl de HRP 3 mg de HRP diluido en 1 ml H₂O. **Tabla 5**

Se incubó 1cm² de soporte de celulosa activado con PGA con una solución en la cual se diluyeron 10 µl de enzima HRP (3 mg/ml) con 0,5 ml de H₂O. Al mismo tiempo incubamos 1 cm² del soporte de celulosa activado con PGA, pero en este caso, se ofrece una solución formada por 10 µl de enzima HRP diluida con 0,5 ml de tampón acetato de sodio pH 4,5. **Tabla 5**

Se incubó la enzima HRP con la resina absorbente sintética en la cual previamente se ha activado con IDA-Cu³⁰, para ello pesamos 0,1 gramos de la resina IDA-Cu y le añadimos 10 µl de enzima HRP diluida en 1 ml de H₂O. **Tabla 5**

Las reacciones se dejaron en agitación suave llevándose a cabo a 25°C. Se toma una alícuota del blanco y del sobrenadante se mide la actividad enzimática a diferentes tiempos para ir siguiendo la cinética de inmovilización¹⁶.

3.6.4. Inmovilización anticuerpo Anti-salmonella

Se incubó 1 cm² de celulosa en diferentes soluciones para comprobar la cinética de inmovilización del Anticuerpo anti-salmonella 400 mg/ml.

- Inmovilización anticuerpo anti-salmonella en soporte de celulosa-IDA-Cu

Se diluyeron 1,25 µl de anticuerpo anti-salmonella en 998,75 µl de tampón bicarbonato de sodio 0,1 M pH 8,5, esta solución se ofreció a 1 cm² de soporte de celulosa activado con IDA-Cu²².
- Inmovilización anticuerpo anti-salmonella en soporte celulosa-CHO

Se diluyeron 1,25 µl de anticuerpo anti-salmonella en 998,75 µl de tampón bicarbonato de sodio 0,1 M pH 10, esta solución se ofreció a 1 cm² de soporte de celulosa oxidado con NaIO₄²².
- Inmovilización anticuerpo anti-salmonella en soporte de celulosa-TEA

Se diluyeron 1,25 µl de anticuerpo anti-salmonella en 998,75 µl de tampón de fosfato de sodio 5 mM pH 7, esta solución se ofreció a 1cm² de soporte de celulosa activado con TEA²².
- Inmovilización anticuerpo anti-salmonella en soporte de celulosa- Glutaraldehído

Se diluyeron 1,25 µl de anticuerpo anti-salmonella en 998,75 µl de tampón bicarbonato de sodio 25 mM pH 7, esta solución se ofreció a 4 discos de soporte de celulosa activado con glutaraldehído¹⁵.

Las soluciones se dejaron en agitación suave a 25 °C. Se cuantificará el número de anticuerpos inmovilizados tomando alícuotas del sobrenadante a diferentes tiempos mediante el Método de Bradford³¹, midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm, se toma un blanco a las diferentes concentraciones estudiadas y este se resta al sobrenadante obtenido del papel. **Tabla 6**

3.6.5. Inmovilización Anticuerpo antiHRP

A continuación, se procederá a la inmovilización en distintos soportes de dos tipos de anticuerpos antiHRP de diferentes proveedores por duplicado, un primer anticuerpo antiHRP producido en conejo de (Sigma Aldrich) 3 mg/ml y un segundo anticuerpo

antiHRP producido en cabra (Biorad) 5mg/ml todos ellos en las mismas condiciones.

Tabla 7 y Tabla 8

- Inmovilización de anticuerpo antiHRP en 1 cm² de soporte celulosa-IDA-Cu
Se diluyeron 10 µl de anticuerpo antiHRP en 1,2 ml de tampón bicarbonato 100 mM pH 8,5. Esta solución se ofreció a 1 cm² de celulosa tratados con IDA-Cu²².
- Inmovilización de anticuerpo antiHRP en 1 cm² de soporte celulosa-TEA
Se incubó el soporte con 50 µl del anticuerpo antiHRP disuelto en 1 ml de tampón bicarbonato 100 mM pH 8,5.
- Inmovilización anticuerpo antiHRP en 1 cm² de soporte celulosa-IDA-Cu.
Se incubó el soporte con 50 µl del anticuerpo antiHRP disuelto en 1 ml de tampón bicarbonato 100 mM pH 8,5.
- Inmovilización anticuerpo antiHRP en 0,1 gr de resina-IDA-Cu
Se incubó la resina con 34 µl de anticuerpo antiHRP diluida en 340 µl de H₂O.
- Inmovilización anticuerpo antiHRP en 0,1 gr de resina-IDA-Cu
Se incubó la resina con una dilución de 150 µl del anticuerpo antiHRP disuelto en 1,5 ml de tampón bicarbonato 100 mM pH 8,5.
- Inmovilización anticuerpo antiHRP en 0,1 gr resina lavada con grupos amino NH₂.
A la resina se le ofrecen 150 µl del anticuerpo antiHRP disueltos en 1,5 ml de tampón fosfato de sodio 5mM pH 7.
- Inmovilización anticuerpo antiHRP en 0,1 gr de agarosa-IDA-Cu
Se incubó la agarosa con 60 µl del anticuerpo antiHRP disuelto en 750 µl de tampón bicarbonato 100 mM pH 8,5.

Las soluciones se dejaron en agitación suave a 25 °C. Se cuantificará el número de anticuerpos inmovilizados a diferentes tiempos mediante el método de Bradford ³¹, midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm, se toma un blanco a las diferentes concentraciones estudiadas y este se resta al sobrenadante obtenido del papel.

3.7. *Actividad biológica anticuerpo antiHRP*

Por último, se medirá la actividad biológica de ambos anticuerpos, el primer antiHRP suministrado por Sigma Aldrich y el segundo suministrado por Biorad, a todos los soportes se les ofrece la misma cantidad de moles de enzima HRP que de antiHRP hay inmovilizados en los distintos soportes ⁶.

En primera instancia, las incubaciones del anticuerpo antiHRP producido en conejo 3 mg/ml (Sigma Aldrich) fueron estas:

- A 1 cm² de soporte de celulosa activado con IDA-Cu ²², en el cual hemos inmovilizado el anticuerpo antiHRP. **Tabla 9**
Se ofrecen 10 µl de HRP 3 mg/ml diluido en 1 ml de tampón de fosfato de sodio 25 mM pH 7.
- A 0,1 gr de soporte de Resina-IDA-Cu³⁰, en el cual hemos inmovilizado el anticuerpo antiHRP. **Tabla 9**
Se ofrecen 2,64 µl de HRP 3 mg/ml diluidos en 264 µl de tampón fosfato 25 mM pH 7.
- A 0,1 gr de soporte de Resina-IDA-Cu³⁰, en el cual hemos inmovilizado el anticuerpo antiHRP. **Tabla 9**
Se ofrecen 2,9 µl de HRP 3 mg/ml diluidos en 290 µl de tampón fosfato 25 mM pH 7.

Seguidamente, se realizaron las incubaciones del anticuerpo antiHRP producido en cabra 5 mg/ml (Biorad) estas fueron:

- A 1 cm² de soporte de celulosa activado con IDA-Cu ²², en el cual hemos inmovilizado el anticuerpo antiHRP. **Tabla 10**
Se ofrecen 3 µl de HRP 5 mg/ml diluidos en 300 µl de tampón de fosfato de sodio 25 mM pH 7.
- A 1 cm² de soporte de celulosa activado con IDA-Cu ²², en el cual hemos inmovilizado el anticuerpo antiHRP. **Tabla 10**
Se ofrecen 3 µl de HRP 5 mg/ml diluidos en 300 µl de tampón de fosfato de sodio 25 mM pH 7.

- A 0,1 gr de soporte de Resina-IDA-Cu³⁰, en el cual hemos inmovilizado el anticuerpo antiHRP. **Tabla 10**
Se ofrecen 3,5 µl de HRP 5 mg/ml diluidos en 350 µl de tampón fosfato 25 mM pH 7.

- A 0,1 gr de soporte de Resina-IDA-Cu³⁰, en el cual hemos inmovilizado el anticuerpo antiHRP. **Tabla 10**
Se ofrecen 4,5 µl de HRP 5 mg/ml diluidos en 450 µl de tampón fosfato 25 mM pH 7.

- A 0,1 gr de soporte de Agarosa-Cu²², en el cual hemos inmovilizado el anticuerpo antiHRP. **Tabla 10**
Se ofrecen 2,4 µl de HRP 5 mg/ml diluidos en 240 µl de tampón fosfato 25 mM pH 7.

Las soluciones se dejaron de forma suave en agitación a 25 °C. Se tomaron alícuotas del sobrenadante a los 30 minutos, para ir medir la cinética de inmovilización del antígeno al anticuerpo¹⁶.

4. Resultados y Discusión

4.1. Caracterización del papel con medidas de oxidación y cuantificación de grupos epóxido

El soporte de celulosa Whatman n° 2 utilizado está compuesto por celulosa pura con un peso de 73 g/m², un espesor de 0,170 mm y una resistencia mecánica en presencia de agua del orden de 0,290-0,260 Kn/m.

Su estructura fue estudiada por SEM y se puede observar que está formada por una red de fibras que dan lugar a una estructura porosa (**Ilustración 4**) que en principio debe ser apropiada para su uso como soporte de inmovilización de biomacromoléculas. La superficie interna y el tamaño de poro se midieron mediante porosimetría de mercurio, obteniendo que este papel en particular tiene una superficie interna de 6,6 m² por gramo.

Teniendo en cuenta que la superficie macroscópica del papel utilizado fue de 137 cm², esto significa que se trata de un soporte con una alta porosidad. La superficie interna era aproximadamente 480 veces mayor que la superficie externa. La porosidad de este papel fue aproximadamente un 70% del cual podemos encontrar poros de diferente tamaño, pero con poros regulares de alrededor de 14000 nm. Esta distribución de tamaño de poro es adecuada para la inmovilización de biomacromoléculas con diferentes tamaños lo que, en principio, lo convierte en un soporte adecuado.

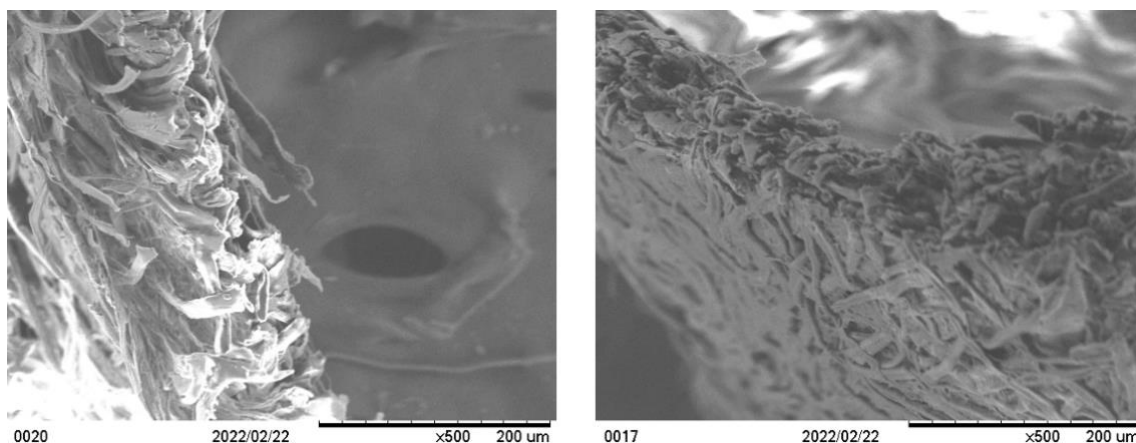


Ilustración 4. Micrografías SEM de soporte de celulosa Whatman n° 2.

Como primera aproximación al tratamiento de la celulosa comercial (folio) para la inmovilización de biomacromoléculas se llevó a cabo una caracterización del soporte. Se caracteriza la celulosa viendo los grupos que se pueden oxidar, (dado que la celulosa está compuesta de glucosas y estas pueden ser oxidables) y los grupos que se pueden activar como epóxidos²².

La activación de los soportes de celulosa con epiclorhidrina²², produce soportes de celulosa que contienen grupos epóxido y glicerilo^{9,22}. Los soportes de celulosa activados con grupos epóxido, pueden modificarse fácilmente a grupos que puedan adsorber proteínas a través de diferentes mecanismos²². Estos grupos glicerilo se oxidan fácilmente con NaIO₄ con el objetivo de convertirlos en una gran cantidad de grupos aldehído⁹, capaces de establecer enlaces covalentes multipunto fuertes, y por lo tanto, pudiendo obtener una inmovilización estable^{6,13,25}.

Por ello se llevó a cabo una medida de oxidación y cuantificación de los grupos epóxido de los soportes de celulosa comercial, tal y como se muestra en la **Tabla 1**.

Para ello se miden 4 cm² de tres soportes de celulosa diferentes: Soporte de celulosa comercial sin activar, soporte de celulosa activado con grupos epóxido²² y por último, soporte de celulosa sin activar hidrolizada con H₂SO₄, como podemos observar en la **Tabla 1**, se ha producido la activación de 90,1 μmol/gr de soporte de los cuales son epóxidos 52 μmol/gr. El número de grupos epóxido se cuantificó por la diferencia en el consumo de peryodato entre el soporte hidrolizado y el soporte epóxido inicial²². El consumo de peryodato se cuantificó mediante una Iodimetría.

Tabla 1. Oxidación en soporte de celulosa comercial con NaIO₄.

Soporte	Oxidación del soporte en μmol/gr
Celulosa comercial	485,9
Celulosa Activada	524
Celulosa Hidrolizada	576

4.2. Inmovilización BSA en soporte de celulosa

Como primera aproximación a esta metodología, se inmovilizó la proteína BSA, ya que es una proteína la cual se dispone pura y comercialmente certificada en soportes de celulosa comercial y soportes de celulosa Whatman n° 2. Se incubó la proteína BSA a diferentes concentraciones (0,005, 0,01, 0,03, 0,05, 0,2) mg/ml en 1 cm² de celulosa comercial **Tabla 2** y (0,005, 0,01, 0,03, 0,05,) mg/ml en 1 cm² de celulosa Whatman n° 2 **Tabla 3**. Y se comparó cuál de los dos soportes de celulosa tiene mejores resultados de inmovilización de la proteína BSA y así seleccionarlo para futuros ensayos.

Como podemos observar en la **Tabla 2**, se utilizaron múltiples soportes a diferentes concentraciones de pH favoreciendo la inmovilización al soporte. Los soportes de celulosa oxidados con NaIO₄²² presentaron una elevada inmovilización de la proteína sobre la concentración proteica de 0,005 mg/ml y 0,01 mg/ml de BSA, logrando inmovilizar el 91,5% y un 84% al soporte de celulosa respectivamente. Resultado que concuerda con múltiples estudios anteriores^{6,15,16,22,30}, ya que los grupos aldehído generados por la oxidación del soporte son capaces de establecer enlaces covalentes multipunto fuertes y, por lo tanto, obtener una inmovilización estable⁹. Sin embargo, para concentraciones de 0,03 mg/ml y 0,05 mg/ml de proteína BSA, se obtuvo una inmovilización menor, un 27% y 4,78% respectivamente. Estos resultados pueden ser dados a que la proteína al estar menos diluida presente una menor cinética de inmovilización al soporte.

En múltiples estudios se informa sobre las ventajas de inmovilización de biomacromoléculas sobre soportes de inmovilización convencionales a través de los grupos amino de la proteína utilizando glutaraldehído^{21,22}. Se realizaron experimentos de inmovilización de BSA en soporte activado con glutaraldehido a pH 7¹⁵ **Tabla 2**, obteniendo una inmovilización del 38,55% de proteína al soporte de celulosa activada con glutaraldehido pH 7¹⁵.

Esta unión de la BSA mediante la activación con glutaraldehido descrita anteriormente, debería ser más considerable en comparación con otros estudios^{11,15,29}, ya que permite la inmovilización de biomacromoléculas de manera estable y mediante uniones multipunto²⁹, sin embargo no es un soporte en el cual se hayan conseguido resultados extraordinarios en el mantenimiento de la actividad del anticuerpo, esto es debido a que permiten la unión del anticuerpo a través de los grupos amino más reactivos, pudiendo orientar la inmovilización hacia las regiones Fab bastante cerca de la superficie de soporte^{15,28}, disminuyendo así la capacidad de funcionalidad del anticuerpo^{6,15,16,17,18}.

Tras observar los resultados de inmovilización de BSA en los soportes de celulosa Whatman nº 2 tratados con NaIO₄⁹ y glutaraldehido¹⁵ en las mismas condiciones que el soporte de celulosa comercial, y midiendo las diferencias de inmovilización entre ambos soportes, todos los resultados de inmovilización en el soporte Whatman nº 2 fueron menores comparado con la celulosa comercial (folio) **Tabla 3**, por lo cual, se decide seguir adelante con el soporte de celulosa comercial, folio común y realizar el resto de los ensayos con este soporte.

Tabla 2. Inmovilización BSA en diferentes soportes de celulosa comercial.

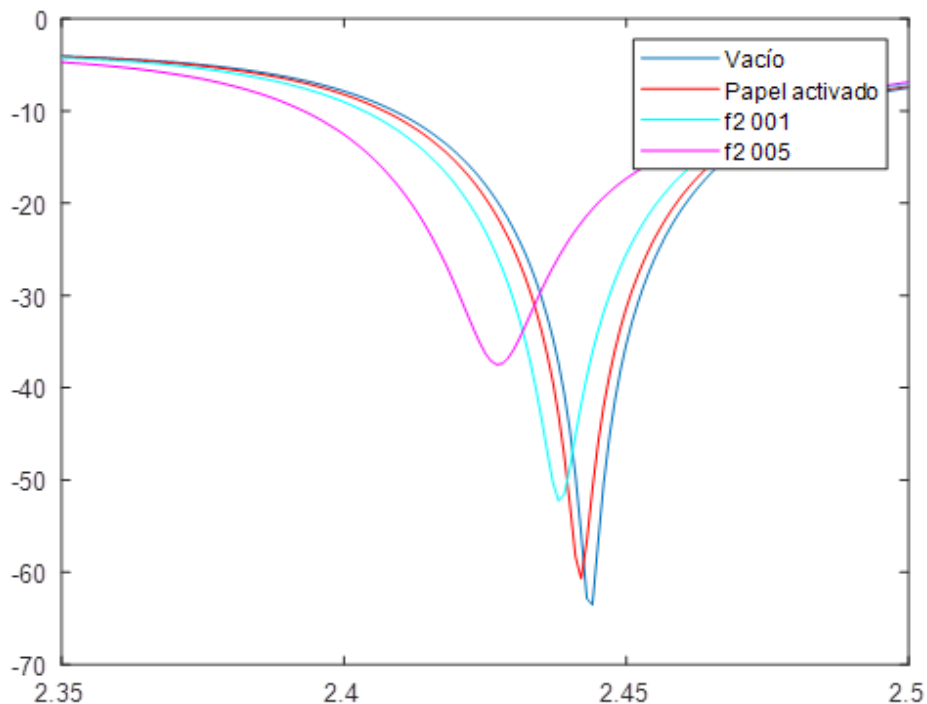
Soporte	pH	Concentración BSA. (mg/ml)	BSA inmovilizado (mg) en 1 cm ²
Folio-CHO	10	0,01	0,0084
Folio-CHO	10	0,03	0,0081
Folio-CHO	10	0,005	0,00457
Folio-CHO	10	0,05	0,00239
Folio-Gutaraldehido	7	0,03	0,01156
Folio-IDA-Cu	8,5	0,03	0,02865
Folio-IDA-Cu	8,5	0,05	0,04984
Folio-IDA-Cu	8,5	0,2	0,177
Folio-IDA-Cu	10	0,03	0,02766

Seguidamente, se procedió a la incubación con el soporte activado con IDA-Cu²², se realizó la incubación a pH distinto, con un pH alcalino de 8,5, se ha demostrado que en condiciones alcalinas, distintas biomacromoléculas se unen con mayor facilidad a soportes de quelato metálicos heterofuncionales^{6,22}, esta incubación se hizo para las concentraciones de 0,03, 0,05 y 0,2 mg/ml obteniendo inmovilizaciones muy altas del 95,5%, 99,68% y un 88,5% respectivamente, mientras que para el pH 10 a una concentración de 0,03 mg/ml de BSA se obtuvo una inmovilización del 92,2%, en ambos casos se obtuvo una cinética de inmovilización favorecida, similar a los resultados mostrados en diferentes estudios donde la carga de biomacromoléculas en estos soportes de quelato metálicos heterofuncionales fue considerable^{6,22,26}.

Tabla 3. Inmovilización BSA en diferentes soportes de celulosa Whatman nº 2.

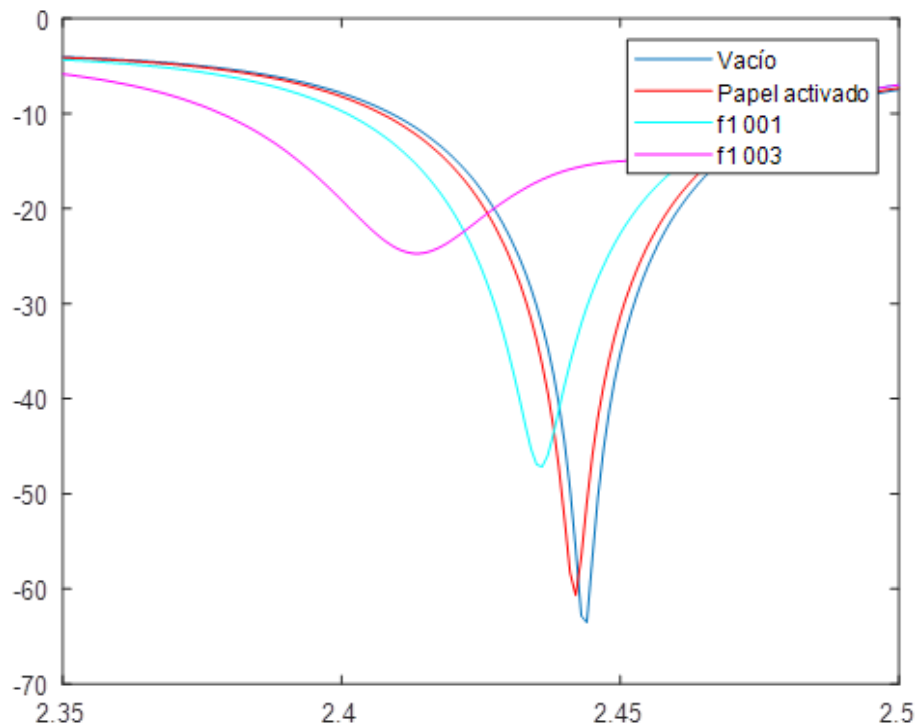
Soporte	pH	Concentración BSA. (mg/ml)	BSA inmovilizado (mg) en 1 cm ²
Filtro-CHO	10	0,005	0,00285
Filtro-CHO	10	0,01	0,005747
Filtro-CHO	10	0,03	0,0064
Filtro-CHO	10	0,05	0,00715
Filtro-Glutaraldehido	7	0,03	0,00951

Como podemos observar en la **Gráfica 1**, mediante un medidor de resonancia de frecuencias diseñado por Escuela Técnica Superior de Ingeniería (ICAI) de Madrid, el biosensor es capaz de detectar la presencia de la proteína BSA en el soporte de celulosa comercial, al cual se le ofreció la proteína BSA a diferentes concentraciones (0,01 y 0,05 mg/ml BSA), para ello se efectúa la medición del soporte de celulosa comercial activado con grupos epóxido ²², para comprobar si el biosensor es capaz de detectar la señal del soporte de celulosa comercial activado y diferenciarlo de los dos soportes de celulosa con proteína BSA inmovilizada, seguidamente se midió un soporte de celulosa-CHO con 0,0092 mg de BSA inmovilizado (f2 001) y por último un tercer soporte de celulosa-CHO con 0,00457 mg de BSA inmovilizada (f2 005). De esta manera, se obtiene una representación de las señales obtenidas por los tres soportes, pudiendo diferenciarlos claramente entre sí.



Gráfica 1. Comparativa de resultados de la inmovilización de BSA (0,01 y 0,05) mg/ml en soporte de celulosa-CHO y celulosa activada con grupos epóxido detectados en el biosensor.

Por otro lado, se realizó una segunda medición con el biosensor, como se muestra en la **Gráfica 2**, el biosensor vuelve a detectar con éxito la presencia de la proteína BSA en el soporte de celulosa comercial, a la cual se le ofreció la proteína a diferentes concentraciones (0,01 y 0,03 mg/ml BSA), para ello se efectúa una medición del soporte de celulosa comercial activado , seguido de un soporte de celulosa-CHO con 0,0076 mg de BSA inmovilizado (f1 001) y por último un tercer soporte de celulosa-CHO con 0,01 mg de BSA inmovilizada (f1 003). De esta manera, se consigue obtener una representación de las señales obtenidas por los tres soportes, pudiendo diferenciarlos claramente entre sí de nuevo sin producir apenas apantallamiento del sistema.



Gráfica 2 Comparativa de resultados de la inmovilización de BSA (0,01 y 0,03) mg/ml en soporte de celulosa-CHO y celulosa activada con grupos epóxido detectados en el biosensor.

4.3. *Inmovilización de la β -galactosidasa en soporte de celulosa comercial*

El siguiente paso consistió en la inmovilización de enzimas muy activas y con actividad catalítica fácilmente medible para de este modo evaluar la viabilidad de este soporte para la inmovilización de estas y estudiar si se conserva dicha actividad catalítica.

Se realizó una comparación de la cinética de inmovilización de la enzima β - galactosidasa en soportes de celulosa comercial de 1 cm² **Tabla 4**. La enzima tuvo una inmovilización completa en soportes activados con cobre y soportes oxidados²². La enzima se inmoviliza correctamente en el soporte de celulosa tratado con NaIO₄, ya que el soporte activado con grupos aldehído es capaz de establecer enlaces covalentes multipunto fuertes sobre la enzima y, por lo tanto, se obtiene una inmovilización total, como se muestra también en algunos estudios^{6,9,22}.

Paralelamente, el soporte de celulosa activado con IDA-Cu²² en condiciones alcalinas promueve una correcta orientación de la enzima sobre el soporte, específicamente en regiones con un alto número de residuos de histidinas²². Diversas enzimas para uso

industrial se han inmovilizado en soportes sólidos mediante enlaces covalentes multipunto usando quelatos metálicos y los resultados han sido positivos, sin embargo, como concluyen estos estudios suele apreciarse una pérdida de actividad por parte de la enzima^{8,22,30}.

Tabla 4. Inmovilización enzima β -galactosidasa en soporte de celulosa comercial.

Soporte	pH	Co. β -gal. (mg/ml)	β -gal inmovilizada (mg) en 1 cm ²
Folio-IDA-Cu	8,5	25	25
Folio-CHO	7	25	25
Folio-IDA-ZnCl ₂	7	25	5,2
Folio-PGA	4,5	25	21,25

A continuación, se realizó una incubación de 25 mg/ml de la β -galactosidasa con un soporte activado mediante IDA-ZnCl₂ pH 7²² y un soporte aminado activado con PGA pH 4,5, en el primer caso se obtuvo un resultado de inmovilización menor comparada con el soporte oxidado y el soporte activado con IDA-Cu pH 8,5²² solamente inmovilizamos un 20,8% esta diferencia de inmovilización con respecto al cobre esto es debido a que el cinc tiene menor facilidad para quelar, disminuyendo así su capacidad de inmovilizar la enzima con respecto al cobre^{8,22}.

Por otro lado, en el soporte de celulosa activado con PGA pH 4,5 la inmovilización enzimática fue muy superior un 84,8% de la enzima ofrecida, esto es debido a las interacciones electroestáticas con polímeros de gran tamaño y flexibles con cargas negativas que se produce en el soporte, permitiendo englobar fácilmente y favorecer la unión enzimática, específicamente por su región con mayores cargas positivas^{6,15,22,30}.

Tras inmovilizar la enzima en los cuatros soportes, el siguiente paso fue medir la actividad enzimática⁶, y comprobar que la enzima no haya perdido la mayor parte de su actividad una vez se une al soporte. En todos los soportes, la β -galactosidasa tuvo una pérdida total de su actividad al inmovilizarse. En múltiples estudios se ha comprobado que la inmovilización enzimática suele conllevar una pérdida de actividad de la enzima^{5,7,10-12,14}. Esto podría deberse a las fibras que componen la celulosa, estas se podrían haber introducido en el centro activo, taponando el mismo y disminuyendo así la actividad enzimática, al mismo tiempo la inmovilización puede originar un cambio conformacional que conduce a una forma inactiva⁷. Esto podría explicar el descenso de actividad de la enzima libre y la actividad de la enzima ya inmovilizada.

4.4. Inmovilización peroxidasa

Se realizó una comparación de la cinética de inmovilización de la enzima HRP en diferentes soportes de celulosa comercial, **Tabla 5**. Se ofrecieron 0,03 mg/ml de enzima HRP a un soporte aniónico activado con IDA pH 10²² y en un soporte de quelato metálico IDA-Cu pH 8,5²² la inmovilización de HRP es del 17,4 % correspondiente a el soporte activado con IDA pH 10 y 10 % con respecto a el soporte activado con IDA-Cu. Ambos muestran un resultado de inmovilización despreciable, en comparación a la β -galactosidasa. En el primer soporte aniónico activado con IDA²², se puede intuir que no hubo una reactividad esperada de los residuos de lisina después de la incubación a pH 10 y como muestran otros estudios, la carga enzimática comparado a otros soporte fue menor^{30,22}. Por otro lado, la incubación de HRP en soporte activados con quelatos metálicos a pH 8,5 fue despreciable también, esto puede ser debido a que las lisinas de la enzima fueron incapaces de interactuar con los grupos glyoxil del soporte en comparación con otros estudios en los cuales la inmovilización de HRP en soportes heterofuncionales fue completa^{6, 8,9,22}.

No obstante, se observaron unos resultados de inmovilización enzimática mayores en soportes activados con PGA los cuales se incubaron paralelamente a pH 7 y pH 4,5 obteniendo una inmovilización del 83,3% y 55% respectivamente, los soportes activados con PGA al ser un polímero flexible con alta carga es más probable que inmovilice la enzima con mayor facilidad y eficacia que un soporte tradicional aniónico^{8,22,30}.

Tabla 5. Inmovilización de la enzima peroxidasa HRP en soporte celulosa comercial y en soporte de resina absorbente sintética.

Soporte	pH	Co. Peroxidasa (mg/ml)	Peroxidasa inmovilizada (mg) en 1 cm ²
Folio-IDA-Cu	8,5	0,03	0,00522
Folio-IDA	10	0,03	0,003
Folio-PGA	7	0,03	0,025
Folio-PGA	4,5	0,03	0,0165
Resina IDA-Cu	8,5	0,03	0,015

Seguidamente y viendo los resultados mostrados, se inmovilizó la enzima HRP en soportes de resina absorbente activados con IDA-Cu pH 8,5²² en la cual se obtuvo una inmovilización superior con respecto a los soportes de celulosa activados en las mismas

condiciones, del 50% de enzima inmovilizada ofreciendo 0,03 mg/ml, estos soportes de resina absorbente sintética (Sepabeads) se han estudiado como soportes para la inmovilización enzimática^{26,30}, pero son soportes altamente hidrofóbicos, en muchos casos desestabilizan las enzimas tras el proceso de inmovilización.

Al igual que ocurrió con la enzima β -galactosidasa, en todos los soportes en los cuales se inmovilizó la enzima HRP, esta tuvo una pérdida total de su actividad al inmovilizarse.

4.5. *Inmovilización Ac anti-salmonella en soporte de celulosa comercial*

Como primer paso de esta metodología de inmovilización de anticuerpos sobre soportes de celulosa comercial, se incubaron 400 mg/ml de anticuerpo anti-salmonella como modelo en 1 cm² de soporte de celulosa comercial. Estos soportes de celulosa, como podemos observar en la **Tabla 6**, tuvieron diferentes resultados en la inmovilización de anticuerpos. El soporte de celulosa oxidado con NaIO₄ pH 10²² y el soporte activado con glutaraldehído pH 7¹⁵, tuvieron una inmovilización similar del anticuerpo anti-salmonella entre ambos un 25% y un 26,6% respectivamente, este dato de inmovilización tan similar entre ambos es el esperado ya que ambos soportes dan una orientación similar a los anticuerpos y tienen una elevada capacidad de intercambio iónico^{15,29}.

Paralelamente los soportes catiónicos activados con TEA a pH 7²² y el soporte activado con IDA-Cu pH 8,5²² tuvieron una inmovilización del anticuerpo superior, inmovilizándose un 85,7% y un 89,5% del anticuerpo ofrecido. Estos resultados concuerdan con diversos estudios de inmovilización de anticuerpos en distintos soportes, los soportes catiónicos inmovilizan muy bien biomacromoléculas a pH neutro²², mientras que en los soportes quelato metálicos heterofuncionales, el anticuerpo va a tener marcada afinidad hacia soportes con cationes Cu²⁺, presentado unos grandes porcentajes de inmovilización⁶, además, esto ocurre porque en la cadena pesada del anticuerpo, concretamente en el extremo C-terminal, hay ubicada una región con la capacidad de interaccionar con metales, esta zona específica de afinidad a los quelatos metálicos se encuentra en la región Fc, lo que hará diferencialmente más afín a ellos que la región Fab. Esta diferencia va a permitir que la unión al soporte del anticuerpo quede parcialmente orientada, algo muy importante como se ha citado anteriormente⁶.

Tabla 6. Inmovilización anticuerpo anti-salmonella en soporte de celulosa comercial.

Soporte	pH	Co. Anticuerpo (mg/ml)	Ac. Inmovilizado (mg) en 1 cm ²
Folio-CHO	10	400	100
Folio-IDA-Cu	8,5	400	342,8
Folio-TEA	7	400	358
Folio-Glutaraldehido	7	400	106,4

4.6. Inmovilización anticuerpo antiHRP

Una vez realizado un ensayo con un anticuerpo modelo, el anticuerpo anti-salmonella, se procede a inmovilizar un anticuerpo antiHRP en el cual se podrá medir la actividad biológica. Se llevó a cabo la inmovilización del anticuerpo antiHRP en 1 cm² de soporte de celulosa comercial activada con IDA-Cu ²² ofreciendo al soporte 0,03 mg/ml de anticuerpo e inmovilizándose un 88% del anticuerpo antiHRP al soporte. El anticuerpo antiHRP presenta un porcentaje de unión elevado, al igual que el anticuerpo anti-salmonella a soportes quelato metálicos heterofuncionales. **Tabla 7**

Tabla 7. Inmovilización Anticuerpo antiHRP (Sigma Aldrich) en 1cm² soporte celulosa comercial activada con IDA-Cu y en 0,1 gr soporte de resina absorbente sintética y 0,1 gr soporte de Agarosa-IDA-Cu.

Soporte	pH	Co. Anticuerpo (mg/ml)	Ac. Inmovilizado (mg)
Folio-IDA-Cu	8,5	0,03	0,0264
Resina-IDA	8,5	0,3	0,027
Resina-IDA-Cu	8,5	0,3	0,0545
Resina- NH ₂	7	0,3	0,066

A continuación, tras observar la pérdida de actividad que sufren las enzimas al inmovilizarse en los soportes de celulosa comercial, se decide estudiar la inmovilización del anticuerpo antiHRP de conejo (Sigma aldrich) en otros soportes sólidos. Se incuban 0,1 gr de soporte de resina absorbente sintética y 0,1 gr de soporte de agarosa activados con Cu pH 8,5 **Tabla 7**, en primer lugar, la resina absorbente sintética activada con IDA pH 8,5 y la activada con IDA-Cu pH 8,5 ²² obtuvieron unos resultados de inmovilización del anticuerpo del 9 % y 18,16% respectivamente, resultado similar a la inmovilización

enzimática que se produjo con la enzima HRP, en el primer soporte aniónico activado con IDA ²², se puede intuir al igual que con la enzima HRP que no hubo una reactividad esperada de los residuos de lisina después de la incubación a pH 10. Mientras tanto el soporte de resina el cual tuvo mayor inmovilización de anticuerpo antiHRP fue el soporte de resina lavada con grupos amino a pH 7 en el cual se inmovilizo un 22%, ya este soporte final aminado facilita la unión del anticuerpo^{6,22}. Estos resultados corroboran los estudios de inmovilización realizados sobre biomacromoléculas donde en varios procesos de inmovilización se ha observado una diferencia de inmovilización entre los soporte aniónicos y aminados de más del 50% ^{6,22,26,29,30}.

Paralelamente se realizó la incubación de un segundo anticuerpo antiHRP sobre los soportes de celulosa, esta vez suministrado por la empresa Biorad, los resultados de la inmovilización de este anticuerpo antiHRP los podemos observar en la **Tabla 8**.

Estos resultados fueron superiores a los resultados de inmovilización obtenidos por el anticuerpo antiHRP suministrado por Sigma Aldrich **Tabla 7**. Se ofrecieron a los soportes de agarosa y resina 0,5 mg/ml de anticuerpo, mientras que a los soportes de célula se ofrecieron concentraciones de 0,05 mg/ml de anticuerpo antiHRP, por un lado, en la resina absorbente sintética activada con IDA-Cu pH 8,5 ²² se inmovilizo un 20% y con la resina aminada se inmovilizó un 17,7% del anticuerpo ofrecido al soporte.

Por otro lado, la inmovilización del anticuerpo antiHRP sobre el agarosa-IDA-Cu ²², 18% del anticuerpo antiHRP ofrecido.

Tabla 8. Inmovilización Anticuerpo antiHRP (Biorad) en 1 cm² de soportes celulosa, en 0,1 gr soporte de resina absorbente sintética y en 0,1 gr soporte de Agarosa-IDA-Cu.

Soporte	pH	Co. Anticuerpo (mg/ml)	Ac. Inmovilizado (mg)
Agarosa-IDA-Cu	8,5	0,5	0,09
Resina-IDA-Cu	8,5	0,5	0,1
Resina-NH ₂	7	0,5	0,0885
Folio-TEA	8,5	0,05	0,01135
Folio-IDA-Cu	8,5	0,05	0,0115

4.7. Actividad anticuerpo antiHRP

A continuación, tras inmovilizar los anticuerpos en los distintos soportes, se procederá al estudio de la actividad biológica que presentan estos anticuerpos inmovilizados ¹⁶ en soportes de celulosa activados con TEA²² e IDA-Cu²², Resina-IDA-Cu ³⁰, Resina-NH₂ y agarosa-IDA-Cu²². Este estudio de actividad se llevó a cabo primero para el anticuerpo antiHRP suministrado por Sigma Aldrich y seguidamente para el anticuerpo suministrado por Biorad, a todos los soportes se les ofrece la misma cantidad de moles de enzima HRP que de antiHRP hay inmovilizados en el soporte como se indica en la **Tabla 9 y Tabla 10**.⁶

Con el anticuerpo antiHRP suministrado por Sigma Aldrich los resultados son desfavorables, como podemos observar en la **Tabla 9**, no se produce ninguna interacción entre la HRP ofrecida a los distintos soportes con anticuerpo inmovilizado, es decir, el anticuerpo no presenta actividad biológica alguna. Aunque en diversos estudios de inmovilización observado una alta disminución de la actividad biológica del anticuerpo una vez este se une a los distintos soportes ^{6,15,16,30}, finalmente hemos detectado que el anticuerpo antiHRP suministrado por Sigma Aldrich estaba defectuoso desde un principio.

Tabla 9. Inmunoactividad anticuerpo antiHRP (Sigma Aldrich) inmovilizado en 1 cm² de soportes celulosa IDA-Cu, en 0,1 gr soporte de resina absorbente sintética y en 0,1 gr soporte de Agarosa-IDA-Cu.

Soporte	pH	Nanomol antiHRP/gr soporte	Nanomol HRP/gr soporte	% HRP unido al anticuerpo anti HRP
Folio-IDA-Cu	8,5	1,76	1,76	0%
Resina-IDA-Cu	8,5	0,264	0,264	0%
Resina- NH ₂	7	0,29	0,29	0%

Sin embargo, como podemos observar en la **Tabla 10**, el anticuerpo antiHRP de Biorad obtiene una inmunoactividad en los soportes de celulosa activados con IDA-Cu ²² y TEA ²² del 21% y 18% respectivamente, por otra parte, se adquiere un 27% y 38% de inmunoactividad sobre soportes de Resina-IDA-Cu³⁰ y Resina-NH₂ respectivamente, por otro lado, el soporte de agarosa-IDA-Cu ²², un 25% de la peroxidasa ofrecida interacciona con el anticuerpo antiHRP unido al soporte, es decir, el anticuerpo mantiene su actividad biológica al unirse a los soportes. Como muestran los resultados y a la par de diferentes investigaciones, se muestran como los soportes activados con IDA-Cu ²² y grupos amino

mantienen un mayor porcentaje de inmunoactividad del anticuerpo inmovilizado comparado con otros soportes activados^{6,16,30}.

Estos resultados muestran cómo se mantienen similares actividades biológicas de los anticuerpos inmovilizados en los soportes de celulosa en comparación a los soportes de agarosa y resinas activadas con los mismos grupos funcionales. Por lo cual, este soporte de celulosa tiene un gran potencial para la inmovilización de anticuerpos.

Tabla 10. Inmunioactividad anticuerpo antiHRP (Biorad) inmovilizado en 1 cm² de soportes celulosa, en 0,1 gr soporte de resina absorbente sintética y en 0,1 gr soporte de Agarosa-IDA-Cu.

Soporte	pH	Nanomol Ac. antiHRP/gr soporte	Nanomol HRP/gr soporte	% HRP unido al anticuerpo antiHRP
Resina-IDA-Cu	8,5	0,72	0,72	27%
Resina- NH ₂	7	0,583	0,583	38%
Agarosa-Cu	8,5	0,6	0,6	25%
Folio-IDA-Cu	7	0,757	0,757	21%
Folio-TEA	7	0,767	0,767	18%

5. Conclusiones

De los diferentes estudios realizados durante el presente trabajo, se pueden sacar diferentes conclusiones:

- a) Tras la caracterización de los soportes de celulosa comercial, especialmente los tipos folio, se ha podido ver como tienen características que les hacen ser potencialmente muy útiles para la inmovilización de biomacromoléculas. Esto es debido a que tienen una naturaleza porosa y fibrosa con una razonable superficie interna (en el caso del papel Whatman nº 2 que fue el medido mediante técnicas de isotermas de adsorción de mercurio). Además de esto, son fácilmente activables con diferentes grupos reactivos lo que hace que se puedan orientar las biomoléculas a través de diferentes grupos funcionales y por tanto por diferentes regiones de su superficie.
- b) Si bien estos soportes han sido capaces de inmovilizar diferentes enzimas, no se ha podido recuperar su actividad catalítica si se compara con la obtenida tras inmovilización sobre otros soportes (agarosa, resinas acrílicas entre otros). Esto es un tema pendiente de estudio, pero podría venir dado por posibles inactivaciones producidas por interacciones entre fibras del soporte y el centro activo de las diferentes enzimas utilizadas.
- c) Estos soportes de celulosa inmovilizaron diferentes anticuerpos anti-salmonela y antiperoxidasa, este último, con rendimientos de inmovilización similares a los obtenidos tras comparación con la inmovilización en soportes más tradicionalmente utilizados (agarosa y resinas acrílicas).
- d) La inmovilización del anticuerpo antiperoxidasa resultó satisfactoria en comparación a los soportes anteriormente citados, conservando similares actividades biológicas a los anticuerpos inmovilizados sobre agarosa y resinas activadas con los mismos grupos funcionales. Esto puede ser debido al gran tamaño de los anticuerpos comparados con otras enzimas con una mayor estructura globular.

- e) Estos soportes han demostrado ser unos candidatos excelentes para el futuro inmovilizando anticuerpos de mayor interés desde el punto de vista de biodiagnóstico, dado que las pruebas de papel con BSA inmovilizada resultaron altamente satisfactorias en medidas reales por resonancia de radiofrecuencias. Este soporte permitió una fácil detección de preparaciones con diferentes concentraciones de la molécula modelo (BSA) sin producir apenas apantallamiento del sistema.

En general y para concluir, me gustaría comentar que el trabajo ha resultado satisfactorio de cara a estudiar un sistema modelo, con soportes baratos, pero fácilmente activables y biodegradables. Posteriormente el grupo de trabajo del laboratorio de biocatálisis utilizará estos conocimientos adquiridos para utilizarlos en la inmovilización de anticuerpos con uso terapéutico, para la detección y seguimiento de diferentes patologías dependientes de algún factor o molécula antigénica.

6. Bibliografía

1. Franco EDJ. Estrategias de inmovilización de anticuerpos para la detección directa de hormonas mediante Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial. Published online 2013:171.
2. Peraile Muñoz I, Gil García M, Guamán Collaguazo C, González López L, Cabria Ramos J, Lorenzo Lozano P. Optimización del proceso de inmovilización de anticuerpos en inmunobiosensores. *Sanid Mil.* 2018;74(3):158-162. doi:10.4321/S1887-85712018000300004
3. Díaz Betancor Z. Vías de inmovilización de biomoléculas sobre SU-8 y otras superficies poliméricas para su utilización en biosensado óptico sin marcaje. Published online 2020. <https://riunet.upv.es/handle/10251/149576>
4. Byrne B, Stack E, Gilmartin N, O'Kennedy R. Antibody-based sensors: Principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors (Switzerland).* 2009;9(6):4407-4445. doi:10.3390/s90604407
5. Biol C, Tfno M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Published online 1998:1-17.
6. Batalla P. Nuevos métodos para la inmovilización orientada de anticuerpos sobre soportes sólidos. Published online 2009:122.
7. Klein MP, Scheeren CW, Lorenzoni ASG, Dupont J, Frazzon J, Hertz PF. Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. *Process Biochem.* 2011;46(6):1375-1379. doi:10.1016/j.procbio.2011.02.021
8. Mateo C, Grazu V, Palomo JM, Lopez-Gallego F, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1022-1033. doi:10.1038/nprot.2007.133
9. Martins De Oliveira S, Velasco-Lozano S, Orrego AH, et al. Functionalization of Porous Cellulose with Glyoxyl Groups as a Carrier for Enzyme Immobilization and Stabilization. *Biomacromolecules.* 2021;22(2):927-937. doi:10.1021/acs.biomac.0c01608
10. Mislovičová D, Masárová J, Vikartovská A, Gemeiner P, Michalková E. Biospecific immobilization of mannan-penicillin G acylase neoglycoenzyme on Concanavalin A-bead cellulose. *J Biotechnol.* 2004;110(1):11-19. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.01.006
11. Huang XJ, Chen PC, Huang F, Ou Y, Chen MR, Xu ZK. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *J Mol Catal B Enzym.* 2011;70(3-4):95-100. doi:10.1016/j.molcatb.2011.02.010

12. Labus K, Turek A, Liesiene J, Bryjak J. Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers. *Biochem Eng J.* 2011;56(3):232-240. doi:10.1016/j.bej.2011.07.003
13. Namdeo M, Bajpai SK. Immobilization of α -amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study. *J Mol Catal B Enzym.* 2009;59(1-3):134-139. doi:10.1016/j.molcatb.2009.02.005
14. Bryjak J, Aniulyte J, Liesiene J. Evaluation of man-tailored cellulose-based carriers in glucoamylase immobilization. *Carbohydr Res.* 2007;342(8):1105-1109. doi:10.1016/j.carres.2007.02.014
15. Batalla P, Mateo C, Grazu V, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Immobilization of antibodies through the surface regions having the highest density in lysine groups on finally inert support surfaces. *Process Biochem.* 2009;44(3):365-368. doi:10.1016/j.procbio.2008.11.017
16. Fuentes M, Mateo C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. *Biosens Bioelectron.* 2005;20(7):1380-1387. doi:10.1016/j.bios.2004.06.004
17. Jung Y, Jeong JY, Chung BH. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. *Analyst.* 2008;133(6):697-701. doi:10.1039/b800014j
18. Kang JH, Choi HJ, Hwang SY, Han SH, Jeon JY, Lee EK. Improving immunobinding using oriented immobilization of an oxidized antibody. *J Chromatogr A.* 2007;1161(1-2):9-14. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.023
19. Cho IH, Paek EH, Lee H, Kang JY, Kim TS, Paek SH. Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces. *Anal Biochem.* 2007;365(1):14-23. doi:10.1016/j.ab.2007.02.028
20. Liu Y, Yu J. Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review. *Microchim Acta.* 2016;183(1):1-19. doi:10.1007/s00604-015-1623-4
21. Wimalasena RL, Wilson GS. Factors affecting the specific activity of immobilized antibodies and their biologically active fragments. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1991;572(1-2):85-102. doi:10.1016/0378-4347(91)80475-R
22. Mateo C, Bolivar JM, Godoy CA, et al. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. *Biomacromolecules.* 2010;11(11):3112-3117. doi:10.1021/bm100916r
23. Mateo C, Torres R, Fernández-Lorente G, et al. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules.* 2003;4(3):772-777. doi:10.1021/bm0257661

24. Turková J, Bláha K, Malaníková M, Vančurová D, Švec F, Kálal J. Methacrylate gels with epoxide groups as supports for immobilization of enzymes in pH range 3-12. *BBA - Enzymol.* 1978;524(1):162-169. doi:10.1016/0005-2744(78)90114-6
25. Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal - B Enzym.* 2000;10(1-3):157-176. doi:10.1016/S1381-1177(00)00124-7
26. Mateo C, Abian O, Fernández-Lorente G, et al. Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol Prog.* 2002;18(3):629-634. doi:10.1021/bp010171n
27. Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb Technol.* 2000;26(7):509-515. doi:10.1016/S0141-0229(99)00188-X
28. Monsan P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *J Mol Catal.* 1978;3(5):371-384. doi:10.1016/0304-5102(78)80026-1
29. Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(4):877-882. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.01.014
30. Mateo C, Fernández-Lorente G, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules.* 2000;1(4):739-745. doi:10.1021/bm000071q
31. Emami Bistgani Z, Siadat SA, Bakhshandeh A, Ghasemi Pirbalouti A, Hashemi M. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop J.* 2017;5(5):407-415. doi:10.1016/j.cj.2017.04.003
32. Peng Y, Gelder V Van, Amaladoss A, Patel KH. Covalent binding of antibodies to cellulose paper discs and their applications in naked-eye colorimetric immunoassays. *J Vis Exp.* 2016;2016(116):1-11. doi:10.3791/54111