

Trabajo Fin de Grado

Generación enzimática de nanomateriales de cobre para la determinación de tiramina como amina biógena modelo.

Autora

Marta Pericás Albarova

Directora

Susana de Marcos Ruiz

Resumen

Con este trabajo se pretende realizar el estudio y optimización de los parámetros de un método analítico basado en la reacción enzimática de formación de nanomateriales de cobre para la determinación de aminas biógenas usando la tiramina como amina biógena modelo.

En primer lugar, se realiza la validación del método con Au(III) y posteriormente, se procede al estudio de la reacción con Cu(II) mediante formación de nanopartículas (absorción) y nanoclusters (fluorescencia) realizando su caracterización por XPS y TEM.

Se realiza la optimización de las condiciones de reacción de formación de nanopartículas y nanoclusters de cobre: las concentraciones de Cu(II) y de la enzima TAO, la disolución amortiguadora, su concentración y el pH al que se lleva a cabo la reacción, la temperatura y el tiempo de adición de Cu(II).

A partir de estos resultados se realiza la calibración para la determinación de tiramina mediante la formación de nanopartículas (banda de absorción del plasmon) a 50°C, sobre una disolución amortiguadora de MES a pH=6 y 0,1M, con una concentración de 0,25 U/mL de TAO y [Cu(II)]=0,25 mM. En esta calibración se obtiene una función sigmoideal que concuerda con el mecanismo de formación de las nanopartículas.

Para la determinación de tiramina mediante la formación de nanoclusters (fluorescencia), se prepara una calibración a 50°C, sobre una disolución amortiguadora de MES a pH=6 y 0,1M, con una concentración de 1,5 U/mL de TAO y [Cu(II)]=0,05 mM.

Tras la calibración se obtienen parámetros analíticos, tales como límite de detección, límite de cuantificación y DER.

Finalmente, se estudia el efecto interferente de otras aminas biógenas similares al analito de estudio tales como cadaverina, histamina y putrescina.

Abstract

The main purpose of this work is to study and optimize the parameters of an analytical method which focuses on the formation of copper-based nanomaterials for the determination of biogenic amines using tyramine as a model.

Firstly, a validation of the method with Au(III) is carried out and secondly, the reaction is studied with Cu(II) through the generation of nanoparticles (absorption) and nanoclusters (fluorescence), both characterized by XPS and TEM.

The next step is the optimization of the reaction conditions for the formation of copper nanoparticles and nanoclusters: the optimal concentration of Cu(II) and TAO; concentration, pH and buffer used for the reaction, temperature and addition time of Cu(II).

From these results, a calibration for the determination of tyramine through the plasmon band of the nanoparticles formation is prepared, using as reaction parameters: 50°C, a pH=6 MES (0.1 M) buffer, 0.25 U/ml of TAO and 0.25 mM of Cu(II). This calibration can be represented with a logistic function which is in accordance with the mechanism of formation of the nanomaterials.

The determination of tyramine based on the fluorescence of nanoclusters is carried out using the following reaction parameters: 50°C, buffer MES (0.1 M) of pH 6, 1.5 U/ml of TAO and 0.05 mM of Cu(II).

Then, the detection and quantification limits were calculated, along with the relative standard deviation (RSD).

Finally, a study of the interfering effect of other biogenic amines (putrescine, cadaverine and histamine) is carried out

Índice

1.Introducción	1
1.1 Nanomateriales	1
1.2 Aminas biógenas	2
1.3 Determinación de las aminas biógenas.....	3
2. Objetivos y planteamiento	3
3. Resultados y discusión	4
3.1 Validación del método con Au(III)	4
3.2 Estudio de la reacción con Cu(II)	6
3.3 Optimización de la reacción por formación de nanopartículas	9
3.3.1 Optimización de la concentración de cobre.....	9
3.3.2 Optimización del volumen de enzima TAO	9
3.3.3. Elección de disolución amortiguadora	10
3.3.4 Optimización de la concentración de la disolución amortiguadora MES	11
3.3.5. Optimización del pH	12
3.3.6. Optimización de la temperatura	12
3.3.7. Optimización del tiempo de adición de Cu(II)	13
3.3.8. Características analíticas.	14
3.4.Estudio de la reacción por formación de nanoclusters.....	16
3.4.1. Optimización de la concentración de cobre.....	17
3.4.2. Optimización de la concentración de Tiramina Oxidasa (TAO).....	17
3.4.3. Características analíticas.	18
4. PARTE EXPERIMENTAL	20
4.1. Reactivos y disoluciones.....	20
4.2.Instrumentación y material.....	21
4.3 Procedimiento experimental	21
4.3.1. Procedimiento de medida de absorción molecular	21
4.3.2. Procedimiento para la medida de fluorescencia.....	22
5. Conclusiones.....	22
6. Bibliografía	24
Anexos.....	25
Anexo 1. Relación sigmoideal para absorción.....	25
Anexo 2: Relación sigmoideal para fluorescencia	26

1.Introducción

1.1 Nanomateriales

La definición de nanomaterial engloba a todos aquellos materiales en los cuales, al menos una de sus dimensiones se encuentra en la nanoescala, es decir, entre 1 y 100 nanómetros. Debido a su tamaño y a la elevada proporción de átomos en su superficie, dan como resultado nuevas propiedades físicas y químicas.⁽¹⁾

Desde hace años, la síntesis de nanomateriales es una de las ramas más activas de la nanociencia. Una de las principales ventajas de estos materiales es su reducido tamaño dando lugar a una elevada relación superficie-volumen. Avances en el campo de los nanomateriales ponen de manifiesto las amplias aplicaciones de estos materiales en sectores tan diversos como la medicina, el sector textil, el sector energético o la construcción.⁽²⁾

En cuanto a la investigación analítica, una de las aplicaciones de mayor interés son sus propiedades ópticas ya que han ofrecido múltiples posibilidades en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas. La caracterización de estos nanomateriales se realizará mediante microscopía de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) o mediante otras técnicas más sencillas como la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) o la espectroscopía UV-vis⁽³⁾

Desde el punto de vista del desarrollo de biosensores ópticos enzimáticos, estos se basan en el acoplamiento de una segunda reacción enzimática que sirva de indicadora, ya que la mayoría de los compuestos involucrados en la reacción enzimática principal no tienen propiedades ópticas adecuadas. Esta segunda reacción, implica la oxidación del indicador por H_2O_2 catalizada por una enzima tipo peroxidasa (HRP)⁽⁴⁾ tal como muestra la figura 1.

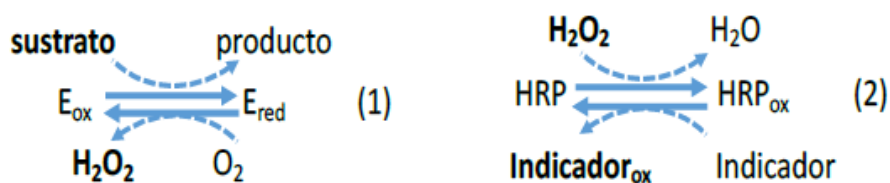


Figura 1: Mecanismo simplificado del método de análisis enzimático basado en enzimas del tipo oxidasa.

Uno de los principales objetivos del grupo de investigación donde se desarrolla este trabajo es la simplificación de la metodología existente, centrándose fundamentalmente en la eliminación de la segunda reacción indicadora⁽⁵⁾ ya que en estas reacciones aparecen con frecuencia varios problemas como la inestabilidad del indicador, las reacciones laterales que pueden aparecer entre el indicador y la enzima y la falta de especificidad de la enzima peroxidasa. La incorporación de los nanomateriales ha permitido dar un paso más en este objetivo. En esta línea, el grupo ha sido pionero en la generación in situ de nanomateriales de oro⁽⁴⁾ durante la reacción enzimática, tal como muestra la figura 2, en la que se pretende aprovechar las propiedades reductoras de las enzimas implicadas para la síntesis “in situ” de

nanomateriales, cuyas propiedades ópticas se pueden relacionar con la concentración del sustrato ⁽⁶⁾.

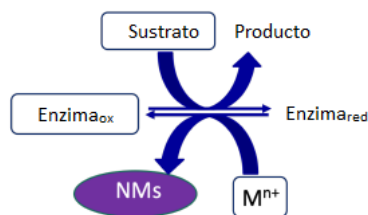


Figura 2: Representación esquemática de la generación enzimática de nanomateriales (los sufijos 'ox' y 'red' se refieren a la forma oxidada y reducida de la enzima respectivamente.)

El presente trabajo se basa en el estudio de las propiedades ópticas de nanomateriales metálicos, en particular de nanomateriales de cobre, diferenciando entre nanoclusters (NCs) y nanopartículas (NPs). La principal diferencia entre ambos tipos se encuentra en el tamaño ya que los nanoclusters tienen un diámetro menor que las nanopartículas, de unos pocos nm.

1.2 Aminas biógenas

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular formados por la descarboxilación de aminoácidos o por la aminación y transaminación de aldehídos y cetonas como se muestra en la figura 3. Según su procedencia, pueden clasificarse en endógenas si las sintetiza el propio organismo o exógenas si se ingieren mediante la dieta ⁽⁷⁾.

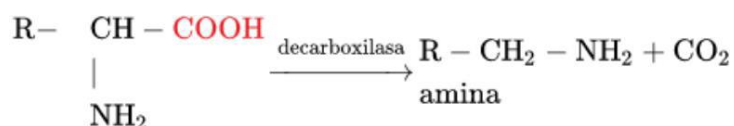


Figura 3: Formación de una amina biógena por la acción de una enzima descarboxilasa.

Estas moléculas tienen funciones fisiológicas esenciales en los seres vivos puesto que actúan en la síntesis de proteínas y en la regulación del crecimiento celular, entre otras. En pequeñas dosis, pueden ser eliminadas mediante procesos enzimáticos por acción de aminas oxidasas presentes en nuestro organismo, pero si las dosis son elevadas se dificulta su eliminación ya que las enzimas encargadas de su metabolismo no son capaces de degradarlas por completo. Este aumento de aminas biógenas en el organismo causa efectos perjudiciales tales como trastornos respiratorios, náuseas o migrañas.

Se pueden encontrar altas concentraciones de estas aminas en el queso, el vino o pescados. Tiramina e histamina son las dos aminas biógenas que causan el mayor número de intoxicaciones alimentarias.

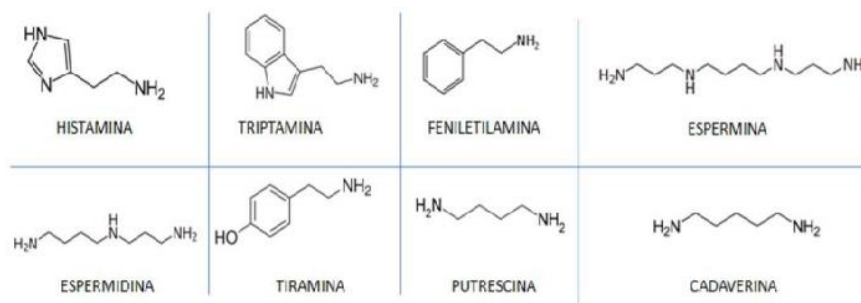


Figura 4: Estructura química de las aminas biógenas con mayor presencia en alimentos.

1.3 Determinación de las aminas biógenas

Existen diferentes métodos para la determinación de aminas biógenas, aunque los más extendidos para su separación y cuantificación se basan en métodos cromatográficos, principalmente HPLC de fase reversa.

Actualmente están surgiendo distintas alternativas más rápidas y más económicas como los biosensores, que se fundamentan en el acoplamiento de la segunda reacción enzimática y la oxidación de un colorante ⁽⁸⁾.

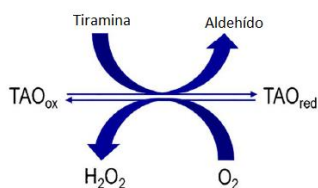


Figura 5: Representación esquemática de la reacción de oxidación de tiramina en la que se obtiene H₂O₂ que posteriormente sufrirá la reacción de oxidación.

2. Objetivos y planteamiento

Partiendo de los estudios previos realizados por el grupo de investigación, este trabajo tiene como objetivo el estudio y optimización de los parámetros de un método analítico para la determinación enzimática de aminas biógenas usando para ello tiramina como amina biógenamodelo. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de Cu(II) de forma que se produce la reducción del metal estabilizándose en forma de nanomateriales (nanopartículas, nanoclusters), los cuales presentan propiedades de absorción o fluorescencia, que serán utilizadas como parámetro analítico para la determinación de la amina biógena. Para ello, es necesaria la presencia de la enzima tiramina oxidasa, responsable de la oxidación de la tiramina.

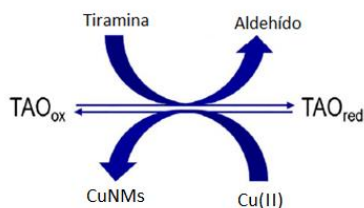


Figura 6: Reacción de formación de nanomateriales de cobre (CuNMs) mediante la oxidación de la tiramina en presencia de tiramina oxidasa (TAO).

Durante el transcurso del trabajo, se optimizarán los parámetros analíticos para la determinación de tiramina tanto a través de medidas de absorción (nanopartículas) como de fluorescencia (nanoclusters).

Los objetivos específicos del trabajo se estructuran de la siguiente forma:

1. Consulta de material bibliográfico y artículos relacionados con el tema de estudio.
2. Comprender el funcionamiento y aprender el correcto manejo de un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis y de fluorímetro.
3. Aprender a resolver un problema en el ámbito de la Química Analítica siguiendo el método científico.
4. Estudiar y optimizar los diferentes parámetros que afectan a la reacción de formación de nanomateriales de cobre.
5. Realizar un estudio de calibración para la reacción objeto de estudio y calcular los parámetros analíticos asociados al método.
6. Estudio de interferencias de aminas biógenas: histamina, putrescina y cadaverina.
7. Tratamiento de datos y obtención de información analítica de los datos obtenidos en el laboratorio.

3. Resultados y discusión

3.1 Validación del método con Au(III)

Estudios anteriores proporcionan una metodología que permite la determinación de tiramina a través de una reacción con tiramina oxidasa (TAO) en presencia de oro, por la cual, se generan in situ nanopartículas de oro⁽⁸⁾.

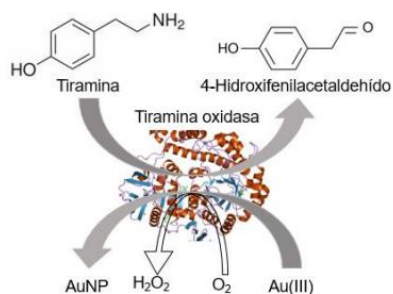


Figura 7: Reacción de formación de nanopartículas de oro.

En primer lugar, se realiza una validación del método realizando medidas con diferentes concentraciones de tiramina y comprobando como la concentración de nanopartículas de oro es proporcional a la concentración de tiramina de acuerdo con los siguientes resultados experimentales:

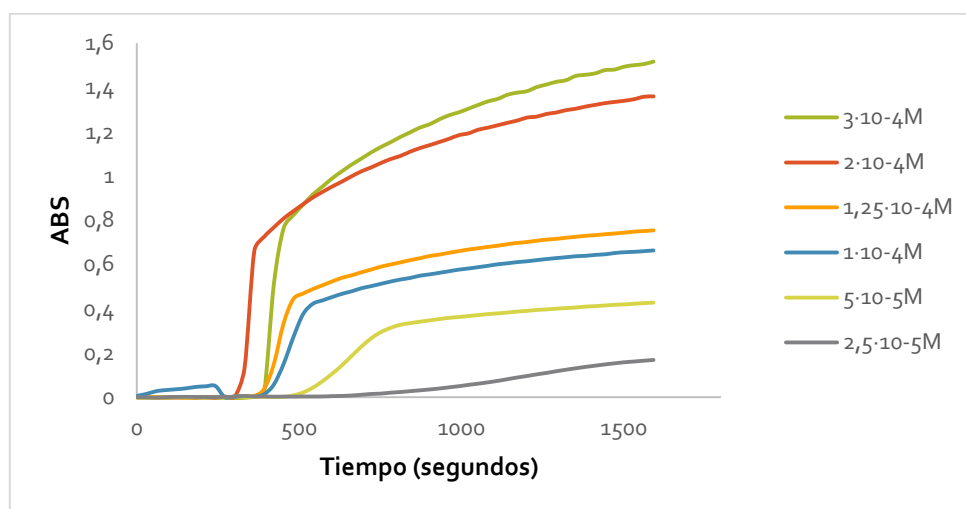


Figura 8: Registro cinético a $\lambda=390 \text{ nm}$ perteneciente a la determinación de tiramina por formación de nanopartículas de oro (AuNPs). Condiciones experimentales: TAO= 50 U/mL, $[\text{Au(III)}]= 1\text{mM}$, tiempo de adición 5 minutos, temperatura 40°C y $\text{pH}=6$ con disolución amortiguadora de fosfatos $0,1\text{M}$.

El estudio de calibrado muestra que a medida que aumenta la concentración de tiramina en disolución, aumenta la señal de absorbancia como cabría esperar. La cuantificación se realiza a través de la medida de la absorbancia en el máximo (540 nm) a un tiempo dado (1500s) obteniendo la siguiente representación:

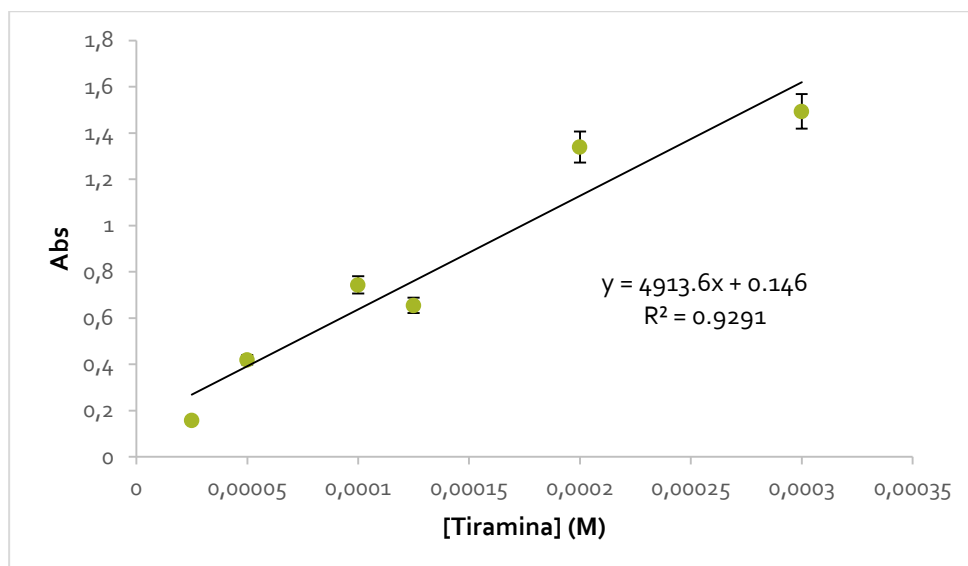


Figura 9: Recta de calibrado para la determinación de tiramina mediante la formación de nanopartículas de oro (AuPNs) en las condiciones óptimas (Fig. 8)

3.2 Estudio de la reacción con Cu(II)

Una vez se comprueba que la reacción con Au(III) tiene lugar y que por lo tanto el método funciona, se procede al estudio de la reacción con Cu(II).

Para comprobar si la reacción tiene lugar mediante la formación de nanopartículas de cobre, se realizaron distintos experimentos para estudiar el transcurso de la reacción en ausencia de alguno de los reactivos mediante absorción:

Experimento 1: Se realiza la medida en ausencia de Cu(II) y añadiendo en el orden correspondiente 1960 μL MES pH=6, 20 μL TAO y 20 μL tiramina $2,5 \cdot 10^{-2}\text{M}$

Experimento 2: Se realiza la medida en ausencia de tiramina oxidasa (TAO) y añadiendo en el orden correspondiente 1975 μL MES pH=6, 20 μL tiramina $2,5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ y 5 μL de Cu(II) de 25mM.

Experimento 3: Se realiza la medida en ausencia de tiramina y se añade en el orden correspondiente 1975 μL MES pH=6, 20 μL TAO y 5 μL de Cu(II) de 25mM.

Experimento 4: Se realiza la medida con el procedimiento de medida habitual añadiendo 1955 μL MES pH=6, 20 μL TAO, 20 μL tiramina $2,5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ y 5 μL de Cu(II) de 25mM.

Una vez realizados los cuatro experimentos, obtenemos la siguiente representación:

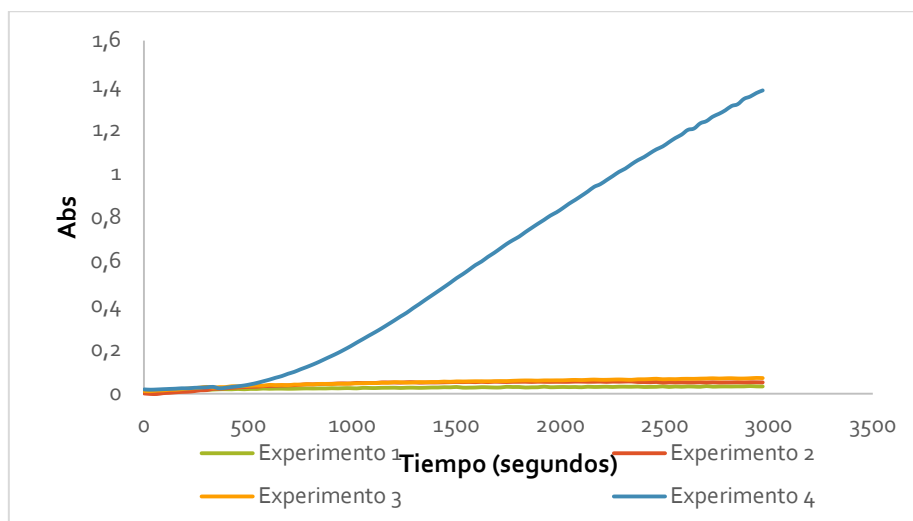


Figura 10: Registro cinético a $\lambda=390$ nm para el estudio de la formación de nanopartículas en presencia de Cu(II).

Como se observa, los resultados experimentales concuerdan con las primeras hipótesis en la cual, en presencia de Cu(II) se observa la formación de nanopartículas.

El resultado de la reacción se analiza por microscopía electrónica de barrido (STEM) para comprobar que la señal de absorción es debida a las nanopartículas, obteniendo las siguientes imágenes:

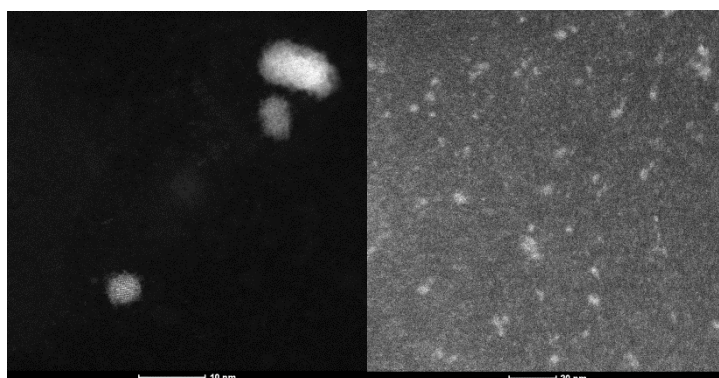


Figura 11: Imágenes de STEM correspondientes a la reacción sobre una disolución amortiguadora de MES a pH=6 y 0,1M; [TAO]=0,25U/mL; [Tiramina]= $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, tiempo de adición 5 minutos y temperatura 40°C.

En las imágenes obtenidas por STEM, se pueden ver estructuras agrupadas con un tamaño superior a 10nm correspondientes a los CuNPs que son las que generan las bandas de absorción. Así mismo, se evidencia la presencia de partículas de tamaño mucho menor lo que correspondería a la formación de CuNCs por lo que se procede al estudio de la reacción por fluorescencia, realizando mediante el mismo procedimiento cuatro experimentos distintos:

Experimento 1: Se realiza la medida en ausencia de Cu(II) y añadiendo en el orden correspondiente 1960 μ L MES pH=6, 20 μ L TAO y 20 μ L tiramina $2,5 \cdot 10^{-2}$ M

Experimento 2: Se realiza la medida en ausencia de tiramina oxidasa (TAO) y añadiendo en el orden correspondiente 1975 μ L MES pH=6, 20 μ L tiramina $2,5 \cdot 10^{-2}$ M y 5 μ L de Cu(II) de 25mM.

Experimento 3: Se realiza la medida en ausencia de tiramina y se añade en el orden correspondiente 1975 μ L MES pH=6, 20 μ L TAO y 5 μ L de Cu(II) de 25mM.

Experimento 4: Se realiza la medida con el procedimiento de medida habitual añadiendo 1955 μL MES pH=6, 20 μL TAO, 20 μL tiramina $2,5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ y 5 μL de Cu(II) de 25mM.

Una vez realizados los cuatro experimentos, se obtienen los siguientes resultados experimentales:

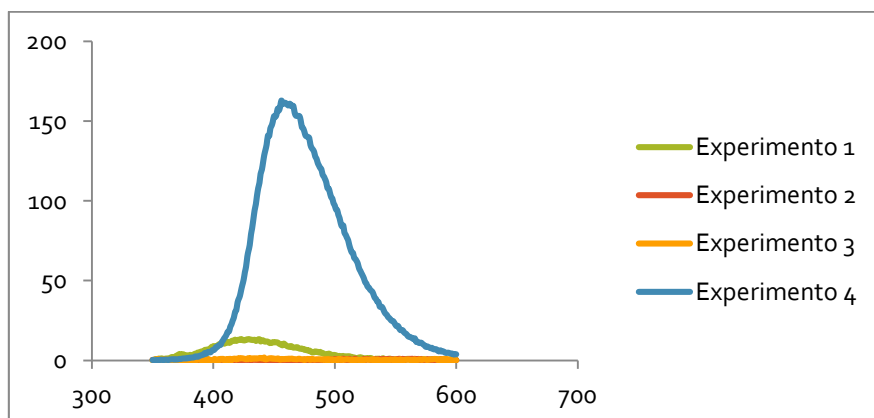


Figura 12: Espectro de fluorescencia para la formación de nanoclusters en presencia de Cu(II).

Mediante espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) se analizaron dos muestras correspondientes a la reacción por fluorescencia y por absorción con el fin de obtener la información relativa al estado químico del cobre presente en la superficie de los nanoclusters y nanopartículas respectivamente.

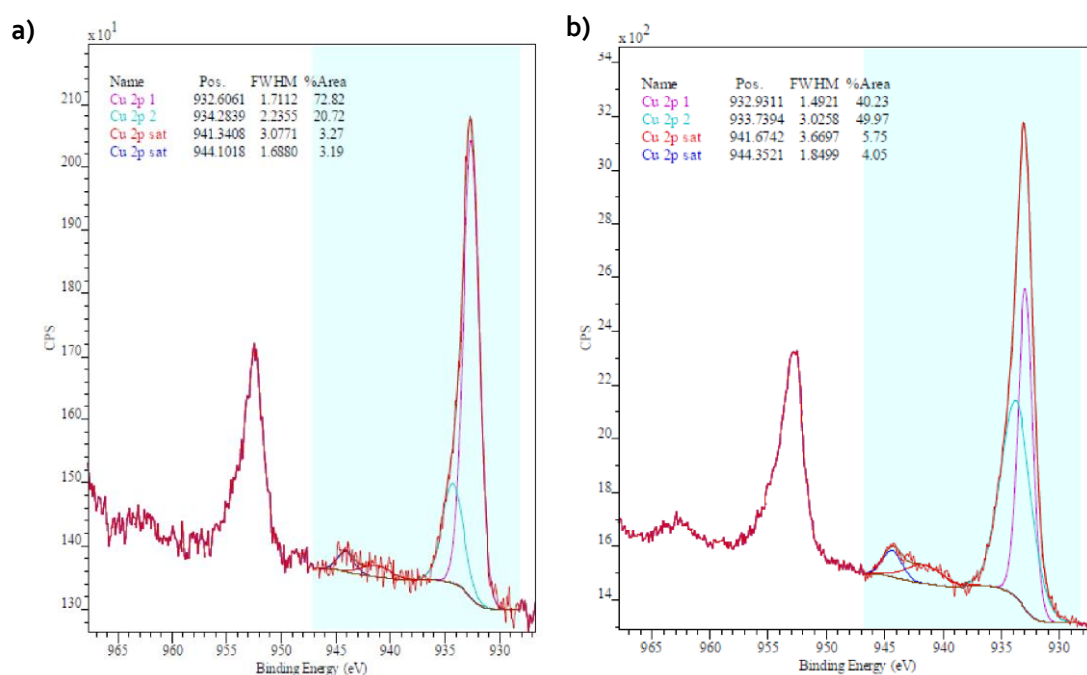


Figura 13: a) XPS correspondiente al estudio de la reacción mediante fluorescencia, b) XPS correspondiente al estudio de la reacción mediante absorción.

Las bandas de las energías de 941 y 944 eV corresponden, respectivamente a Cu(0)/Cu(I), lo que demuestra la formación de los nanomateriales.

3.3 Optimización de la reacción por formación de nanopartículas

Una vez comprobada la formación de nanopartículas de Cu(II), se llevó a cabo la optimización de distintos parámetros y condiciones de reacción.

3.3.1 Optimización de la concentración de cobre

Para determinar la concentración óptima de cobre, se trabaja con siete concentraciones diferentes realizando los barridos espectrales de absorbancia a 390 nm durante 50 minutos obteniendo la siguiente representación:

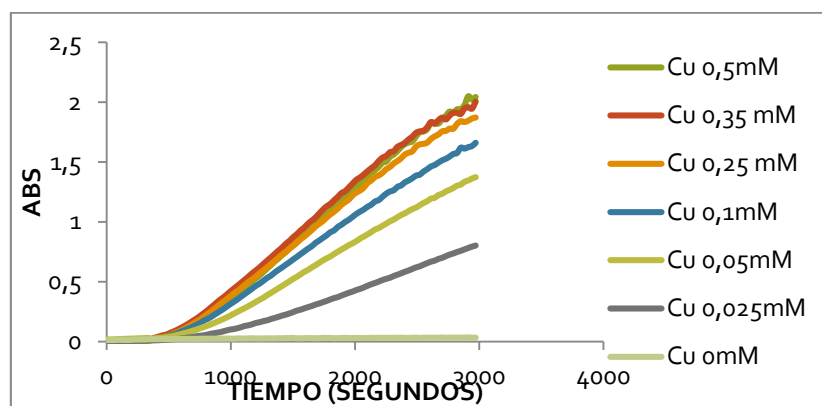


Figura 14: Registro cinético a $\lambda=390$ nm perteneciente al estudio de la concentración óptima de Cu(II) para la reacción enzimática. Condiciones experimentales: [TAO]= 50 U/mL, [Tiramina]= $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, tiempo de adición 5 minutos, temperatura 40°C y pH= 6 con disolución amortiguadora MES 0,1 M.

Como se puede observar para todas las concentraciones estudiadas, se sigue una cinética similar y es a partir de 0,25 mM, cuando la señal de absorbancia no aumenta e incluso se considera señal saturada, por lo que se escoge 0,25mM como la concentración óptima de Cu(II).

3.3.2 Optimización del volumen de enzima TAO

Para la optimización de la concentración de TAO y una vez optimizada la concentración de Cu(II) concentraciones distintas recogiendo los barridos espectrales para cada una de ellas durante 50 minutos.

A priori, se espera teóricamente que conforme aumente el volumen de TAO y por consiguiente, la concentración de TAO en la cubeta, la reacción ocurra a mayor velocidad alcanzando valores máximos de absorbancia. Esta hipótesis no concuerda con lo obtenido experimentalmente como se observa en la siguiente gráfica:

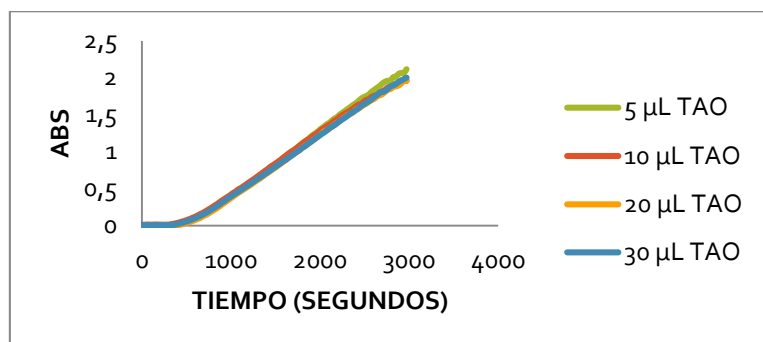


Figura 15: Registro cinético a $\lambda=390$ nm de la concentración de TAO. Condiciones experimentales: [Tiramina]= $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, [Cu(II)]= 0,25 mM, tiempo de adición 5 minutos, temperatura 40°C y pH=6 en disolución amortiguadora MES 0,1 M.

A partir de la gráfica, observamos que no hay relación entre un aumento de señal con el aumento de la concentración de enzima TAO por lo que se realiza un estudio sobre el efecto que la TAO tiene sobre la reacción a un tiempo dado (2971,9 segundos) con concentraciones menores de TAO: 0,025, 0,05, 0,075, 0,125, 0,175, 0,25, 0,5 y 0,75 U/mL obteniendo los siguientes resultados experimentales:

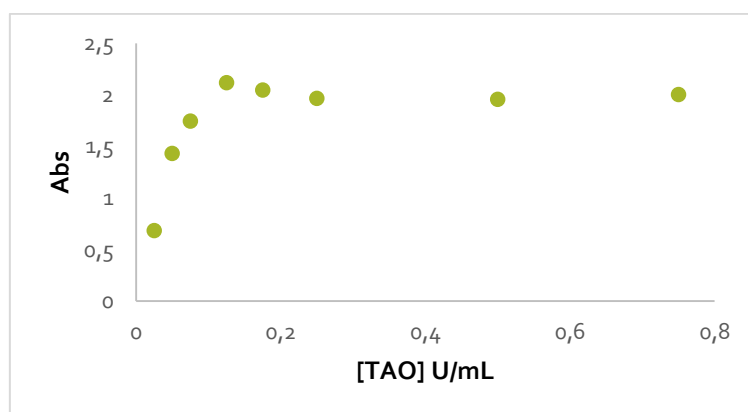


Figura 16: Efecto de la TAO en la reacción a $t=2971,9$ segundos y $\lambda=390$ nm. Condiciones experimentales: [Tiramina]= $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, [Cu(II)]= 0,25 mM, tiempo de adición 5 minutos, temperatura 40°C y pH=6 en disolución amortiguadora MES 0,1 M.

Como se observa, a partir de 0,25 U/mL la señal permanece inalterada, presentando la TAO efecto en concentraciones inferiores por lo que se escoge 0,25 U/mL como concentración óptima de TAO que corresponde a 5 μ L.

3.3.3. Elección de disolución amortiguadora

Dado que el pH óptimo de la enzima es 6, se estudiaron distintas disoluciones amortiguadoras para comprobar cómo el medio afectaba a la formación de nanomateriales para lo cual se eligen como posibles disoluciones amortiguadoras:

- Disolución de TRIS (tris-(hidroximetil)aminometano) cuyo $pK=8,1$ realizándose la medida a pH=7.
- Disolución de fosfatos con $pK_1=2,2$; $pK_2=7,2$ y $pK_3= 12,4$. La medida se realiza a pH = 6 ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$).
- Disolución de carbonatos con $pK_1=6,3$ y $pK_2=10,4$; realizándose la medida a pH=6.
- Disolución MES con $pK= 6,15$ y realizando la medida a pH= 6.

Para todas las disoluciones amortiguadoras se utiliza una concentración 0,1M y se realiza el barrido espectral de absorbancia durante 50 minutos para cada una de ellas obteniendo la siguiente representación:

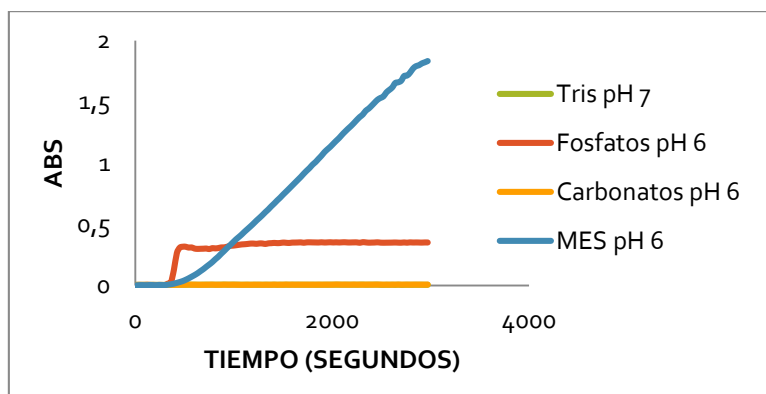


Figura 17: Registro cinético a $\lambda=390$ nm para distintas disoluciones amortiguadoras. Condiciones experimentales: [Tiramina]= $2,5 \cdot 10^{-4}$, [TAO]=0,25 U/mL, [Cu(II)]= 0,25 mM, tiempo de adición 5 minutos, temperatura 40°C y [dis. Amortiguadora]= 0,1 M.

Como se observa, para la disolución de carbonatos a pH=6 la reacción no tiene lugar y no se observa en la cubeta turbidez ni precipitado por lo que se considera que los carbonatos inhiben la formación de las nanopartículas. Para la disolución de TRIS a pH=7 no hay un aumento de señal pero sin embargo si se observa turbidez. Finalmente, con la disolución de fosfatos a pH=6 observamos un aumento de la señal en los primeros instantes de la reacción sin observar ningún cambio perceptible en el medio de reacción por lo que se considera que se produce un aumento de la línea base.

Tras la interpretación de los resultados, se escoge finalmente como disolución amortiguadora MES, pues es con la única con la que conseguimos una buena señal.

3.3.4 Optimización de la concentración de la disolución amortiguadora MES

Se usa como disolución amortiguadora MES, que tiene un $pK=6,15$ y teniendo en cuenta que amortigua en un rango aproximadamente de $pK \pm 1$, realizamos las medidas a pH=6.

Para la optimización de la concentración de la disolución amortiguadora, se eligen cuatro concentraciones distintas y se realiza para cada una de ellas el barrido espectral de absorbancia durante 50 minutos, obteniendo la siguiente representación:

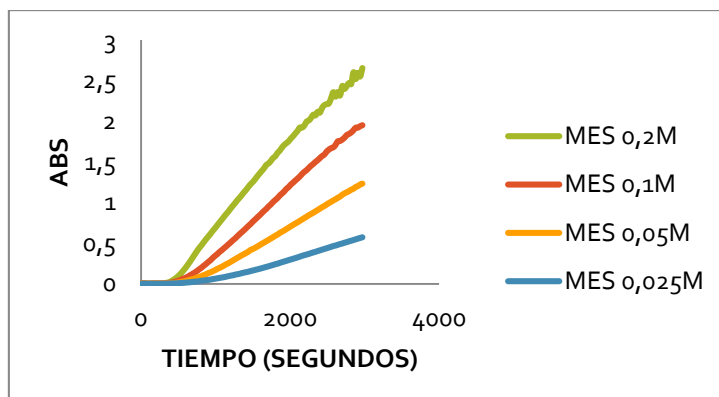


Figura 18: Registro cinético a $\lambda=390$ nm para distintas concentraciones de MES. Condiciones experimentales: [Tiramina] = $2,5 \cdot 10^{-4}$, [TAO] = 0,25 U/mL, [Cu(II)] = 0,25 mM, tiempo de adición 5 minutos, temperatura 40°C y pH=6.

Según los resultados obtenidos experimentalmente, se observa que la señal de absorbancia tiene una gran dependencia de la concentración de la disolución amortiguadora. La señal obtenida con una concentración de 0,2 M de MES aparece saturada por lo que se elige como concentración óptima de disolución amortiguadora 0,1 M, que es la que proporciona mejor señal.

3.3.5. Optimización del pH

Se preparan distintas disoluciones amortiguadoras de MES con valores de pH entre 5-7, ya que es el intervalo de pHs amortiguados por esta disolución.

Una vez obtenida la concentración óptima de disolución amortiguadora, realizamos los barridos espectrales de absorbancia para cada disolución preparada durante 50 minutos, obteniendo los siguientes resultados:

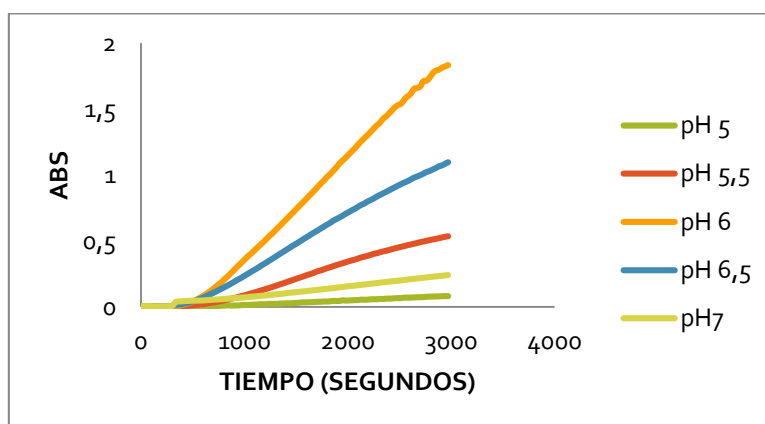


Figura 19: Registro cinético a $\lambda=390$ nm para el estudio del pH óptimo. Condiciones experimentales: [Tiramina] = $2,5 \cdot 10^{-4}$, [TAO] = 0,25 U/mL, [Cu(II)] = 0,25 mM, tiempo de adición 5 minutos, temperatura 40°C y [MES] = 0,1 M.

Como se observa experimentalmente, la disolución correspondiente a pH=7 presenta turbidez y una señal de absorbancia prácticamente constante y con un valor muy pequeño durante el tiempo de reacción. Con una tira reactiva indicadora de H_2O_2 , se comprueba la presencia de peróxidos en la cubeta de reacción ($Cu(OH)_2$) lo que justifica la turbidez y que no proporcione una señal significativa.

La mejor señal la proporciona la disolución amortiguadora de pH=6, por lo que elegimos éste como el pH óptimo.

3.3.6. Optimización de la temperatura

Una vez obtenidas las condiciones de reacción óptimas, se procede a la optimización de la temperatura para lo cual se realizan diferentes barridos espectrales de absorbancia durante una hora y con temperaturas comprendidas entre 20-60°C obteniéndose los siguientes resultados:

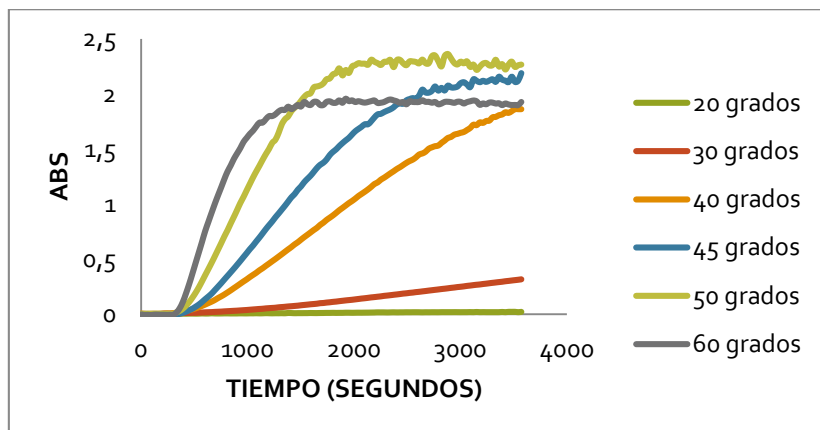


Figura 20: Registro cinético a $\lambda=390$ nm para distintas temperaturas. Condiciones experimentales: [Tiramina]= $2,5 \cdot 10^{-4}$, [TAO]= 0,25 U/mL, [Cu(II)]= 0,25 mM, tiempo de adición 5 minutos, pH=6 en disolución amortiguadora MES 0,1 M.

A temperaturas bajas la reacción es lenta y no se llega a ver un aumento de la señal de absorbancia. A 60°C se observa que la representación no alcanza el máximo de absorbancia posible y produciéndose una saturación de la señal posiblemente por la desnaturalización de la enzima. Se elige como temperatura óptima 50°C que es aquella que nos proporciona mejor relación señal/tiempo de reacción.

3.3.7. Optimización del tiempo de adición de Cu(II)

Hasta ahora, todas las medidas se realizan con un tiempo de adición de cinco minutos ya que en estudios anteriores con Au(III) se comprobó que los mejores resultados se obtenían con este tiempo de adición. Para realizar el estudio del tiempo de adición, se realizan diferentes medidas con un tiempo de adición comprendido entre 0-7 minutos, obteniéndose los siguientes resultados:

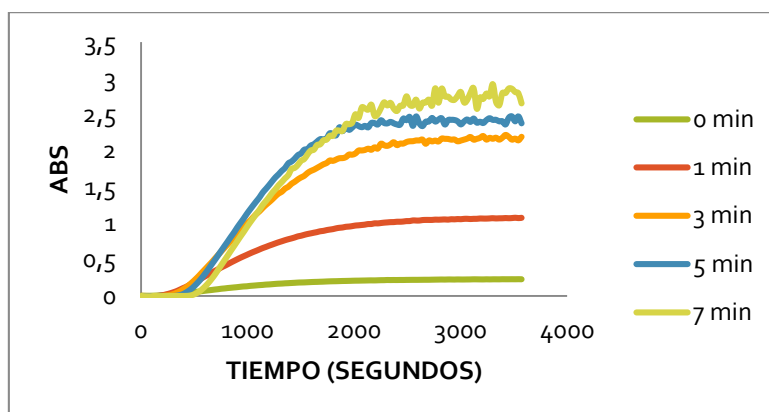


Figura 21: Registro cinético a $\lambda=390$ nm para el estudio del tiempo de adición. Condiciones experimentales: [Tiramina]= $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, [TAO]= 0,25 U/mL, [Cu(II)]= 0,25 mM, temperatura 50°C y pH= 6 en disolución amortiguadora MES 0,1 M.

Para tiempos de adición bajos, la reacción es lenta obteniendo finalmente poca señal evidenciándose que la reacción no llega a su fin. Con 7 minutos, la señal aparece saturada

completamente. Este comportamiento se ajusta al mecanismo propuesto de formación de los nanomateriales según el cual, son las propiedades reductoras del producto de la reacción y de la enzima reducida los responsables, primero de la reducción del Cu(II) a Cu(0) y segundo, la estabilización como nanomateriales debidas al efecto “capping” de la enzima siguiendo el siguiente esquema sintético:

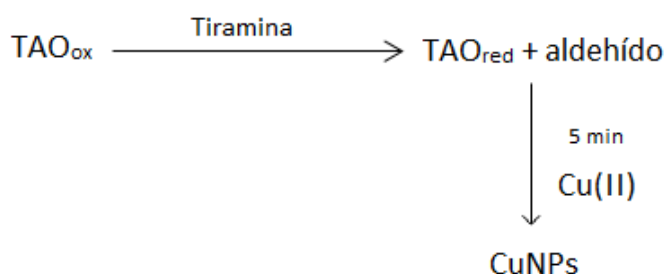


Figura 22: Representación esquemática del mecanismo de reacción de formación de CuNPs.

Finalmente, se escoge como tiempo de adición óptimo 5 minutos, el cual nos proporciona mejor relación señal/tiempo de reacción.

3.3.8. Características analíticas.

3.3.8.1. Calibración

Una vez optimizados todos los parámetros y condiciones para la reacción, se procede al estudio de calibración para diferentes concentraciones de tiramina realizando una representación de la señal (Abs) en función del tiempo, observándose que a medida que aumenta la concentración de tiramina en disolución, la velocidad de reacción es mayor y obtenemos señales más altas.

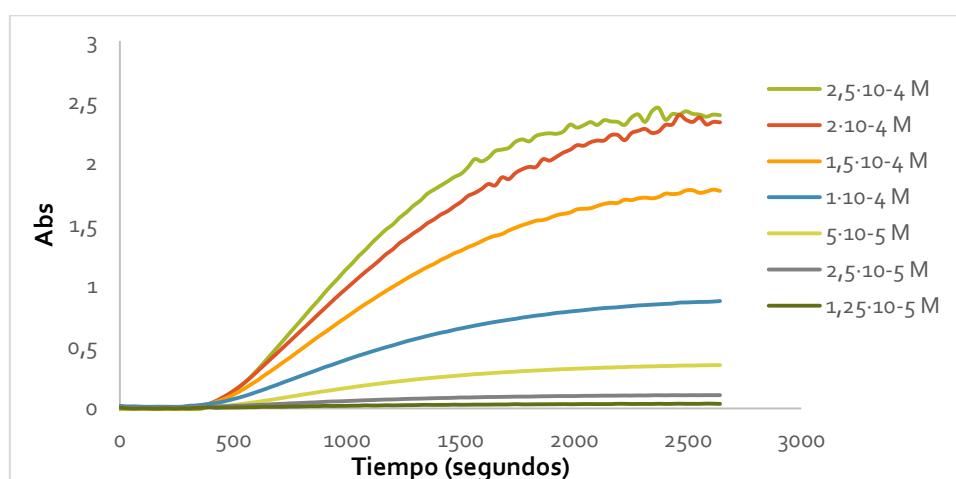


Figura 23: Estudio de calibración para distintas concentraciones de tiramina. Condiciones experimentales: [TAO]= 0,25 U/mL, [Cu(II)]= 0,25 mM, temperatura 50°C y pH= 6 en disolución amortiguadora MES 0,1 M y tiempo de adición 5 minutos.

Se tomó un tiempo en el cual se consideran las medidas estabilizadas y se realizó la representación de la señal para cada una de las concentraciones al tiempo dado (en este caso 2551,9 segundos) obteniéndose la siguiente calibración.

Los resultados obtenidos tras las reacciones fueron los siguientes:

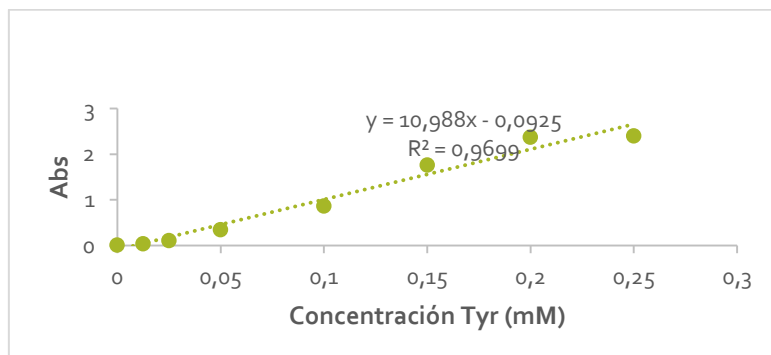


Figura 24: Recta de calibrado para la determinación enzimática de tiramina basada en la formación de nanopartículas de Cu en las condiciones óptimas (Figura 23).

La calibración se ajusta a una recta de ecuación:

$$y = 10,988[\text{tiramina}] - 0,0925$$

$$R^2 = 0,9699$$

Interpretando los resultados obtenidos, vemos como gráficamente, la distribución de los puntos se podría ajustar a una función sigmoideal por lo que se realiza un nuevo ajuste obteniendo la siguiente representación, lo que concuerda con el mecanismo de formación de nanomateriales propuesto.

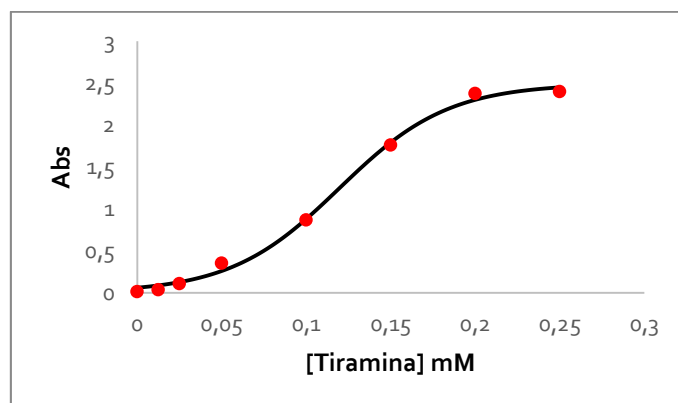


Figura 25: Función logística correspondiente a la determinación enzimática de tiramina basada en la formación de nanopartículas de Cu en las condiciones óptimas (Figura 23).

En este caso, la ecuación correspondiente a esa función sigmoideal es de la forma:

$$y = \frac{a}{1 + be^{-kx}}$$

Mediante los cálculos adecuados, obtenemos el valor de los siguientes parámetros analíticos:

LOD (mM)	DER	LOQ (mM)
0,004	6,74%	0,014

3.3.8.2. Interferencias

Se realizaron varios estudios para determinar si otras aminas biógenas como la histamina, la putrescina y la cadaverina producen interferencias en la reacción de formación de nanopartículas de cobre obteniendo los siguientes resultados:

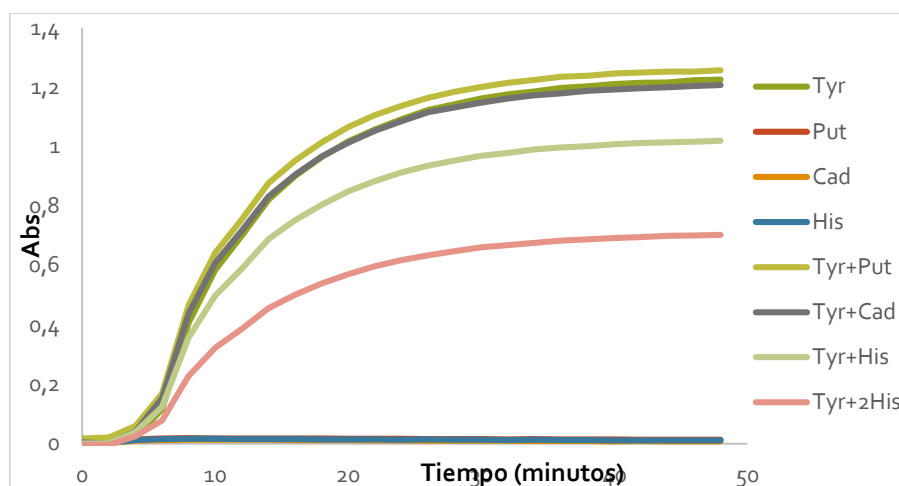


Figura 26: Registro cinético a $\lambda=390$ nm correspondiente al efecto interferente de distintas aminas biógenas. Condiciones experimentales: $[AB]=1 \cdot 10^{-4}$ M, $[TAO]=0,25$ U/mL, $[Cu(II)]=0,25$ mM, temperatura 50°C y $\text{pH}=6$ en MES $0,1\text{M}$.

Como se observa en la representación, por si solas, las tres aminas biógenas estudiadas no dan lugar a la formación de nanomateriales. Este hecho refuerza el mecanismo propuesto según el cual tanto el producto de la reacción como la enzima reducida son las responsables de la estabilización de los nanomateriales.

Una mezcla equimolar de tiramina con cadaverina y de tiramina con putrescina proporciona una señal similar a la de la tiramina por lo que en presencia de ésta, ambas aminas no son interferentes. Sin embargo, una mezcla equimolar de histamina y tiramina provoca una disminución de la señal de Abs y conforme aumentamos la concentración de histamina, el valor de la señal de absorbancia es menor, lo que indica una interferencia negativa. Esta respuesta cabría explicarse por las propiedades de la histamina para reducir el Cu(II) , impidiendo en parte la formación de los nanomateriales de Cu(II) . Esta interferencia podría evitarse trabajando con concentraciones de Cu(II) y que serán objeto de estudio en trabajos posteriores.

3.4. Estudio de la reacción por formación de nanoclusters

Tal como se vio en la caracterización microscópica electrónica (TEM), los nanomateriales formados tienen un tamaño muy pequeño por lo que se comprobó la formación de nanoclusters mediante medidas de fluorescencia. Considerando la temperatura, pH y la disolución amortiguadora optimizada para ambos métodos, ya que afectan fundamentalmente

a la reacción enzimática, se procede al estudio de la concentración de cobre y la cantidad de tiramina oxidasa para fluorescencia.

Todos los estudios de optimización de la señal de fluorescencia se realizaron una vez estabilizada la reacción de formación de los nanoclusters.

3.4.1. Optimización de la concentración de cobre

Se trabaja en las condiciones indicadas anteriormente y con seis concentraciones distintas de cobre realizando el espectro de fluorescencia y obteniendo la siguiente representación:

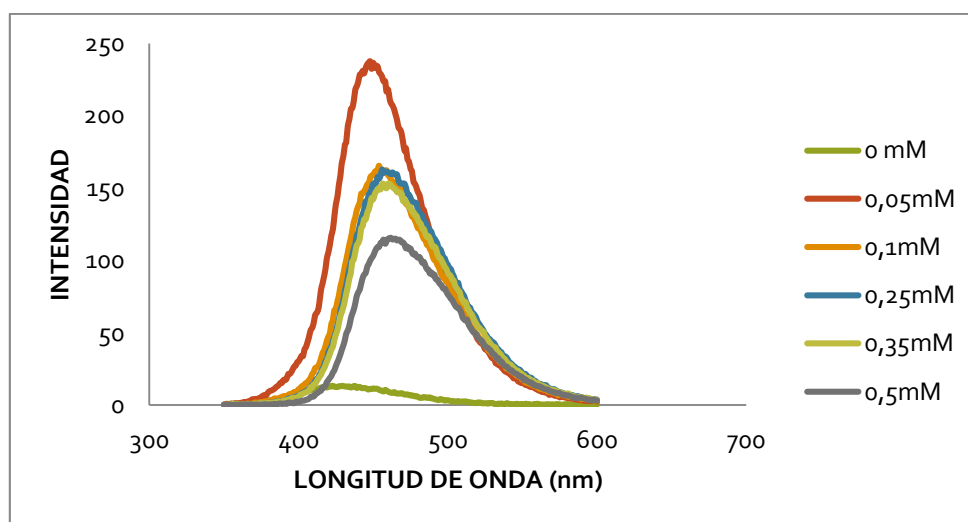


Figura 27: Espectro de fluorescencia para el estudio de la concentración de Cu(II). Condiciones experimentales : [TAO]= 1,5 U/mL, tiempo de adición 5 minutos, temperatura ambiente y pH=6 en disolución amortiguadora MES 0,1 M.

Como se observa, cuando en la disolución no hay cobre, el espectro de fluorescencia no registra intensidad lo que indica que al no formarse los nanoclusters de cobre, la reacción no funciona.

La medida de todas las disoluciones proporciona señales que siguen la misma tendencia, presentando un máximo en alrededor de 460 nm y de excitación a 330nm. En este caso, la señal más alta y por lo tanto la concentración que consideramos óptima es la de 0,05mM de Cu(II)

3.4.2. Optimización de la concentración de Tiramina Oxidasa (TAO)

Se realiza de la misma forma el espectro de fluorescencia para disoluciones con distinta concentración de TAO. Se espera que a mayor concentración obtengamos mayor señal.

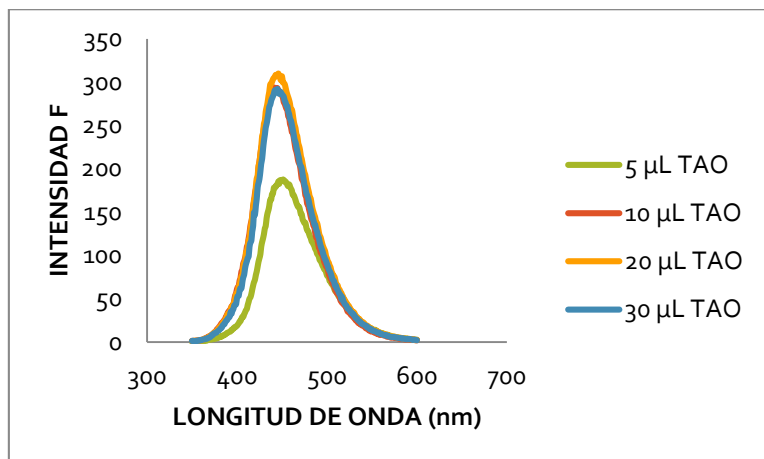


Figura 28: Espectro de fluorescencia a $\lambda_{exc}=330$ nm y $\lambda_{em}=460$ nm, para el estudio de la concentración de TAO. Condiciones experimentales: [Tiramina] = $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, [Cu(II)] = 0,25 mM, tiempo de adición 5 minutos, temperatura ambiente y pH=6 en disolución amortiguadora MES 0,1 M.

Se observa cómo, al contrario de la optimización del volumen de TAO en absorción, conforme aumentamos el volumen de TAO en la disolución objeto de estudio, aumenta la señal obtenida en el espectro de fluorescencia, encontrando una pequeña mejora de la señal en la disolución que contiene 30 µL de TAO, volumen el cuál consideraremos óptimo para fluorescencia.

3.4.3. Características analíticas.

3.4.3.1. Calibración

Se realiza un estudio de calibración para diferentes concentraciones de tiramina, realizando una representación de la señal de fluorescencia (intensidad) en función del tiempo.

Una vez optimizados todos los parámetros y condiciones para la reacción, se procede al estudio de calibración para diferentes concentraciones de tiramina realizando una representación de la señal (Abs) en función del tiempo, observándose que a medida que aumenta la concentración de tiramina en disolución, la velocidad de reacción es mayor y obtenemos señales más altas.

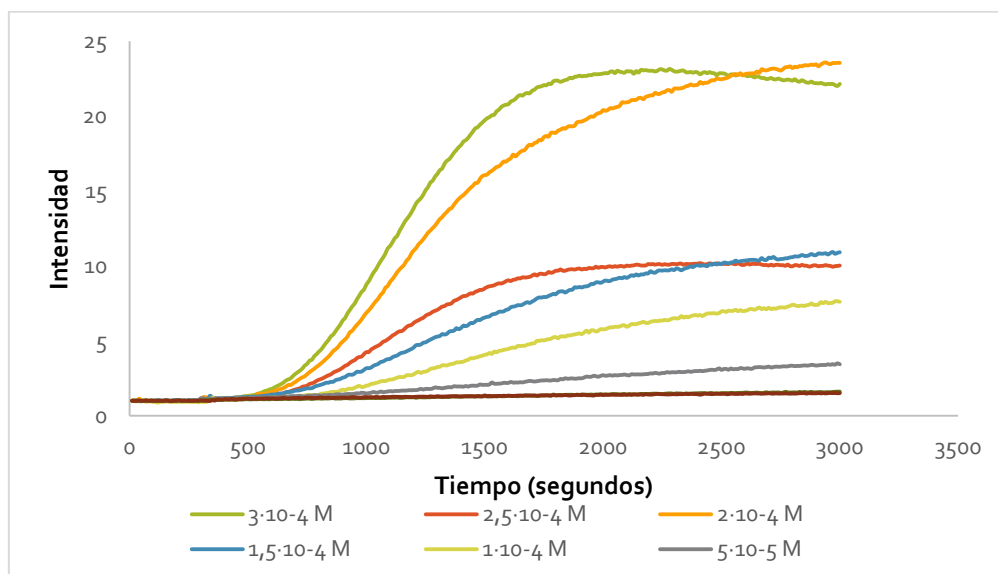


Figura 29: Estudio de calibración para distintas concentraciones de tiramina. Condiciones experimentales: [Tiramina]= $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, [Cu(II)]= 0,25 mM, [TAO]=1,5 U/mL tiempo de adición 5 minutos, temperatura ambiente y pH=6 en disolución amortiguadora MES 0,1 M.

Tal como se indica en el apartado 3.3.8.1 y considerando el mecanismo de formación de nanoclusters de cobre mediante el siguiente esquema sintético:

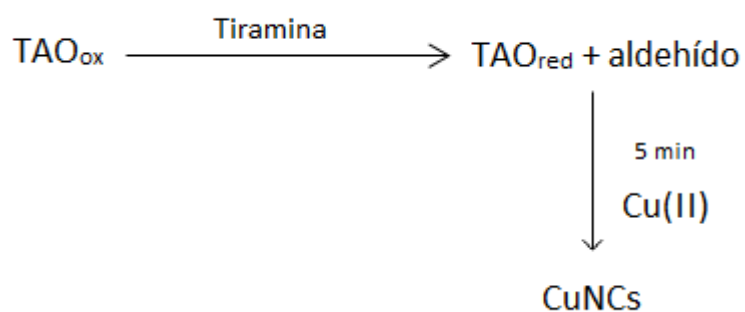


Figura 30: Representación esquemática del mecanismo de reacción de formación de CuNPs.

Se propone un nuevo ajuste sigmoidal obteniendo la siguiente representación:

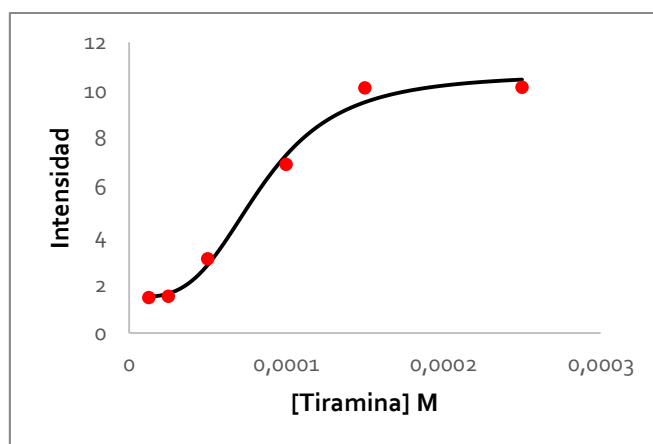


Figura 31: Función logística correspondiente a la determinación enzimática de tiramina basada en la formación de nanoclusters de Cu en las condiciones óptimas (Figura 29).

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x / x_0)^p} + A_2$$

LOD (mM)	DER	LOQ (mM)
0,011	6,57%	0,036

3.4.3.2 Interferencias

Se realizaron varios experimentos para estudiar el carácter interferente de otras aminas biógenas tales como histamina, cadaverina y putrescina en la reacción de formación de nanoclusters de cobre obteniendo la siguiente representación:

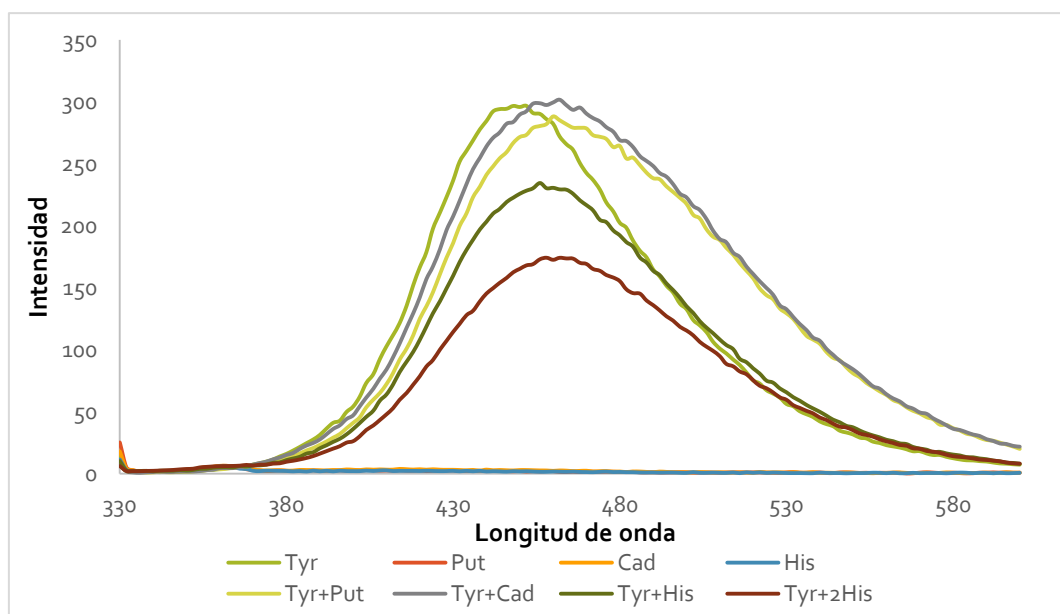


Figura 32: Espectro de fluorescencia para el estudio del efecto interferente de otras aminas biógenas. Condiciones experimentales: $[AB]=1 \cdot 10^{-4}$ M, $[TAO]=0,125$ U/mL, $[Cu(II)]=0,25$ mM, temperatura 50°C y $\text{pH}=6$ en MES $0,1\text{M}$.

Los resultados son consistentes con los obtenidos en el estudio de las interferencias en la reacción de formación de nanopartículas de cobre (apartado 3.3.8.2) obteniendo la misma tendencia para las distintas aminas estudiadas. Para la histamina, putrescina y cadaverina, por si solas no se observa la formación de nanoclusters de cobre, mientras que para mezclas equimolares de estas con tiramina, se obtienen señales equiparables a las obtenidas con tiramina con mayor anchura del pico.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos y disoluciones

- Disolución $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de $\text{pH}=7$ de concentración $0,1$ M preparada disolviendo aproximadamente $0,70$ g de Na_2HPO_4 en 50 mL de agua milli-Q.
- Disolución de tiramina (tyraminehidroclorhide) 50 mM, preparada disolviendo $0,0089$ g en agua milli-Q.
- Disolución TAO 50 U/mL.
- Disolución Au(III) 50 mM, preparada a partir de HAuCl_4 sólido y disuelto en agua milli-Q.
- Disolución Cu(II) 25 mM, en agua milli-Q.
- Disolución amortiguadora MES $\text{pH}=6$ de concentración $0,1$ M preparada disolviendo aproximadamente $0,98$ g en 50 mL de agua milli-Q.

- Para preparar cada una de las disoluciones para la calibración, se pesa una masa exacta de tiramina y se disuelve en un volumen determinado de agua milli-Q. A partir de esta disolución, se hacen las diluciones necesarias para obtener las concentraciones deseadas.

4.2. Instrumentación y material

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Agilent 8453 (Haz simple), con lámparas de wolframio y deuterio, red de fotodiodos y un rango de medida comprendido entre 190 y 1100nm.
- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Specord 210 Plus (Analytik Jena), con lámparas de wolframio y deuterio y un rango de medida comprendido entre 185 y 1200nm.
- Espectrofotómetro Fluorescencia Photon Technology International (PTI) modelo TimeMasterTM TM-2/2003
- pH-metro CRISON, Basic 20
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión ± 0.01 mg.
- Centrifuga eppendorf 5427 R (con control de temperatura)
- Baño de ultrasonidos P Selecta, Precistern.
- CentrifugalfiltersAmiconUltra- 4 mL (UltraCell – 10K Membrane), Millipore (UFC801024).
- CentrifugalfiltersAmiconUltra - 0.5 mL (UltraCell – 10K Membrane), Millipore (UFC801024).
- Material desechable: cubetas plástico, puntas micropipetas, Eppendorf, tubo Falcon.
- Cubetas de vidrio y cuarzo, con 1 cm de paso óptico.
- Agitador magnético A-01, SB5.
- Tiras reactivas para la determinación semicuantitativa de peróxido de hidrogeno. (Quantofix 91319).
- Filtro óptico Kodak amarillo que corta por debajo de 390 nm.

4.3 Procedimiento experimental

4.3.1. Procedimiento de medida de absorción molecular

Se llevaron a cabo las medidas de absorbancia en un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis. Se utilizaron indistintamente cubetas de plástico, vidrio o cuarzo, de 1 cm de paso óptico y con un volumen total de 4mL.

Antes de realizar cada medida, se efectúa un blanco con la disolución amortiguadora correspondiente a cada experimento, siendo generalmente MES a pH=6.

Para cada medida se añade en la cubeta, sobre la disolución amortiguadora los reactivos necesarios siguiendo el siguiente orden: enzima TAO 50U/mL, generalmente 5 μ L; la amina

biógena modelo, es decir, el analito, siendo éste la tiramina en la concentración que corresponda a cada experimento, comprendida entre $1,25 \cdot 10^{-4}$ y $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, siendo el volumen añadido 20 μ L. Tras la adición de la amina, se esperaron 5 minutos con el fin de que la reacción evolucionase, se produjera la oxidación de la amina y se consumiera el O₂ presente en disolución. Una vez transcurrido el tiempo, se añade la concentración de cobre correspondiente para cada experimento siendo generalmente 25 mM, siendo el volumen añadido 20 μ L y se comienza a medir la señal de absorbancia a 390 nm.

Transcurrido un tiempo de entre 1 y 7 minutos (dependiendo de la concentración de tiramina en disolución) desde la adición del cobre, comenzó a aumentar la señal lo que indica la aparición de los nanomateriales (NPs en absorción y NCs en fluorescencia).

Por último, se dejó avanzar la reacción enzimática durante aproximadamente una hora, hasta que esta se hubo estabilizado.

4.3.2. Procedimiento para la medida de fluorescencia

Se llevaron a cabo medidas de fluorescencia en un fluorímetro. Se utilizaron cubetas de fluorescencia de 1 cm de paso óptico y volumen total 4mL.

Antes de realizar cada medida, se efectúa un blanco con la disolución amortiguadora correspondiente a cada experimento, siendo generalmente MES a pH=6.

Para cada medida, se añade en la cubeta y siguiendo siempre el mismo orden: enzima TAO 50U/mL añadiendo un volumen de 30 μ L; a continuación, se añade la tiramina, siendo el volumen generalmente 20 μ L y en concentración comprendida entre $1,25 \cdot 10^{-4}$ y $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. Tras la adición del analito, se esperan cinco minutos y se añaden 20 μ L de Cu(II) y se mide la intensidad durante 50 minutos.

5. Conclusiones

Se ha comprobado que la tiramina se puede determinar en disolución en presencia de la enzima TAO por la formación de CuNMs.

1. Se ha demostrado las propiedades reductoras de las enzimas que son capaces de generar nanomateriales de cobre, obteniendo una señal proporcional a la concentración de analito lo que permite desarrollar el método analítico con el que se ha trabajado.
2. Tras los resultados obtenidos mediante la caracterización por TEM y XPS se demuestra no solo la formación de nanopartículas sino de nanoclusters permitiendo estudiar la reacción por fluorescencia.
3. Mediante los estudios de las condiciones de reacción, se ha conseguido optimizar el método de determinación de la tiramina, obteniendo una relación sigmoideal consistente con el mecanismo propuesto de formación de nanomateriales.
4. Las tres aminas biógenas estudiadas como posibles interferencias (cadaverina, putrescina e histamina) no dan lugar a la formación de nanomateriales por sí solas, y en concentraciones equimolares de putrescina o cadaverina no se ve afectada la formación de los correspondientes nanomateriales. Sólo en el caso de la histamina se ha observado una disminución en la formación del nanomaterial, que podría

estar relacionado con las propiedades reductoras de la histamina y que serán objeto de estudio en trabajos posteriores.

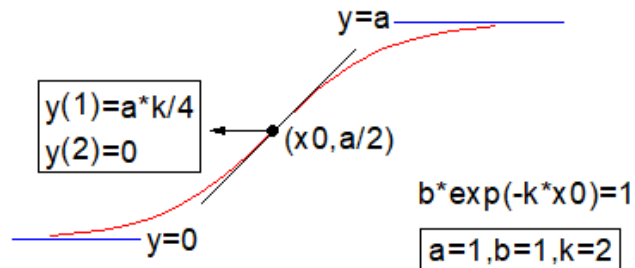
6. Bibliografía

- (1) López-Lorente, Á. I.; Valcárcel, M. The Third Way in Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Involvement of Nanotools and Nanoanalytes in the Same Analytical Process. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, *75*, 1–9.
- (2) Cao, G.; Wang, Y. Nanostructures and Nanomaterials; WORLD SCIENTIFIC, 2011; Vol. Volume 2.
- (3)Yaqoob, S. B.; Adnan, R.; Rameez Khan, R. M.; Rashid, M. Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A. June 3, 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00376>.
- (4) J. Camacho-Aguayo, S. de M. J. G. Selective Generation of Gold Nanostructures Mediated by Flavo-Enzymes to Develop Optical Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* (In revision) 2022.
- (5) Ortega, E., de Marcos, S., &Galbán, J. (2013). Fluorometric enzymatic autoindicating biosensor for H₂O₂ determination based on modified catalase. *Biosensors and Bioelectronics*, *41*, 150-156;
- (6) Sanz, J., de Marcos, S., &Galbán, J. (2012). Autoindicating optical properties of laccase as the base of an optical biosensor film for phenol determination. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *404*(2), 351-359)
- (7) Doeun, D.; Davaatseren, M.; Chung, M. S. Biogenic Amines in Foods. *Food Science and Biotechnology*. The Korean Society of Food Science and Technology December 1, 2017, pp 1463–1474.
- (8) Navarro, J.; de Marcos, S.; Galbán, J. Colorimetric-Enzymatic Determination of Tyramine by Generation of Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* 2020, 187 (3).

Anexos.

Anexo 1. Relación sigmoideal para absorción

Anexo I: Absorción, relación sigmoideal.



Parameters

		Value	Standard Error
C	a	2,49189	0,06906
	b	40,19686	10,85082
	k	30,89552	2,57135

Iterations Performed = 5

Total Iterations in Session = 5

Fit converged - tolerance criterion satisfied.

Statistics

	C
Number of Points	8
Degrees of Freedom	5
Reduced Chi-Sqr	0,00455
Residual Sum of Squares	0,02275
Adj. R-Square	0,99579
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :

100 : Fit converged

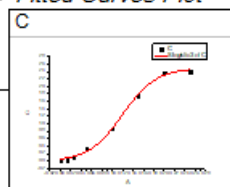
Summary

	a		b		k		Statistics	
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
C	2,49189	0,06906	40,19686	10,85082	30,89552	2,57135	0,00455	0,99579

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
C	Regression	3	15,36852	5,12284	1126,13869	2,30921E-7
	Residual	5	0,02275	0,00455		
	Uncorrected Total	8	15,39126			
	Corrected Total	7	7,56422			

Fitted Curves Plot



Anexo 2: Relación sigmoidal para fluorescencia

Anexo 2: Fluorescencia. Relación sigmoidal.Logistic

