

Jesús María Navarro Domínguez

Nanosensores ópticos enzimáticos  
basados en la generación de  
nanomateriales para la  
determinación de aminas  
biógenas: una alternativa a los  
sistemas colorimétricos clásicos  
de respuesta rápida.

Director/es

Galbán Bernal, Javier  
De Marcos Ruiz, Susana

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**NANOSENSORES ÓPTICOS ENZIMÁTICOS  
BASADOS EN LA GENERACIÓN DE  
NANOMATERIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE  
AMINAS BIÓGENAS: UNA ALTERNATIVA A LOS  
SISTEMAS COLORIMÉTRICOS CLÁSICOS DE  
RESPUESTA RÁPIDA.**

Autor

**Jesús María Navarro Domínguez**

Director/es

Galbán Bernal, Javier  
De Marcos Ruiz, Susana

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Ciencia Analítica en Química

2022





Departamento de  
Química Analítica  
Universidad Zaragoza

## Tesis doctoral

# NANOSENSORES ÓPTICOS ENZIMÁTICOS BASADOS EN LA GENERACIÓN DE NANOMATERIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS: UNA ALTERNATIVA A LOS SISTEMAS COLORIMÉTRICOS CLÁSICOS DE RESPUESTA RÁPIDA.

Jesús Navarro Domínguez

Directores:

Javier Galbán Bernal

Susana de Marcos Ruiz

Departamento de Química Analítica

Universidad de Zaragoza

2021

Grupo de Biosensores Analíticos

Instituto de Nanociencia y Materiales de  
Aragón







D. Javier Galbán Bernal, Catedrático de Universidad, y Dña. Susana de Marcos Ruiz, Profesora Titular de Universidad, del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza,

**CERTIFICAN,**

que la presente Memoria:

**Nanosensores ópticos enzimáticos basados en la generación de nanomateriales para la determinación de aminas biógenas: una alternativa a los sistemas colorimétricos clásicos de respuesta rápida.**

ha sido realizada por **D. JESÚS NAVARRO DOMÍNGUEZ** bajo nuestra dirección para optar al Grado de Doctor en Química.

Y asimismo,

**AUTORIZAN**

la presentación de dicha Memoria para que sea defendida ante el Tribunal correspondiente.

Zaragoza, a 29 de octubre de 2021,

Fdo. Javier Galbán Bernal

Fdo. Susana de Marcos Ruiz





Este trabajo es parte de los proyectos de I+D+i **CTQ2016-76846-R y PID2019105408GB-I00** financiados por MICIN/AEI/10.13039/501100011033 y las ayudas del Gobierno de Aragón a los grupos de investigación **E-74 y E\_25\_17R**.

Jesús Navarro agradece al Gobierno de Aragón el haber podido disfrutar de un contrato de formación predoctoral para la realización de esta tesis.



<b>SECCIÓN I. Aspectos generales</b> .....	15
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Presentación de la tesis. Objetivos.....	18
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Estructura de la tesis.....	26
<b>CAPÍTULO 3</b>	
3.1. Importante de las aminas biógenas .....	31
3.1.1. Estructura química, funciones y problemática.....	31
3.1.2. Tiramina.....	34
3.1.3. Putrescina y cadaverina.....	36
3.2. Métodos analíticos para la determinación de aminas biógenas basados en técnicas de separación instrumentales .....	37
3.3. Métodos analíticos rápidos para la determinación de aminas biógenas. Biosensores.....	39
3.3.1. Necesidad de los biosensores.....	39
3.3.2. Sensores y biosensores para Aminas Biógenas. ....	40
3.3.3. Diamino oxidasa y Tiramina oxidasa como base de sensores ópticos ....	42
3.4. Bibliografía.....	46
<b>CAPÍTULO 4</b>	
4.1. Reactivos y materiales.....	54
4.1.1. Reactivos.....	54
4.1.2. Materiales.....	55
4.2. Instrumentación .....	56
4.2.1. Espectrofotómetros de Absorción Molecular UV-Vis.....	56
4.2.2. Luminómetros .....	58

4.2.3.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	59
4.2.4.	Microscopía de fuerza atómica (AFM) .....	59
4.2.5.	Voltametría cíclica .....	59
4.3.	Procedimientos .....	60
4.3.1.	De medida .....	60
4.3.1.1.	Absorción molecular .....	60
4.3.1.2.	Fluorescencia .....	60
4.3.1.3.	Medida del consumo del O <sub>2</sub> (método fluorimétrico) .....	61
4.3.1.4.	Medida visual del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con tiras reactivas .....	62
4.3.1.5.	Medida de la Put y Cad por el método del o-aminobenzaldehído: productos cíclicos de la reacción de la DAO .....	63
4.3.2.	Específicos de trabajo .....	64
4.3.2.1.	Obtención de los productos de la oxidación de Put, Cad e His por acción de la DAO .....	64
4.3.2.2.	Separación del ABTS <sub>ox2</sub> en columna de Sephadex .....	64
4.3.2.3.	Preparación soportes de celulosa .....	65
	A) Soportes sin estabilizante .....	65
4.3.2.4.	Eliminación del cobre en aminas oxidasas .....	66
4.3.2.5.	Formación de 2-(4-hidroxifenil)acetaldehído .....	66
4.3.3.	De tratamiento de muestra .....	67
4.3.3.1.	Muestras de atún .....	67
4.3.3.2.	Elección de muestras de queso .....	68
4.3.3.3.	Preparación muestras de queso .....	68
4.4.	Bibliografía .....	69

## **SECCIÓN II. Determinación de aminas biógenas por métodos basados en reactivos colorimétricos orgánicos.....70**

### **CAPÍTULO 5**

5.1.	Introducción .....	74
------	--------------------	----

5.2.	Utilización de las propiedades intrínsecas de la DAO .....	75
5.3.	Utilización de las propiedades intrínsecas de la HRP: sensor de putrescina. .	79
5.3.1.	Propiedades intrínsecas de la HRP .....	79
5.3.1.1.	Exceso de HRP respecto al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	81
5.3.1.2.	Exceso de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> respecto a la HRP .....	82
5.3.2.	Método en disolución.....	84
5.4.	Colorantes más frecuentes: ABTS y TMB .....	88
5.4.1.	ABTS.....	88
5.4.2.	TMB.....	90
5.5.	Bibliografía.....	92

## **CAPÍTULO 6**

6.1.	Características espectroscópicas de las especies de ABTS.....	96
6.2.	Posibilidades analíticas del ABTS <sub>ox</sub> .....	97
6.2.1.	Consideraciones para obtener una señal óptima del ABTS <sub>ox</sub> .....	97
6.2.1.1.	Inestabilidad del ABTS .....	97
6.2.1.2.	Formación e inestabilidad del producto azul: ABTS <sub>ox</sub> .....	98
6.2.2.	Estudio mecanístico.....	104
6.2.2.1.	Cálculo de k <sub>-1</sub> .....	104
6.2.2.2.	Cálculo de k <sub>2</sub> .....	105
6.2.3.	Determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	107
6.2.3.1.	Modo discontinuo .....	107
6.2.3.2.	Modo continuo .....	108
6.2.4.	Determinación de putrescina y cadaverina .....	111
6.2.5.	Estudio de interferencias.....	117
6.2.6.	Aplicación en muestra real .....	121
6.3.	Posibilidades analíticas de ABTS <sub>ox2</sub> .....	122
6.4.	Bibliografía.....	129

## **CAPÍTULO 7**

7.1.	Resultados experimentales previos.....	132
7.1.1.	Estudio en disolución del TMB .....	132
7.1.1.1.	Influencia de la relación TMB:H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	133
7.1.1.2.	Optimización de la cantidad de HRP .....	133
7.1.1.3.	Reacción de la DAO/ABs/HRP/TMB.....	134
7.1.1.4.	Calibración en disolución.....	136
7.1.1.5.	Estudio de interferencias: tiramina e histamina. ....	137
7.1.1.6.	Determinación de Put/Cad en una muestra de atún .....	139
7.1.2.	Estudio en soportes de celulosa .....	139
7.1.2.1.	Modelado matemático de la señal RGB .....	139
7.1.2.2.	Estudios previos en tiras comerciales de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	142
7.1.2.3.	Diseño de los soportes de celulosa .....	144
7.1.2.4.	Optimización de las condiciones experimentales .....	146
7.1.3.	Aplicación a muestra real .....	148
7.2.	Bibliografía.....	151

### **SECCIÓN III. Determinación de aminas biógenas por métodos basados en la generación de nanomateriales de oro.....152**

#### **CAPÍTULO 8**

8.1.	Tipos de nanopartículas de oro .....	156
8.2.	Nanoesferas de oro .....	157
8.2.1.	Estrategias en métodos colorimétricos .....	158
8.2.1.1.	Cambios en el índice de refracción.....	158
8.2.1.2.	Cambios en la banda de absorción del plasmón debido a la agregación de las AuNPs	158
8.2.1.3.	Formación in situ de AuNPs.....	159
8.2.1.4.	Cambios en la fluorescencia un fluoróforo .....	160
8.2.2.	Métodos basados en la Espectroscopía Raman Mejorada en la Superficie (SERS)	161

8.2.3.	Las nanopartículas de oro como catalizadores .....	162
8.3.	Nanoclusters de oro .....	162
8.3.1.	Estrategias de detección.....	163
8.3.1.1.	Filtro interno.....	163
8.3.1.2.	Desactivación de la fluorescencia (estática).....	164
8.3.1.3.	Desactivación de la fluorescencia (dinámica).....	164
8.3.1.4.	Transferencia de energía o electrones .....	165
8.3.1.5.	Otras posibilidades de fluorescencia de AuNCs .....	166
8.4.	Nanorods (AuNRs) .....	169
8.4.1.	Tipos de estrategias.....	169
8.4.1.1.	Estrategias basadas en el crecimiento de los AuNRs .....	169
8.4.1.2.	Estrategias basadas en el decrecimiento (Etching) .....	170
8.5.	Nanoestrellas de oro (AuNSs).....	170
8.5.1.	Estrategias de detección.....	171
8.5.1.1.	Medida del plamón superficial (LSPR) .....	171
8.5.1.2.	Medida del aumento de dispersión Raman (SERS) .....	171
8.6.	Bibliografía.....	172

## **CAPÍTULO 9**

9.1.	Estudios teóricos de generación de nanopartículas.....	185
9.1.1.	Revisión de los modelos matemáticos descritos.....	185
9.1.2.	Propuesta de un modelo modificado .....	195
9.1.2.1.	Planteamiento general .....	195
9.1.2.2.	Modelo cuando hay exceso de Au(III) .....	196
9.1.2.3.	Modelo cuando hay exceso de tiramina. ....	197
9.1.2.4.	Aplicación del modelo .....	198
9.2.	Desarrollo del método enzimático: 1. Origen químico de la señal .....	200
9.2.1.	Generación de la señal .....	200
9.2.2.	Especies involucradas en la formación de las AuNP.....	201

9.2.2.1.	Tiramina.....	201
9.2.2.2.	Peróxido de hidrógeno .....	204
9.2.2.3.	Tiramina oxidasa en su estado oxidado .....	205
9.2.2.4.	2-(4-hidroxifenil)acetaldehido.....	206
9.2.2.5.	Tiramina oxidasa en su estado reducido .....	210
9.2.2.6.	Conclusiones generales. ....	211
9.3.	Desarrollo del método enzimático: 2. Optimización de las condiciones experimentales.....	213
9.3.1.	Efecto del pH .....	214
9.3.2.	Concentración de Tiramina Oxidasa.....	217
9.3.3.	Concentración del Au(III).....	221
9.3.4.	Tiempo de inyección del Au(III) en la reacción entre TAO-tiramina .....	223
9.3.5.	Temperatura de la reacción.....	225
9.4.	Desarrollo del método enzimático: 3. Caracterización de las nanopartículas de oro. Cálculo del rendimiento de la reacción. ....	228
9.5.	Desarrollo del método enzimático: 4. Características analíticas e interferencias	231
9.5.1.	Efecto de la concentración de TAO en la calibración. ....	231
9.5.2.	Efecto de la temperatura.....	234
9.5.3.	Estudio de interferencias.....	236
9.5.3.1.	Reactividad de otras aminas biogenas .....	236
9.5.3.2.	Interacciones de las AB con tiramina durante la reacción. ....	238
9.6.	Desarrollo del método enzimático: 5. Aplicación en muestra real .....	243
9.7.	Bibliografía.....	246
<b>CAPÍTULO 10</b>		
10.1.	Desarrollo del método enzimático: 1. Origen químico de la señal .....	254
10.1.1.	Generación de la señal. ....	254
10.1.2.	Especies químicas involucradas en la formación de AuNP.....	255



10.1.2.1.	Putrescina y cadaverina.....	256
10.1.2.2.	Productos cíclicos: 1-pirrolina y 1-piperideina .....	257
10.1.2.3.	Importancia de la DAO .....	262
10.1.2.4.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> generado durante la reacción .....	266
10.1.3.	Modelo matemático .....	269
10.2.	Desarrollo del método enzimático: 2. Optimización de las condiciones experimentales.....	271
10.2.1.	pH de la reacción .....	272
10.2.2.	Cantidad de DAO .....	274
10.2.3.	Cantidad de Au(III).....	276
10.2.4.	Temperatura .....	278
10.3.	Desarrollo del método enzimático: 3. Características analíticas e interferencias.....	279
10.3.1.	Características analíticas .....	279
10.3.2.	Interferencias de otras aminas biógenas .....	282
10.3.2.1.	Estudios previos.....	282
10.3.2.2.	Tiramina.....	284
10.3.2.3.	Histamina.....	285
10.4.	Desarrollo del método enzimático: 4. Primeros estudios sobre la determinación de Put y Cad: determinación semicuantitativa.....	286
10.5.	Bibliografía.....	294

## **CAPÍTULO 11**

11.1.	Estudio de la reacción entre tiramina y Au(III).....	297
11.1.1.	Origen de la señal .....	297
11.1.2.	Caracterización del fluoróforo.....	299
11.2.	Optimización del método dependiente del tiempo .....	305
11.2.1.	Estabilidad de los AuNC formados: efecto del tiempo.....	305
11.2.2.	Composición de la disolución amortiguadora .....	307

11.2.3.	pH de la disolución amortiguadora .....	309
11.2.4.	Concentración de Au(III) .....	310
11.2.5.	Características analíticas del método .....	311
11.2.6.	Estudio de interferencias.....	312
11.3.	Optimización del método independiente del tiempo .....	313
11.3.1.	Efecto de la concentración de fosfato.....	313
11.3.2.	Efecto de la concentración de Au(III) .....	314
11.3.3.	Confirmación de la existencia de AuNC.....	316
11.3.4.	Características analíticas del método.....	317
11.3.5.	Estudio de interferencias.....	318
11.4.	Aplicación a una muestra real .....	323
11.5.	Bibliografía.....	325
<b>SECCIÓN IV. Conclusiones.....</b>		<b>327</b>
<b>SECCIÓN V. ARTÍCULOS.....</b>		<b>332</b>

# I

## Aspectos generales



# **Capítulo 1**

## **Presentación de la tesis.**

### **Objetivos**



En la presente tesis se han desarrollado diversos métodos ópticos enzimáticos para la determinación de aminas biógenas (ABs), que puede ser aplicados en disolución o implementados en biosensores. Como se verá, hay una cierta superposición en cuanto a sus fundamentos y aplicaciones, sin embargo, cada uno de ellos tiene un origen y un propósito distinto. Estas primeras páginas de la Tesis tienen como propósito dar una breve explicación de cómo se han ido gestando estos métodos, presentar un esquema general que ayude a diferenciarlos y **definir, a partir de ello, los Objetivos de este trabajo.**

Inicialmente, la Tesis estaba encuadrada dentro de la principal línea que se estaba desarrollando en el grupo de investigación, consistente en la puesta a punto de biosensores enzimáticos ópticos autoindicadores (denominados también “reagentless” o “label-free”). Estos dispositivos aprovechan los cambios que se producen en las propiedades ópticas de las enzimas (absorción o fluorescencia) para llevar a cabo la determinación de los sustratos que participan en las reacciones catalizadas por ellas, sin necesidad de acoplar reacciones indicadoras adicionales. No todas las enzimas tienen propiedades ópticas utilizables. Hasta el inicio de la Tesis se habían desarrollado biosensores basados principalmente en reacciones catalizadas por flavo-enzimas, el cofactor es un grupo flavina, y peroxidasa, el cofactor es un grupo hemo (ver Apéndice 1, sección V). La revisión bibliográfica mostró que las reacciones enzimáticas más importantes (y accesibles comercialmente) para AB se basan en enzimas Amino-oxidasas (AO) que catalizan su oxidación según la reacción 1.1.



*Reacción 1.1: Reacción de Aminos oxidasas (AO) con aminas biógenas (AB)*

Las AO más importantes son Diamino Oxidasa (DAO), que cataliza muy eficazmente la oxidación de diaminas (como la putrescina y cadaverina), y la Tiramina Oxidasa (TAO), que hace lo propio con la tiramina (e histamina). Estas

enzimas son cobre-dependientes, es decir, contienen coenzimas constituidos por diferentes compuestos de cobre. A partir de aquí se definió el primer objetivo de la Tesis.

**Objetivo 1.-** Evaluar si las propiedades intrínsecas de Absorción y/o Fluorescencia de las enzimas con centro activo de Cobre son adecuadas para desarrollar métodos de análisis y/o biosensores para la determinación de Aminas Biógenas.

El desarrollo de este objetivo se basaba, en realidad, en resultados preliminares, realizados durante los inicios de esta Tesis, en los que se había puesto a punto un biosensor para la determinación de dopamina (una AB neurotransmisora) usando la enzima Lacasa, que es también cobre-dependiente (ver **Apéndice 2**), por lo que lo que la hipótesis de partida parecía razonable.

Sin embargo, tal como se expone en el **capítulo 5** los resultados que se obtuvieron con DAO (y TAO) en disolución acuosa no ofrecieron una sensibilidad lo suficientemente alta como para justificar estudios dirigidos a su implementación en biosensores y su aplicación en muestras reales. Para paliar esta falta de sensibilidad se acopló la Peroxidasa (HRP) sobre la reacción (1), con objeto de utilizar las propiedades indicadoras de esta enzima. Los resultados obtenidos con ella permitieron mejorar la sensibilidad, pero surgieron problemas relacionados con el mecanismo y las interferencias (se describen también en el **capítulo 3**) que impidieron su aplicación sobre muestras reales.

Descartado el uso de las propiedades intrínsecas de las enzimas, se optó por buscar metodologías alternativas basadas en el uso de reacciones indicadoras acopladas a la reacción 1.1. Se abrieron dos alternativas que se fueron desarrollando prácticamente en paralelo y que conforman las **dos secciones principales de esta Tesis Doctoral**.



La **primera de ellas**, que se describe en la **sección II**, consistió en acoplar una reacción indicadora para determinar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado en la reacción 1.1, según:



*Reacción 1.2: Reacción entre la enzima HRP y los H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de un colorante.*

De aquí surgen los dos siguientes objetivos de la Tesis:

**Objetivo 2.-** Desarrollo de métodos analíticos enzimáticos colorimétricos para la determinación de las aminas biógenas Putrescina y Cadaverina, basados en el uso de la enzima Diamino Oxidasa (DAO) y una reacción indicadora basada en HRP/colorante.

**Objetivo 3.-** Implementación de estos métodos en sensores colorimétricos de un solo uso (tiras reactivas) que mediante detección visual (método de criba) o por imagen digital (cuantitativo), permitan la determinación de Putrescina y Cadaverina.

Se trataba de desarrollar métodos enzimáticos clásicos, donde los colorantes habituales son ABTS y TMB. En realidad, se pensaba que ya existirían métodos para ABs basados en este tipo de reacciones, pero apenas se encontró información bibliográfica. Además, durante el desarrollo del método para Put y Cad con DAO y HRP/ABTS, se obtuvieron una serie de resultados que permitieron aportar, no solo nueva información sobre los mecanismos de reacción y aparición del color, sino también sobre la forma en la que se generan interferencias y sobre nuevas metodologías alternativas de trabajo que permiten su implementación en biosensores (**capítulo 6**). Por el color formado (azul-verdoso), su uso en tiras reactivas de celulosa resultó no ser el más conveniente, por lo que se sustituyó para este objetivo por TMB, el cuál fue estudiado en paralelo en el grupo de

investigación y aplicado directamente a tiras reactivas para el desarrollo del objetivo (**capítulo 7**). Durante este capítulo se desarrollo un modelo matemático que permitiera relacionar el valor de las Coordenadas RGB con las características de la sustancia absorbente y del soporte sólido.

**La segunda alternativa**, que **corresponde a la sección III**, constituye el núcleo más novedoso de esta Tesis. Consistió en sustituir la reacción indicadora 1.2 por Au(III) como único reactivo auxiliar con la idea de que diera lugar a la formación nanopartículas de oro (AuNP) durante la reacción enzimática. De aquí surgen los dos siguientes objetivos de la Tesis doctoral.

**Objetivo 4.-** Estudio de la formación de nanopartículas de oro (AuNP) a partir de Au(III) durante una reacción enzimática y su utilización como un nueva metodología indicadora que pueda ser implementada en biosensores. Aplicación a la determinación de Tiramina con la enzima Tiramina Oxidasa (TAO)

**Objetivo 5.-** Evaluar si la nueva metodología desarrollada en el Objetivo 4 pudiera ser de uso general para otras reacciones enzimáticas, estudiando la determinación enzimática de Putrescina y Cadaverina con DAO por formación de AuNP

Esto suponía un reto metodológico, ya que su utilización como regenerador del ciclo catalítico de enzimas y su consecuente formación de nanopartículas *in situ* no había sido descrito previamente. El objetivo era, no solo diseñar una nueva alternativa indicadora general, sino también simplificar la reacción indicadora, eliminar el HRP y el colorante (evitando así posibles todas las dificultades derivadas de su uso) y evaluar otras posibles ventajas adicionales de su utilización. En el **capítulo 9** se describe el mecanismo del uso del Au(III) en la reacción de la

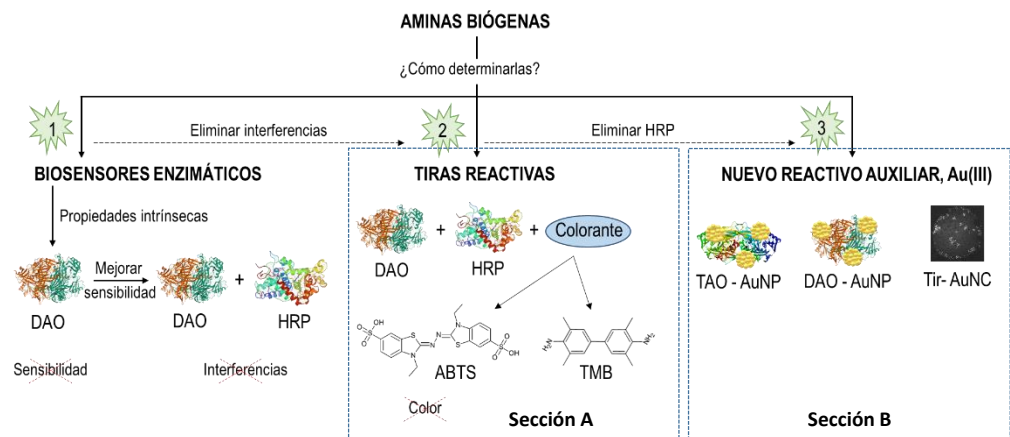
Tiramina oxidasa (TAO), su utilización como método colorimétrico para tiramina y se propone un modelo cinético que describe su formación. En el **capítulo 10** se extrapoló esta metodología a la reacción de la DAO, para verificar y establecer su uso como una posible vía para la determinación enzimática de diferentes analitos.

Por último, y no menos importante, a raíz del uso del Au(III) en la reacción de la TAO, se observaron señales de fluorescencia cuando la reacción se llevaba a cabo en ausencia de TAO. Estas señales, que se asociaron a la formación de nanoestructuras de oro previas a la formación de nanopartículas de oro, suscitó mucho interés en el desarrollo de esta tesis, por lo que se siguió investigando en esta línea, y se planteo un último objetivo:

**Objetivo 6.-** Estudio y aplicación analítica de la formación de nanoestructuras de oro durante la reacción (sin enzima) entre el Au(III) y la tiramina.

Tal como se describe en el **capítulo 11**, se han obtenido nanoclusters que permiten la determinación de tiramina sin necesidad de la utilización de TAO.

En la siguiente figura, se muestra un esquema general que pretende resumir las diferentes metodologías desarrolladas en esta Tesis.





## **Capítulo 2**

# **Estructura de la tesis**



En este capítulo se va a clarificar la estructura de la presente tesis, teniendo en cuenta los objetivos descritos en el capítulo anterior. Como se puede observar en el índice, consta de 5 bloques principales, enumerados con números romanos. Dentro de cada uno de ellos se desarrollan diferentes capítulos según la temática de cada bloque.

El bloque I (Aspectos generales) desarrolla a lo largo de 4 capítulos los aspectos que definen el marco común de la tesis, evitando así la repetición sucesiva de los mismos. Además de los primeros, incluye el contexto analítico de las aminas biógenas (capítulo 3) y los aspectos relacionados con los materiales utilizados y la metodología experimental llevada a cabo (capítulo 4).

El bloque II (Colorantes) incluye un capítulo inicial (capítulo 5) que describe los resultados obtenidos al utilizar las propiedades intrínsecas de las enzimas, los problemas analíticos que van asociados a su utilización y la necesidad de tener que utilizar métodos indicadores basados en colorantes. Además incluye otros dos capítulos donde se exponen los resultados obtenidos al utilizar reacciones indicadoras de dos colorantes, el ABTS (capítulo 6) y el TMB (capítulo 7), así como la utilización de este último en métodos rápidos basados en la medida del color.

En el bloque III (Nanomateriales) incluye un capítulo inicial (capítulo 8) en el que se describe de manera bibliográfica, cuáles son los usos principales que, hasta la fecha se han hecho del uso analítico de los nanomateriales en métodos ópticos enzimáticos. El resto de capítulos de este bloque desarrollan los resultados obtenidos al utilizar la síntesis de nanomateriales de oro como alternativa a los métodos basados en colorantes, estableciendo así nuevas metodologías que pueden ser implementadas en las reacciones enzimáticas. En el capítulo 8 se describe un método enzimático para la determinación de tiramina y en el capítulo 9, su análogo para la determinación de putrescina y cadaverina. Por último, se describe en el capítulo 11 una metodología derivada de los resultados anteriores

## Capítulo 2: Estructura de la tesis

que implica la generación de nanoclusters de oro para la determinación de tiramina, sin la necesidad de una reacción enzimática.

En el bloque IV se exponen las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos a lo largo de los bloques II y III y por último en el bloque V se muestran los artículos que han sido publicados hasta la fecha, tanto en estudios previos como en el desarrollo de la misma.



## **Capítulo 3**

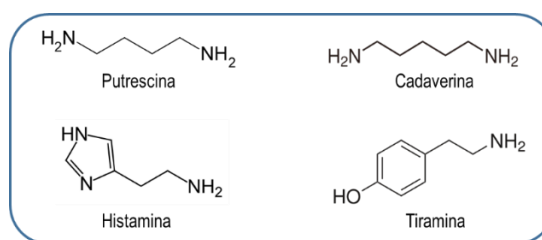
# **Aspectos generales de las aminas biógenas**



### 3.1. Importante de las aminas biógenas

#### 3.1.1. Estructura química, funciones y problemática.

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que forman parte del organismo humano y que realizan funciones importantes. Estos compuestos provienen de la degradación de los aminoácidos, por lo que se trata de una familia muy numerosa, sin embargo, desde un punto de vista de salud alimenticia las más importantes son: Histamina (His), Tiramina (Tir), Putrescina (Put) y Cadaverina (Cad), en alimentos dirigidos al consumo humano (figura 3.1).



*Figura 3.1: Estructura química de las cuatro principales aminas biógenas encontradas en alimentos.*

Aunque se producen por la descarboxilación de aminoácidos, este proceso puede transcurrir a través dos vías principales. La primera es la denominada “vía endógena” en la que el proceso de descarboxilación está catalizado por enzimas propias del organismo (humano, en este caso), que actúan sobre los aminoácidos libres en el interior celular, tal y como puede observarse en la figura 3.2 [3.1] La segunda, es la “vía exógena”, en la cual las aminas biógenas se producen debido a las enzimas de diferentes microorganismos presentes en los alimentos, sobre todo las procedentes de diversos tipos de peces (atún, caballa y otros escómbridos) o del queso (gouda, cheddar o gruyere), pero también de fermentados en general [3.2]. Los contenidos de Aminas biógenas en alimentos pueden aumentar durante su procesado o transporte se producen cambios en sus condiciones de conservación (temperatura, [O<sub>2</sub>],...) [3.3] que afecten a la actividad de los microorganismos.

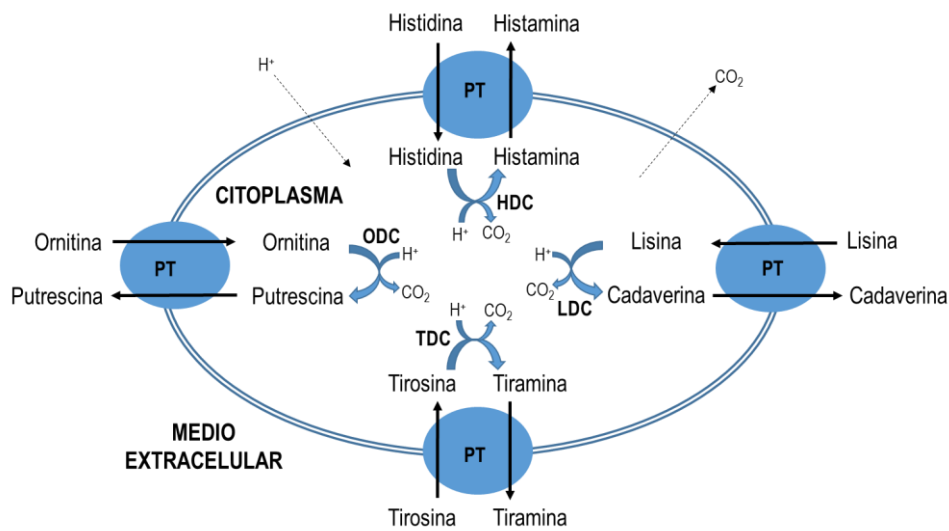


Figura 3.2: Formación de las principales ABs en el interior celular. PT: proteína transportadora. HDC: Histamina descarboxilasa, LDC: Lisina descarboxilasa, TDC: Tiroamina descarboxilasa, ODC: Ornitina descarboxilasa.

Es bien conocida la importancia fisiológica que tienen las aminas biógenas en los seres vivos. La Histamina (His), con su doble actividad hormonal y neurotransmisora es, quizás, la más conocida, pero el grupo de las denominadas “aminas traza”, al que pertenece, la Tiramina (Tir), y el de las “diaminas”, en el que se incluyen la Putrescina (Put) y la Cadaverina (Cad), tienen funciones biológicas muy relevantes como neuromoduladores o reguladoras en el desarrollo celular, respectivamente [3.4]. Para que todas estas funciones se desarrollen de forma equilibrada, la concentración de estas aminas en el organismo está regulada por la actividad de dos enzimas: la Diamino oxidasa (DAO) y la Monoamina oxidasa (MAO) [3.5], que metabolizan a las AB de forma similar, aunque presentan diferente selectividad hacia ellas. El control de los niveles basales de las aminas biógenas está relacionado con el buen funcionamiento de estas dos enzimas; deficiencias en ellas producen desórdenes fisiológicos por la acumulación excesiva de aminas biógenas que no han podido ser metabolizadas [3.6, 3.7], apareciendo

los problemas de intolerancia y, en los casos más graves, de intoxicación. De hecho, los alimentos o complementos nutricionales ricos en DAO intentan suplir esas deficiencias.

Pero, además la ingesta de alimentos con elevadas cantidades de estas aminas puede ocasionar incrementos puntuales (o crónicos) en personas que no sean deficitarias en estas enzimas, produciéndoles una sintomatología similar a la de la intolerancia. Quizás los problemas de salud más conocidos son los provocados por la histamina, que produce un cuadro clínico conocido como “intoxicación por escómbridos”, que se manifiesta en síntomas de muy diversa índole e importancia que van desde enrojecimiento de la cara y cuello o erupciones cutáneas, hasta palpitaciones, ataques de asma o problemas gastrointestinales graves [3.8, 3.9].

Hace ya unos años que desde organismos internacionales como la FAO [3.10] o la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) [3.11] se viene alertando sobre un continuo incremento en las concentraciones de AB en la dieta, debido al aumento en el consumo de alimentos envasados de origen cárnico (embutidos) y láctico; esto se ha materializado en niveles fisiológicos inadecuados de ABs en el organismos, con la consecuente aparición de intoxicaciones e intolerancias. La respuesta de las autoridades ha sido empezar a legislar sobre los niveles máximos permitidos de las mismas en alimentos destinados al consumo. También desde este punto, la AB que más interés ha despertado es la His. Hasta la fecha sólo está regulado, a nivel internacional, el contenido en His en los escómbridos, y así los niveles máximos permitidos en Estados Unidos son  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  y  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  en la Comunidad Europea [3.12]. Sin embargo, esto no parece ser suficiente ya que los estudios que se han realizado sobre la cantidad de His necesaria para provocar estos efectos adversos abarca un rango de concentración mucho más variable (en los casos notificados, los contenidos oscilaban entre 5 y 5000 mg/Kg en el alimento). La principal causa de esta variabilidad entre la población, es debida a la diferente eficacia de los mecanismos de detoxificación entre distintos individuos;

esta variabilidad se achaca a diferentes factores, que pueden concurrir o no en un mismo paciente, como son: 1) deficiencias endógenas en el metabolismo (falta de enzimas); 2) un efecto potenciador por la presencia de otras sustancias, como el etanol; y 3) bloqueo de la enzima por medicación, en especial, por fármacos para la depresión y/o ansiedad. Es en especial esta última causa la que más ha crecido en las últimas décadas; de hecho se considera que aproximadamente el 1% de la población presenta intolerancia a His. Por ello, la European Food Safety Authority (EFSA) recomienda controlar las aminas biógenas en alimentos y establecer métodos analíticos estandarizados rápidos para las diferentes matrices donde se pueden encontrar mayores niveles de ellos [3.13]. Las razones de este control no son toxicológicas y de salud, sino también porque pueden jugar un papel importante como indicadores de calidad en algunos alimentos y la gestión de esta calidad es una forma de garantizar la seguridad alimentaria [3.14].

Esta Tesis se focaliza sobre las otras tres aminas biógenas consideradas como más importantes: Tir, Put y Cad. Se comentarán algunos aspectos generales de estas en los siguientes apartados.

#### **3.1.2. Tiramina**

La Tir se produce por la descarboxilación de la tirosina (figura 3.3). Las reacciones adversas que produce en el organismo son similares a las de la His, e incluyen [3.15, 3.16] efectos vasoconstrictores, producción de migrañas, náuseas, vómitos, desórdenes respiratorios e incluso se ha descrito que produce incrementos en la concentración de glucosa en sangre. Las dosis necesarias de Tir para producir una respuesta adversa del organismo son elevadas y oscilan entre 600 y 2000 mg. Sin embargo, al igual que ocurría con la His estos niveles disminuyen drásticamente cuando se dan determinados factores; por ejemplo, para una persona medicada con psicofármacos de última generación, se requieren cantidades entre 50 y 150 mg, mientras que si son fármacos clásicos, se pueden producir respuestas a partir de unos 5 mg.

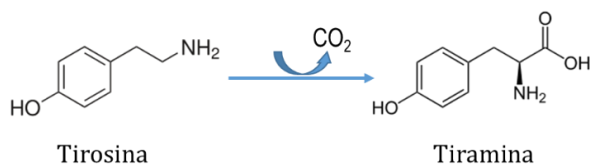


Figura 3.3: Formación de tiramina mediante la descarboxilación del aminoácido tirosina.

Normalmente, los contenidos de Tir en alimentos son muy inferiores a los de otras aminas biógenas (especialmente putrescina y cadaverina), pero en aquellos que han sido sometidos a fermentación o procesos industriales por acción de bacterias tipo *lactobacillus* [3.17] aparecen contenidos anormalmente altos procedentes del metabolismo de estos microorganismos. Los productos más representativos que pertenecen a este grupo son:

\* Derivados lácteos, particularmente el queso [3.18, 3.19] En mucha de la literatura publicada sobre la determinación de aminas biógenas, destaca la presencia de concentraciones anormalmente altas de Tir en este alimento. No es, por ello, de extrañar que al cuadro de reacciones fisiológicas adversas que produce la Tir en el organismo humano, que se han descrito anteriormente, se les denomine vulgarmente “reacción al queso” [3.20]. Los resultados también demuestran que cuanto más curado este el queso mayor es la concentración de Tir [3.21], por lo que el envejecimiento juega un papel importante en la aparición de esta amina.

\* Cerveza. En este caso, los estudios realizados sobre las materias primas como la harina de malta o el lúpulo, revelan también concentraciones altas de Tir [3.22, 3.23]. Además, cuanto mayor tiempo lleve envasada la cerveza, mayor es la concentración encontrada. Es importante indicar además que, en el caso de la cerveza, el problema de salud es doble ya que la ingestión de bebidas alcohólicas dispara las reacciones alérgicas a Tir (y a las demás AB en general) dado que el etanol inhibe la acción de las enzimas oxidasas anteriormente comentadas, especialmente la MAO [3.23].

\* Finalmente, hay también cantidades elevadas de tiramina en productos fabricados a partir de residuos de otros cuyo proceso de elaboración implique el la presencia de lactobacilos. Un ejemplo bien conocido son las harinas procedentes de cascara de crustáceos (gambas, en particular) [3.24].

El contenido de tiramina en productos para el consumo humano no está regulado por los organismos correspondientes. Sin embargo, sí que aparecen recomendados valores máximos de Tir en ciertos alimentos dentro de los *Codex Alimentarius* propios de algunos países; por ejemplo dentro del de la Republica Eslovaca se regula el contenido de Tir en queso en 200 mg/Kg [3.25].

### **3.1.3. Putrescina y cadaverina**

La Put y la Cad son dos aminas biógenas que, a diferencia de la tiramina, son diaminas de cadena lineal. La Cad se produce por la descarboxilación directa de la lisina, pero la ruta de síntesis de Put es algo más compleja, ya que sale de la degradación de la Ornitina o de la Agmatina; la primera de ellas proviene, a su vez, de la Glutamina y de la Argina, mientras que la segunda proviene solo de la Arginina [3.26]. Sus niveles en alimentos son, en general, de los más altos siendo habitualmente las AB mayoritarias; además, cuando empiezan a descomponer los niveles de ambas aumentan muchísimo, adquiriendo los alimentos el olor característico “a podrido” e impidiendo que los productos alimenticios sean aptos para el consumo humano. De hecho, el nombre vulgar de la Put está relacionado con este olor característico que desprenden los alimentos durante su putrefacción.

Para la Put y Cad no se han encontrado, hasta la fecha, efectos toxicológicos directos importantes, pero pueden potenciar los efectos producidos por la His y la Tir, ya que bloquean las rutas metabólicas de su degradación mediante las enzimas Monoamina oxidasa (MAO) y la Diamino oxidasa (DAO). Ambas enzimas pueden reaccionar con la Put y Cad, mediante una reacción de desaminación oxidativa, generando los aldehídos correspondientes de cada una de ellas. Esto puede derivar en que ambas enzimas no sean capaces de degradar la histamina, ya que están



realizando reacciones paralelas con las diaminas, y por tanto los niveles de histamina se vean incrementados. La Put y Cad pueden, además, actuar como precursores de N-nitrosaminas, que son compuestos peligrosos [3.27], consideradas por la EPA dentro del grupo B2 de riesgo de cáncer. Los mecanismos por los cuales se forman estas nitrosaminas a partir de las AB son muy variados [3.28], pero incluyen desde la forma en la que se cocinan los alimentos (alta T<sup>a</sup>) hasta reacciones enzimáticas nitrificantes que se producen dentro del propio organismo humano; estas son las más peligrosas ya que transforma la ingestión de Put/Cad en ingestión de nitrosaminas. Por ello es necesario tenerlas en cuenta para establecer un buen control de calidad de los alimentos propensos a contener niveles altos de estas aminas.

Los niveles de estas aminas biógenas en alimentos tampoco se encuentran legislados, pero es opinión de los expertos que no se tardará mucho en disponer de legislación para ellas y otras [3.29], incluso se ha planteado la conveniencia de indicar en los envases de alimentos la presencia de ABs, en particular, His (igual que con los alérgenos).

### **3.2. Métodos analíticos para la determinación de aminas biógenas basados en técnicas de separación instrumentales**

Con lo expuesto anteriormente, el control de aminas biógenas en alimentos es necesario tanto en el proceso de manufactura, como en el producto final que llega a los consumidores. Los métodos existentes para ello son, por un lado, los basados en técnicas de separación instrumentales, muy útiles para el control, en laboratorios, de uno o varios de estos compuestos. Por otro, métodos no cromatográficos, normalmente dirigidos a una AB concreta y que permiten un análisis cuantitativo o semi-cuantitativo (*screening*) más rápido, en ocasiones, incluso *in situ*. En este apartado se comentarán brevemente los primeros.

Se han publicado diferentes artículos de revisión que cubren, en todo o en parte, el uso de este tipo de técnicas de separación instrumentales para AB [3.1, 3.30, 3.31]. Sin duda, la HPLC en fase reversa usando columnas C<sub>18</sub> es la más utilizada para la determinación de ABs en alimentos [3.32, 3.33]. En general, para la preparación de muestras se suele realizar un proceso de extracción previo, con los que se pretende eliminar interferencias y concentrar los analitos. En la mayoría de los casos se utiliza detección basada en absorción o fluorescencia, y dadas las malas propiedades ópticas de la mayoría de estos compuestos es necesario derivatizarlos para lo que el reactivo de elección es casi siempre cloruro de dansilo, y menos frecuentemente o-ftaladehído. Cuando es posible, HPLC se combina con detectores de MS [3.34] o MS/MS, como es el caso del método de referencia usado en esta tesis [3.35].

La electroforesis capilar es la segunda técnica más utilizada para la determinación de aminas biógenas, a pesar de que no se suele alcanzar una sensibilidad tan alta. Las ventajas que presenta esta técnica se centran en que es simple, rápida y sirve para realizar un cribado de un número elevado de muestras en poco tiempo [3.36, 3.37]. Aun así, es necesario tener en cuenta que su utilidad depende de los niveles de aminas biógenas en las muestras, por lo que es muy habitual utilizar procesos de derivatización o kits específicos con unas especificaciones limitadas.

La cromatografía de gases no es tan utilizada como la HPLC o la electroforesis capilar para la determinación de aminas biógenas, sin embargo, recientemente se ha comenzado a utilizar acoplada a espectrometría de masas como método de detección [3.38, 3.39]. También es necesario un proceso de derivatización para aumentar la volatilidad y disminuir la polaridad de las aminas biógenas. En términos generales el proceso global de análisis, es más rápido que en algunos métodos de cromatografía líquida, obteniéndose límites de detección similares.

### **3.3. Métodos analíticos rápidos para la determinación de aminas biógenas. Biosensores**

#### **3.3.1. Necesidad de los biosensores**

Aunque los métodos instrumentales comentados permiten determinaciones precisas, exactas y, en muchos casos, multicomponentes, desde el punto de vista de la necesidad de su control rápido en alimentos, presentan tres grandes limitaciones: el tiempo de necesario para llevarlos a cabo (derivatización, proceso de separación,...), la necesidad de tener que llevar las muestras a un laboratorio adecuadamente preparado (con personal cualificado) y tener que disponer (y mantener) de un sistema cromatográfico con unas prestaciones mínimas. Para un control rápido de estos compuestos es necesario disponer de procedimientos rápidos y sencillos

Una alternativa que puede cubrir estas necesidades son los biosensores. Los conceptos básicos de estos dispositivos son bien conocidos por lo que, en esta tesis, solo se recordar muy brevemente. La IUPAC define sensor como un dispositivo que transforma información química (concentración) de una muestra en una señal analíticamente útil (transformable en información) [3.40]. Para ajustarse a esta definición un sensor está constituido por los componentes que se muestran en la figura 3.4. Estos componentes se pueden categorizar en dos grandes partes:

1. Zona receptora: es donde se encuentra el receptor (sustancia (bio)química que da selectividad al sensor), cuya misión es interaccionar con el analito y permitir que la información química se transforme, biunívocamente, en una forma de energía o señal primaria
2. Zona transductora: es donde se encuentra el transductor que transforma la señal primaria en la señal analítica final.

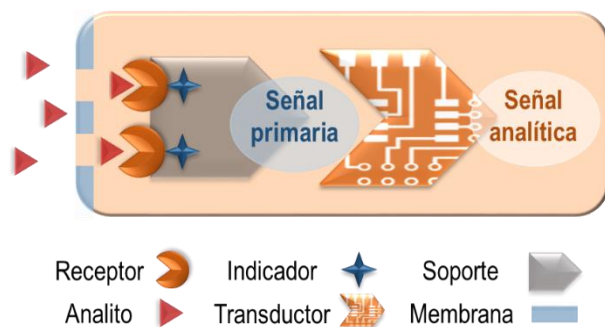


Figura 3.4: Representación de los componentes principales de un sensor.

Los sensores pueden ser concebidos para un solo uso (desechables) o para medir repetidas veces e incluso de forma continua, llamándose entonces sistemas de monitorización. Estos sistemas de monitorización presentan una señal transitoria a lo largo del tiempo, donde se relaciona el tipo de señal obtenida con un flujo de muestra a analizar. Las propiedades analíticas y la aplicabilidad de los sensores están muy condicionadas por el tipo de receptor. Si el receptor es una única sustancia con propiedades autoindicadoras reversibles no será necesario el uso de reactivos auxiliares y se tendrá un receptor idóneo para poder ser utilizado en un sistema de monitorización, siendo éste el caso de las enzimas que poseen propiedades intrínsecas.

### 3.3.2. Sensores y biosensores para Aminas Biógenas.

El campo de las AB es uno de los más trabajados desde el punto de vista de los sensores, especialmente para conseguir sistemas que se puedan incorporar en envases de alimentos y los transformen en “envases inteligentes” [3.41]. Sin embargo, la gran mayoría de estos sensores están basados en el uso de reactivos orgánicos colorimétricos o fluorimétricos [3.42] ó nanomateriales con propiedades ópticas o electroquímicas [3.43, 3.44] , sin que medie un reactivo de reconocimiento altamente específico. Por ello, algunos de estos sistemas se usan

para la determinación total de AB en la muestra; en otros, se corre el riesgo de baja selectividad.

En los biosensores, el receptor es una biomolécula, normalmente un anticuerpo, una enzima o un aptámero (aunque también los MIP se suelen considerar dentro de este grupo). Esto permite un diseño más sencillo. El uso de anticuerpos da, desde luego, mucha selectividad al sistema pero encarece tremendamente el dispositivo. Por ello, dado que la His es la única AB cuya concentración está legislada, la mayoría de las referencias bibliográficas encontradas se refieren a inmunosensores para His [3.45], algunos de los cuales se han incluso comercializado, pero, hasta donde se sabe, no se han encontrado sensores inmunológicos comerciales para otras AB.

Los biosensores enzimáticos que se han desarrollado hasta la fecha suelen utilizar aminas oxidasas como la Monoamina oxidasa (MAO), la Diamino oxidasa (DAO) y en casos muy contados, la Tiramina Oxidas (TAO) [3.46] que reaccionan de manera específica con aminas biógenas. Estas enzimas se combinan con la enzima peroxidasa (HRP) que reacciona a su vez con el  $H_2O_2$  formado. La mayor parte de los biosensores son también electroquímicos que miden la corriente catódica producida por la reducción de un mediador [3.47]. Aunque hay referencias bibliográficas en las que se han combinado las reacciones enzimáticas con reactivos colorimétricos, son más bien escasas y, como se ha indicado, la mayoría se refieren a His [3.48 - 3.50].

Una de las principales ventajas de los sensores enzimáticos es que reducen el tiempo requerido para el análisis, ofreciendo un cribado rápido en industrias alimenticias, necesario para el control de calidad rutinario. Como se ha comentado en el capítulo 1, a lo largo de esta tesis se exponen diversos procedimientos basados en el uso de enzimas y métodos colorimétricos para la determinación de aminas biógenas. Como resultado, algunos se han implementado en dispositivos sensores desechables y en otros se ha demostrado su viabilidad en disolución y la

posibilidad de ser implementados en soportes sólidos. Las dos reacciones enzimáticas que se han utilizado se basan en la DAO y la TAO, cuyas propiedades se comentarán brevemente.

### **3.3.3. Diamino oxidasa y Tiramina oxidasa como base de sensores ópticos**

Las aminas oxidasas de cobre son una clase de enzimas que se pueden encontrar en diversos organismos, desde bacterias y hongos hasta plantas y animales [3.51]. Estas enzimas son capaces de llevar a cabo la oxidación de aminas primarias formando los correspondientes aldehídos y liberando a su vez amonio y peróxido de hidrógeno. Su centro activo está formado por dos cofactores, el primero de ellos es un grupo prostético orgánico, 2,4,5-trihidroxifenilalanina quinona (TPQ) y el segundo, un metal inorgánico, el ión cuprato (Cu(II)). Las aminas oxidasas se caracterizan por ser homodímeros, presentando un molécula de TPQ y un Cu(II) por cada subunidad [3.52]. Tanto la Diamina Oxidasa (DAO) como la Tiramina Oxidasa (TAO) pertenecen a este grupo de enzimas, diferenciándose solo en su especificidad.

Los espectros de absorción molecular suelen presentar una banda en torno a 480-500 nm debida a la interacción del Cu(II) con el cofactor orgánico, confiriéndoles un color rosáceo naranja cuando la concentración de la enzima es alta (mayor a 10 mg/mL [3.53]), dada su baja absorptividad molar.

El cofactor TPQ se forma por una modificación postraducciona de la enzima, debido a la oxidación de un aminoácido de tirosina. Este cofactor confiere propiedades redox a las enzimas oxidasas que lo poseen, ya que pueden oxidarse y reducirse con facilidad; este comportamiento se observa en su ciclo catalítico, que se expone con más detalle en el capítulo 5, figura 5.3. Las aminas oxidasas que contienen este grupo prostético, poseen también un ión cuprato coordinado a tres residuos de histidina de sus cadenas peptídicas y a dos moléculas de agua [3.54]].

Este cobre se sitúa muy cerca del grupo TPQ, ya que está involucrado en el proceso de transferencia electrónica durante los procesos redox que catalizan este tipo de enzimas.

Existen diferentes DAO dependiendo del organismo del que se obtenga, diferenciándose principalmente en las constantes cinéticas para diversas aminas biógenas [3.55]. A lo largo de esta tesis la DAO utilizada tiene origen vegetal, siendo el organismo del que se ha extraído y purificado, *Lathyrus cicera* [3.56]. Como se ha comentado anteriormente, se trata de una amina oxidasa de cobre, siendo sus principales sustratos la Put y la Cad. Se trata de es un homodímero con un grupo TPQ y un ión cuprato en cada subunidad, y un peso molecular en torno a 150000 (75000 por cada subunidad es de 75000 Da [3.57]).

Posteriormente se insistirá en ello (capítulo 5), pero es importante decir que durante la reacción entre la DAO y la Put se observa cómo la banda de absorción a 498 nm de la enzima nativa desaparece y se generan dos nuevas bandas en torno a 430 y 465 nm (figura 3.5). Para que estos cambios espectroscópicos se observen es necesario trabajar en ausencia de O<sub>2</sub> [3.58]. Este hecho se produce cuando la concentración de amina es lo suficientemente alta como para consumir el O<sub>2</sub> disponible [3.59]. Esto sucede porque la constante de oxidación del centro activo a su estado inicial es muy rápida, siendo necesario consumir el O<sub>2</sub> para poder observar la especie reducida de la enzima.

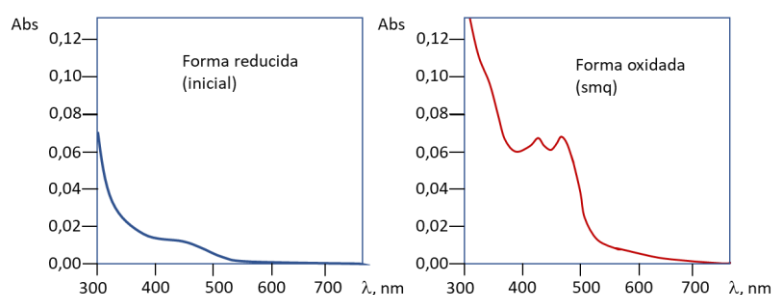


Figura 3.5: Propiedades espectroscópicas intrínsecas de la DAO. [3.58]

### Capítulo 3: Aspectos generales de las aminas biógenas

Los valores reportados para las constantes cinéticas de las diferentes aminas biógenas a pH 7,2 son los que se muestran en la tabla 3.1. Como se puede observar, putrescina y cadaverina presentan un cociente de  $k_{cat}/K_M$  de casi dos órdenes de magnitud superior al resto de aminas biógenas, siendo por tanto los analitos preferentes para esta enzima.

El valor de  $k_{cat}$  (constante catalítica) o número de recambio indica el número de moléculas del analito (sustrato) transformadas en producto por unidad de tiempo y por molécula de enzima, por lo que valores elevados indican una gran eficiencia de la enzima en el proceso de transformación químico de reactivos a productos. El valor de  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten) se suele utilizar como indicador de la afinidad de la enzima por el analito estudiado.

Tabla 3.1 valores de las  $k_{cat}$  y  $K_M$  de la DAO (*Lathyrus cicera*) usada en este trabajo según [3.55]

Amina biógena	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ (M)	$K_{cat}/K_M$ ( $s^{-1}\cdot M^{-1}$ )
Putrescina	262	$2,7\cdot 10^{-4}$	$9,7\cdot 10^5$
Cadaverina	159	$1,0\cdot 10^{-4}$	$1,6\cdot 10^6$
Tiramina	32,9	$3,1\cdot 10^{-3}$	$1,1\cdot 10^4$
Histamina	10,3	$7,9\cdot 10^{-4}$	$1,3\cdot 10^4$

La información de la que se dispone para la Tiramina Oxidasa es mucho más reducida. Se trata de una enzima que proviene de *Arthrobacter sp.* y se caracteriza por ser una amina oxidasa de cobre, por lo que no debe confundirse con la Tiramina oxidasa de *Sarcina lutea*, que es una amina oxidasa dependiente de FAD [3.60]; esta última se denomina a veces Monoamino Oxidasa (MAO).





### 3.4. Bibliografía

- [3.1] J. L. Ordóñez, A. M. Troncoso, M. D. C. García-Parrilla, and R. M. Callejón, "Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 939, pp. 10–25, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2016.07.045.
- [3.2] M. Křížek, F. Vácha, L. Vorlová, J. Lukášová, and Š. Cupáková, "Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*) stored at different temperatures," *Food Chem.*, vol. 88, no. 2, pp. 185–191, 2004, doi: 10.1016/j.foodchem.2003.12.040.
- [3.3] A. Halász, Á. Baráth, L. Simon-Sarkadi, and W. Holzapfel, "Biogenic amines and their production by microorganisms in food," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 5, no. 2, pp. 42–49, 1994, doi: 10.1016/0924-2244(94)90070-1
- [3.4] C. W. Tabor and H. Tabor, "Polyamines," *Annu. Rev. Biochem.*, 1984.
- [3.5] B. ten Brink, C. Damink, H. M. L. J. Joosten, and J. H. J. Huis in 't Veld, "Occurrence and formation of biologically active amines in foods," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 11, no. 1, pp. 73–84, 1990, doi: 10.1016/0168-1605(90)90040-C.
- [3.6] G. Manzotti, D. Breda, M. Di Gioacchino, and S. E. Burastero, "Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance," *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, vol. 29, no. 1, pp. 105–111, 2016, doi: 10.1177/0394632015617170.
- [3.7] L. Maintz and N. Novak, "Histamine and histamine intolerance," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 85, no. 5, pp. 1185–1196, 2007, doi: 10.1093/ajcn/85.5.1185
- [3.8] J. M. Hungerford, "Scombroid poisoning: A review," *Toxicon*, vol. 56, no. 2, pp. 231–243, 2010, doi: 10.1016/j.toxicon.2010.02.006.
- [3.9] M. Curran, "Communicable Diseases Intelligence Volume 38 Number 2 June 2014," *Commun. Dis. Intell.*, vol. 38, no. 2, 2014, [Online]. Available: <http://www.health.gov.au/cdi>.
- [3.10] FAO/WHO. Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. En *Joint FAO/WHO Expert Meeting Report; Rome, Italy, 23–27 July 2012*. Food and Agricultural Organization/World Health Organization: Rome, Italy, 2013.

- [3.11] Food, E. & Authority, S. Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. (2017) doi:10.2903/sp.efsa.2017.EN-1301.
- [3.12] Comis, L. A. *et al.* L 282/46. **9**, 46–47 (2013).
- [3.13] S. Bodmer, C. Imark, and M. Kneubühl, “Biogenic amines in foods: Histamine and food processing,” *Inflamm. Res.*, vol. 48, no. 6, pp. 296–300, 1999, doi: 10.1007/s000110050463.
- [3.14] Ruiz-capillas, C. & Herrero, A. M. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. (2019) doi:10.3390/foods8020062.
- [3.15] A. Marcobal, B. de las Rivas, J. M. Landete, L. Tabera, and R. Muñoz, “Tyramine and Phenylethylamine Biosynthesis by Food Bacteria,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 52, no. 5, pp. 448–467, 2012, doi: 10.1080/10408398.2010.500545.
- [3.16] J. Stadnik and Z. J. Dolatowski, “Biogenic Amines and in the Meat Product,” *ACTA Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, vol. 9, no. 3, pp. 251–263, 2010, [Online]. Available: [www.food.actapol.net](http://www.food.actapol.net).
- [3.17] Izquierdo-Pulido, M., Mariné-Font, A. & Vidal-Carou, M. C. Effect of tyrosine on tyramine formation during beer fermentation. *Food Chem.* **70**, 329–332 (2000).
- [3.18] Razavi Rohani, S. M., Aliakbarlu, J., Ehsani, A. & Hassanzadazar, H. Biogenic amines determination in some traditional cheeses in West Azerbaijan province of Iran. *Vet. Res. Forum* **4**, 115–118 (2013)
- [3.19] Innocente, N., Biasutti, M., Padovese, M. & Moret, S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chem.* **101**, 1285–1289 (2007).
- [3.20] A. R. Shalaby, “Significance of biogenic amines to food safety and human health,” *Food Res. Int.*, vol. 29, no. 7, pp. 675–690, 1996, doi: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X.
- [3.21] Dionex. Determination of biogenic amines in fermented and non-fermented foods using Ion Chromatography with suppressed conductivity and Integrated Pulsed Amperometric detections. *Dionex* **183**, 1–14 (2007).

- [3.22] Kalač, P., Hlavatá, V. & Křížek, M. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. *Food Chem.* **58**, 209–214 (1997)
- [3.23] Romero, R., Bagur, M. G., Sánchez-Viñas, M. & Gázquez, D. The influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 162–167 (2003)
- [3.24] Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D. I. & Campas-Baypoli, O. N. HPLC determination of histamine, Tyramine and Amino acids in shrimp by-products. *J. Braz. Chem. Soc.* **23**, 96–102 (2012)
- [3.25] Karovičová, J. & Kohajdová, Z. Biogenic amines in food. *Chem. Pap.* **59**, 70–79 (2005)
- [3.26] Benkerroum, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15**, 801–826 (2016).
- [3.27] Herrmann, S. S. & Granby, K. Occurrence of volatile and non-volatile N - nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. **48**, 163–169 (2015).
- [3.28] Beard, J. C. & Swager, T. M. An Organic Chemist's Guide to N-Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants. (2021) doi:10.1021/acs.joc.0c02774.
- [3.29] Ruiz-capillas, C., Jiménez-colmenero, F., Jiménez-colmenero, F., Ruiz-capillas, C. & Enez-colmenero, F. J. I. M. Biogenic Amines in Meat and Meat Products Biogenic Amines in Meat and Meat. **8398**, (2010).
- [3.30] Erim, F. B. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **52**, 239–247 (2013)
- [3.31] Jain, A. & Verma, K. K. Strategies in liquid chromatographic methods for the analysis of biogenic amines without and with derivatization. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **109**, 62–82 (2018)
- [3.32] A. Pineda, J. Carrasco, C. Peña-Farfal, K. Henríquez-Aedo, and M. Aranda, "Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC," *Food Control*, vol. 23, no. 1, pp. 251–257, 2012, doi: 10.1016/j.foodcont.2011.07.025.

- [3.33] V. Šimat and P. Dalgaard, "Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 2, pp. 399–406, 2011, doi: 10.1016/j.lwt.2010.08.011.
- [3.34] Self, R. L., Wu, W. H. & Marks, H. S. Simultaneous quantification of eight biogenic amine compounds in tuna by matrix solid-phase dispersion followed by HPLC-orbitrap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5906–5913 (2011)
- [3.35] ITE-FQ080-02: determination of biogenic amines by HPLC-MS/MS. Public health laboratory, Government of Aragón (Spain).
- [3.36] D. Daniel, V. B. dos Santos, D. T. R. Vidal, and C. L. do Lago, "Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1416, pp. 121–128, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.08.065.
- [3.37] D. An *et al.*, "Determination of biogenic amines in oysters by capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence," *Food Chem.*, vol. 168, pp. 1–6, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.019.
- [3.38] C. Almeida, J. O. Fernandes, and S. C. Cunha, "A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer," *Food Control*, vol. 25, no. 1, pp. 380–388, 2012, doi: 10.1016/j.foodcont.2011.10.052.
- [3.39] S. C. Cunha, M. A. Faria, and J. O. Fernandes, "Gas chromatography-mass spectrometry assessment of amines in port wine and grape juice after fast chloroformate extraction/derivatization," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 16, pp. 8742–8753, 2011, doi: 10.1021/jf201379x.
- [3.40] H. Adam; G. Stanislav; I. Folke. Chemical sensors: definitions and classification. *Pure and applied chemistry*, 1991, vol. 63, no 9, p. 1247-1250.
- [3.41] Miller, K., Reichert, C. L. & Schmid, M. Biogenic Amine Detection Systems for Intelligent Packaging Concepts: Meat and Meat Products. *Food Rev. Int.* **00**, 1–25 (2021).

### Capítulo 3: Aspectos generales de las aminas biógenas

- [3.42] Danchuk, A. I. *et al.* Optical sensors for determination of biogenic amines in food. *Anal. Bioanal. Chem.* **412**, 4023–4036 (2020)
- [3.43] Yang, X. *et al.* Carbon nanomaterial based electrochemical sensors for biogenic amines. *Microchim. Acta* **180**, 935–956 (2013).
- [3.44] Torre, R., Costa-Rama, E., Nouws, H. P. A. & Delerue-Matos, C. Screen-printed electrode-based sensors for food spoilage control: Bacteria and biogenic amines detection. *Biosensors* **10**, (2020).
- [3.45] Adányi, N., Székács, I., Szendro, I. & Székács, A. Determination of histamine content in vegetable juices by using direct and competitive immunosensors. *Food Agric. Immunol.* **25**, 20–33 (2014).
- [3.46] M. Di Fusco, R. Federico, A. Boffi, A. MacOne, G. Favero, and F. Mazzei, “Characterization and application of a diamine oxidase from *Lathyrus sativus* as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 401, no. 2, pp. 707–716, 2011, doi: 10.1007/s00216-011-5131-z.
- [3.47] W. Henao-Escobar, L. Del Torno-De Román, O. Domínguez-Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, and M. J. Arcos-Martínez, “Dual enzymatic biosensor for simultaneous amperometric determination of histamine and putrescine,” *Food Chem.*, vol. 190, pp. 818–823, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.035.
- [3.48] Lerke, P. A., Porcuna, M. N. & Chin, H. B. Screening Test for Histamine in Fish. *J. Food Sci.* **48**, 155–157 (1983).
- [3.49] Fairclough, D. L., Saunders, R. D. & Bateman, R. C. A rapid dipstick test for histamine in tuna. *Food Biotechnol.* **9**, 39–57 (1995).
- [3.50] Punakivi, K., Smolander, M., Niku-Paavola, M. L., Mattinen, J. & Buchert, J. Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. *Talanta* **68**, 1040–1045 (2006).
- [3.51] Medda, Rosaria; Padiglia, Alessandra; Floris, Giovanni. Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, 1995, vol. 39, no 1, p. 1-9.4.
- [3.52] Mukherjee, Arnab, et al. Inner-sphere mechanism for molecular oxygen reduction catalyzed by copper amine oxidases. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, vol. 130, no 29, p. 9459-9473.

- [3.53] Murakawa, T. *et al.* Probing the catalytic mechanism of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* with halide ions. *J. Biol. Chem.* **290**, 23094–23109 (2015).
- [3.54] Kishishita, S. *et al.* Role of copper ion in bacterial copper amine oxidase: Spectroscopic and crystallographic studies of metal-substituted enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1041–1055 (2003).
- [3.55] P. Pietrangeli, R. Federico, B. Mondovì, and L. Morpurgo, “Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 101, no. 7, pp. 997–1004, 2007, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.03.014.
- [3.56] C. Eaborn, “Compendium of chemical Terminology: IUPAC Recommendations,” *J. Organomet. Chem.*, vol. 356, no. 2, pp. C76–C77, 1988, doi: 10.1016/0022-328x(88)83113-9
- [3.57] A. Cogon, R. Farci, R. Medde, A. Rinaldi, and G. Floris, “Amine Oxidase From *Lathyrus Cicera* And *Phaseolus Vulgaris*: Purification And Properties,” *Prep. Biochem.*, vol. 19, no. 2, pp. 95–112, 1989, doi: 10.1080/10826068908544901.
- [3.58] S. Longu, A. Mura, A. Padiglia, R. Medda, and G. Floris, “Mechanism-based inactivators of plant copper/quinone containing amine oxidases,” *Phytochemistry*, vol. 66, no. 15, pp. 1751–1758, 2005, doi: 10.1016/j.phytochem.2005.06.013.
- [3.59] A. Padiglia *et al.*, “The reductive and oxidative half-reactions and the role of copper ions in plant and mammalian copper-amine oxidases,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, no. 1, pp. 35–42, 2001, doi: 10.1002/1099-0682(20011)2001:1<35::aid-ejic35>3.0.co;2-#.
- [3.60] A. Padiglia *et al.*, “The reductive and oxidative half-reactions and the role of copper ions in plant and mammalian copper-amine oxidases,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, no. 1, pp. 35–42, 2001, doi: 10.1002/1099-0682(20011)2001:1<35::aid-ejic35>3.0.co;2-#.

# Capítulo 4

## Experimental





## 4.1. Reactivos y materiales

En este capítulo se van a describir todos los reactivos, materiales, instrumentos y procedimientos desarrollados a lo largo de la tesis.

### 4.1.1. Reactivos

- ✓ 2,2'-azino-bis(3-etilbenzolona-6-sulfónico) (ABTS) como sal de amonio de pureza  $\geq 98\%$  (CAS 30931-67-0) de Sigma-Aldrich.
- ✓ 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) de pureza  $\geq 99\%$  (CAS 54827-17-7) de Sigma-Aldrich.
- ✓ Ácido tetracloroaurico (CAS 27988-77-8) sólido de pureza 99,995% de Sigma-Aldrich.
- ✓ Ácido tricloroacético de Scharlab. Se prepara en disolución al 5%.
- ✓ Celulosa de diferentes casas comerciales.
  - A: Aldrich 310697. Celulosa microcristalina de 20  $\mu\text{m}$ . Grado de polimerización  $< 350$ .
  - B: Aldrich 11365 Avicel PH101. Celulosa microcristalina de 50  $\mu\text{m}$ . Grado de polimerización  $< 350$ .
  - C: Macherey Nagel and Co 815050.1. Celulosa nativa de longitud de fibra entre 20 y 75  $\mu\text{m}$ . Grado de polimerización promedio entre 620 y 680
  - D: Macherey Nagel and Co 815060. Celulosa nativa de longitud de fibra entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ . Grado de polimerización promedio entre 620 y 680.
  - E: Sigma Aldrich 22,184. Celulosa de longitud de fibra en 20 y 250  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Catalasa de hígado bovino (EC 1.11.1.6) de  $\geq 10000 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de sólido liofilizado de Sigma-Aldrich.
- ✓ Clorhidrato de tiramina (CAS 60-60-19) de pureza  $\geq 98\%$  de Sigma-Aldrich

- ✓ Diamino oxidasa (EC 1.4.3.6) de extracto de planta (*Lathirus cicera*) disuelto en disolución amortiguadora 50 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> pH 6 de ≈ 200 U·ml<sup>-1</sup>.
- ✓ Diclorhidrato de putrescina (CAS 333-93-7) de pureza ≥ 98% de Sigma-Aldrich
- ✓ Diclorhidrato de cadaverina (CAS 1476-39-7) de pureza ≥ 98% de Sigma-Aldrich
- ✓ Diclorhidrato de histamina (CAS 56-92-8) de pureza ≥ 98% de Sigma-Aldrich
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) de pureza 99,9% de Panreac.
- ✓ Peroxidasa de rábano picante (HRP) (EC 1.11.1.7) de ≈ 150 U·mg<sup>-1</sup> de sólido liofilizado de Sigma-Aldrich
- ✓ Peróxido de hidrógeno de pureza 33% (m/v) de Panreac.
- ✓ Sales de NaHCO<sub>3</sub> y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> grado ACS de Sigma-Aldrich.
- ✓ Sales de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> grado ACS de Sigma-Aldrich y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de pureza 99% de Panreac.
- ✓ Seroalbúmina bovina (BSA) (EC 232.936.2) de Sigma Aldrich.
- ✓ Tiramina oxidasa (EC 1.4.3.6) de *Arthrobacter sp.* de 4,6 U·mg<sup>-1</sup> de sólido liofilizado de Sekisui Diagnosis.
- ✓ Tris(2,2'-bipiridin)diclororutenio(II) hexahidrato de pureza 97% de Sigma-Aldrich.
- ✓ Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) (CAS 201-064-4) de Panreac.

#### 4.1.2. Materiales

A lo largo de la esta tesis se ha utilizado el siguiente material de laboratorio:

- ✓ Micropipetas Socorex
- ✓ Cubetas de vidrio, cuarzo y plástico de 1 cm de paso óptico.
- ✓ Centrífuga MiniSpin eppendorf
- ✓ pH-metro CRISON, Basic 20

## Capítulo 4. Experimental

- ✓ Centrifuga LOCH, Bunsen
- ✓ Balanza analítica AND modelo GR-202 (resolución 0,01 mg hasta 42 g)
- ✓ Sephadex G-100.
- ✓ Filtros de centrifuga Amicon Ultra - 0,5/4 mL (UltraCell-10K Membrane), Millipore.
- ✓ Material desechable (eppendorf, puntas de micropipeta, tubos falcon, pipetas pasteur...)
- ✓ Material de vidrio (vidrio de reloj, vasos de precipitados, matraces aforados, probetas)
- ✓ Agitador magnético A-01-SBS
- ✓ Tiras reactivas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quantofix 913-19)

### 4.2. Instrumentación

#### 4.2.1. Espectrofotómetros de Absorción Molecular UV-Vis

Las medidas de absorción molecular se han realizado utilizando dos equipos diferentes: espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible y espectrofotómetro Specord 210 plus.

El Agilent 8453 UV-visible (figura 4.1) permite medir entre 190 y 1100 nm utilizando dos lámparas, wolframio y deuterio, con una rendija de 1 nm. Contiene un red de fotodiodos (PDA) situado posteriormente al compartimento de muestra y una red de difracción. Al tratarse de un equipo de óptica inversa, a la cubeta le llega el haz de luz completo, en ocasiones es necesario añadir al sistema un filtro de corte de 400 nm, para impedir que lleguen longitudes de onda del UV a la muestra y se produzcan procesos de fotooxidación que puedan modificar los compuestos de interés.

Este instrumento lleva acoplado un módulo Peltier de HP modelo 89090A que permite hacer las medidas agitando y controlando la temperatura en la cubeta.



*Figura 4.1: Agilent 8453 UV-Visible*

Por otro lado, se ha utilizado el Specord 210 plus (figura 4.2), sobre todo, para poder realizar medidas cinéticas con varias cubetas a la vez, ya que tiene un portacubetas con capacidad para 8 cubetas. En este caso, el equipo permite medir entre 185 y 1200 nm, con dos lámparas de wolframio y deuterio, al igual que el Agilent, sin embargo las rendijas son variables y se pueden escoger (0,2; 0,5; 1; 2 o 4 nm). Este equipo es de doble haz, con un monocromador con rejilla holográfica. Además permite acoplarle un baño de refrigerante para controlar la temperatura.

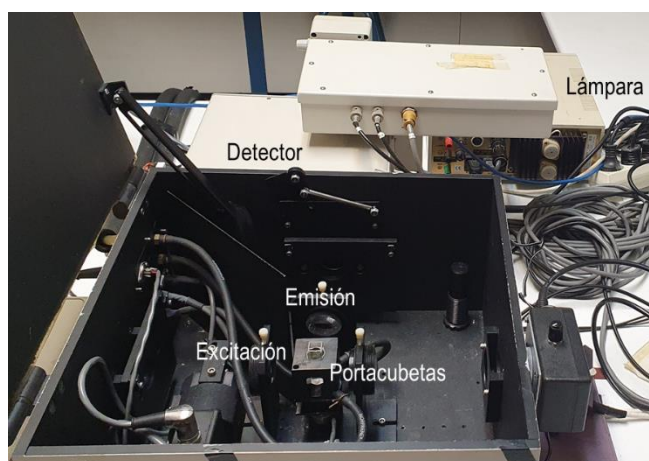


*Figura 4.2: Specord 210 plus*

#### 4.2.2. Luminómetros

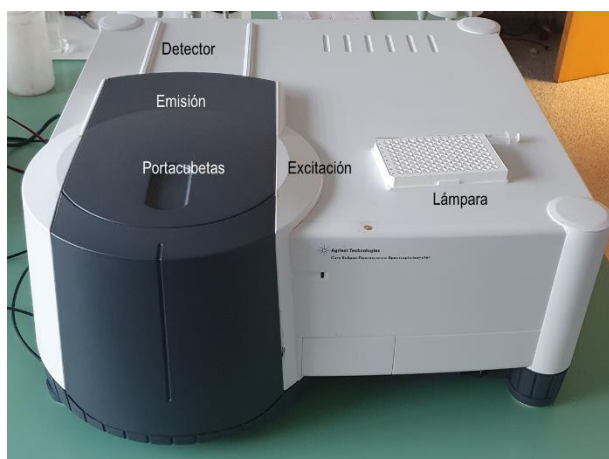
Las medidas de fluorescencia a lo largo de la tesis se han realizado utilizando dos equipos diferentes: un TimeMaster TM-2/2003 de PTI (Photon Technology Internacional) y un Cary Eclipse de Agilent.

El TimeMaster es un equipo modular que posee una lámpara de xenón de 70 W con un detector fotomultiplicador; en la figura 4.3 se muestra el compartimento de muestras del equipo. Las rendijas de los monocromadores, tanto de excitación como de emisión, así como el voltaje de la lámpara se pueden ajustar según las necesidades. Además es posible acoplarle un baño termostatzado para poder controlar la temperatura.



*Figura 4.3: Compartimento de muestra del PTI*

El Cary Eclipse (figura 4.4) es un equipo compacto que dispone una lámpara de xenón pulsada con voltaje 8 W. Todos los demás parámetros instrumentales (rendijas y voltaje del fotomultiplicador) son variables y elegibles por el usuario.



*Figura 4.4: Espectrofotómetro Cary Eclipse*

#### **4.2.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Las imágenes de las nanopartículas y nanoclusters, en discontinuo, expuestas en la sección III han sido realizadas por el microscopio electrónico Tecnai F30 (FEI), con voltajes de trabajo de 200 y 300 kV. Todas las medidas realizadas en este equipo fueron realizadas por el grupo de Microscopías Avanzadas, LMA, de la Universidad de Zaragoza.

#### **4.2.4. Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

Las imágenes de las nanopartículas y nanoclusters, en continuo, se han hecho utilizando un AFM Multimode 8 provisto de una unidad de control Nanoscope V de Veeco, operando en modo "Tapping". Las imágenes fueron tomadas con una velocidad 0,5-1,2 Hz en condiciones ambientales.

#### **4.2.5. Voltametría cíclica**

Las medidas de voltametría cíclica se llevaron a cabo usando potenciostato mAUTOLABIII/FRA2 (de Methrom). En el que se incorporaron los siguientes

electrodos: Pt microcristalino (Trabajo), Pt (Auxiliar) y Ag/AgCl/NaCl 3M (Referencia). Los barridos se realizaron entre diferentes rangos de potenciales, generalmente a una velocidad de 20 mV/s.

### 4.3. Procedimientos

#### 4.3.1. De medida

##### 4.3.1.1. *Absorción molecular*

Para las medidas de absorción molecular se utiliza una cubeta (ver apartado 4.1.2) en el caso del Agilent y dos cubetas en el caso del Specord. La manera de preparar las cubetas de reacción es similar; se añade el volumen de disolución amortiguadora necesario para alcanzar 2 mL tras haber restado los volúmenes que se van a añadir de los demás componentes. De manera general, los reactivos que se van a añadir a la cubeta se han preparado con una concentración que permita adicionar 20  $\mu\text{L}$  y así se diluyan siempre 1:100. En alguna ocasión se han añadido 50  $\mu\text{L}$ , ya que las disoluciones de partida eran más diluidas y no se podían concentrar (muestras de atún).

La diferencia entre los dos equipos es que en el Agilent se hace el blanco con una cubeta al comienzo de las medidas y en el Specord son necesarias dos cubetas para realizar el blanco. Además en el Specord, se deja una de las cubetas de referencia durante las medidas.

##### 4.3.1.2. *Fluorescencia*

Las medidas de fluorescencia se han realizado utilizando un procedimiento similar al descrito en el apartado anterior. Se añade el volumen de disolución amortiguadora a utilizar para alcanzar 2 mL totales tras haber restado los volúmenes de los demás componentes de la reacción (20  $\mu\text{L}$  de cada uno de ellos). Posteriormente se eligen los parámetros instrumentales ( $W_{\text{ex}}$ ,  $W_{\text{em}}$ ,  $\lambda_{\text{em}}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}$  y  $V$ ).



#### 4.3.1.3. *Medida del consumo del O<sub>2</sub> (método fluorimétrico)*

A lo largo de la tesis se ha medido el consumo de O<sub>2</sub> durante diferentes reacciones enzimáticas. Estas medidas sirven para esclarecer la especificidad de las enzimas utilizadas por diferentes analitos, ya que estas enzimas utilizan el O<sub>2</sub> como regenerante del centro activo, por lo que la velocidad con la que éste se consume sirve para relacionarlo con la cinética específica de la enzima en cuestión según los analitos adicionados.

Para poder medir el consumo de O<sub>2</sub> se utiliza una sal de rutenio (II), en este caso, tris(2,2'-bipiridin)diclororutenio(II) hexahidrato (figura 4.5A). Los espectros de excitación y emisión de este compuesto son los que se muestran en la figura 4.5B. Como puede observarse tiene un máximo de excitación a 450 nm y de emisión a 610 nm. El método se basa en que el O<sub>2</sub> actúa como desactivador (“quencher”) de la fluorescencia del compuesto de Ru, por lo que conforme se va consumiendo, la fluorescencia del compuesto aumenta.

Experimentalmente, se adiciona esta sal de Ru(II) a una cubeta de reacción que incluya una enzima oxidorreductasa al pH específico que se quiera estudiar. Posteriormente se mide la emisión a 610 nm (excitando a 450 nm) en continuo a lo largo del tiempo, para establecer la señal base del Ru(II) adicionado. Una vez que la señal es estable, se añade el analito, que comenzará a consumir O<sub>2</sub> por el propio ciclo catalítico de la enzima, lo que originará un aumento de fluorescencia. La velocidad con la que aumenta la fluorescencia refleja la cinética de reacción de la enzima con el analito adicionado.

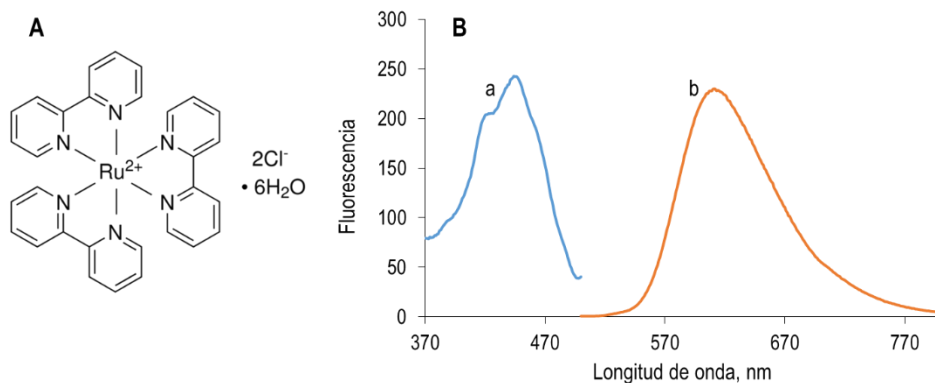


Figura 4.5: **A.** Estructura molecular de la sal de Ru(II). **B.** Espectros de excitación y emisión de la sal de Ru(II) a pH 7 con  $r_{exc} = r_{em} = 10$  nm. a) Espectro de excitación a 610 nm, b) espectro de emisión a 450 nm.

#### 4.3.1.4. Medida visual del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con tiras reactivas

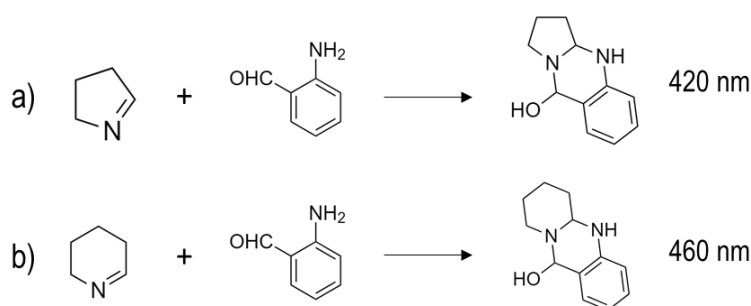
Para comprobar la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o la eliminación de los mismos por la acción de la catalasa se han utilizado tiras de peróxido comerciales. Para su utilización se vierten 10 μL en la zona de celulosa. Se deja reaccionar 1 minuto y se compara con la escala proporcionada por el fabricante. En la figura 4.6 se muestra una de estas pruebas. También es posible medir de forma semicuantitativa alguna amina biógena; para ello es necesario añadir previamente a la tira un pequeño volumen de la disolución de la enzima (DAO, TAO) entre 5 y 10 μL de una concentración aproximada de 100 U·mL<sup>-1</sup>



Figura 4.6: Tiras de peróxido Quantofix a las que se les ha adicionado 10 μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de concentración  $2,9 \cdot 10^{-4}$  M

**4.3.1.5. Medida de la Put y Cad por el método del o-aminobenzaldehído: productos cíclicos de la reacción de la DAO.**

La reacción de la DAO con putrescina y cadaverina permite realizar la desaminación oxidativa de un grupo amino a aldehído en ambas diaminas, obteniéndose inicialmente el 4-aminobutanal y el 5-aminopentanal respectivamente. Posteriormente estos productos pueden ciclar de manera espontánea, mediante el ataque interno del grupo amino al carbono del aldehído, formándose el 1-pirrolina y el 1-piperideína respectivamente. Estos productos pueden formar un compuesto coloreado al hacerlos reaccionar con o-aminobenzaldehído. Los compuestos formados presentan máximos de absorción a 420 y 460 nm y son los que se muestran en la figura 4.7.



*Figura 4.7: Compuestos cíclicos formados tras la condensación de los productos de la reacción de la DAO con putrescina (a) y cadaverina (b).*

Para ello, en la cubeta de reacción en la que se encuentra la DAO y putrescina o cadaverina a pH 7, se adiciona  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M de o-aminobenzaldehído, siguiendo la reacción mediante espectros de absorción molecular registrados cada 3 segundos.

### 4.3.2. Específicos de trabajo

#### 4.3.2.1. *Obtención de los productos de la oxidación de Put, Cad e His por acción de la DAO*

Los productos de la oxidación de putrescina, cadaverina e histamina con la DAO no son comerciales, por lo que es necesario poder generarlos y aislarlos para poder utilizarlos en diferentes ensayos.

Para ello se ha mezclado DAO ( $0,5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) con cada una de las aminas por separado ( $5\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) en presencia de catalasa ( $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) para eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado durante la reacción enzimática. Debido a que la reacción enzimática se quedaría bloqueada una vez que se consume el  $\text{O}_2$  disuelto, se borbotea una corriente de  $\text{O}_2$  de manera continua durante 30 minutos. Durante este tiempo la enzima es capaz de reaccionar completamente con las aminas adicionadas, formándose la misma cantidad de producto, ya que la estequiometría entre ambos compuestos es 1:1.

Una vez finalizada, en la mezcla de reacción sólo hay producto, DAO y catalasa, ya que se ha comprobado mediante una tira reactiva de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que este subproducto ha sido eliminado. Para eliminar las enzimas se centrifuga utilizando un centricon de 10 KDa toda la mezcla de reacción. Las enzimas no pasan por el filtro porque su peso molecular es mayor a 10 KDa.

#### 4.3.2.2. *Separación del $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$ en columna de Sephadex.*

La separación del  $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$  se realizó una columna de vidrio de 13 cm de largo y 1 cm de diámetro, rellena de Sephadex G-100. El eluyente (disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 M pH 6) se hace circular mediante una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson) a una velocidad de  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ . La salida de la columna se encuentra conectada a una celda de flujo para la medida de la

absorbancia con el espectrofotómetro Agilent. El volumen de muestra adicionada en la columna fue de 100  $\mu\text{L}$ .

#### **4.3.2.3. Preparación soportes de celulosa**

Para preparar los soportes de celulosa se han utilizado tapas de placas de 96 pocillos, ya que poseen una superficie circular delimitada sobre la que depositar la dispersión de celulosa para su posterior secado. El procedimiento es el mismo independientemente de la celulosa utilizada, sin embargo difiere según sea para soportes con celulosa sin estabilizante o con estabilizante.

##### **A) Soportes sin estabilizante**

Sobre una dispersión del 3 % (p/v) de celulosa en disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 M pH 6, se añade TMB disuelto en DMSO y HRP. La concentración de TMB y HRP deben ser 0,4 mM y 0,6  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente. Una vez que se han mezclado correctamente, se depositan 75  $\mu\text{L}$  de esta dispersión sobre la superficie circular de la tapa. Posteriormente, esta tapa es introducida en un incubador para su secado a 35°C durante 1 hora.

Una vez que se obtienen los soportes, la DAO se adiciona 30 segundos antes de ser usados, adicionando 10  $\mu\text{L}$  de una disolución 100  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Por último se adicionan 5  $\mu\text{L}$  de la muestra a analizar.

##### **B) Soportes con estabilizante**

Sobre una dispersión del 3 % (p/v) de celulosa en disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 M pH 6, se añade TMB disuelto en DMSO con una concentración de 0,4 mM. Posteriormente se depositan 75  $\mu\text{L}$  de esta dispersión sobre la superficie circular de la tapa y se introducen en el incubador a 35°C durante 1 hora. Después se añaden 10  $\mu\text{L}$  de DAO (100  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y 10  $\mu\text{L}$  de HRP (0,6  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A los 30 segundos se añaden 10  $\mu\text{L}$  del estabilizante (según convenga). Por último se

introducen en una bolsa con un desecante y se guardan hasta su uso en un frigorífico. A la hora de utilizarlos, se añadirán 5  $\mu\text{L}$  de la muestra.

#### **4.3.2.4. Eliminación del cobre en aminas oxidasas.**

Para eliminar el Cu(II) de las aminas oxidasas utilizadas en esta tesis, se realiza el siguiente procedimiento:

Se añade la enzima, en la cantidad total deseada, a una disolución de EDTA 0,1 M pH 7 que contiene metilamina (1 mM), en condiciones de atmósfera inerte (flujo de  $\text{N}_2$ ) a 4°C y durante 12 horas con agitación. Por último, se centrifuga esta disolución mediante centrífugas de 0,5 mL con membrana de 10 KDa, quedándose la enzima sin cobre (apo-enzima) en el filtrado superior.

#### **4.3.2.5. Formación de 2-(4-hidroxifenil)acetaldehído**

El producto de la reacción de desaminación oxidativa de la TAO y la tiramina forma el 2-(4-hidroxifenil)acetaldehído. Este producto no se encuentra de manera comercial, por lo que se ha sintetizado de manera experimental para poder realizar ensayos con él. El procedimiento es muy similar al mostrado en el apartado 4.3.1 (productos de la oxidación de la DAO).

Para ello se ha mezclado TAO ( $0,15 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) con tiramina ( $5\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) en presencia de catalasa ( $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) para eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado durante la reacción enzimática. Debido a que la reacción enzimática se quedaría bloqueada una vez que se consume el  $\text{O}_2$  disuelto, se borbotea una corriente de  $\text{O}_2$  de manera continua durante 30 minutos. Durante este tiempo la enzima es capaz de reaccionar completamente con la tiramina adicionada, formándose la misma cantidad de producto, ya que la estequiometría entre ambos compuestos es 1:1.

Una vez finalizada, en la mezcla de reacción sólo hay producto, TAO y catalasa, ya que se ha comprobado mediante una tira reactiva de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que este subproducto

ha sido eliminado. Para eliminar las enzimas se centrifuga utilizando un centricon de 10 KDa toda la mezcla de reacción. Como las enzimas tienen mayor peso molecular que 10 KDa, se quedan la parte superior del centricon.

Para poder comparar este hecho se han realizado dos ensayos con dos alícuotas distintas de este filtrado. En la primera de ellas, se ha añadido tiramina y se deja durante 15 minutos. Posteriormente se comprueba si se han formado  $H_2O_2$ , lo que estaría indicando que quedan trazas de TAO en la mezcla. Al comprobarlo con una tira reactiva de peróxido el resultado es negativo. El otro ensayo es añadir al filtrado  $H_2O_2$ . Se comprueba tanto al principio cual es el color que se observa con una tira reactiva de  $H_2O_2$  como al cabo de 15 minutos. En ambos casos el color observado es muy similar, por lo que queda descartado que haya pasado catalasa, ya que habría eliminado el  $H_2O_2$  adicionado.

Con todo ello, queda comprobado que esta forma de síntesis es eficaz para poder tener alícuotas de concentración prácticamente conocida de 2-(4-hidroxifenil)acetaldehído.

### **4.3.3. De tratamiento de muestra**

#### ***4.3.3.1. Muestras de atún***

Las muestras de atún utilizadas para validar los métodos desarrollados en esta tesis fueron cedidas por el Servicio de Salud Pública (LSP) de la Diputación General de Aragón (DGA). Estas muestras han sido preparadas utilizando el siguiente procedimiento de análisis, usando un método validado [4.1] usado en el LSP. Para ello, se toman 2,5 g de atún y se mezclan con 20 mL de ácido tricloroacético (5%). Posteriormente se adicionan 100  $\mu$ L de patrón interno (diclorohidrato de histamina deuterada, d4 100  $mg \cdot L^{-1}$ ). Esta mezcla se agita manualmente durante 30 segundos, luego se le aplica ultrasonidos durante 10 minutos y por último se

centrifuga a 4°C a 4000 rpm durante otros 10 minutos. La disolución resultante se filtra y se lleva a un volumen de 50 mL con ácido tricloroacético (5%).

Para la estandarización de la muestra, el LSP siguió el procedimiento descrito y posteriormente inyectó 10 µL del extracto en el equipo de HPLC-MS-MS, obteniéndose las siguientes concentraciones de aminas biógenas (tabla 4.1):

Tabla 4.1: Concentraciones de aminas biógenas en las muestras de atún proporcionadas por el LSP.

Aminas	Put	Cad	His	Tyr	Tryp	FEA
C, mg·kg <sup>-1</sup>	100 ± 11	380 ± 19	900 ± 40	300 ± 22	20 ± 2,2	50 ± 5,6

#### 4.3.3.2. Elección de muestras de queso

Para aplicar los métodos enzimáticos desarrollados a lo largo de la tesis, se ha realizado un *screening* previo de 4 quesos para saber cuál de ellos tiene mayor cantidad de tiramina. Para ello se modificaron unas tiras reactivas de peróxido adicionando diferentes cantidades de TAO sobre su superficie. Previamente se comprobó la reactividad de las mismas con tiramina, obteniéndose la mejor señal colorimétrica cuando se añadían 0,12 U totales sobre la tira y se deja secar durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Estas tiras se introdujeron directamente en los trozos de queso, además se realizaron blancos con tiras de peróxido en las que no se había adicionado TAO. De los 4 quesos ensayados (Emmental, Gouda, Cheddar y Azul), el único que presentó señal apreciable fue el Emmental, por lo que fue el queso elegido como óptimo para ser utilizado como muestra real.

#### 4.3.3.3. Preparación muestras de queso

Para la preparación del extracto de aminas biógenas obtenidas a partir de una muestra real de queso, se tomó una placa de queso Emmental, se cortó en trozos y



se trituró utilizando una trituradora hasta obtener un sólido fino homogéneo. De esta muestra granulada se tomaron 10 g y se adicionaron 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (w/v). Esta mezcla se agita vigorosamente durante 30 minutos para maximizar el proceso de extracción de las aminas a la parte acuosa. Una vez finalizada la extracción, se centrifuga durante 20 minutos a 5000 rpm a una temperatura de 4°C. Esta temperatura ayuda a que la grasa extraída anteriormente forme una capa semisólida en la parte superior del falcon y sea más fácil su eliminación. El sobrenadante se recoge y se ajusta el pH mediante la adición de NaOH 2 M hasta pH neutro (gota a gota). De nuevo se vuelve a realizar un ciclo de centrifugación durante 20 minutos a 5000 rpm y 4°C. El sobrenadante obtenido, se filtra utilizando un filtro de nailon de 0,45 µm para eliminar cierta turbidez ocasionada por componentes de la matriz. Por último se lleva la disolución resultante a un matraz de 50 mL para su enrase utilizando agua miliQ. En la figura 4.8 se muestra un esquema gráfico del proceso de tratamiento de la muestra hasta su posterior medida en el espectrofotómetro UV-Vis.



*Figura 4.8: Esquema del tratamiento del queso Emmental para la extracción de aminas biógenas.*

#### 4.4. Bibliografía

[4.1] ITE-FQ080-02: determination of biogenic amines by HPLC-MS/MS. Public health laboratory, Government of Aragón (Spain).

# **II**

## **Determinación de aminas biógenas por métodos basados en reactivos colorimétricos orgánicos.**



## **Capítulo 5**

**Problemas asociados a las propiedades ópticas de las enzimas. Necesidad de una reacción indicadora.**



## 5.1. Introducción

Como se ha avanzado en el capítulo 3, las reacciones enzimáticas desarrolladas en esta tesis pueden ser evaluadas mediante el uso de biosensores enzimáticos colorimétricos. La combinación de la selectividad inherente de una reacción enzimática con la sensibilidad y robustez de la absorción molecular UV-visible, conforman un grupo de métodos analíticos muy utilizados para la determinación de compuestos de naturaleza orgánica [5.1]. El campo de aplicación de estos métodos abarca desde el análisis de compuestos de interés clínico hasta el análisis industrial, pasando por el análisis de alimentos o compuestos de interés medioambiental entre otros [5.2].

Desde un punto de vista metodológico, estos métodos se pueden clasificar en dos grupos: 1) uso de las propiedades intrínsecas de las amino oxidasas utilizadas y 2) uso de reactivos auxiliares que generen cambios espectroscópicos, asociados a un cambio de color (capítulos 6 y 7). En ambos casos, los cambios producidos durante la reacción enzimática son los que se relacionan con la cantidad de ABs y por tanto son los que permiten la determinación de las mismas. En la figura 5.1 se representa un esquema general de ambas metodologías, donde los círculos de color marcan los cambios espectroscópicos que sirven para seguir la reacción.

Estudios previos realizados en esta tesis para la determinación de dopamina mediante el uso de propiedades intrínsecas de la enzima Lacasa [5.3], así como el uso del cofactor FAD en enzimas oxidoreductasas [5.4] (ver **apéndice 2 sección V**) permitieron establecer una metodología extrapolable al uso de enzimas oxidasas para la determinación de ABs. Para ello se necesita que la enzima sufra un cambio en su centro activo que sea medible mediante espectroscopía de absorción molecular, pudiendo así relacionar estos cambios con la concentración de analito presente durante la reacción. Estos cambios en el centro activo están relacionados

con el grupo prostético o cofactor que posee la enzima en su centro activo. Esta la fue la primera opción que se utilizó durante esta Tesis doctoral.

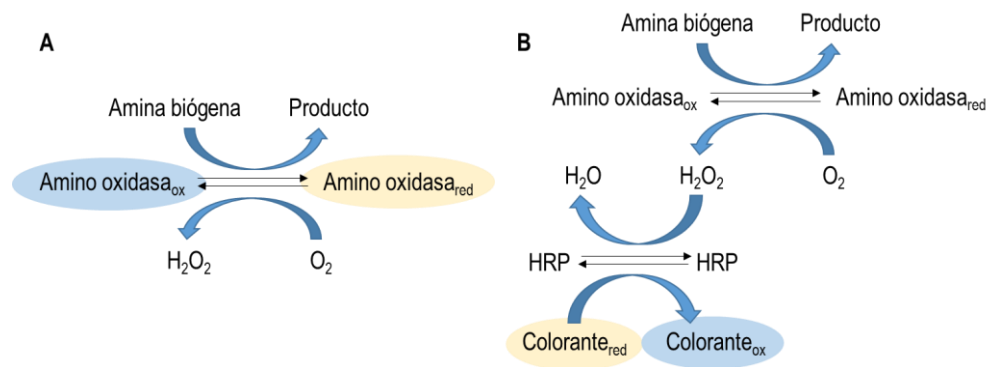


Figura 5.1. **A:** Reacción enzimática general de las Aminas oxidasas. **B:** Acoplamiento de la reacción de la HRP y colorante a la reacción enzimática de las Aminas oxidasas.

## 5.2. Utilización de las propiedades intrínsecas de la DAO

La Diamino oxidasa (DAO) es una enzima oxidorreductasa que es capaz de reaccionar con diaminas como la putrescina o cadaverina. Se han caracterizado y publicado variantes de la DAO procedentes de diversos organismos, con diferentes centros catalíticos. La diferencia fundamental entre ellas radica en su centro catalítico, es decir, en cómo realizan el proceso de óxido-reducción necesario para que los electrones procedentes de la diamina correspondiente, terminen reduciendo al oxígeno molecular para formar peróxido de hidrógeno (figura 5.2). En un principio se ensayó DAO de hígado de cerdo (es la que se suele utilizar en los preparados alimenticios comerciales, que contienen suplemento de DAO); sin embargo, los resultados no fueron buenos, al tratarse de una enzima muy poco activa y poco soluble, que impidió un diseño de método adecuado. Posteriormente se utilizó una DAO de origen vegetal (*Lathirus cicera*), la cual tiene un centro catalítico de cobre coordinado a un grupo prostético TPQ (2,4,5-trihidroxifenilalanina quinona) tal y como se muestra en la figura 5.3 [5.5]; esta fue la enzima que se utilizó a lo largo del trabajo. El mecanismo del proceso de

reducción ocurre en dos pasos. El papel del TPQ en este proceso redox es bien conocido, sin embargo no está tan claro cómo actúa el cobre. Algunos autores defienden la idea de que el Cu(II) es reducido a Cu(I) y es éste el que está involucrado en la reducción del  $O_2$  a  $H_2O_2$ , siendo este un mecanismo de esfera interna. Por otro lado, otros autores defienden la idea de que pueda ocurrir un mecanismo de esfera externa, es decir, que sea el TPQ y no el centro metálico el que está involucrado durante el proceso redox, actuando así el Cu(II) como estabilizante de la especie superóxido ( $O_2^-$ ) que se genera durante el proceso.

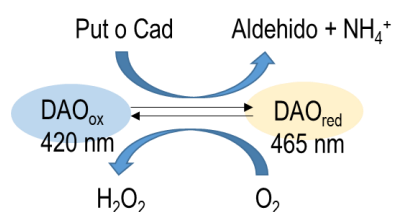


Figura 5.2: Reacción catalítica de la Diamino oxidasa (DAO).

Este mecanismo no es sería exclusivo de la DAO vegetal utilizada, sino que también la TAO utilizada a partir del capítulo 9 utilizaría este mismo mecanismo, ya que posee los mismos cofactores que la DAO (TPQ y Cu(II)).



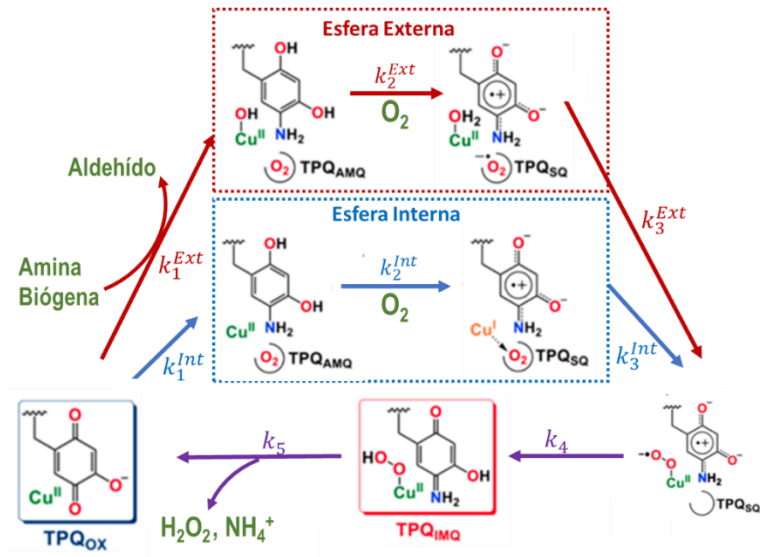


Figura 5.3: Mecanismo del centro catalítico de enzimas con centro de  $\text{Cu(II)}$  y TPQ.  
[5.5]

La DAO, en su estado oxidado, presenta una banda de absorción característica a 420 nm debido al entorno del centro activo. Cuando pasa a su estado reducido, debido a la reacción con las diaminas, presenta un espectro característico en torno a 465 nm [5.6].

Estas propiedades espectroscópicas son interesantes a la hora de plantear una plataforma biosensora utilizando las propiedades intrínsecas de la enzima, ya que no se necesita de reactivos químicos auxiliares. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos indicaron que los cambios espectrales propios de la enzima sólo fueron observables si se cumplían dos premisas:

1) La cantidad de enzima utilizada es elevada. Esto es necesario porque el coeficiente de absorción molar de la especie reducida de la enzima resultó ser muy pequeño por lo que se necesita una concentración elevada para poder ver la banda del espectro en torno a 465 nm.

2) La cantidad de analito adicionada es alta. Se pudo comprobar que esta condición viene impuesta porque la constante cinética de retorno de la enzima reducida a su estado oxidado por medio del  $O_2$  disuelto en el medio es muy grande ( $k_2$  en el esquema), lo que imposibilita observar ( $2,2 \cdot 10^{-4} M$ ), momento en el cual la enzima se queda bloqueada en su estado reducido y es posible observar la banda a 465 nm (figura 5.4).

En la figura 5.4 se puede ver el resultado que se obtuvo al llevar a cabo la reacción directa de la DAO con Put, en las condiciones óptimas de pH. En ellas se muestra que una concentración de 1 mM de Put genera un cambio total de absorbancia a 465 nm de sólo 0,05 unidades.

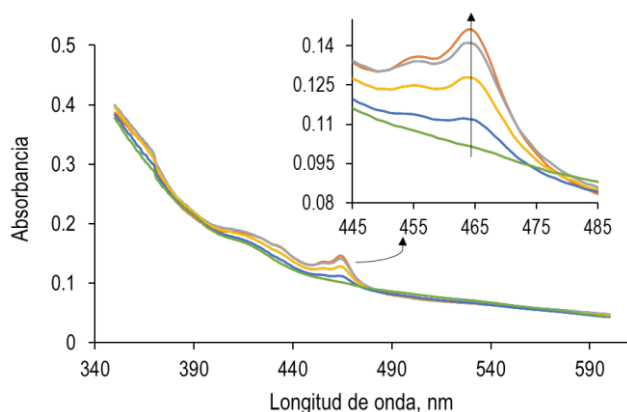


Figura 5.4: Evolución espectral del centro catalítico de la DAO en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  pH 6,5,  $[DAO] 100 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Put] = 1 mM$ .

Con estos resultados no es posible utilizar los cambios espectroscópicos de la DAO como señal analítica de interés, ya que la sensibilidad del método no sería adecuada para poder llevar a cabo determinaciones de aminas biógenas en muestras reales.

Para mejorar la sensibilidad, se planteó acoplar otra enzima, la Peroxidasa (HRP), que al reaccionar con el  $H_2O_2$  formado en la reacción de la DAO sufre

cambios espectroscópicos que pueden utilizarse para la determinación. Los resultados obtenidos se describen en el siguiente apartado.

### 5.3. Utilización de las propiedades intrínsecas de la HRP: sensor de putrescina.

#### 5.3.1. Propiedades intrínsecas de la HRP

La HRP es una hemoproteína que puede ser usada para determinar AB según el esquema que se presenta en la figura 5.5, ya que durante la reacción entre la HRP y  $H_2O_2$ , se obtienen señales transitorias debido al cambio del espectro de absorción de la propia enzima.

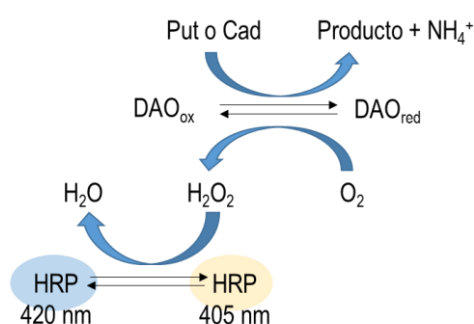


Figura 5.5: Esquema de la reacción acoplada entre DAO-HRP asociada con los cambios espectroscópicos de la HRP.

Previamente en el grupo de investigación se ha estudiado en detalle el mecanismo de la reacción entre la HRP y el  $H_2O_2$ . Los resultados más importantes y que sirven de base para la comprensión de la señal obtenida en este tipo de sensor/método, son los que se muestran a continuación:

1) El centro activo de la HRP es un grupo hemo, con el átomo de hierro central en estado de oxidación +3 (Fe(III)). En estas condiciones la enzima presenta un espectro de absorción molecular con un máximo a 405 nm (figura 5.6, espectro a).

2) El  $H_2O_2$  reacciona con el grupo hemo, oxidando al Fe(III) a un estado virtual de Fe(V) lo que produce un cambio en el espectro (figura 5.6, espectro b). Por ello, tras la mezcla de HRP con  $H_2O_2$  se debería observar un incremento muy grande de absorbancia a 420 nm y un descenso a 405 nm.

3) Una vez oxidado, el Fe(V) puede volver a su estado original mediante un agente externo (por ejemplo, cromógenos como ABTS, TMB y otros) pero también mediante aminoácidos con propiedades redox adecuadas (como tiramina, triptófano). Estos aminoácidos pueden pertenecer a la propia molécula de HRP oxidada (mecanismo de reducción intramolecular) o a otra molécula de enzima (mecanismo intermolecular) [5.7] o de cualquier proteína que haya en el medio. Si esto ocurre, las señales a 405 y 420 nm vuelven a su estado inicial. El cambio global de absorbancia observado a cualquiera de las dos longitudes de onda, durante este proceso de oxidación/reducción de la HRP, es proporcional al  $H_2O_2$  y, en este caso, a la AB que lo ha generado.

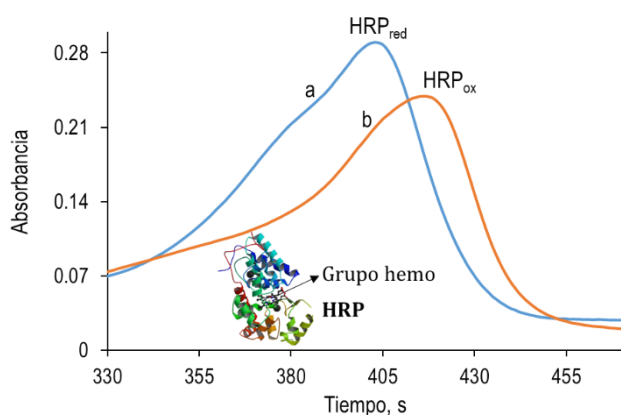


Figura 5.6: Espectros de absorción molecular de las diferentes especies de la HRP. a)  $HRP_{red}$  (405 nm) y b)  $HRP_{ox}$  (420 nm).

Este proceso se puede esquematizar en el diagrama de la figura 5.7, donde HRPII es la forma oxidada, HRP es la forma original (Fe(III)) y los signos + indican

que, como consecuencia del proceso inter o intramolecular, algún aminoácido de la HRP esta oxidado.

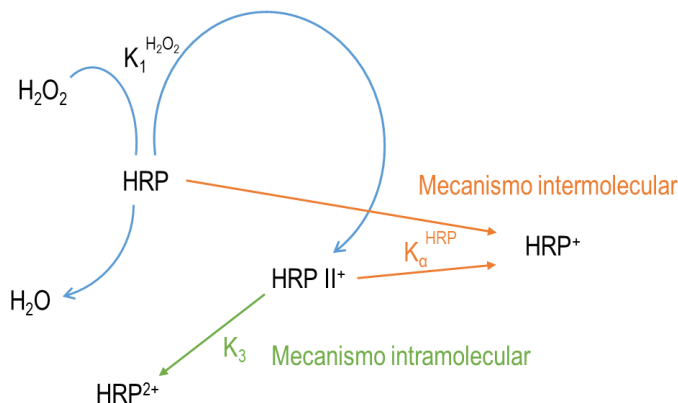


Figura 5.7: Mecanismo simplificado para la reacción HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con exceso de HRP.

En este punto, es necesario realizar una diferenciación según cuál de los componentes (HRP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se encuentran en exceso, ya que los resultados, desde un punto de vista analítico, son totalmente diferentes.

### 5.3.1.1. Exceso de HRP respecto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Al comienzo de la reacción el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona en su totalidad con HRP, formando HRP II<sup>+</sup>, quedando además HRP en disolución (ya que hay exceso). La HRP II<sup>+</sup> se reduce, tanto por el mecanismo intramolecular, como por el intermolecular, produciendo HRP<sup>2+</sup> y HRP<sup>+</sup> respectivamente. Esto hace que las concentraciones de HRP y HRP II<sup>+</sup> decrezcan y las concentraciones de HRP<sup>+</sup> y HRP<sup>2+</sup> aumenten.

Si relacionamos la absorbancia con las especies que intervienen en este proceso, quedaría de la siguiente manera: inicialmente se producirá un aumento de la absorbancia a 420 nm, que será tanto mayor como cuanto mayor sea la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado. Después de este aumento, la absorbancia irá disminuyendo ya que irá desapareciendo la especie HRP II<sup>+</sup> (especie que tiene

mayor  $\epsilon$  a 420 nm). Así pues, se obtienen señales transitorias representando la  $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$  a una de las longitudes de onda del centro activo frente al tiempo, a 405 nm o 420 nm (figura 5.8). Como parámetro analítico se puede utilizar o bien la altura o bien el área de esta señal frente a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Este esquema de reacción se puede acoplar a enzimas que generen  $\text{H}_2\text{O}_2$  como producto, pudiendo determinar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado con las propiedades espectroscópicas intrínsecas de la HRP, y relacionarlo con el analito correspondiente. En este caso, se ha acoplado DAO, que como se ha comentado anteriormente reacciona con las diaminas, putrescina y cadaverina, generando  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

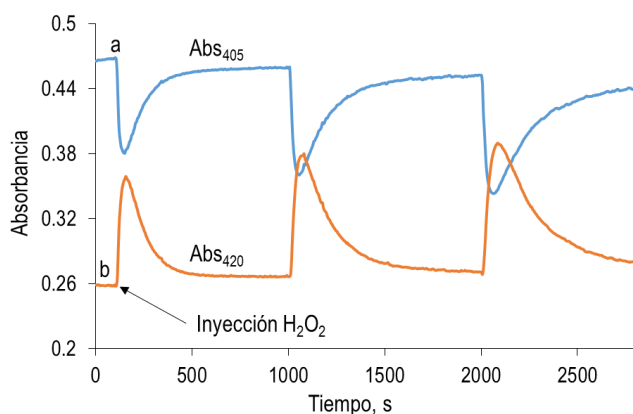


Figura 5.8: Señales de Abs frente al tiempo en disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$  0,1 M pH 6,  $[\text{HRP}] = 25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5.1\cdot 10^{-6} \text{ M}$  a) 405 nm y b) 420 nm

Gracias a esta metodología es posible utilizar el sistema enzimático como base de un biosensor, pudiendo medir en continuo y posibilitando el uso del sistema durante varias medidas.

### 5.3.1.2. Exceso de $\text{H}_2\text{O}_2$ respecto a la HRP

Aunque a través de cualquiera de los dos mecanismos de la figura 5.7 la HRP se regenera, en realidad cada ciclo de oxidación/reducción que sufre la enzima (es

decir, cada vez que un aminoácido regenera al centro activo) hace que la actividad de la HRP disminuya y la reacción se vuelva más lenta. Hay, por tanto, un límite en los ciclos de regeneración.

Para este supuesto, predomina la reducción intramolecular, ya que reacciona toda la HRP disponible con el  $H_2O_2$  y una vez que ha sucedido esto, sigue quedando  $H_2O_2$ , por lo que la única posibilidad es que la HRP oxidada se reduzca mediante su parte proteica. De manera esquemática, el mecanismo sería el que se muestra en la figura 5.9.

Sin embargo, si el exceso de  $H_2O_2$  es muy grande, la enzima quedará finalmente oxidada sin posibilidad de regeneración, por lo que el cambio de señal no informa sobre la concentración de sustrato. Si esto ocurre, la mejor manera de poder plantear un método analítico es utilizando un cromógeno que actúe de reductor externo y que tras la reducción de la HRP  $II^+$  a su estado nativo, cambie de color para poder hacer un seguimiento espectroscópico de la reacción. Esta metodología es la que se desarrolla en los capítulos 6 y 7. Por otra parte en el apartado 5.4, se describen dos cromógenos frecuentemente utilizados en la reacción de la HRP con  $H_2O_2$ .

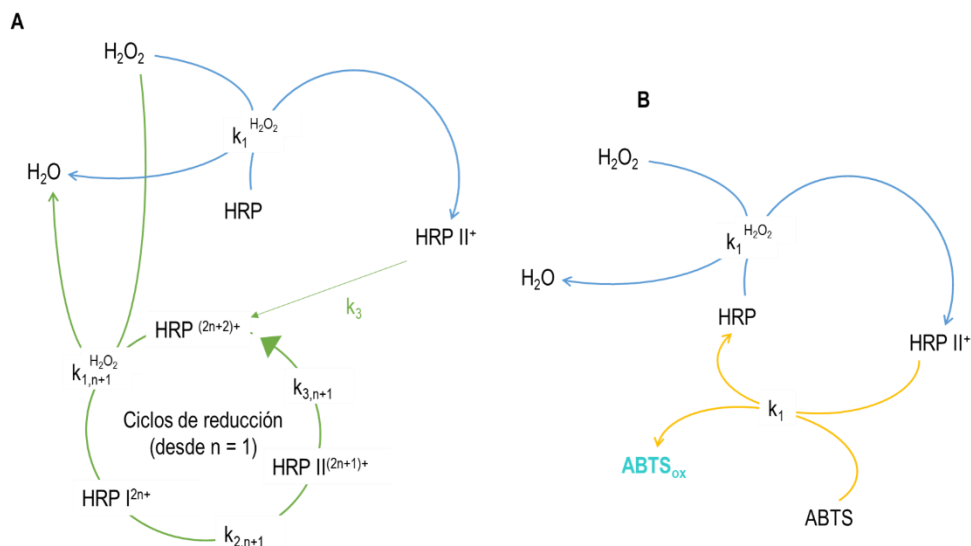
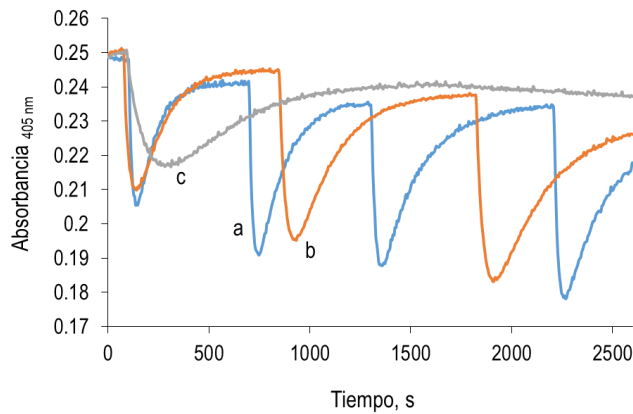


Figura 5.9: **A.** Mecanismo simplificado para la reacción HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
**B.** Mecanismo simplificado para la reacción HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con en presencia de ABTS

### 5.3.2. Método en disolución

Para poder desarrollar un sensor utilizando las propiedades intrínsecas de la HRP, es necesario optimizar la cantidad de DAO a utilizar, ya que es necesario que las aminos adicionadas se conviertan rápido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y así pueda actuar la HRP tal y como lo haría si se adicionasen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> directamente. En la figura 5.10, se observa que una concentración de DAO menor a 2 U·mL<sup>-1</sup> es insuficiente, ya que libera los H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lentamente y el tiempo necesario para retomar el valor inicial es muy largo, sin embargo a partir de 2 U·mL<sup>-1</sup>, apenas se observan diferencias, ya que las señales generadas tras cada adición de putrescina son muy parecidas, por lo que la cantidad óptima de DAO sería 2 U·mL<sup>-1</sup>. La cantidad de HRP y el pH de trabajo no fueron optimizados, ya que se utilizaron valores derivados de trabajos previos [5.8].





*Figura 5.10: Registro cinético de la reacción DAO-Put en presencia de HRP para diferentes concentraciones de DAO, en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 6,  $[HRP] = 47 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Put] = 2,5 \cdot 10^{-6} M$  (en cada adición) y  $[DAO] = a)$  4, b) 2, c)  $1 U \cdot mL^{-1}$ .*

Una vez conocidas las cantidades de HRP y DAO necesarias para poder obtener una señal transitoria con un tiempo de formación aceptable, se han realizado calibraciones para la Put y Cad. En la figura 5.11 se muestran las rectas obtenidas al representar la altura de la señal ( $\Delta Abs_{420 \text{ nm}}$ ) respecto a la concentración de diamina.

De estas calibraciones destacan dos cosas: la primera de ellas es que el rango lineal es corto (menor a un orden de magnitud) y la segunda es que la pendiente de las rectas para Put y Cad son bastante diferentes. Este hecho es sorprendente, ya que la especificidad y sensibilidad de la DAO por las diaminas es muy similar, así que la única opción es que el producto oxidado de la Cad sea regenerado en parte a la HRP, disminuyendo así la señal observable durante su ciclo catalítico.

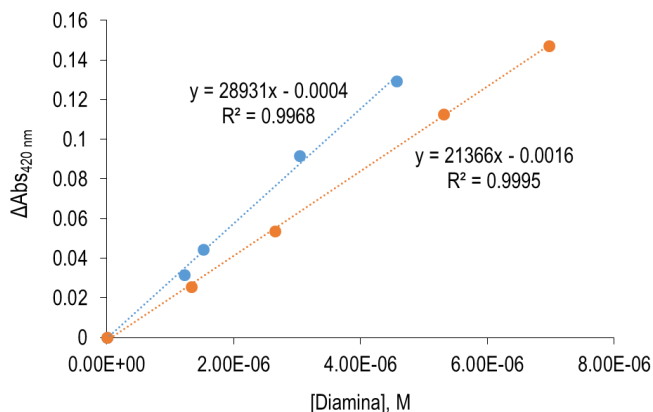


Figura 5.11. Rectas de calibrado de Put y Cad mediante el sistema sensor DAO/HRP midiendo las propiedades intrínsecas de la HRP (420 nm), en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 6,  $[HRP] = 47 U \cdot mL^{-1}$  y  $[DAO] = 2 U \cdot mL^{-1}$

Por último, antes intentar inmovilizar las enzimas en un soporte, es necesario conocer las interferencias que pueden presentarse debido a la His y a la Tir. En el caso de la His, tal y como se observa en la figura 5.12, no afecta a la señal hasta que su concentración es 5 veces superior al conjunto de las diaminas. Esto concuerda con la especificidad de la DAO, ya que reacciona de manera más lenta con His, por lo que es necesario una concentración elevada de ésta para que se generen peróxidos que puedan interferir.

En el caso de la tiramina el efecto es mucho más acusado (figura 5.13). Como puede observarse, la tiramina actúa como regenerante de la HRP, por lo que hace disminuir la señal observable a 420 nm. Esto supone un problema a la hora de implementar este sensor para la determinación de Put y Cad en muestras reales de manera continua.

Para poder solventar este problema se ha optado por añadir un colorante que cambie de color durante la reacción con la HRP (figura 5.1.B). Así, la reducción de la HRP estaría controlada por el colorante y no por la tiramina, eliminando de esta manera la interferencia. Esta metodología es la que se desarrolla en el capítulo 6,

donde se realiza un estudio conciso de la utilización del ABTS como colorante para la reacción de la DAO con diaminas en presencia de HRP.

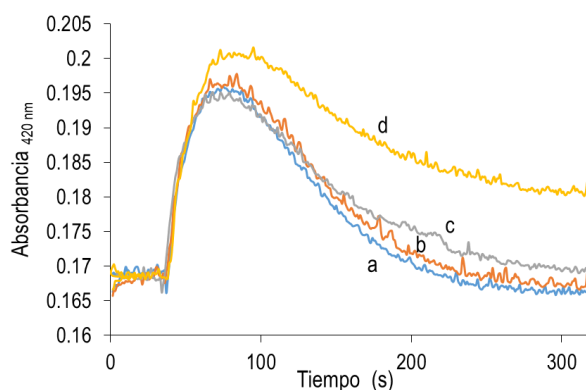


Figura 5.12: Interferencia generada por His en el sistema DAO/AB/HRP en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 6,  $[HRP] = 47 U \cdot mL^{-1}$  y  $[DAO] = 2 U \cdot mL^{-1}$ .  $[Put] = 1,17 \cdot 10^{-6} M$ ,  $[Cad] = 1,06 \cdot 10^{-6} M$ ,  $[His] =$  a) 0 M, b)  $1,1 \cdot 10^{-6} M$ , c)  $5,17 \cdot 10^{-6} M$ , d)  $1,1 \cdot 10^{-5} M$

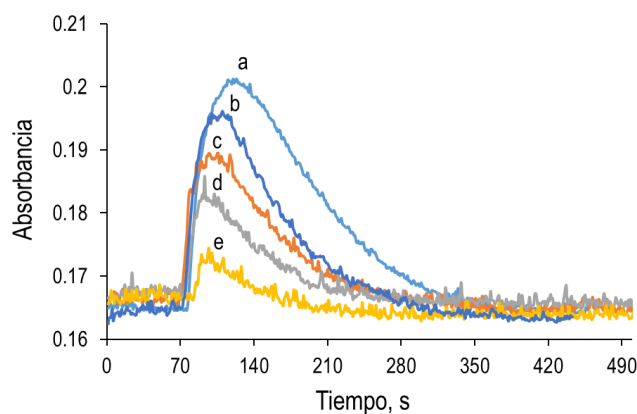


Figura 5.13: Registro cinético a 420 nm de la reacción HRP/DAO/Put en presencia de tiramina. Condiciones experimentales:  $[HRP] = 47 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[DAO] = 1,8 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Put] = [Cad] = 1,2 \cdot 10^{-6} M$ ,  $[Tir] =$  a) 0 M, b)  $5 \cdot 10^{-7} M$ , c)  $1,0 \cdot 10^{-6} M$ , d)  $3,1 \cdot 10^{-6} M$ , e)  $5,2 \cdot 10^{-6} M$ .

## 5.4. Colorantes más frecuentes: ABTS y TMB

Como se ha comentado anteriormente, los métodos enzimáticos colorimétricos más habituales utilizan reactivos auxiliares que permitan el seguimiento de la reacción enzimática principal de manera más sensible. Una de las posibilidades es acoplar a la reacción de la HRP un cromógeno que sea capaz de reaccionar con el centro activo de la enzima tras haber reaccionado con el  $H_2O_2$ , de manera que devuelva a la enzima a su estado redox inicial y cambiando el estado de oxidación del cromógeno el cual en este nuevo estado de oxidación presenta una coloración específica. Los dos cromógenos utilizados en esta tesis son el ABTS y el TMB.

### 5.4.1. ABTS

El ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) es un cromóforo que puede ser oxidado en reacciones enzimáticas que involucren a la enzima peroxidasa (HRP) [30]. Cuando la HRP reacciona con  $H_2O_2$  su centro activo queda oxidado, actuando así como oxidante del ABTS (figura 5.14), que pasa a su forma radicalaria  $ABTS_{ox}$  ( $ABTS^{\cdot+}$ ) con un espectro de absorción característico que presenta máximos de absorción a 430 nm y 730 nm, confiriéndole un color azul-verdoso. Estos cambios espectroscópicos son utilizados como base para la determinación de  $H_2O_2$  mediante métodos colorimétricos enzimáticos. El esquema de la reacción enzimática de la HRP con  $H_2O_2$ , acoplada al uso del ABTS, es el que se representa en la figura 5.15. Además del  $ABTS_{ox}$ , existe otra especie con un estado de oxidación mayor, el  $ABTS_{ox2}$  ( $ABTS^{2+}$ ) que sólo se puede obtener en condiciones muy específicas, como con el uso de oxidantes fuertes o el uso de cantidades elevadas de proteínas [5.9], sin embargo, hasta la fecha este producto no se ha utilizado con fines analíticos.

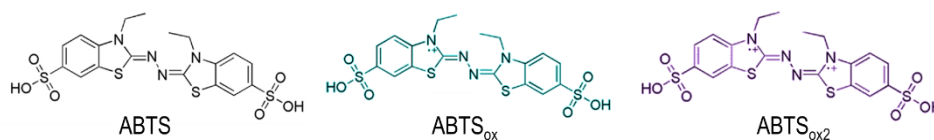


Figura 5.14: Estructuras químicas de las diferentes especies del ABTS según su estado de oxidación. [5.9]

Por otra parte, los usos más extendidos del ABTS<sub>ox</sub> son aquellos que se basan en su capacidad de reaccionar con agentes antioxidantes. En este tipo de ensayos, se mide la capacidad antioxidante de diferentes sustratos, que reaccionan con el ABTS<sub>ox</sub>, haciendo que disminuya la absorbancia a 730 nm [5.10].

Además de estos kits comerciales, también existen otros, que están destinados a medir la actividad de peroxidasas. En este caso, se realiza la reacción de la peroxidasa con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de ABTS. En este tipo de ensayos, se mide el incremento de absorbancia a 730 nm por la formación de ABTS<sub>ox</sub>, relacionando su velocidad de aparición con la actividad de la enzima objeto de estudio [5.11].

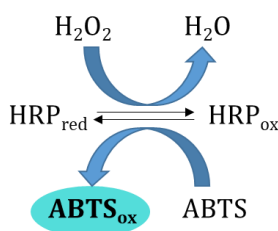


Figura 5.15: Esquema de la reacción entre la HRP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de ABTS y la consecuente formación de ABTS<sub>ox</sub>.

El sistema HRP/ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es utilizado frecuentemente en metodologías analíticas para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o en reacciones enzimáticas acopladas donde se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5.12, 5.13], sin embargo, en la bibliografía hay diferentes aspectos que no están descritos de manera apropiada y que es necesario estudiar para poder obtener las condiciones de reacción óptimas y que el sistema responda de manera controlada.

Lo primero, es preciso establecer cuál es el mecanismo de formación de las especies de ABTS que se generan según las condiciones de medida, ya que el ABTS puede sufrir dos procesos de oxidación como se muestra en la figura 5.16 y cuyas estructuras químicas se han representado en la figura 5.14



*Figura 5.16: Especies químicas del ABTS según su estado de oxidación.*

Cada uno de estos estados de oxidación presenta diferentes propiedades espectroscópicas en absorción molecular. Éstas deben estar bien definidas a la hora de plantear una metodología analítica que utilice las propiedades espectroscópicas de cada uno de los estados de oxidación, y así poder obtener unos resultados que puedan ser interpretados de manera correcta.

A lo largo del capítulo 6 se evalúan las diferentes posibilidades que pueden aportar los diversos estados de oxidación del ABTS, así como las limitaciones de cada uno de ellos. Además se desarrolla una metodología analítica para el uso de estas especies en la determinación colorimétrica de aminas biógenas en una muestra real de extracto de atún conferida por el Servicio de Salud Pública de Aragón.

#### **5.4.2. TMB**

El TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) es un cromógeno que actúa de la misma manera que el ABTS, es decir, reacciona con el centro activo de la enzima mediante un proceso redox que forma una especie coloreada (650 nm). Esta especie coloreada se forma mediante un complejo de transferencia de carga, tal y como se muestra en el esquema de la figura 5.17 [5.14]. El color formado utilizando el TMB

se visualiza mejor en tiras de celulosa, por lo que su uso en la presente tesis está focalizado en su implementación como colorante en tiras reactivas (capítulo 7).

El mecanismo de formación del TMB según el pH de trabajo y las condiciones experimentales (en disolución) ha sido desarrollado de manera paralela en el grupo de investigación [5.15]. La figura 5.17 muestra las reacciones de oxidoreducción del TMB, así como los espectros asociados a cada una de las especies.

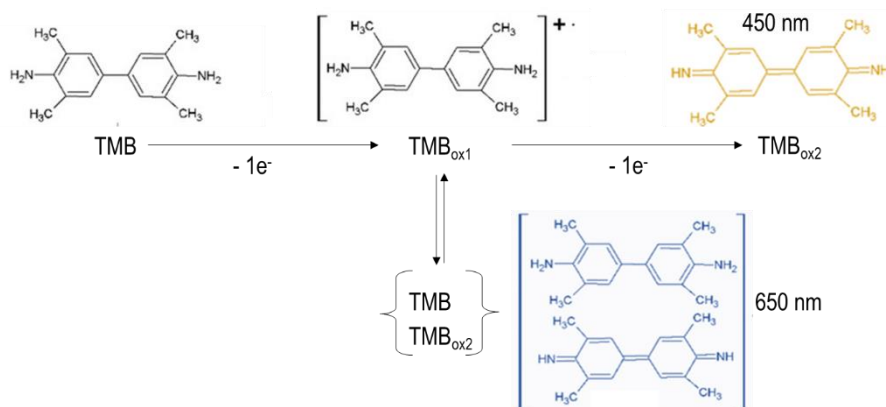


Figura 5.17. Esquema de las diferentes especies del TMB con sus correspondientes espectros de absorción molecular.

## 5.5. Bibliografía

- [5.1] Chen, C., & Wang, J. (2020). Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review. *Analyst*, 145(5), 1605-1628.
- [5.2] Chen, Y. T., Lee, Y. C., Lai, Y. H., Lim, J. C., Huang, N. T., Lin, C. T., & Huang, J. J. (2020). Review of integrated optical biosensors for point-of-care applications. *Biosensors*, 10(12), 209
- [5.3] J. Navarro, J. Galbán, and S. De Marcos, "A label-free platform for dopamine biosensing," *Bioanalysis*, vol. 10, no. 1, pp. 11–21, 2018, doi: 10.4155/bio-2017-0161.
- [5.4] J. Galbán, I. Sanz-Vicente, J. Navarro, and S. De Marcos, "The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: A review," *Methods Appl. Fluoresc.*, vol. 4, no. 4, 2016, doi: 10.1088/2050-6120/4/4/042005.
- [5.5] D. A. Quist, D. E. Diaz, J. J. Liu, and K. D. Karlin, "Activation of dioxygen by copper metalloproteins and insights from model complexes," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 22, no. 2–3, pp. 253–288, 2017, doi: 10.1007/s00775-016-1415-2.
- [5.6] P. Pietrangeli, S. Nocera, R. Federico, B. Mondovi, and L. Morpurgo, "Inactivation of copper-containing amine oxidases by turnover products," *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, no. 1, pp. 146–152, 2004, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03913.x.
- [5.7] V. Sanz, S. De Marcos, J. R. Castillo, and J. Galbán, "Application of molecular absorption properties of horseradish peroxidase for self-indicating enzymatic interactions and analytical methods," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 3, pp. 1038–1048, 2005, doi: 10.1021/ja046830k.
- [5.8] V. Sanz, S. de Marcos, and J. Galbán, "A reagentless optical biosensor based on the intrinsic absorption properties of peroxidase," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 6, pp. 956–964, 2007, doi: 10.1016/j.bios.2006.04.008.
- [5.9] G. Gramss, "Formation of the Azodication (ABTS<sub>2</sub><sup>+</sup>) from ABTS [2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)] in Sterile Plant Cultures: Root-Exuded Oxidoreductases Contribute to Rhizosphere Priming," *Soil Syst.*, vol. 2, no. 2, p. 26, 2018, doi: 10.3390/soilsystems2020026.



- [5.10] M. B. Arnao, A. Cano, and M. Acosta, "The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity," *Food Chem.*, vol. 73, no. 2, pp. 239–244, **2001**, doi: 10.1016/S0308-8146(00)00324-1.
- [5.11] D. C. Goodwin, I. Yamazaki, S. D. Aust, and T. A. Grover, "Determination of rate constants for rapid peroxidase reactions," *Anal. Biochem.*, vol. 231, no. 2, pp. 333–338, **1995**, doi: 10.1006/abio.1995.0059.
- [5.12] N. Majkibsingh, M. Stojanov, S. Spas, and I. Berkes, "Spectrophotometric determination of serum uric acid by an enzymatic method with," vol. 16, 1981.
- [5.13] H. Cai *et al.*, "Multi-wavelength spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water with peroxidase-catalyzed oxidation of ABTS," *Chemosphere*, vol. 193, pp. 833–839, **2018**, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.091.
- [5.14] P. D. Josephy, T. Eling, and R. P. Mason, "The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates," *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 7, pp. 3669–3675, **1982**, doi: 10.1016/s0021-9258(18)34832-4.
- [5.15] S. Oliver, S. de Marcos, I. Sanz-Vicente, V. Cebolla, and J. Galbán, "Direct minimally invasive enzymatic determination of tyramine in cheese using digital imaging," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1164, **2021**, doi: 10.1016/j.aca.2021.338489.

## **Capítulo 6.**

# **Estudio crítico de las posibilidades analíticas del ABTS y su uso para la determinación de putrescina y cadaverina.**



### 6.1. Características espectroscópicas de las especies de ABTS

Como se ha descrito, el ABTS puede presentar tres estados de oxidación. Las dos formas oxidadas presentan absorción, pero lo más llamativo es que la forma de estos espectros (en especial, del  $ABTS_{ox2}$ ) dependen de las condiciones experimentales usadas para obtenerlos (figura 6.1). Sin embargo, los únicos registros estables a lo largo del tiempo corresponden al  $ABTS_{ox}$  (espectro a) y al  $ABTS_{ox2}$  unido a proteínas (espectro d). Los otros dos espectros del  $ABTS_{ox2}$ , generados por la oxidación del ABTS con persulfato de sodio (espectro b) y con cerio(IV) (espectro c) no son estables y terminan desapareciendo poco después de haberse formado. Es por ello que el estudio realizado a lo largo del capítulo se centra en las especies estables del ABTS oxidado, es decir,  $ABTS_{ox}$  y  $ABTS_{ox2}$  unido a proteínas. Estos dos últimos tienen espectros de absorción diferentes, y ambos difieren del espectro del ABTS, lo que permite su identificación fácilmente.

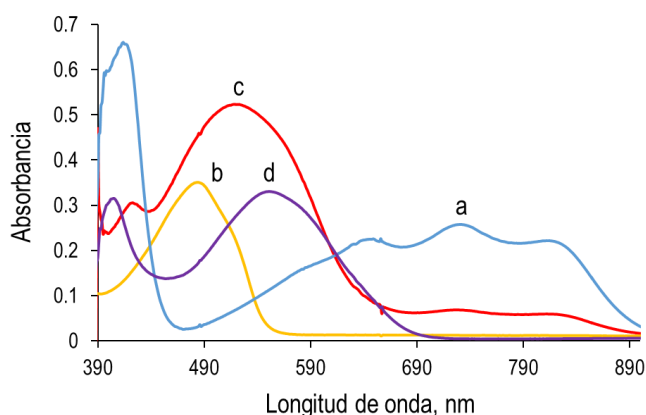


Figura 6.1: Espectros de absorción molecular de las diferentes especies oxidadas del ABTS. a)  $ABTS_{ox}$ , b)  $ABTS_{ox2}$  (con persulfato y calor), c)  $ABTS_{ox2}$  (con  $Ce(IV)$ ), d)  $ABTS_{ox2}$  (mediante proteínas).

A partir de este punto, se va a realizar una división del capítulo en dos secciones, la primera de ellas explica la utilización del ABTS acoplada a reacciones enzimáticas (aparición del color azul-verdoso, figura 6.1 espectro a) y el modelado

teórico y experimental de las condiciones necesarias para su utilización analítica. La segunda sección se centra en otras posibilidades analíticas que pueden utilizarse a partir de  $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$  unido a proteínas y que hasta la fecha no han sido descritas desde esta perspectiva.

## **6.2. Posibilidades analíticas del $\text{ABTS}_{\text{ox}}$**

Tal y como se describe en la bibliografía, el  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  presenta un espectro de absorción característico con máximos en torno a 430 nm y 730 nm (figura 6.1 espectro a). Como se puede observar, el máximo de 430 nm es más sensible debido a que su coeficiente de absorción molar es mayor, sin embargo, a lo largo de todos los estudios experimentales que se plantean en este capítulo, no se ha utilizado esta longitud de onda porque esa zona del espectro es más propensa a interferencias espectrales; se ha preferido perder sensibilidad en el método, para ganar especificidad en las medidas. Además, como se ha visto, la HRP presenta un máximo de absorción a 420 nm, por lo que dependiendo de la concentración de esta enzima, se podrían obtener solapamientos. Finalmente, considerando las características del equipo, la radiación de 430 nm no parece muy adecuada.

### **6.2.1. Consideraciones para obtener una señal óptima del $\text{ABTS}_{\text{ox}}$**

#### **6.2.1.1. Inestabilidad del ABTS**

La primera consideración a tener en cuenta, es que el ABTS se descompone por la radiación de la luz mediante procesos de fotooxidación [6.1]. Esta fotooxidación se produce cuando se incide luz ultravioleta al ABTS en disolución, produciéndose  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$ .

Para realizar las medidas de absorción molecular, se utiliza un equipo de red de fotodiodos (descrito en el capítulo 4), que es de óptica inversa, es decir, la red de difracción se encuentra después del compartimento de cubeta, antes del detector;

## Capítulo 6. Estudio crítico de las posibilidades analíticas del ABTS y su uso para la determinación de putrescina y cadaverina

es necesario colocar un filtro a la salida de la fuente, justo antes del compartimento cubeta (figura 6.2), para eliminar la luz ultravioleta causante de estos procesos. Este filtro elimina toda radiación de longitud de onda menor a 400 nm, por lo que evita que llegue a la cubeta la radiación ultravioleta que fotooxida al ABTS. Gracias a ello, los registros que se obtienen son estables a lo largo del tiempo, además de permitir conocer la concentración de ABTS sin que haya posibilidad de pérdida a lo largo del tiempo.

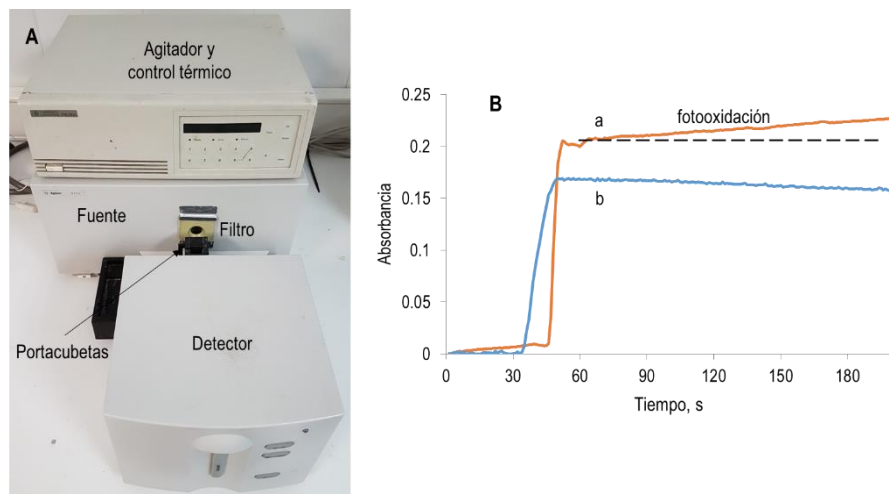
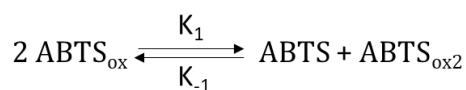


Figura 6.2: **A.** Espectrofotómetro UV-Vis Diode Array con filtro previo al compartimento de cubeta. **B.** Evolución de la absorbancia a 730 nm del ABTS<sub>ox</sub> formado a lo largo del tiempo sin filtro (a) y con filtro (b).

### 6.2.1.2. Formación e inestabilidad del producto azul: ABTS<sub>ox</sub>

La especie oxidada (ABTS<sub>ox</sub>) es la que se ha utilizado con fines analíticos hasta la fecha, tal y como se ha comentado en el capítulo 5. Sin embargo, algunos aspectos de inestabilidad tras su formación, no quedan descritos lo suficientemente claros como para poder establecer un método robusto, que no presente errores en la determinación de los compuestos a analizar. Es por ello que se han realizado una serie de estudios para poder esclarecer la estabilidad del ABTS<sub>ox</sub> en disolución acuosa.

Si la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  está en defecto respecto del ABTS, todo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  produce cuantitativamente  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$ . Este  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  presenta algo de inestabilidad debido a un proceso de desproporción (reacción 6.1) que ya ha sido anteriormente descrito en la bibliografía [6.2]. Este proceso es el causante de que el color azul se vaya perdiendo paulatinamente a lo largo del tiempo y por tanto los registros cinéticos a 730 nm presenten una tendencia descendente de la señal, por lo que podrían causar problemas en la determinación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sobre todo si no se toman los valores de absorbancia a 730 nm al comienzo de la formación del  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$ .



*Reacción 6.1: Equilibrio de desproporción del  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$*

Para poder observar la extensión del equilibrio descrito anteriormente, es necesario tener presente que la especie  $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$  no presenta un espectro de absorción visible si no se estabiliza mediante el uso de proteínas. Este hecho es el que se expondrá más adelante en el apartado 6.3. Además, el ABTS presenta bandas de absorción en la zona ultravioleta, que no se pueden observar por el montaje instrumental utilizado, ya que el filtro no permite tener en cuenta esta zona del espectro. Es por ello que, para confirmar esta hipótesis, se ha realizado el registro de espectros desde 270 nm tomados cada 30 segundos y sin filtro, ya que si la fuente sólo irradia puntualmente, se puede considerar que la fotooxidación del ABTS es minoritaria (figura 6.3) y por tanto se puede observar el ABTS en su estado inicial.

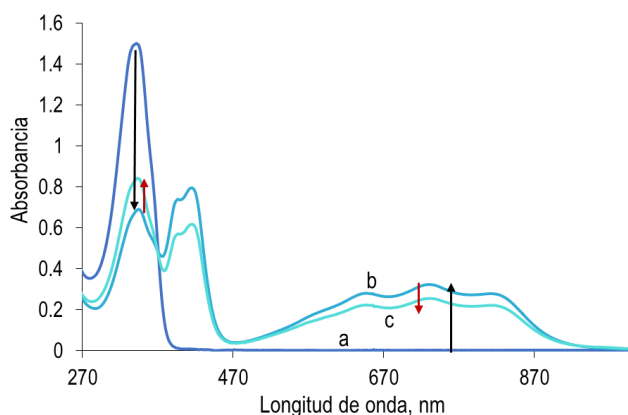


Figura 6.3: Evolución espectral del ABTS y  $ABTS_{ox}$  debido a la reacción entre HRP y  $H_2O_2$  y su posterior desproporción.  $[HRP] = 2 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[H_2O_2] = 9,8 \cdot 10^{-6} M$ ,  $[ABTS] = 3,94 \cdot 10^{-5} M$ .

Como se observa en la figura 6.3, una vez que se ha formado el  $ABTS_{ox}$  (espectro b), éste decae en pequeña proporción, obteniéndose un pequeño aumento en la señal de ABTS (flecha roja a 345 nm), lo que puede estar verificando la hipótesis de que el  $ABTS_{ox}$  pueda estar desproporcionando en parte a su estado inicial y a otro estado de oxidación mayor ( $ABTS_{ox2}$ ) que no se observa en el espectro de absorción si no se estabiliza.

Teniendo en cuenta el equilibrio descrito en la reacción 6.1, un aumento en la concentración de ABTS, haría que, tras la reacción de formación de  $ABTS_{ox}$ , quede un exceso considerable de la especie inicial (ABTS). En estas condiciones, el equilibrio estaría más desplazado hacia el  $ABTS_{ox}$ , lo que debería evitar, en parte, su desproporción. Esto se confirma con los resultados de la figura 6.4; cuanto mayor es la cantidad de ABTS, menor descenso de la señal se produce, lo que indicaría que el proceso de desproporción se está produciendo en menor medida. Sin embargo, con concentraciones elevadas de ABTS, sigue produciéndose descenso en la señal del  $ABTS_{ox}$ , por lo que este equilibrio no explicaría la totalidad de la inestabilidad observada.



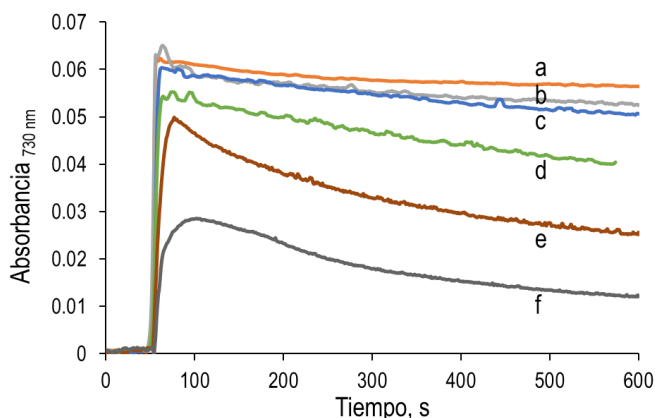


Figura 6.4: Registro cinético de la  $Abs_{730\text{ nm}}$  frente al tiempo para diferentes concentraciones de ABTS en relación con la  $[H_2O_2]$  en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[HRP] = 2\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[H_2O_2] = 2,01\cdot 10^{-6}\text{ M}$ . Ratios  $[ABTS]/[H_2O_2]$  a) 100, b) 20, c) 10, d) 5, e) 2 y f) 1.

Una vez comprobado que la desproporcionación no explica la desaparición completa del color, se pensó que la HRP podría estar actuando sobre el  $ABTS_{ox}$ . La cinética de la reacción del sistema  $H_2O_2/HRP/ABTS$  es muy rápida, por lo que la cantidad de HRP necesaria es muy baja, sin embargo si se aumenta la cantidad de HRP, se observa cómo la pérdida de color se produce de manera más significativa (figura 6.5). Esto confirmaría la hipótesis de que la HRP reacciona con el  $ABTS_{ox}$ , haciendo que disminuya la cantidad presente en la reacción y por tanto, se produce una disminución en la absorbancia observada a 730 nm.

Este hecho, podría ser explicado por las propiedades reductoras de algunos aminoácidos de la enzima, anteriormente indicadas. Al igual que la  $HRP_{ox}$  puede volver a su estado inicial ( $HRP_{red}$ ) mediante un mecanismo intramolecular que involucra a los aminoácidos triptófano y tirosina, éstos también pueden reducir el  $ABTS_{ox}$  y producir esa disminución de señal que se observa en la figura 6.5. De hecho, el poder reductor de los aminoácidos con el  $ABTS_{ox}$  ya ha sido descrito [6.3], tal y como se muestra en la figura 6.6.

Capítulo 6. Estudio crítico de las posibilidades analíticas del ABTS y su uso para la determinación de putrescina y cadaverina

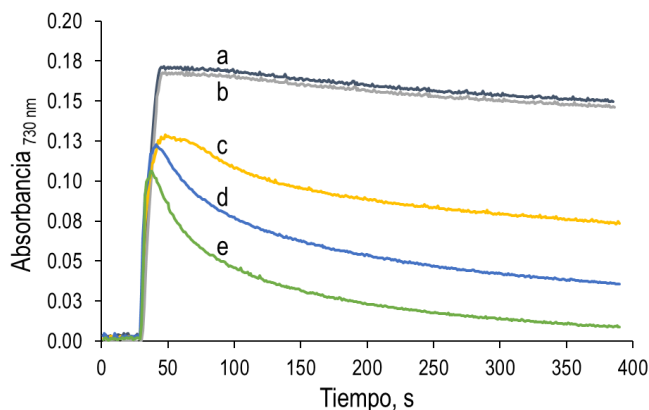


Figura 6.5: Registro cinético de la  $Abs_{730nm}$  frente al tiempo para diferentes concentraciones de HRP en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[ABTS] = 4,4 \cdot 10^{-5} M$ ,  $[H_2O_2] = 2,2 \cdot 10^{-6} M$   $[HRP] =$  a)  $1 U \cdot mL^{-1}$  b)  $2 U \cdot mL^{-1}$  c)  $5 U \cdot mL^{-1}$  d)  $16 U \cdot mL^{-1}$  e)  $26 U \cdot mL^{-1}$

Para verificar que los aminoácidos reductores de la enzima son los causantes de esta pérdida de señal, se ha añadido albúmina a una disolución de  $ABTS_{ox}$ . La albúmina sirve como modelo proteico de la HRP, sin tener además un centro activo redox que pudiese enmascarar las posibles oxidorreducciones que se pudiesen producir.

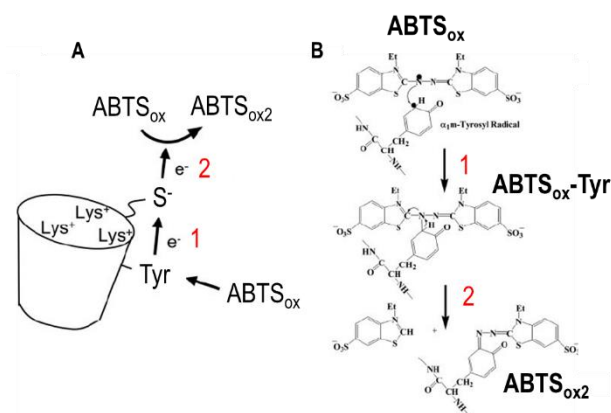


Figura 6.6. **A:** Proceso de formación del  $ABTS_{ox2}$  a partir de los aminoácidos reductores de las proteínas. **B:** Esquema del proceso A. [6.3]

Tras la adición de albúmina se observa una disminución de señal considerable (figura 6.7). Esto verifica que los aminoácidos reductores de las proteínas reaccionan con el  $ABTS_{ox}$ . En esta figura se observa como para dos cantidades diferentes de albúmina el descenso es diferente. A mayor cantidad de albúmina, mayor número de aminoácidos reductores y por tanto mayor pérdida de señal. Además, se observa como hay una tendencia clara, con una disminución inicial y posteriormente otra disminución con una pendiente menor, observándose de manera muy clara el punto de cambio de tendencia. Estas disminuciones se comentarán posteriormente en el apartado 6.3, ya que están relacionadas con la estabilización del  $ABTS_{ox2}$ .

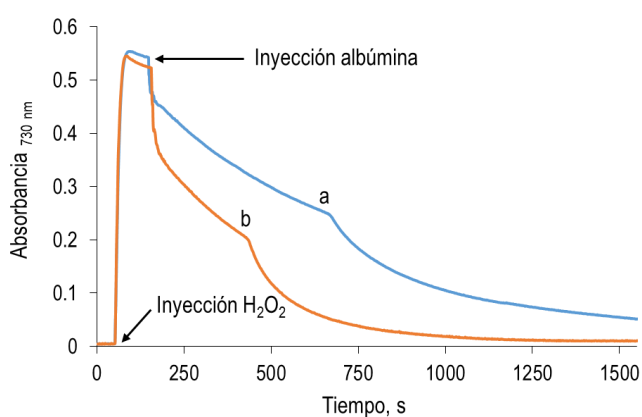
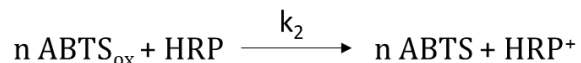


Figura 6.7: Evolución temporal de la señal del  $ABTS_{ox}$  tras la adición de albúmina en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[HRP] = 2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[ABTS] = 4,2\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[H_2O_2] = 4,9\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[Alb] = a) 1,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $b) 2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Este proceso se esquematiza en la reacción 6.2, donde  $HRP^+$  representa el estado oxidado de la HRP debido a los cambios en sus aminoácidos (no al centro activo), por lo que mantiene su estado redox en el centro activo y  $n$  representa el número de moléculas de  $ABTS_{ox}$  que puede reducir cada molécula de HRP.

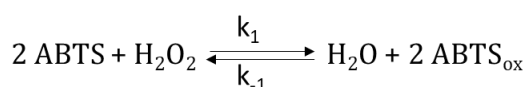
Para poder estimar la constante del proceso y la estequiometría de esta reacción, se ha llevado a cabo un estudio teórico-matemático de las constantes cinéticas que rigen el proceso. Este estudio es el que se muestra a continuación.



*Reacción 6.2: Proceso de reducción del ABTS<sub>ox</sub> por parte de los aminoácidos de la enzima HRP.*

### 6.2.2. Estudio mecanístico

Teniendo en cuenta la reacción de formación de ABTS<sub>ox</sub> a través del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reacción 6.3), se puede afirmar que es mucho más rápida que: 1) la desproporción del ABTS<sub>ox</sub> y que 2) la reducción del ABTS<sub>ox</sub> por parte de la HRP.



*Reacción 6.3: Formación del ABTS<sub>ox</sub> a partir de ABTS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.*

Como puede observarse en las figuras 6.4, 6.5 y 6.7, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre una mezcla de HRP con ABTS, genera rápidamente ABTS<sub>ox</sub>. Debido a que el ABTS adicionado está en exceso respecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, implica que las concentraciones resultantes sean:

$$[\text{ABTS}_{\text{ox}}]_{t=0} = 2[\text{H}_2\text{O}_2]_0 \quad \text{Ec. 6.1}$$

$$[\text{ABTS}]_{t=0} = [\text{ABTS}]_0 - 2[\text{H}_2\text{O}_2]_0 \quad \text{Ec. 6.2}$$

El subíndice 0 hace referencia a las concentraciones iniciales adicionadas a la cubeta de reacción, mientras que el subíndice t=0 se refiere a las concentraciones antes de que ocurran las reacciones 6.1 y 6.2.

#### 6.2.2.1. Cálculo de $k_1$

De la figura 6.5 puede desprenderse la conclusión de que para concentraciones bajas de HRP, la reacción predominante es la descrita en la reacción 6.3 y que la

reacción inversa es mucho más lenta que la reacción directa, al menos en el intervalo de tiempo considerado. Por ello, la ecuación diferencial que la define es la siguiente:

$$-\frac{d[\text{ABTSox}]}{dt} = 2k_{-1}[\text{ABTSox}]^2 \quad \text{Ec. 6.3}$$

y la solución a la misma sería:

$$\frac{1}{[\text{ABTSox}]} = \frac{1}{2[\text{H}_2\text{O}_2]_0} + 2k_{-1}t \quad \text{Ec. 6.4}$$

En la figura 6.8, se muestran los resultados obtenidos utilizando una concentración de HRP  $7 \cdot 10^{-7}$  M los cuales fueron representados siguiendo la ecuación 6.4.  $k_{-1}$  es calculado a partir de esta representación obteniendo el siguiente valor:  $k_{-1} = 39 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ .

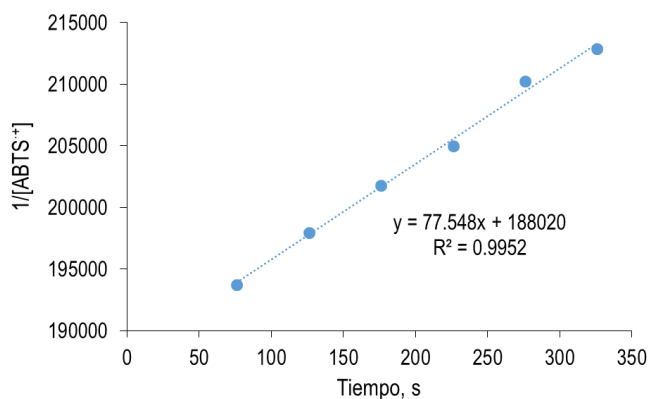


Figura 6.8: Cálculo de  $k_{-1}$  en disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 M pH 6.

### 6.2.2.2. Cálculo de $k_2$

Para concentraciones más altas de HRP, hay que tener en cuenta tanto la ecuación 6.3 y 6.4, por lo que la ecuación diferencial quedaría de la siguiente forma:

Capítulo 6. Estudio crítico de las posibilidades analíticas del ABTS y su uso para la determinación de putrescina y cadaverina

$$-\frac{d[\text{ABTS}_{\text{ox}}]}{dt} = 2k_{-1}[\text{ABTS}_{\text{ox}}]^2 + k_2[\text{ABTS}_{\text{ox}}][\text{HRP}] \quad \text{Ec. 6.5}$$

Considerando que la  $[\text{HRP}]$  es mayor que  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$  y que cada molécula de HRP puede reducir a varias moléculas de  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$ , se puede llevar a cabo la siguiente simplificación:

$$[\text{HRP}] = [\text{HRP}]_0 \quad \text{Ec. 6.6}$$

Esta simplificación es todavía más precisa cuando se aplica a las concentraciones más elevadas de HRP ensayadas. Con ello la solución de la ecuación diferencial 6.5 es la siguiente:

$$\text{Ln} \frac{[\text{ABTS}_{\text{ox}}]}{k_{-1}[\text{ABTS}_{\text{ox}}] + k_2[\text{HRP}]_0} = k_2[\text{HRP}]_0 t - \text{Ln} \frac{[\text{ABTS}_{\text{ox}}]_0}{k_{-1}[\text{ABTS}_{\text{ox}}]_0 + k_2[\text{HRP}]_0} \quad \text{Ec. 6.7}$$

Además se puede tener en cuenta otra simplificación, ya que la velocidad de reducción del  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  es mucho mayor debido a la HRP (cuando ésta se encuentra en cantidades elevadas) que la velocidad de formación de ABTS por parte del  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  debido a su inestabilidad (proceso de desproporción), por lo que:

$$k_{-1}[\text{ABTS}_{\text{ox}}] + k_2[\text{HRP}]_0 \approx k_2[\text{HRP}]_0 \quad \text{Ec. 6.8}$$

y por tanto la ecuación 6.7 quedaría simplificada de la siguiente manera:

$$\text{Ln} [\text{ABTS}_{\text{ox}}] = \text{Ln} [\text{ABTS}_{\text{ox}}]_0 - k_2[\text{HRP}]_0 t \quad \text{Ec. 6.9}$$

Con ello, si se ajustan los datos de la figura 6.9, para las dos concentraciones más elevadas de HRP ( $10^{-5}$  y  $2 \cdot 10^{-5}$  M) a la ecuación 6.9, se puede obtener el valor de  $k_2$ , siendo este valor:  $k_2 = 480 \pm 30 \text{ s}^{-1}$ . Este valor justifica la simplificación tomada en la ecuación 6.8.

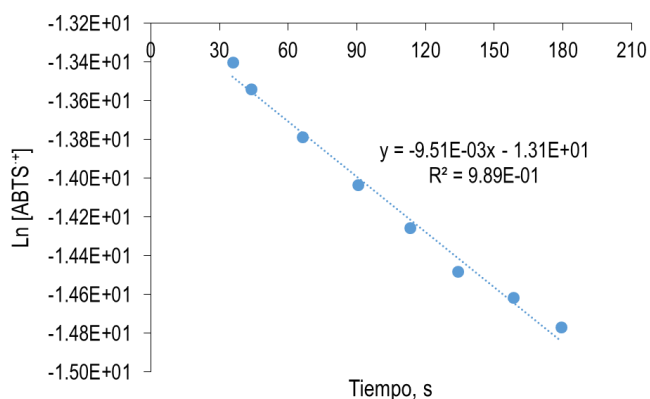


Figura 6.9. Cálculo de  $k_2$  en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 6.

### 6.2.3. Determinación de $H_2O_2$

Tras establecer las condiciones necesarias para poder utilizar la especie  $ABTS_{ox}$  en determinaciones analíticas de  $H_2O_2$ , se ha querido explorar dos posibilidades distintas. La primera de ellas, es analizar la sensibilidad del método directo, es decir, la aparición del color azul-verdoso (730 nm) tras la adición de  $H_2O_2$  con HRP baja (modo discontinuo), pudiendo hacer una única medida en cada una de las reacciones llevadas a cabo. La segunda de ellas surge al utilizar las capacidades reductoras de los aminoácidos de la HRP para conseguir una señal transitoria tipo sensor, evaluando así la posibilidad de regenerar el ABTS consumido para poder utilizarlo en más de una medida (modo continuo); esto se explicará en detalle después.

#### 6.2.3.1. Modo discontinuo

Teniendo en cuenta todos los aspectos comentados anteriormente, para poder determinar  $H_2O_2$  utilizando las propiedades espectroscópicas del  $ABTS_{ox}$  (azul-verdoso), es necesaria una concentración de HRP baja ( $0,5 U \cdot mL^{-1}$ ) y una cantidad

de ABTS alta (0,34 mM) para así asegurar una señal estable del  $ABTS_{ox}$  formado, además cuanto mayor es la cantidad de ABTS, se consigue un mayor rango de respuesta lineal del sistema, ya que es posible consumir mayor cantidad de  $H_2O_2$ , porque el ABTS sigue estando en exceso.

Considerando la estequiometría de la reacción, la sensibilidad máxima teórica del sistema HRP/ $H_2O_2$ /ABTS es la que se muestra a continuación:

$$\text{Máxima sensibilidad} = 2 \varepsilon_{ABTS_{ox}}^{730} = 30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ Ec. 6.10}$$

Como se puede observar en la figura 6.10, a partir del estudio de respuesta lineal obtenido para el  $H_2O_2$ , la sensibilidad alcanzada no difiere significativamente de la teórica, por lo que se puede afirmar que las condiciones alcanzadas son óptimas para la determinación de  $H_2O_2$ .

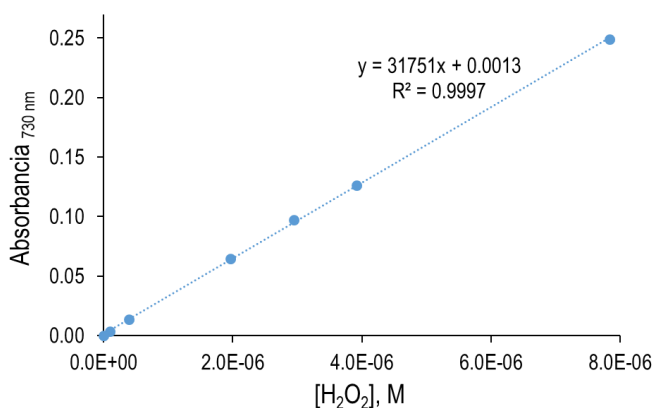


Figura 6.10: Relación entre la señal de  $Abs_{730}$  y la  $[H_2O_2]$  en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[ABTS] = 4,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ,  $[HRP] = 2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

### 6.2.3.2. Modo continuo

Teniendo en cuenta el mecanismo por el cual la HRP es capaz de regenerar el  $ABTS_{ox}$  a la forma inicial del ABTS (mediante sus aminoácidos reductores), se ha considerado la posibilidad de desarrollar un método en el que se pueda medir de



manera continua, es decir, utilizando la misma alícuota de HRP/ABTS, para analizar diferentes adiciones de  $H_2O_2$ , comportándose así el sistema como un sensor, ya que se obtiene una señal transiente con el tiempo.

Para poder llevar a cabo esta metodología, es necesario optimizar la relación de HRP/ABTS que se debe utilizar para obtener, por un lado, una señal que sea sensible y por otro lado, diversas medidas con la misma alícuota de HRP/ABTS.

### **Optimización de la relación HRP/ABTS**

Se han ensayado diversas proporciones de ABTS/HRP tal y como se muestran en la figura 6.11. Como se puede observar conforme se aumenta la cantidad de HRP la velocidad de regeneración es más rápida, ya que será mayor el número de aminoácidos capaces de reducir el  $ABTS_{ox}$ . Además, se observa cómo a partir de una relación 1:5 ([ABTS]:[HRP]), al cabo de 3 adiciones la señal comienza a comportarse de manera inusual. Este comportamiento será explicado posteriormente en la segunda sección del capítulo, ya que se está produciendo otra especie del ABTS ( $ABTS_{ox2}$  estabilizada mediante proteínas), que puede ser utilizada con fines analíticos según las condiciones experimentales que se quieran utilizar.

A la vista de los resultados obtenidos, se ha escogido como proporción óptima la 1:3 (registro B de la figura 6.11), ya que se obtiene una señal transitoria reproducible durante más medidas, y además el tiempo de cada medida es adecuado; tiempos más cortos implican menor sensibilidad (porque la señal se regenera demasiado rápido, como se observa en las primeras señales de la figura 6.11 C y D), y tiempos más largos no son prácticos para desarrollar una señal tipo sensor (figura 6.11 registro A).

Capítulo 6. Estudio crítico de las posibilidades analíticas del ABTS y su uso para la determinación de putrescina y cadaverina

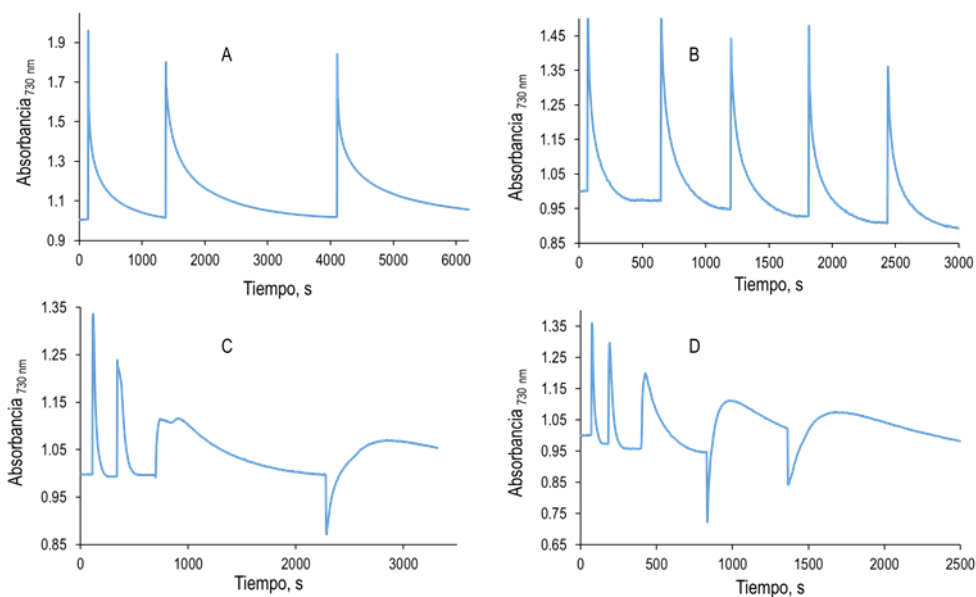


Figura 6.11. Relación entre la señal de Abs<sub>730</sub> frente al tiempo para diversas relaciones [ABTS]/[HRP] en la reacción HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS en disolución amortiguadora de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0,1 pH 6. [ABTS] = 4,41·10<sup>-5</sup> M, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 4,22·10<sup>-6</sup> M, [ABTS]/[HRP] = **A.** 1/1, **B.** 1/3, **C.** 1/5, **D** 1/10.

Una vez elegida la relación de HRP/ABTS, se ha realizado un estudio de calibración, donde se ha elegido como parámetro analítico el área de la señal obtenida, frente a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente. En la figura 6.12 se muestra las señales obtenidas para diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ensañadas sobre una misma alícuota de ABTS/HRP.

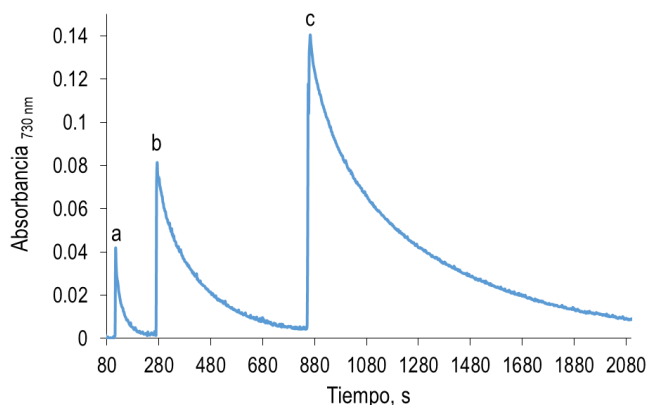


Figura 6.12. Registro de la  $Abs_{730}$  frente al tiempo para diversas adiciones de  $H_2O_2$  en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[ABTS] = 1,00 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[HRP] = 99,6 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[H_2O_2] =$  a)  $1,96 \cdot 10^{-6} M$ , b)  $3,43 \cdot 10^{-6} M$ , c)  $4,91 \cdot 10^{-6} M$

#### 6.2.4. Determinación de putrescina y cadaverina

Una vez evaluadas las posibilidades que ofrece el  $ABTS_{ox}$  para la determinación de  $H_2O_2$ , se ha acoplado a este sistema la enzima Diamino oxidasa (DAO), con el objetivo de poder analizar putrescina y cadaverina.

Inicialmente, se han evaluado las condiciones óptimas necesarias para el sistema  $HRP/H_2O_2/ABTS$  (apartado 6.2.3.1), y así obtener una señal estable de  $ABTS_{ox}$ . Lo primero, ha sido comprobar si la DAO puede regenerar al  $ABTS_{ox}$  de la misma manera que sucedía con la HRP. Como se puede observar en la figura 6.13 conforme se aumenta la cantidad de DAO añadida disminuye la señal del  $ABTS_{ox}$  debido a los aminoácidos de esta enzima. Además, se observa como la cinética inicial de formación del  $ABTS_{ox}$  (valor de la pendiente tras adicionar el  $H_2O_2$ ) aumenta al adicionar mayor cantidad de DAO. Esto es debido a que la DAO comercial contiene trazas de alguna peroxidasa y por eso aumenta la cinética de transformación del  $H_2O_2$  en  $ABTS_{ox}$  coloreado. Con ello, la mejor opción es utilizar la menor cantidad de DAO posible,  $0,5 U \cdot mL^{-1}$ , ya que transforma las diaminas en

el menor tiempo posible y así interfiere lo menos posible en la señal analítica del  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$ .

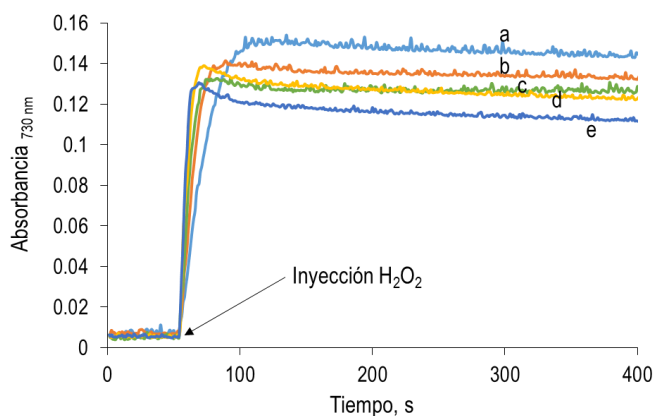


Figura 6.13: Registros cinéticos de la  $\text{Abs}_{730}$  frente al tiempo de la reacción  $\text{DAO/HRP/H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$  para diversas  $[\text{DAO}]$  en amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[\text{HRP}] = 0,2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{ABTS}] = 4,41\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,9\cdot 10^{-6} \text{ M}$ ,  $[\text{DAO}] =$  a)  $0 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  b)  $0,55 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  c)  $1,10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , d)  $2,2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e)  $4,4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Por otro lado, tal y como se muestra en la figura 6.14, al representar la absorbancia a 730 nm frente al tiempo, ambas diaminas (putrescina y cadaverina) presentan una señal similar entre ellas, pero menor a la señal descrita por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Además, se pone de manifiesto que, en el caso de la cadaverina, el descenso de señal observada es más notable.

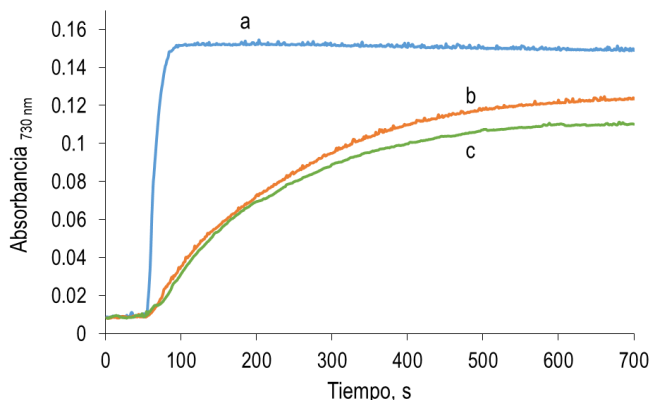


Figura 6.14. Registros cinéticos de la  $Abs_{730}$  frente al tiempo de la reacción diaminas/DAO/HRP/ABTS comparada con la señal de HRP/ $H_2O_2$ /ABTS en  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[DAO] = 0,47 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[HRP] = 0,2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[ABTS] = 4,41\cdot 10^{-4} \text{ M}$ . a)  $[H_2O_2] = 4,9\cdot 10^{-6} \text{ M}$ , b)  $[Put] = 4,97\cdot 10^{-6} \text{ M}$ , c)  $[Cad] = 4,93\cdot 10^{-6} \text{ M}$ .

Esto sólo puede deberse a dos posibles causas. La primera de ellas es que las propias aminas biógenas reaccionen el  $ABTS_{ox}$ , esta hipótesis es menos probable, ya que la reacción con la DAO es rápida y las concentraciones de cadaverina y putrescina serían bajas. La segunda posibilidad es que los aldehídos formados tras la reacción con la DAO pudiesen reaccionar de manera diferente con el  $ABTS_{ox}$ . Para comprobar ambas hipótesis, se ha generado  $ABTS_{ox}$  mediante la reacción de HRP/ $H_2O_2$  y una vez que se ha obtenido una señal estable se han adicionado las diaminas o sus productos oxidados.

Como se puede observar en la figura 6.15 las diaminas no interfieren en la señal del  $ABTS_{ox}$ . Queda totalmente descartado que sean las causantes de la disminución de la señal del  $ABTS_{ox}$ , ya que además las concentraciones ensayadas son mayores que las que hay en la cubeta de reacción, porque como se ha comentado anteriormente, la DAO reacciona muy rápido, por lo que la concentración de diamina con la que puede reaccionar el  $ABTS_{ox}$  es menor que la inicial (concentración ensayada).

Capítulo 6. Estudio crítico de las posibilidades analíticas del ABTS y su uso para la determinación de putrescina y cadaverina

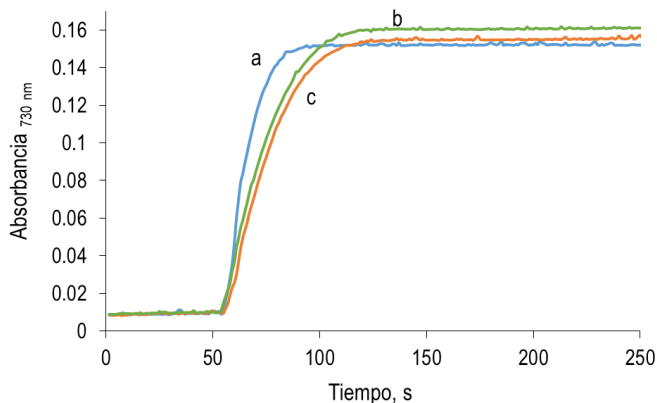
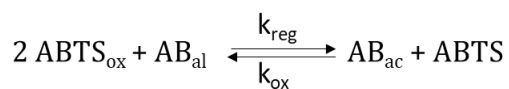


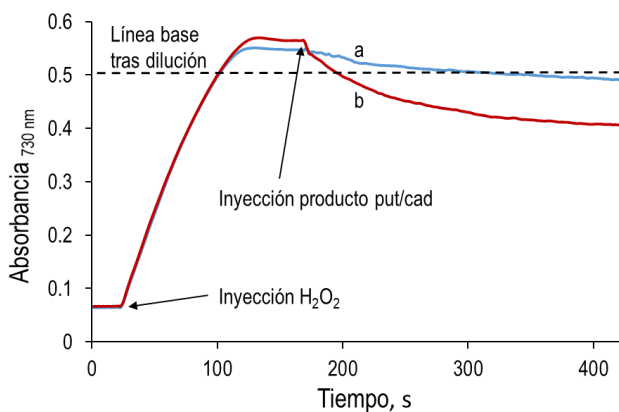
Figura 6.15: Registros cinéticos de la  $Abs_{730}$  frente al tiempo de la reacción  $H_2O_2/HRP/ABTS$  comparada tras la adición de Put y Cad en amortiguadora de  $H_2PO_4/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[DAO]$   $0,47 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[HRP]$   $= 0,2 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[ABTS]$   $= 4,41 \cdot 10^{-4} M$ . a)  $[H_2O_2]$   $= 4,9 \cdot 10^{-6} M$ , b)  $[H_2O_2]$   $= 4,9 \cdot 10^{-6} M$ ,  $[Put]$   $= 4,97 \cdot 10^{-6} M$ , c)  $[H_2O_2]$   $= 4,9 \cdot 10^{-6} M$ ,  $[Cad]$   $= 4,93 \cdot 10^{-6} M$ .

Para corroborar la segunda hipótesis, se han adicionado cada uno de los productos de esta reacción, es decir, los aldehídos correspondientes de la reacción de la DAO con Put y Cad (figura 6.16), que al no ser comerciales, se han obtenido según el procedimiento indicado en el capítulo 4, apartado 4.3.2.1.

La figura muestra que al adicionar los productos de la reacción se produce un descenso de la señal, más pronunciado en el caso del producto de la cadaverina. Esto indicaría que ambos productos, el de la putrescina y el de la cadaverina, estarían reduciendo al  $ABTS_{ox}$ , tal y como se indica en la reacción 6.4. La constante de este proceso, que estaría definida como  $K = k_{reg}/k_{ox}$ , sería mayor para el producto de la cadaverina que para el de la putrescina.



*Reacción 6.4: Reacción de reducción del  $ABTS_{ox}$  mediante los productos de la reacción de putrescina y cadaverina con DAO, es decir, los aldehídos correspondientes de putrescina y cadaverina.*



*Figura 6.16: Registros cinéticos de la  $Abs_{730}$  frente al tiempo tras la adición de los productos de oxidación de la reacción de la DAO con Put y Cad en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[HRP] = 0,65 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[ABTS] = 1,05 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[H_2O_2] = 1,96 \cdot 10^{-5} M$ . a)  $[Put_{ox}] = 9,93 \cdot 10^{-6} M$  b)  $[Cad_{ox}] = 9,42 \cdot 10^{-6} M$ .*

De la misma manera que ocurría con el descenso producido por la desproporción del  $ABTS_{ox}$ , se ha optado por estudiar el efecto que tendría la cantidad de ABTS sobre este descenso producido por el producto de la cadaverina, ya que es el más intenso.

Para ello se ha realizado un ensayo en el que se estudian cantidades crecientes de ABTS utilizando la misma cantidad de cadaverina. Como se muestra en la figura 6.17, se minimiza en gran medida la disminución de señal producida por la cadaverina. Este resultado plantearía el hecho de que el producto de la cadaverina reacciona con el  $ABTS_{ox}$  en forma de equilibrio de reacción, y que al aumentar la cantidad de uno de los productos, el equilibrio se desplaza en menor medida. Con ello, para minimizar este efecto es necesario tener una relación molar de ABTS/Cad de 100:1.

Capítulo 6. Estudio crítico de las posibilidades analíticas del ABTS y su uso para la determinación de putrescina y cadaverina

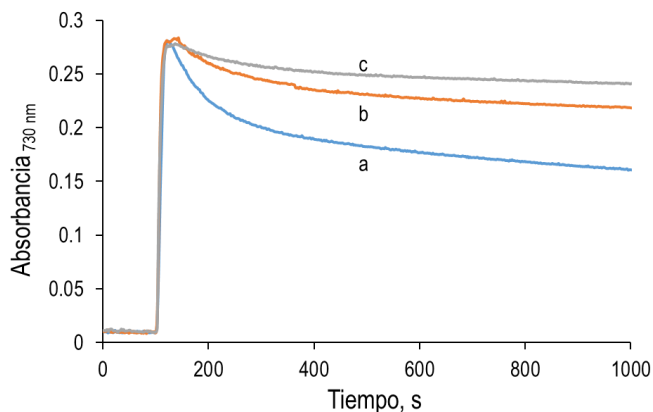


Figura 6.17: Registros cinéticos de la  $Abs_{730}$  frente al tiempo de la reacción DAO/Cad/HRP/ABTS para diversas  $[ABTS]$  en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[DAO] = 2,1 U \cdot mL^{-1} M$ ,  $[HRP] = 1,93 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Cad] = 1,01 \cdot 10^{-5} M$ ,  $[ABTS] = a) 9,84 \cdot 10^{-5} M$ , b)  $2,95 \cdot 10^{-4} M$ , c)  $9,84 \cdot 10^{-4} M$ .

Una vez que se tienen establecidas las condiciones de reacción óptimas, para que la señal producida a 730 nm sea la mejor posible, se ha llevado a cabo la caracterización analítica del método. En la tabla 6.1 se muestran los valores obtenidos para cada una de las diaminas por separado.

Tabla 6.1: Características analíticas del método.

	Putrescina	Cadaverina
Recta de calibrado	$26036 \cdot [Put] + 0,0005$	$24467 \cdot [Cad] - 0,0007$
Rango lineal (M)	$2,5 \cdot 10^{-7} - 3,0 \cdot 10^{-6}$ , $r = 0,999$	$2,5 \cdot 10^{-7} - 3,0 \cdot 10^{-6}$ , $r = 0,998$
DER (%) (n=4)	4,2	5,0
LD	$7,6 \cdot 10^{-8} M$	$7,6 \cdot 10^{-8} M$

Como se observa la sensibilidad del método es mayor en putrescina que cadaverina. Esto se debe a que sigue sucediendo cierto descenso de la señal, que es más pronunciado en la cadaverina que en la putrescina. Como ambas diaminas suelen estar presentes en las muestras reales en proporciones similares, siempre dentro del mismo orden de magnitud, se ha optado por realizar un estudio de la



linealidad con mezclas de ambas al 50 %. Esto hace que no se subestime a ninguna de las dos aminas, y aunque la relación real en muestras no sea 1:1, es la que más representa a cualquier muestra real que contenga estas diaminas.

### 6.2.5. Estudio de interferencias

Una vez realizado el proceso de optimización del método y evaluadas las características analíticas del mismo, se ha optado por realizar un estudio de interferencias utilizando las aminas biógenas más frecuentes en muestras reales (His y Tir). De hecho uno de los objetivos planteados en este capítulo es evaluar las interferencias observadas anteriormente e intentar minimizar algunas de ellas gracias al uso del cromóforo ABTS.

Las aminas biógenas consideradas como posibles interferentes, pueden presentar tres mecanismos de interferencias diferentes en este método:

- 1) Reaccionar parcialmente con la DAO y por tanto generar  $H_2O_2$  intensificando la señal del  $ABTS_{ox}$ .
- 2) Reaccionar con la HRP de manera más rápida que el ABTS y por tanto evitar que se forme  $ABTS_{ox}$  en toda su extensión. La amina biógena que puede actuar de esta manera es la tiramina, ya que como se había estudiado en el capítulo 5, apartado 5.3.2, es capaz de regenerar a la  $HRP_{ox}$ .
- 3) Reaccionar con el  $ABTS_{ox}$  haciendo que se pierda parte del color producido por la putrescina y cadaverina.

En la figura 6.18, se muestran los registros cinéticos para cada una de las aminas biógenas que se han probado en este método. Como puede observarse, la tiramina apenas genera  $H_2O_2$ , ya que la señal del  $ABTS_{ox}$  es mucho menor que la correspondiente a putrescina y cadaverina. Además esa señal obtenida corresponde a una concentración de tiramina 10 veces superior a la concentración

de diaminas, por lo que se puede asumir que en muestras reales no se observaría una interferencia apreciable en los primeros instantes de la reacción, donde la putrescina y cadaverina ya han reaccionado por completo y la tiramina apenas ha generado  $H_2O_2$ . Este resultado es consistente con el observado en el capítulo 3 (apartado 3.3.3) donde se presenta la especificidad de la DAO con las diferentes aminas, observando el consumo de  $O_2$  que producen cada una de ellas.

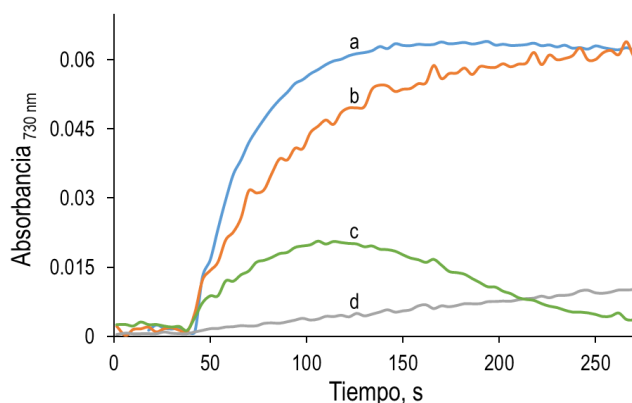


Figura 6.18: Registros cinéticos de la  $Abs_{730}$  frente al tiempo para la reacción DAO/AB/HRP/ABTS para diversas aminas biógenas en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[DAO] = 1,81 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[HRP] = 1,98 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[ABTS] = 4,41 \cdot 10^{-5} M$ ,  $[AB] = a)$   $[Put] = 2,42 \cdot 10^{-6} M$  b)  $[Cad] = 2,44 \cdot 10^{-6} M$  c)  $[His] = 2,39 \cdot 10^{-5} M$  d)  $[Tir] = 4,03 \cdot 10^{-6} M$

Sin embargo, es destacable el efecto que se observa en la histamina. Como puede verse, la señal inicialmente aumenta debido a la producción de  $H_2O_2$ , pero posteriormente sufre una disminución de señal muy intensa, haciendo que desaparezca todo el  $ABTS_{ox}$  formado. Este efecto sólo puede ser debido a que el producto de la reacción entre la DAO y la histamina, 2-(1H-imidazol-5-il)acetaldehído, reacciona con el  $ABTS_{ox}$  y por tanto disminuye la señal producida inicialmente, llegando incluso a hacer que desaparezca por completo.

Debido a que el producto de la histamina (aldehído) no es comercial, al igual que sucede con los productos de la putrescina y cadaverina, se ha obtenido tal y

como se expone en el capítulo 4, apartado 4.3.2.1. Este compuesto se ha añadido a una mezcla de reacción donde se había generado el  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  mediante la reacción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con HRP en presencia de ABTS. Como se muestra en la figura 6.19, la disminución de señal es provocada instantáneamente, lo que indica que es el producto oxidado de la histamina el que reacciona con el  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$ .

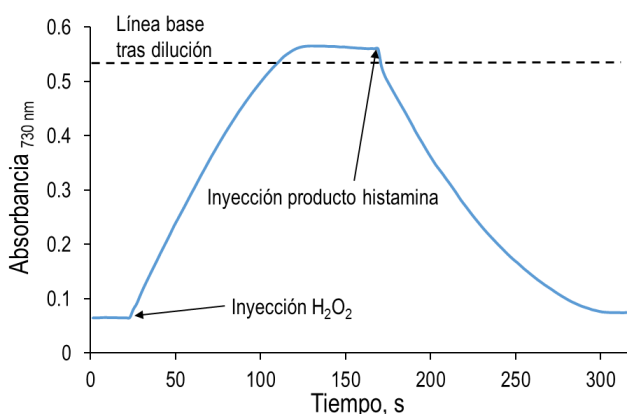


Figura 6.19: Registro cinético de la  $\text{Abs}_{730}$  frente al tiempo tras la adición de histamina ABTS en disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[\text{HRP}] = 0,65 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{ABTS}] = 1,05\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,96\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[\text{His}] = 1,04\cdot 10^{-5} \text{ M}$ .

Al igual que pasaba con el producto de la cadaverina, el producto oxidado de la histamina es capaz de reaccionar con el  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$ , disminuyendo la señal obtenida, lo que supone una interferencia a tener en cuenta. Ahora es necesario evaluar si esta reacción interferente es posible disminuirla con la concentración de ABTS, al igual que pasaba con el producto de la cadaverina, que con una relación molar 100:1 de ABTS respecto al producto oxidado era suficiente para obtener una señal apreciable y poco afectada por dicho producto.

Tal y como se observa en la figura 6.20, es posible corregir el descenso producido por la histamina si se añade ABTS en exceso, de la misma manera que se corregía la señal descendente producida por la cadaverina. En este caso, el

descenso producido por una concentración 5 veces superior de histamina que de putrescina, es corregido por un aumento en la concentración de ABTS.

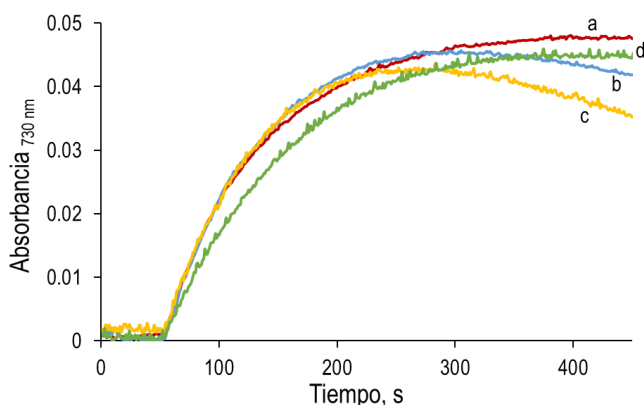


Figura 6.20: Registro cinético de la  $Abs_{730}$  frente al tiempo para diferentes cantidades de histamina y ABTS en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[DAO] = 1,8 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[HRP] = 2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Put] = 2,06\cdot 10^{-6} \text{ M}$  a)  $[ABTS] = 4,51\cdot 10^{-5} \text{ M}$ , b)  $[ABTS] = 4,51\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[His] = 4,02\cdot 10^{-6} \text{ M}$ , c)  $[ABTS] = 4,51\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[His] = 1,01\cdot 10^{-5} \text{ M}$ , d)  $[ABTS] = 4,51\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[His] = 1,01\cdot 10^{-5} \text{ M}$ .

Respecto a la tiramina, teóricamente, gracias al mecanismo de reacción del sistema  $H_2O_2/HRP/ABTS$ , la interferencia que produce esta amina, debería ser minimizada, ya que tanto la tiramina como el ABTS competirían por regenerar la  $HRP_{red}$  y si la cinética de la reacción del ABTS con la  $HRP_{red}$  es mucho mayor que la análoga de la tiramina, este efecto interferente se eliminaría.

Para evaluar esta hipótesis, se ha realizado la reacción de la DAO con putrescina, HRP, ABTS en presencia de tiramina. Como se observa en la figura 6.21, la señal de la putrescina en presencia de tiramina es idéntica a la señal sin tiramina, lo que indicaría que el ABTS actúa como regenerador de la HRP con una cinética superior a la de la tiramina, y por tanto esta interferencia tan notoria al usar las propiedades intrínsecas de la HRP se elimina (capítulo 5, apartado 5.3.3).

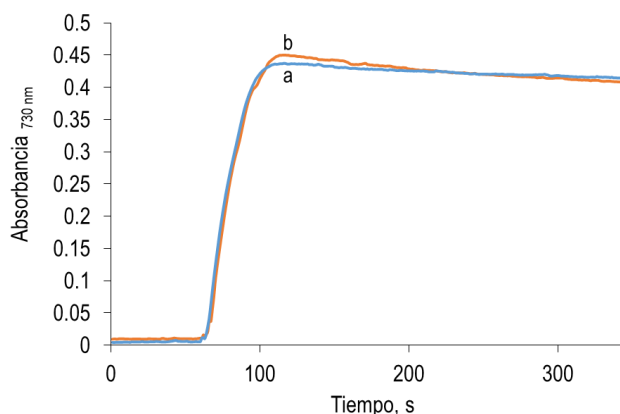


Figura 6.21: Efecto de la tiramina en el sistema DAO/HRP/ABTS, en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 7, [DAO] = 1,8 U·mL<sup>-1</sup>, [HRP] = 0,5 U·mL<sup>-1</sup>, [ABTS] = 4,2·10<sup>-4</sup> M, [Put] = 1·10<sup>-5</sup> M a) sin Tir, b) [Tir] = 1·10<sup>-4</sup> M

### 6.2.6. Aplicación en muestra real

Gracias a la colaboración con el Laboratorio de Sanidad Pública de Aragón, se ha podido estudiar si el método es válido para la determinación de putrescina y cadaverina en muestras reales. Este laboratorio nos ha proporcionado un extracto de atún, el cual ha sido analizado previamente por su método (HPLC-MS-MS) validado. La preparación de dicha muestra real está explicada en el apartado 4.3.3.1 del capítulo 4.

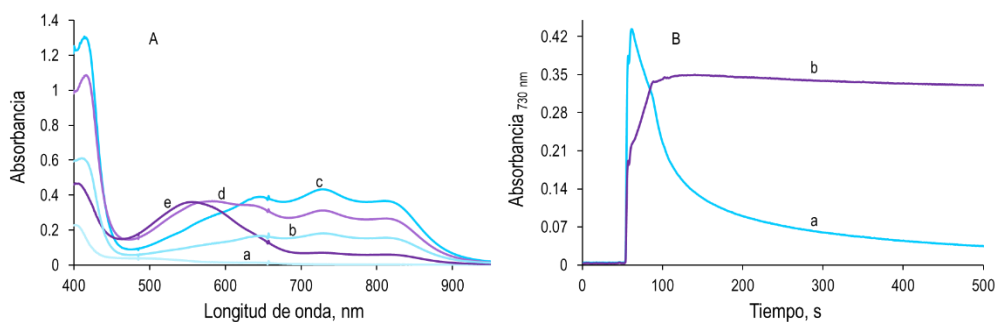
La muestra ha sido evaluada utilizando el método HRP/DAO/ABTS discontinuo, es decir, mediante la formación del color azul-verdoso a 730 nm. Se realizó el análisis por triplicado y las señales obtenidas se interpolaron en la recta de calibrado, obteniendo una concentración de diaminas (putrescina + cadaverina) de 521 ± 66 mg/kg. La concentración arrojada por el Servicio de Salud Pública mediante HPLC/MS fue de 480 ± 22 mg/kg. Estos resultados son estadísticamente similares, ya que usando un test t (al 95% de confianza) se obtiene un  $t_{calculada} =$

2,09 que es menor que la  $t_{crítica}$  de 2,98, por lo que permite validar el método analítico desarrollado.

### 6.3. Posibilidades analíticas de $ABTS_{ox2}$

El ABTS puede sufrir una doble oxidación (figura 6.1). En la bibliografía se encuentran métodos para poder alcanzar al segundo estado de oxidación del ABTS [6.2, 6.4, 6.5], sin embargo, no se describe cómo poder utilizarlo con fines analíticos, debido a que esta oxidación requiere oxidantes fuertes y condiciones muy concretas. Además, en muchos casos, este estado de oxidación parece ser muy inestable. Por ejemplo, como se ha visto antes, es posible obtener el  $ABTS_{ox2}$  utilizando exceso de Ce(IV) en medio ácido, sin embargo el compuesto rojizo formado no es estable en disolución y desaparece al cabo de unos minutos. También es posible obtener este estado de oxidación utilizando persulfato como agente oxidante en caliente. El color de la disolución resulta en un amarillo-anaranjado (figura 6.1). En este apartado del trabajo se quiere profundizar en la formación de esta especie, caracterizar su espectro y ver sus posibilidades analíticas.

En el apartado 6.2.3.2, en la que se describe cómo es posible utilizar la señal del  $ABTS_{ox}$  de manera continua, se describieron unas señales inusuales de  $Abs_{730}$  frente al tiempo tras varias adiciones de sustrato. La evolución espectral de esas señales mostró además la formación de una banda de absorción a 560 nm que se mantuvieron estables a lo largo del tiempo, y que se iban acumulando en las sucesivas adiciones (figura 6.22). Al tratarse de una banda obtenida en exceso de  $H_2O_2$  respecto de ABTS se piensa que es la banda del  $ABTS_{ox2}$  buscada.



*Figura 6.22. A: Evolución espectral (a → e) de la reacción HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS en disolución amortiguadora H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6. [HRP] = 26 U·mL<sup>-1</sup>, [ABTS] = 3,55·10<sup>-5</sup> M, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 3,92·10<sup>-5</sup> M. B: Evolución de la absorbancia a 730 nm (a) y 560 nm (b) de la reacción representada en A.*

En la figura 6.22A se muestran los resultados de un ensayo diseñado para este fin. Como se puede ver en el pie de la figura, se trabaja con una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> superior a la de ABTS. Inicialmente se forma la banda de 730 nm correspondiente a la especie ABTS<sub>ox</sub> (a) que posteriormente disminuye para ir formándose una banda en torno a 560 nm, (desde b hasta e) que se va definiendo conforme disminuye la señal de 730 nm. La evolución temporal (figura 6.22B) muestra que la absorbancia a 730 nm llega a su máximo casi de manera instantánea al principio de la reacción (la absorbancia observada a 560 nm, en ese momento, es debida también a ABTS<sub>ox</sub>, que absorbe algo a esa longitud de onda). Posteriormente, la absorbancia a 730 nm comienza a disminuir linealmente mientras que la absorbancia a 560 nm aumenta a la misma velocidad, lo que parece indicar que una se forma a costa de la otra. Una vez que la absorbancia de 560 nm llega a su máximo, ésta se queda más o menos estable en el tiempo, sin embargo, la absorbancia a 730 nm sufre un segundo descenso con otra velocidad diferente, hasta llegar casi a valores iniciales. La disolución en este momento es de color violáceo, en lugar de azul-verdoso.

La hipótesis más razonable para este resultado es que el ABTS sufre una doble oxidación, primero a ABTS<sub>ox</sub> y luego a ABTS<sub>ox2</sub> siendo la señal a 560 nm debida a

esta última especie. Este proceso ocurrirá hasta que se agote el  $H_2O_2$  (que coincide más o menos con el corte de las líneas a y b de la figura). A partir de ese momento, se tendría que empezar a ver el descenso de la señal de absorbancia debido a la reducción provocada por los aminoácidos de la HRP (es importante recordar que estos reducen al ABTS oxidado), cosa que ocurre con la señal de 730 nm (debida al  $ABTS_{ox}$ ), pero muy débilmente con la de 560 nm ( $ABTS_{ox2}$ ).

En definitiva, en las condiciones vistas es posible llegar a forma el  $ABTS_{ox2}$  que además es más estable frente a la reducción de los aminoácidos. Para concretar algo más la estabilidad del  $ABTS_{ox2}$  frente a las proteínas, se hizo un segundo estudio añadiendo albúmina a la mezcla de reacción (figura 6.23) y disminuyendo la de HRP; de esta forma será la que aporte los aminoácidos reductores. La adición de albúmina se realiza una vez que ha sucedido la primera reacción de oxidación (figura 6.23, intervalo 1), para evitar interferencias redox que puedan distorsionar los espectros. Sorprendentemente, tras la adición de albúmina lo que se observa es que la señal de 560 nm parece estabilizarse; esto implica que la proteína no solo no produce una reducción del  $ABTS_{ox2}$  sino que lo estabiliza.

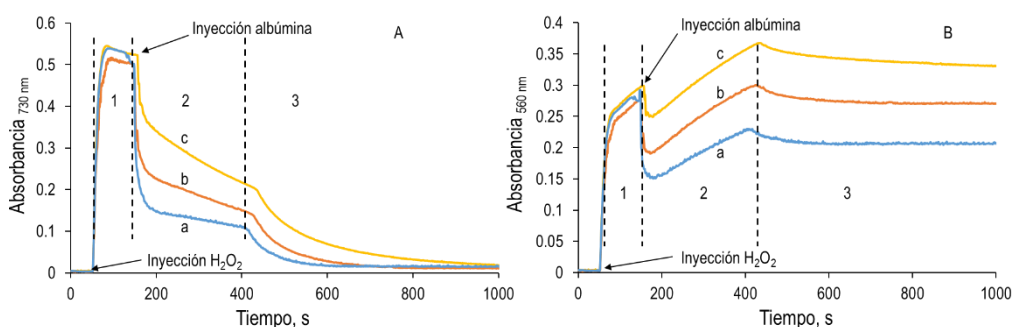


Figura 6.23: Registros cinéticos de la Abs a 730 nm (A) o 560 nm (B) frente al tiempo de la reacción  $H_2O_2/HRP/ABTS$  tras la adición de albúmina en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 pH 6,  $[HRP] = 1,94 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[H_2O_2] = 4,9 \cdot 10^{-5} M$ ,  $[ABTS] = 4,19 \cdot 10^{-5} M$ ,  $[Alb] = a) 10,2 mg \cdot L^{-1}$ , b)  $5,1 mg \cdot L^{-1}$ , c)  $2,5 mg \cdot L^{-1}$ .

Las tendencias a 730 y 560 nm son similares a las ensayadas con una cantidad de HRP elevada, por lo que la hipótesis de que es necesario el centro activo para



formar el  $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$  y los aminoácidos reductores para disminuir el exceso de  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  parecen ser correctas. Para corroborar definitivamente las especies del ABTS que intervienen en los procesos de oxidoreducción, se han realizado espectros incluyendo la zona ultravioleta para así poder observar la absorción molecular del ABTS. En la figura 6.24 la evolución espectral de las diferentes especies del ABTS. Inicialmente, antes de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el ABTS absorbe en torno a 350 nm. Tras la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se forma rápidamente el  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  (730 nm), el cual evoluciona para formar, por una parte  $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$  (560 nm), y posteriormente ABTS (350 nm), tal y como se había hipotetizado inicialmente.

Finalmente, para comprobar si realmente el  $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$  queda unido a la proteína, se ha realizado una separación en una columna de Sephadex. El procedimiento llevado a cabo se detalla en el capítulo 4, apartado 4.3.2.2. Los resultados obtenidos en esta separación son los que se muestran en la figura 6.25. Como se observa la banda del colorante y de la proteína eluyen a la vez, por lo que han debido formar algún tipo de complejo, ya que con las características de la columna preparada, no deberían salir en el mismo tiempo si no hay una unión entre ellos.

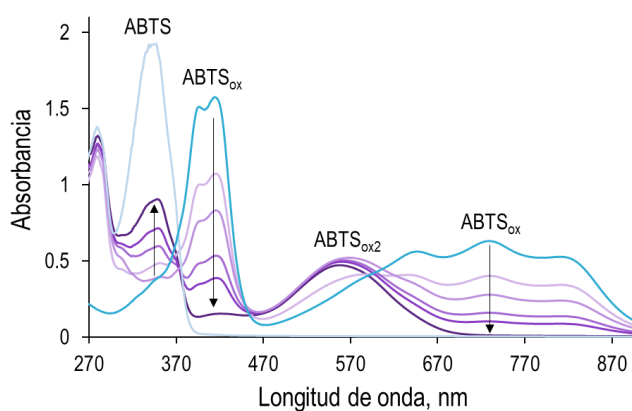


Figura 6.24: Evolución espectral de la reacción  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HRP}/\text{ABTS}$  en presencia de albúmina en disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[\text{Alb}] = 1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{HRP}] = 0,62 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{ABTS}] = 5,01\cdot 10^{-5} \text{ M}$  y  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5,98\cdot 10^{-5} \text{ M}$

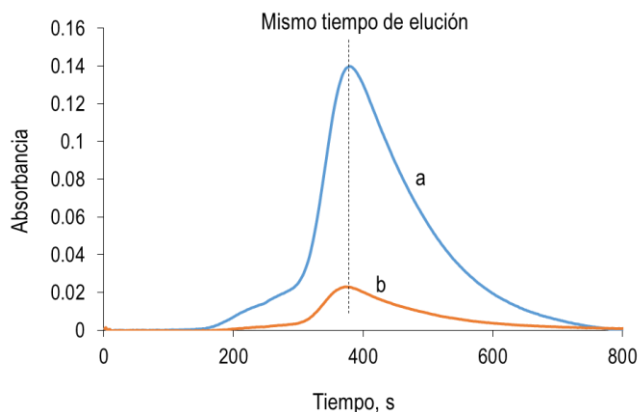


Figura 6.25: Absorbancia medida a la salida de la una columna de Sephadex G-100 en el que se ha inyectado 100  $\mu\text{L}$  de la reacción entre HRP y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de ABTS y albúmina en disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 pH 6.  $[\text{HRP}] = 2,09 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,41\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{ABTS}] = 4,43\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[\text{Alb}] = 4,95 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . a)  $\text{Abs}_{280}$  debida a la parte proteica y b)  $\text{Abs}_{560}$  debida al  $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$ .

Una vez que se conocen cuáles son las condiciones experimentales que llevan a la formación de la segunda especie oxidada del ABTS, se ha realizado un estudio del rango lineal de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que puede ser determinado con cada una de las dos especies oxidadas.

En la figura 6.26 se muestran los rangos lineales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizando la absorbancia del  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  (730 nm) y el  $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$  (560 nm). Para este estudio se ha utilizado una concentración de HRP de  $1,8 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , de albúmina de  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y de ABTS  $5,03\cdot 10^{-5} \text{ M}$ . Como puede observarse, una vez que el rango lineal de  $\text{H}_2\text{O}_2$  determinado gracias al  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  (azul) ha terminado, comienza el de  $\text{ABTS}_{\text{ox}2}$  (violeta). Gracias a este hecho, es posible aumentar el rango lineal del  $\text{H}_2\text{O}_2$  casi un orden de magnitud, utilizando la misma cantidad de ABTS. Este hecho puede ser importante para aquellas muestras que contengan una cantidad de proteína elevada, haciendo que se produzca la segunda oxidación del  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$ , que hasta la fecha podría haber pasado como un problema del ABTS, desechándose este tipo de muestras.

Es necesario apuntar que el rango lineal y la sensibilidad, utilizando la señal del  $ABTS_{ox}$ , es similar al observado sin presencia de albúmina, por lo que ésta no afecta a dichos parámetros analíticos. Por otro lado, la señal del  $ABTS_{ox2}$  (560 nm) ha sido corregida ya que a esa longitud de onda el  $ABTS_{ox}$  también absorbe. Para ello, es necesario establecer cuál es la relación entre  $Abs_{730nm}/Abs_{560nm}$  que presenta el  $ABTS_{ox}$  y usar este factor para corregir la absorbancia a 560 nm debida al  $ABTS_{ox}$ . Esta corrección ha sido tenida en cuenta en la figura 6.26.

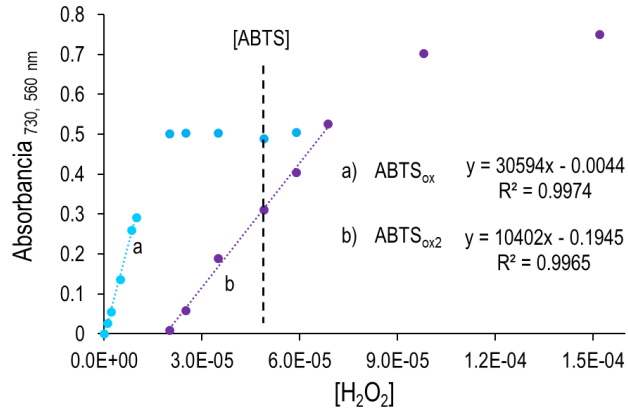


Figura 6.26: Relación entre la  $Abs_{m\acute{a}x}$  a a) 730 nm ( $ABTS_{ox}$ ) y b) 560 nm ( $ABTS_{ox2}$ ). En ambos estudios las condiciones son:  $[ABTS] = 5,03 \cdot 10^{-5} M$ ,  $[HRP] = 0.58 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Alb] = 1,5 mg \cdot mL^{-1}$  y un intervalo de  $[H_2O_2]$  desde  $1,03 \cdot 10^{-6} M$  hasta  $1,52 \cdot 10^{-4} M$ .

Una forma de alargar el rango de respuesta lineal, aprovechando este efecto es combinando las absorbancias a las dos longitudes de onda. La combinación se obtendría sumando a la absorbancia de 730 nm la de 560 nm multiplicada por el cociente de las sensibilidades entre ambas ( $30594/10402 = 2,94$ ). Al realizar esta combinación se obtiene un rango lineal que alcanza una concentración de  $H_2O_2$  hasta  $7 \cdot 10^{-5} M$  (figura 6.27).

Capítulo 6. Estudio crítico de las posibilidades analíticas del ABTS y su uso para la determinación de putrescina y cadaverina

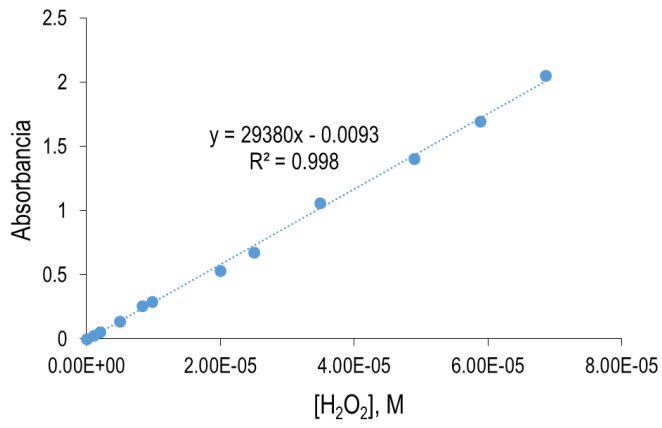


Figura 6.27: Recta de calibrado combinada

#### 6.4. Bibliografía

- [6.1] C. Lee and J. Yoon, "UV direct photolysis of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 197, no. 2-3, pp. 232-238, **2008**, doi: 10.1016/j.jphotochem.2007.12.030.
- [6.2] S. L. Scott, W. J. Chen, A. Bakac, and J. H. Espenson, "Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions," *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 25, pp. 6710-6714, **1993**, doi: 10.1021/j100127a022
- [6.3] C. Aliaga, "Reactions of the radical cation derived from 2, 2' - acid) (ABTS $\cdot$ +) with amino acids. Kinetics and mechanism azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)," *Can. Journal Chem.*, vol. 78, pp. 1052-1059, **2000**, doi: 10.1139/cjc-78-8-1052.
- [6.4] E. Matsumura, T. Shin, S. Murao, E. Yamamoto, and T. Kawano, "New Enzymatic Colorimetric Reactions of Benzoic Acid Derivatives with ABTS [2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] in the Presence of Laccase," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 51, no. 10, pp. 2743-2750, **1987**, doi: 10.1080/00021369.1987.10868460.
- [6.5] A. M. Osman, K. K. Y. Wong, and A. Fernyhough, "ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 346, no. 1, pp. 321-329, **2006**, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.118.

## Capítulo 7

# Determinación de putrescina y cadaverina mediante un método colorimétrico de imagen basado en el uso del TMB



## 7.1. Resultados experimentales previos

Como se ha comentado en el capítulo 3, los resultados de los estudios previos del TMB en disolución se han llevado a cabo de manera paralela en el grupo de investigación. Aunque no pertenecen estrictamente a esta Tesis, se van a presentar los resultados más representativos, para que se pueda entender la base química de este colorante y su posterior aplicación en tiras reactivas de celulosa. Como se verá, muchos de los fenómenos observados en la reacción con ABTS también se van a reproducir aquí y por causas similares.

### 7.1.1. Estudio en disolución del TMB

A pH neutro, el TMB es incoloro en disolución. Éste puede sufrir una primera oxidación, formando el  $\text{TMB}_{\text{ox}}$ , el cual puede sufrir una segunda oxidación para formar el  $\text{TMB}_{\text{ox}2}$  de color amarillento. El  $\text{TMB}_{\text{ox}}$  está en equilibrio con un complejo de transferencia de carga entre TMB y  $\text{TMB}_{\text{ox}2}$  dando lugar a una coloración azul. En la figura 7.1 se muestran las diferentes estructuras del TMB, así como los espectros de absorción de cada uno de ellos a diferentes pH [7.1].

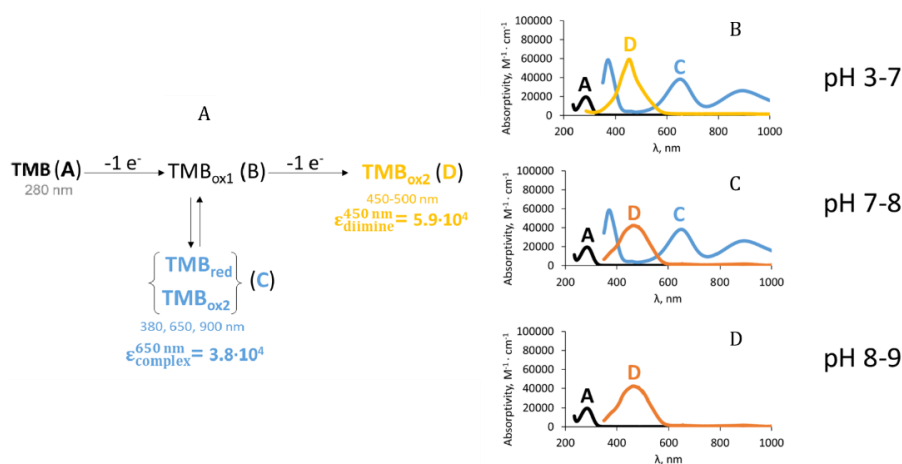


Figura 7.1: A: Esquema de las diferentes especies redox del TMB. B-D: Espectros de absorción molecular de las diferentes especies según el pH. [7.1]



### 7.1.1.1. Influencia de la relación TMB:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tal y como se observa en la figura 7.2, para una relación de [TMB]:[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] igual o inferior a 10 todo el TMB es oxidado a TMB<sub>ox2</sub>. Esto es lógico, ya que para poder formar el complejo de transferencia de carga, es necesario tener TMB en exceso para poder formar en complejo TMB-TMB<sub>ox2</sub>. Al aumentar la cantidad de TMB se observa como existen tanto la forma TMB<sub>ox2</sub> como el complejo de transferencia de carga, alcanzando valores constantes para una relación TMB:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10:1. Con ello se concluye que es necesario trabajar con exceso de TMB para poder alcanzar el complejo de transferencia de carga de color azul, sin embargo, en exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> todavía es posible seguir la reacción midiendo la absorbancia de la especie TMB<sub>ox2</sub>. Además hay que tener en cuenta que el TMB no se disuelve bien en disoluciones acuosas, por lo que la concentración máxima en disolución sería de 0,1 mM.

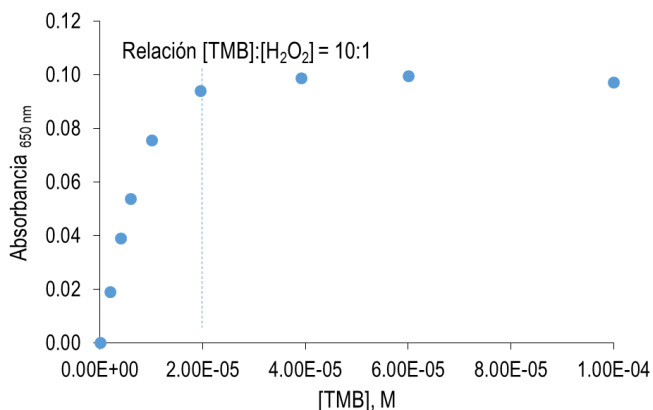


Figura 7.2: Absorbancia a 650 nm del sistema HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB. [HRP] = 1,24 U·mL<sup>-1</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 2,0·10<sup>-6</sup> M, en disolución amortiguadora H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0,1 M pH 6.

### 7.1.1.2. Optimización de la cantidad de HRP

La cinética de la reacción HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB es muy rápida, por lo que la cantidad de HRP necesaria es muy pequeña (figura 7.3), siendo la concentración óptima 0,6 U·ml<sup>-1</sup>. Sin embargo, cuando la concentración de HRP que se adiciona se

incrementa, el color azul debido al  $\text{TMB}_{\text{ox}}$  se pierde gradualmente y cada vez de manera más intensa. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta las propiedades reductoras de los aminoácidos tirosina y triptófano que puedan estar presentes en la cara externa de la proteína. Este hecho es importante tenerlo en cuenta para no perder señal una vez que se haya formado y por tanto las lecturas asociadas a la intensidad de color en soportes de celulosa se puedan ver afectadas a lo largo del tiempo.

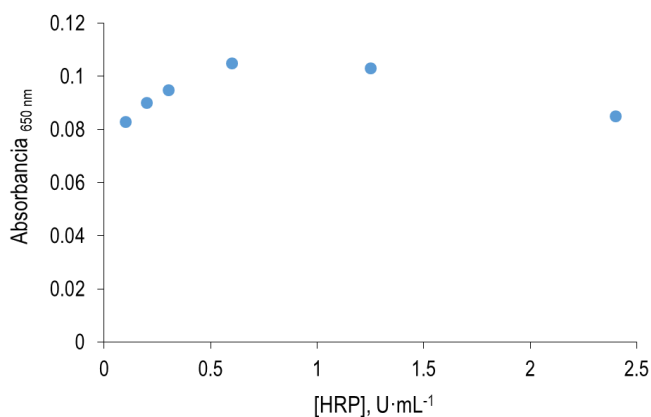


Figura 7.3: Relación entre la señal obtenida y la cantidad de HRP en el sistema HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /TMB.  $[\text{TMB}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , en disolución amortiguadora  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 M pH 6.

### 7.1.1.3. Reacción de la DAO/ABs/HRP/TMB

Como se ha comentado anteriormente, la relación de concentraciones entre el TMB y la HRP debe ser de al menos 10:1, para que así se obtenga el máximo de señal posible. Ahora es necesario saber cómo afecta la DAO a la formación del  $\text{TMB}_{\text{ox}}$ . Como se puede observar en la figura 7.4, la concentración de DAO utilizada afecta a la cinética de la reacción, pero no así al máximo de señal obtenido, ni tampoco a la estabilidad de la señal obtenida. Con una concentración de DAO de 2  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  se obtiene el máximo de señal en menos de 2 minutos.

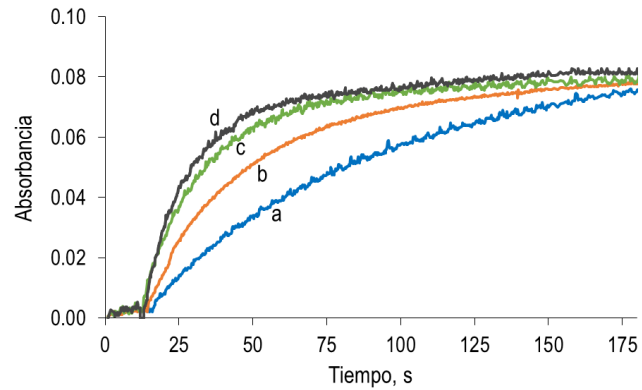


Figura 7.4: Optimización de la concentración de DAO.  $[TMB] = 1,0 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[HRP] = 0,5 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Cad] = 2,5 \cdot 10^{-6} M$  en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$   $0,1 M$  pH 6.

El pH óptimo de trabajo al acoplar la reacción de la DAO con las diaminas es 6, ya que como se observa en la figura 7.5, para pH mayores se observa cómo la señal va disminuyendo gradualmente a lo largo del tiempo, siendo pH 6, el único pH en el que la señal permanece estable.

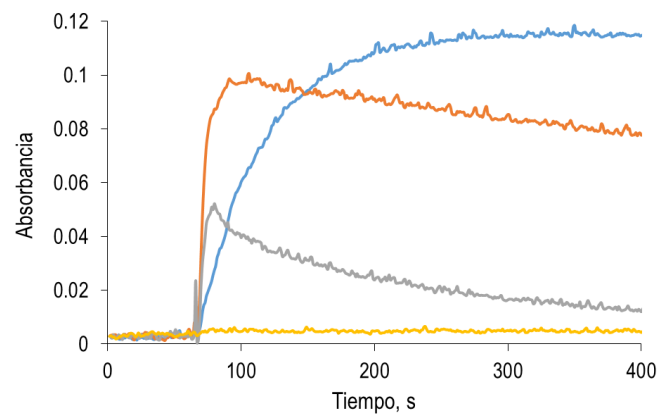


Figura 7.5: Optimización del pH de trabajo.  $[TMB] = 1 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[HRP] = 0,5 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[DAO] = 2 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Cad] = 4 \cdot 10^{-6} M$  en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$   $0,1 M$  pH 6.

#### 7.1.1.4. Calibración en disolución

En la figura 7.6A se muestran las rectas de calibrado para Put y Cad utilizando el sistema enzimático DAO/HRP/TMB, y se comparan con la obtenida utilizando una cantidad equivalente de  $H_2O_2$ . Como puede observarse la pendiente de la calibración de  $H_2O_2$  es mayor que la observada con Put y Cad. Esto puede ser explicado porque tanto la HRP, como la DAO pueden reducir parcialmente el  $TMB_{ox}$  a TMB, sin embargo debido a que la concentración de HRP utilizada es muy pequeña, posiblemente se deba exclusivamente al efecto de la DAO, tal y como se puede observar en la figura 7.6B. Las DER asociadas a las dos calibraciones se muestran en la tabla 7.1. Ambos analitos pueden ser determinados con la misma sensibilidad (no se aprecian diferencias significativas entre ellas utilizando un test t) y el rango de respuesta lineal permite la determinación de ambas aminas en muestras reales.

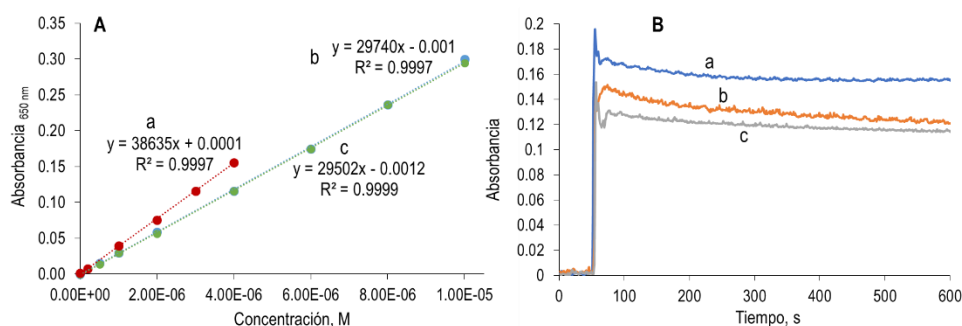


Figura 7.6: **A:** Rectas de calibrado.  $[TMB] = 1 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[HRP] = 0,5 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[DAO] = 2 U \cdot mL^{-1}$  en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 6. a)  $H_2O_2$  (sin DAO), b) Put, c) Cad. **B:** Efecto de la DAO sobre la señal del  $TMB_{ox}$ , en las mismas condiciones que las rectas de calibrado,  $[DAO] =$  a)  $0 U \cdot mL^{-1}$ , b)  $2 U \cdot mL^{-1}$ , c)  $10 U \cdot mL^{-1}$ .

Tabla 7.1: Rectas de calibrado en disolución para cadaverina, putrescina y peróxido de hidrógeno utilizando HRP, DAO y TMB.

Analito	Recta de calibrado ([Cad] y [Put], M)	Rango ( $\mu\text{M}$ )	DER (n = 5)	LD ( $\mu\text{M}$ )
Cad	Abs = 29502 [Cad] + 0,001; r = 0,999	0,5 - 10*	1,8	0,15
Put	Abs = 29740 [Put] + 0,001; r = 0,999	0,5 - 10*	0,8	0,15
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Abs = 38788 [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] + 0,0001; r = 0,999	0,35 - 6	2,3	0,1

Condiciones: [HRP] = 0,6 U·mL<sup>-1</sup>, [TMB] = 0,1 mM, [DAO] = 1,8 U·mL<sup>-1</sup>, pH 6,  $\lambda$  = 650 nm.

\*Máximas concentraciones ensayadas.

#### 7.1.1.5. Estudio de interferencias: tiramina e histamina.

Como se ha descrito en el capítulo 3, la DAO tiene unas 100 veces más especificidad ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) por Put y Cad que por Tir e His, sin embargo es necesario estudiar estas dos aminas como posibles interferentes, ya que suelen aparecer en muestras reales y es necesario conocer cómo actúan sobre el sistema DAO/HRP/TMB.

Según se desprende de la figura 7.7, tanto la tiramina como la histamina no producen una interferencia significativa hasta que su concentración es al menos 10 veces superior a la de las diaminas pero el efecto que producen ambas es distinto. La tiramina no produce cambios en el valor de absorbancia máximo y no cambia la estabilidad de la señal observada. Sin embargo, la histamina, no cambia la absorbancia máxima, pero sí produce un decrecimiento gradual de la señal, que está relacionado con la concentración adicionada de la misma (figura 7.7B). Aunque es una interferencia, este efecto podría ser usado, en un futuro, para la determinación simultánea de Put/Cad e His en muestras que contengan concentraciones elevadas de His en comparación con las de Put/Cad.

Capítulo 7. Determinación de putrescina y cadaverina mediante un método colorimétrico de imagen basado en el uso del TMB

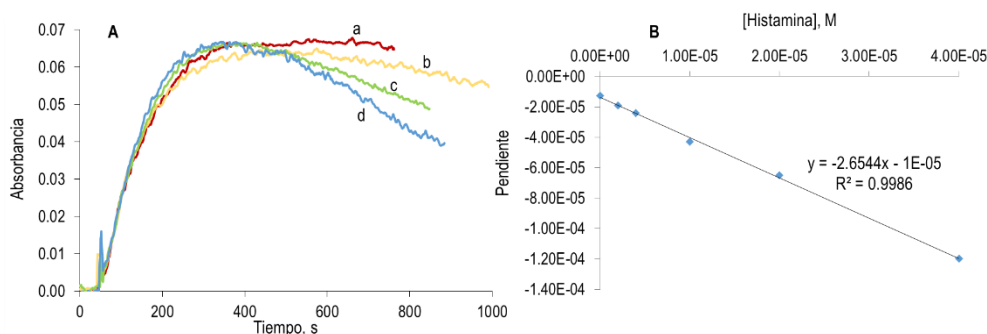


Figura 7.7: Influencia de histamina en la señal DAO/AB/HRP/TMB. **A:** Absorbancia frente al tiempo de la reacción DAO/Put/HRP/TMB en presencia de histamina, en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 6.  $[TMB] = 6,1 \cdot 10^{-5}$  M,  $[HRP] = 0,49$  U·mL<sup>-1</sup>,  $[DAO] = 1,0$  U·mL<sup>-1</sup>,  $[Put] = 2,1 \cdot 10^{-6}$  M,  $[His] =$  a) 0 M, b)  $2,0 \cdot 10^{-6}$  M, c)  $1,0 \cdot 10^{-5}$  M, d)  $2,0 \cdot 10^{-5}$  M. **B:** Relación entre la concentración de histamina y el decrecimiento de la pendiente.

Para conocer a qué puede ser debido la bajada de señal que se observa tras alcanzar el máximo, se ha realizado un estudio en torno a la histamina. La figura 7.8, muestra que no hay ningún cambio de señal tras la adición de histamina.

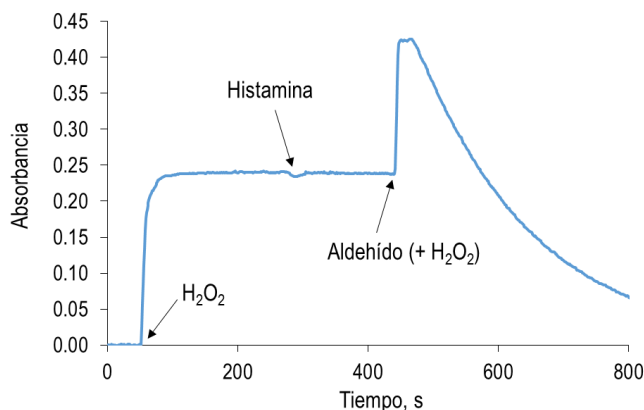


Figura 7.8: Efecto del imidazol-4-il acetaldehído sobre la señal del  $TMB_{ox}$ .  $[TMB] = 1 \cdot 10^{-4}$  M,  $[HRP] = 0,6$  U·mL<sup>-1</sup>,  $[H_2O_2] = 7 \cdot 10^{-6}$  M,  $[His] = 2 \cdot 10^{-4}$  M,  $[His_{ox}] = 2 \cdot 10^{-4}$  M, en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 6.

Posteriormente, al adicionar una mezcla de DAO e histamina, es decir, una adición del producto de la oxidación de la histamina (imidazol-4-il-acetaldehído) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observa la subida de la señal por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado e inmediatamente

después, desciende bruscamente la señal. Esto puede ser debido a que el producto de la oxidación de la histamina regenera el TMB<sub>ox</sub> al igual que ocurría con el ABTS.

#### **7.1.1.6. Determinación de Put/Cad en una muestra de atún**

Para comprobar el método colorimétrico se aplicó a una muestra de atún (capítulo 4, apartado 4.3.3.1). En esta muestra la cantidad de histamina y tiramina está por debajo del límite interferente, por lo que es idónea para poder evaluar el método en la determinación de diaminas. El resultado obtenido fue de 490 ( $\pm 40$ ) mg·kg<sup>-1</sup> (n = 3), siendo un valor estadísticamente similar al obtenido mediante HPLC-MS (método de referencia), siendo la  $t_{cal} = 0,4$  y la  $t_{crit} = 2,78$  (con un 95 de confianza). Es por ello, que este resultado sirve para validar el método desarrollado en disolución y con ello poder implantarlo en tiras reactivas.

### **7.1.2. Estudio en soportes de celulosa**

#### **7.1.2.1. Modelado matemático de la señal RGB**

La implementación de este método en soportes de celulosa tiene más sentido si estos se van a utilizar para la realización de medidas rápidas y, si es posible, *in situ*. Por ello es necesario combinar el método con un procedimiento de cuantificación de la señal que sea fácilmente accesible. Se consideró que la mejor opción era usar un sistema de adquisición de imágenes digitales ampliamente disponible, como es un teléfono inteligente, y un método de cuantificación basado en la medida de color mediante coordenadas RGB.

La utilización de las coordenadas RGB como método (semi-) cuantitativo ha quedado demostrado ampliamente en la bibliografía. En la mayor parte de los estudios descritos, se establecen relaciones empíricas entre los valores de estas coordenadas (o parámetros derivados de ellas) y la concentración de la sustancia absorbente. Con objeto de intentar arrojar algo de luz, se ha desarrollado un

modelo teórico que permita relacionar los valores de las coordenadas con los parámetros relacionados con las características del soporte sólido y las características de la especie absorbente (colorante).

En términos generales, los valores para cualquiera de las coordenadas RGB ( $E_{(R,G,B)}$ ) obtenidas en un sistema de imagen digital se pueden relacionar con la concentración ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de la especie absorbente, en este caso,  $\text{TMB}_{\text{ox}}$ , según: [7.2].

$$E_{(R,G,B)} = A \sum_{\lambda} I_{\lambda} P_{\lambda} R_{\lambda} \quad \text{Ec. 7.1}$$

donde:

- A es una constante que incluye factores relacionados con el diseño de la cámara, el ángulo sólido, el transformador luz-voltaje y la conversión analógica a digital;
- $I_{\lambda}$  es la intensidad espectral de la fuente de iluminación que normalmente es conocida e independiente de las características del sólido medido;
- $P_{\lambda}$  es la sensibilidad espectral de la cámara (este parámetro es característico de cada teléfono inteligente);
- $R_{\lambda}$  es la reflectancia del sólido (tiras reactivas). Este parámetro depende de las especies coloreadas presentes en el sólido ( $C$ , en M y  $\varepsilon_{\lambda}$ , en  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y el coeficiente de dispersión del sólido ( $s_{\lambda}$ , en cm). Varios modelos han propuesto relacionar el parámetro  $R_{\lambda}$  con  $\varepsilon_{\lambda}$ ,  $s_{\lambda}$  y  $C$ , siendo el más utilizado el que deriva de la teoría Kubelka-Munk adaptada a las medidas en cromatografía en capa fina [7.3].

$$R_{\lambda} = \frac{1}{\alpha_{\lambda} + \beta_{\lambda} \text{Coth}(\beta_{\lambda} s_{\lambda} L)} \quad \text{donde } \alpha_{\lambda} = \frac{2,3\varepsilon_{\lambda} C + s_{\lambda}}{s_{\lambda}} \text{ y } \beta_{\lambda} = \sqrt{\alpha_{\lambda}^2 - 1} \quad \text{Ec. 7.2}$$

donde la Coth es la cotangente hiperbólica y L es el paso óptico.



La combinación de las ecuaciones 7.1 y 7.2 da lugar a:

$$E_{(R,G,B)} = A \sum_{\lambda} I_{\lambda} P_{\lambda} \frac{1}{\alpha_{\lambda} + \beta_{\lambda} \text{Coth}(\beta_{\lambda} s_{\lambda} L)} \quad \text{Ec. 7.3}$$

La ecuación 3 sugiere una relación compleja entre  $E_{(R,G,B)}$  y la concentración de analito. Sin embargo, puede ser simplificado utilizando la aproximación de los polinomios de Taylor, dando lugar a:

$$E_{(R,G,B)} = A E_{0,(R,G,B)} + A \sum_i \frac{1}{i!} E_{i,(R,G,B)} c^i \quad \text{Ec. 7.4}$$

Donde  $E_{0,(R,G,B)}$  es la respuesta obtenida cuando la concentración de las especies coloreadas es 0

$$E_{0,(R,G,B)} = A \sum_{\lambda} I_{\lambda} P_{\lambda} \left( \frac{s_{\lambda} L}{1 + s_{\lambda} L} \right) \quad \text{Ec. 7.5}$$

Como es bien conocido, el orden mínimo del polinomio depende de la amplitud del rango de concentraciones a cubrir y la complejidad de la función original. En este caso,  $i = 2$  proporciona un equilibrio adecuado entre el rango de concentración y la robustez de la curva de calibración, si bien para algún rango de concentraciones se puede ajustar una relación lineal.

$$E_{1,(R,G,B)} = - \sum_{\lambda} I_{\lambda} P_{\lambda} \left[ \left( \frac{s_{\lambda} L}{1 + s_{\lambda} L} \right)^2 \left( \frac{3 + 2s_{\lambda} L}{3s_{\lambda}} \right) \right] 2,3 \varepsilon_{\lambda} c \quad \text{Ec. 7.6}$$

$$E_{2,(R,G,B)} = \sum_{\lambda} I_{\lambda} P_{\lambda} \left[ \left( \frac{s_{\lambda} L}{1 + s_{\lambda} L} \right)^3 \left( \frac{30 + 45s_{\lambda} L + 24(s_{\lambda} L)^2 + 4(s_{\lambda} L)^3}{45s_{\lambda}^2} \right) \right] 2,3(\varepsilon_{\lambda} c)^2 \quad \text{Ec. 7.7}$$

Para evitar el efecto de la luz parásita y de A en la señal analítica, se utilizaron  $\Delta E$  y  $\Delta E_r$ ; estos parámetros establecen dos tipos de correcciones respecto de la señal en ausencia de sustancia absorbente.

$$\Delta E_{(R,G,B)} = E_{0,(R,G,B)} - E_{(R,G,B)} \quad \text{Ec. 7.8}$$

$$\Delta E_{(R,G,B),r} = \frac{E_{0,(R,G,B)} - E_{(R,G,B)}}{E_{0,(R,G,B)}} \quad \text{Ec. 7.9}$$

### 7.1.2.2. Estudios previos en tiras comerciales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Previo al diseño de soportes de celulosa se utilizaron tiras comerciales de peróxido, las cuales llevaban inmovilizadas HRP y un colorante similar al TMB (de concentración desconocida). A estas tiras se les añadió DAO para hacerlas sensibles a las aminas biógenas. En la figura 7.9 se muestra una imagen del sistema de medida utilizado.

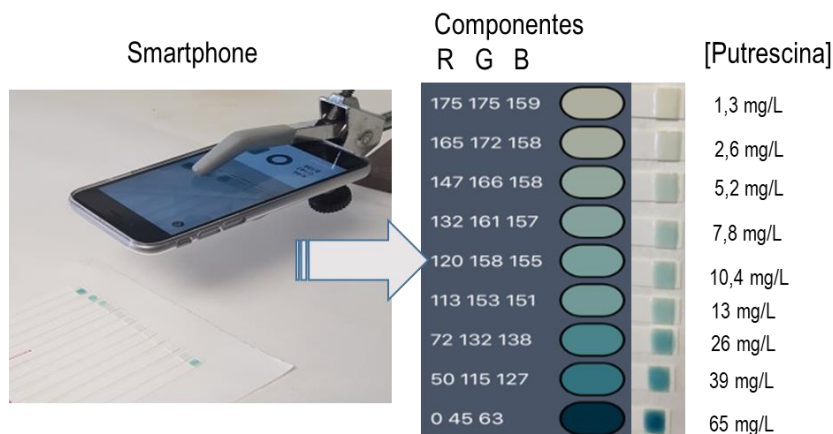


Figura 7.9: Sistema de medida de aminas biógenas en tiras comerciales a las que se les ha adicionado DAO.

Una vez adicionada la DAO y, posteriormente, una disolución de aminas biógenas, se obtuvieron los valores de  $\Delta E_{R,r}$ ,  $\Delta E_{G,r}$ , y  $\Delta E_{B,r}$ . Los resultados obtenidos son los que se muestran en la figura 7.10. De ellos se desprenden las siguientes conclusiones:

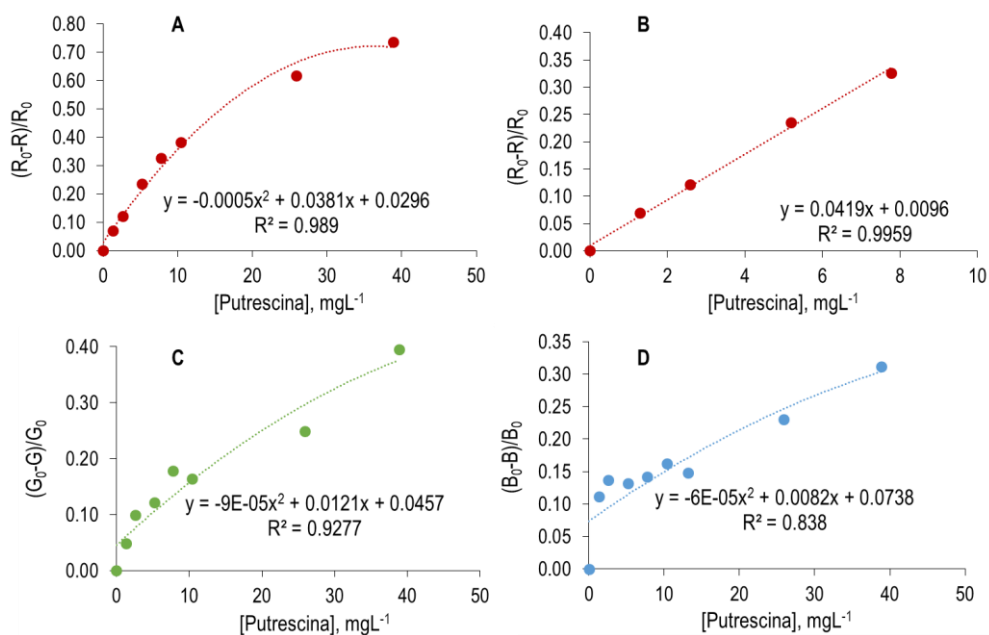


Figura 7.10: Calibraciones de putrescina en las tiras comerciales con DAO.  $[DAO] = 0,25 U_{soporte}$ . **A y B**) coordenada R, **C**) coordenada G, **D**) coordenada B. Las señales fueron tomadas con un iphone 6S con la app Color Value Pro 1.0

1) La mayor sensibilidad viene dada por la componente R ( $\Delta E_{R,r}$ ). Este resultado era previsible teniendo en cuenta el espectro de absorción molecular del  $TMB_{ox}$  comparado con la capacidad de respuesta espectral de la CCD del teléfono móvil usado (figura 7.11). En esta figura se puede observar que el  $TMB_{ox}$  (de color azul) muestra muy baja absorbancia en el rango de longitudes de onda de la componente B, algo mayor en la componente G y mucho mayor en la componente R.

2) Los resultados están de acuerdo con el modelo. Para valores bajos de  $E_r$  (bajas concentraciones de Put) se obtiene una respuesta lineal (figura 7.10B) y una respuesta polinomial de segundo orden para un rango de concentraciones más amplio (figura 7.10A).

3) Estos resultados demuestran que es posible utilizar este tipo de tiras reactivas para la determinación semicuantitativa de Put/Cad mediante la adición de DAO sobre éstas.

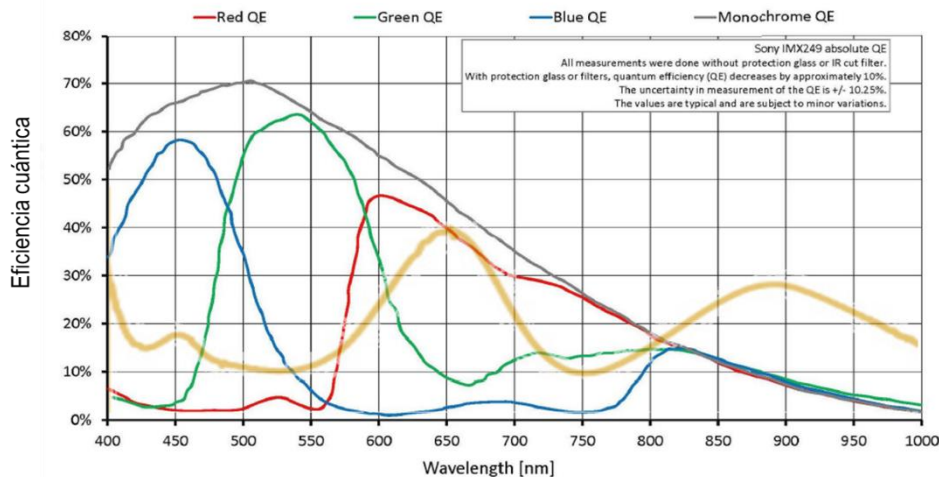


Figura 7.11: Imagen tomada de [7.4] y solapada con el espectro del TMB<sub>ox</sub> (línea amarilla).

### 7.1.2.3. Diseño de los soportes de celulosa

Para el diseño de un método rápido, sensible y reproducible, la cinética de la reacción debe ser rápida y el color generado durante la propia reacción ha de ser intenso y homogéneo (en la medida de lo posible). Obtener estas características requiere controlar dos aspectos: 1) El analito debería difundir de forma controlada a través de los soportes, evitando fenómenos no deseados como “anillo de café”, donde el producto coloreado se acumula en el borde exterior. 2) La enzima no debería perder actividad tras la inmovilización. Ambos aspectos dependen del material utilizado (tipo de celulosa, concentración y volumen de la disolución de celulosa utilizado), y la forma en que se inmoviliza la enzima.

Los diferentes tipos de celulosa utilizados son los que se describen en el capítulo 4, apartado 4.1.1. En la figura 7.12 se muestra la señal obtenida usando

diferentes concentraciones de celulosa desde el 1% hasta el 5% (p/v) para cada una de ellas. Concentraciones menores al 1% dan lugar a soportes muy débiles y concentraciones superiores al 5% proporcionan una baja reproducibilidad debida a su baja difusión. Con ello, se eligió como concentración óptima la celulosa del 3% debido a que mostraba mayor equilibrio entre sensibilidad y tiempo de reacción. Todas las celulosas estudiadas dieron buenos resultados, pero la celulosa A fue la que mejor se adaptaba a los requisitos pretendidos (ANOVA de un factor, 95%).

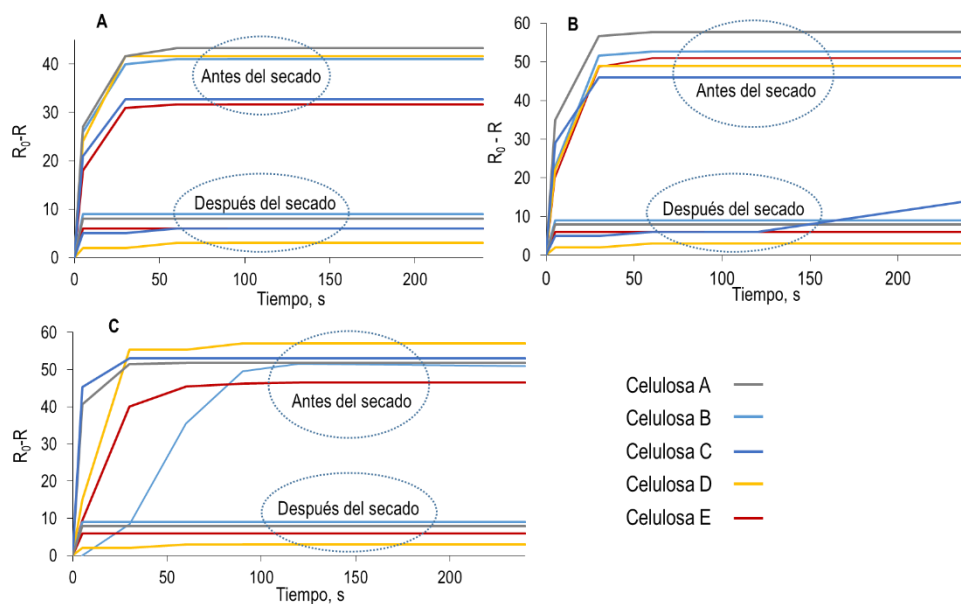


Figura 7.12: Estudio de 5 tipos de celulosas (A-E) usando tres concentraciones en cada una de ellas. **A)** 1 %, **B)** 3 %, **C)** 5 %.  $[TMB] = 6 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[HRP] = 1 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[DAO] = 0,25 U_{soporte}$ . La DAO es adicionada antes y después del secado.

Por otra parte, atendiendo al volumen de muestra adicionado (50, 75 y 100  $\mu L$ ), sin modificar la concentración de la misma, no se observaron diferencias significativas en la señal final. Por último, la inmovilización de la enzima mediante entrapamiento es deseable para obtener un color homogéneo, aunque conlleve una pérdida de actividad enzimática. Si bien la HRP puede ser entrapada sin efectos no deseados, no ocurre lo mismo con la DAO, la cual utilizando esta técnica

de inmovilización disminuye la intensidad de la señal y la velocidad de reacción; es por ello que se decidió inmovilizar esta enzima mediante adsorción.

#### 7.1.2.4. Optimización de las condiciones experimentales

La figura 7.13 muestra los resultados asociados a la cantidad de DAO inmovilizada en el soporte de celulosa. Tal y como se observa, para cantidades mayores a 0,25 U de DAO (en el soporte), los valores de  $\Delta E_R$  no se ven afectados, sin embargo, el tiempo de respuesta disminuye al aumentar la cantidad de DAO. Este comportamiento era de esperar, ya que a mayor cantidad de DAO, más rápida será la transformación de las diaminas en  $H_2O_2$  y por tanto más rápido aparecerá el color azul del  $TMB_{ox}$ . Así pues, la cantidad óptima escogida es 0,25 U/soporte, ya que es la menor cantidad de enzima para la que se obtiene el máximo de señal y además el tiempo de respuesta (en torno a 30 segundos) es apropiado para el desarrollo de un test rápido.

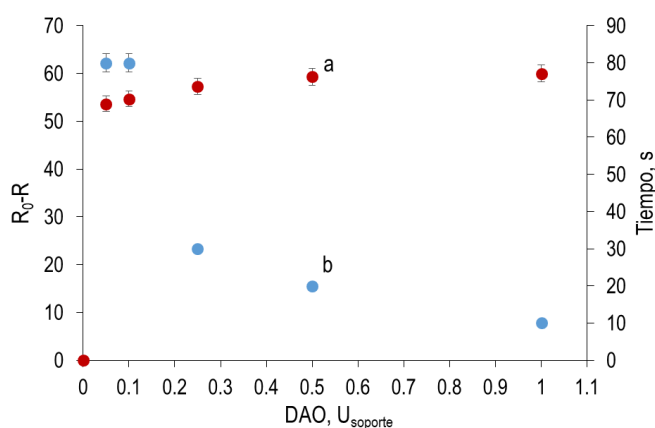


Figura 7.13: Optimización de la cantidad de DAO en los soportes de celulosa según la señal  $R_0-R$  obtenida y el tiempo de respuesta.  $[Celulosa] = 3 \%$ ,  $[HRP] = 0,5 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[TMB] = 6 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[Cad] = 1 \cdot 10^{-4} M$  en disolución amortiguadora  $H_2PO_4/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 7, a)  $R_0-R$  y b) tiempo.

Para estudiar la  $[TMB]$  óptima dentro del soporte de celulosa, se estudiaron diferentes relaciones entre  $[TMB]:[Cad]$ . Estos resultados se muestran se la tabla

7.2. Como puede observarse no hay diferencias significativas para ratios mayores a 10 (ANOVA de un factor), por lo que el exceso de TMB con respecto a las diaminas ha de ser al menos superior o igual a 10. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en disolución.

*Tabla 7.2: Efecto de la relación entre [TMB]:[Cad] en la señal e incertidumbre de los soportes de celulosa.*

[TMB], M	[TMB]:[Cad]	R <sub>0</sub> - R	s
1,00·10 <sup>-5</sup>	0,2:1	13,7	0,4
5,00·10 <sup>-5</sup>	1:1	26,7	0,5
1,00·10 <sup>-4</sup>	5:1	49,3	0,5
2,00·10 <sup>-4</sup>	10:1	56,3	0,6
4,00·10 <sup>-4</sup>	20:1	59,3	0,6
6,00·10 <sup>-4</sup>	30:1	61,0	1,7
8,00·10 <sup>-4</sup>	40:1	57,0	1,5

Una de las características analíticas más importantes es el tiempo de vida de los soportes de celulosa, ya que en ausencia de cualquier estabilizante enzimático, su uso se ve reducido a 4 días. Es por ello, que el grupo de investigación se estudió de manera paralela a esta tesis la utilización de estabilizantes comerciales que ayudasen a aumentar el tiempo de vida útil de estos soportes y además no cambiasen significativamente la respuesta de los mismos.

Lo diferentes estabilizantes comerciales estudiados fueron: StabilCoat, StabilGuard, StabilZyme/HRP y StabilZyme Select. Después de un estudio exhaustivo de diferentes parámetros a tener en cuenta como el momento exacto durante la síntesis del soporte en el que se añadía las enzimas y los estabilizantes, así como el orden de adición, se llegó a la conclusión de que los que otorgaban mejores resultados eran StabilCoat y StabilGuard, llegando a aumentar el tiempo de vida útil hasta al menos los 45 días (figura 7.14). En estas condiciones la señal

óptima se obtiene a los 30 segundos y es estable durante los primeros 5 minutos posteriores.

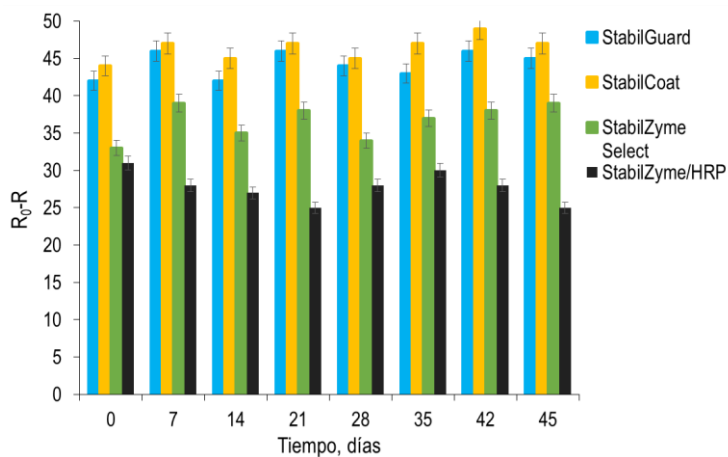


Figura 7.14. Efecto de los diferentes estabilizantes en el tiempo de vida de los soportes de celulosa preparados.

### 7.1.3. Aplicación a muestra real

Para poder realizar la determinación de diaminas en la muestra de atún, primero se realizaron las calibraciones correspondientes a putrescina y cadaverina utilizando los soportes de celulosa optimizados previamente. Los resultados de estas calibraciones son los que se muestran en la tabla 7.3.

Con ambas diaminas se ha conseguido extender el rango de aplicabilidad, trabajando con polinomios de segundo grado, aunque la linealidad de las rectas para ambas diaminas es suficiente para poder aplicarse a muestras reales. Como se observa la sensibilidad del método optimizado es similar para putrescina y cadaverina.



Tabla 7.3: Rectas de calibrado en soportes de celulosa para cadaverina, putrescina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Analito	Rectas de calibrado* ([Cad], [Put] y [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] en M)	Rango (μM)	DER, n = 4	LD (μM)
Cad	$\Delta R_r = 1785[\text{Cad}] - 0,0004$	50 - 200	3,2	15
	$\Delta R_r = -576792[\text{Cad}]^2 + 1906[\text{Cad}] - 0,004$	50 - 400**	3,2	15
Put	$\Delta R_r = 1844[\text{Put}] + 0,0042$	50 - 200	3,1	15
	$\Delta R_r = -965171[\text{Put}]^2 + 2039[\text{Cad}] - 0,001$	50 - 400**	3,1	15
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$(R_0 - R)/R_0 = 2211 [\text{H}_2\text{O}_2] + 0,004;$	15 - 300	3,8	4,5

Condiciones: Soportes del 3% de celulosa, [HRP] = 0,5 U·mL<sup>-1</sup>, [TMB] = 0,6 mM, pH 6. Posteriormente se añade DAO 0,5 U totales en el soporte.

\* Máxima concentración ensayada.

\*\* Los valores de r fueron todos superiores a 0,997.

Para demostrar la utilización de este método en la determinación conjunta de putrescina y cadaverina, se prepararon mezclas de ambas diaminas en proporciones que iban desde el 1:1 hasta el 1:4, para cada una de ellas. Estas mezclas se interpolaron en ambas rectas de calibración y los errores obtenidos en la determinación de la cantidad de conjunta fueron entre el 3 y el 6 %, por lo que se puede asumir que cualquiera de las dos rectas de calibrado, la de putrescina o la de cadaverina, sirven para poder determinar la cantidad conjunta de diaminas en muestras reales.

Antes de poder analizar la muestra de atún del Servicio de Salud Pública de Aragón, es necesario corroborar las interferencias de tiramina e histamina observadas en disolución. Para relaciones de concentración menores a 5:1 de histamina respecto de Put/Cad no se observan cambios en la señal medida (figura 7.15), sin embargo, a los 5 minutos después de añadir la muestra con histamina, la señal ha desaparecido, por lo que el efecto es similar al observado en disolución (figura 7.7A). Así pues, si la señal observada desaparece a lo largo del tiempo,

puede ser debido a la presencia de histamina en la muestra. La tiramina, por el contrario, no produce ninguna interferencia en relaciones menores de 10:1.

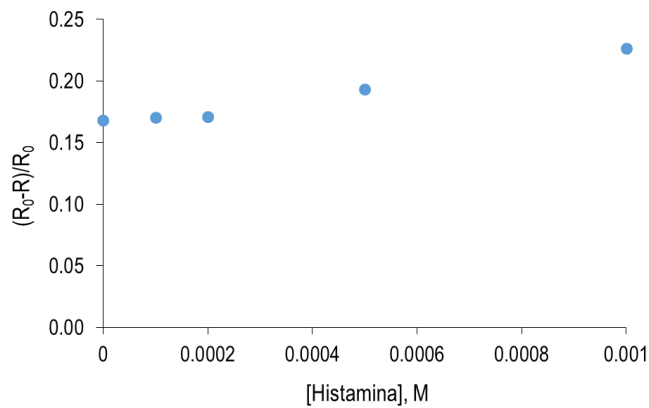


Figura 7.15: Efecto de la concentración de histamina en la señal de putrescina en los soportes de celulosa. [Celulosa] = 3%, [Put] = 0,1 mM.

Con ello, es posible utilizar los soportes de celulosa desarrollados para determinar Put/Cad en la muestra de atún. El resultado obtenido tras aplicar la muestra por triplicado fue:  $460 \pm 65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , siendo éste estadísticamente similar al obtenido mediante HPLC-MS (tabla 4.1, apartado 4.3.3.1) ( $t_{\text{calculada}} = 0,51 < t_{\text{crítica}} = 2,78$ ).

## 7.2. Bibliografía

- [7.1] S. Oliver, S. de Marcos, I. Sanz-Vicente, V. Cebolla, and J. Galbán, “Direct minimally invasive enzymatic determination of tyramine in cheese using digital imaging,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1164, **2021**, doi: 10.1016/j.aca.2021.338489.
- [7.2] D. Connah, S. Westland, and M. G. A. Thomson, “Recovering spectral information using digital camera systems,” *Color. Technol.*, vol. 117, no. 6, pp. 309–312, **2001**, doi: 10.1111/j.1478-4408.2001.tb00080.x.
- [7.3] J. Goldman, “Quantitative theory,” *Sep. Purif. Technol.*, pp. 7–19, **1973**.
- [7.4] <https://photo.stackexchange.com/questions/87172/can-we-compare-the-color-reproduction-accuracy-of-2-camera-sensors-only-by-looki> (Último acceso octubre 2021)

# **III**

## **Determinación de aminas biógenas por métodos basados en la generación de nanomateriales de oro.**



# Capítulo 8

## Métodos enzimáticos basados en el uso de nanomateriales de oro



### 8.1. Tipos de nanopartículas de oro

La incorporación de los nanomateriales, fundamentalmente nanoestructuras metálicas, ha permitido abrir nuevas líneas investigación en las determinaciones ópticas enzimáticas, ya que éstas pueden actuar tanto como indicadores y como catalizadores de la reacción enzimática, lo que ha llevado, en la mayoría de los casos, a la simplificación de la metodología existente, el abaratamiento de costes, y la disminución del tiempo de análisis.

Dentro de las nanoestructuras metálicas, las de oro son las que han experimentado un mayor auge debido a sus propiedades ópticas y físico-químicas, siendo el tamaño y la forma de las nanoestructuras las que determinan sus propiedades ópticas [8.1], y entre las que podemos diferenciar (figura 8.1):

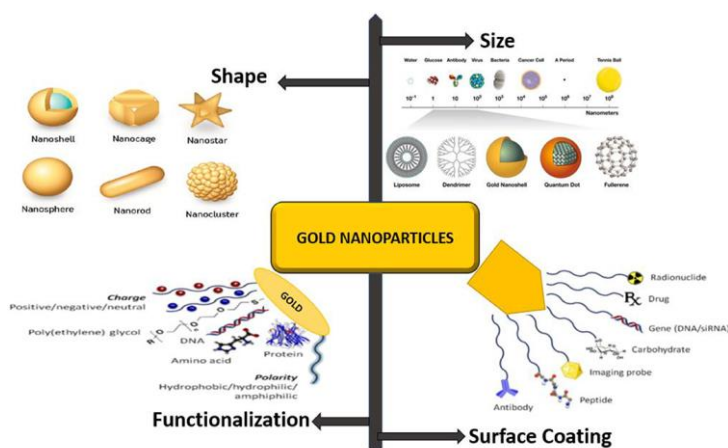


Figura 8.1 Clasificación de las nanopartículas de oro en función del tamaño y la forma y sus posibles aplicaciones [8.1]

- NANOESFERAS, que presentan absorción molecular debido a la resonancia de plasmón superficial longitudinal (LSPR).
- NANOCLUSTERS con propiedades de fluorescencia en la zona del Vis-NIR.



- NANORODS, que presentan dos bandas absorción molecular, una debida al plasmón longitudinal y otra al transversal.
- NANOSTARS con varias bandas de plasmón (una en cada punta de la nanoestructura) y con absorción, principalmente, en la zona del IR.

En este capítulo se discutirán las aplicaciones en determinaciones ópticas enzimáticas de las diferentes nanoestructuras de oro en función su tamaño.

## 8.2. Nanoesferas de oro

Las nanoesferas (también denominadas nanopartículas) de oro (AuNPs) son partículas agrupadas en el rango de unos pocos a varios cientos de nanómetros que consisten en un núcleo de oro y un revestimiento en la superficie. El núcleo de oro define las características fundamentales de una nanopartícula y el revestimiento (compuestos orgánicos de diferentes tamaños y grupos funcionales), que envuelve el núcleo, puede modificarse para interactuar con el entorno, así como para mejorar la estabilidad [8.2].

La incorporación de las nanopartículas de oro (AuNPs) en el desarrollo de biosensores ópticos se ha debido, además de sus propiedades ópticas, a la capacidad de funcionalización, lo que las hace altamente versátiles. La señal analítica utilizada es la debida al cambio en sus propiedades fisicoquímicas en el curso de la reacción enzimática, que puede ser inducida por un cambio en la forma y/o tamaño de las nanopartículas, o bien en el medio alrededor de ellas. Y se han utilizado tanto para la determinación de los analitos implicados en la reacción enzimática como para estudiar la actividad de las propias enzimas. Las estrategias de detección que más se han empleado han sido las colorimétricas, pero también se han aprovechado la capacidad de las AuNPs como potenciadoras de la señal Raman (SERS) o como catalizadoras, gracias a sus propiedades de imitación de enzimas.

### **8.2.1. Estrategias en métodos colorimétricos**

Los métodos colorimétricos se basan en la medida de la banda de plasmón superficial localizada (LSPR), que es debida a la oscilación de la banda de electrones de conducción cuando la luz incide en las AuNPs a longitudes de onda de resonancia específicas, con un máximo de absorbancia en la región visible entre 520 y 650 nm.

Las propiedades de absorción del plasmón dependen de la forma, tamaño y distancia entre las nanopartículas, así como de las propiedades físicas del medio, por lo que un cambio en estas características se asocia con un cambio en el espectro de absorción y un cambio evidente de color, que puede utilizarse para una detección simple a simple vista.

Los cambios en la banda de plasmón que más se han utilizado como señal analítica, son los debidos a:

#### **8.2.1.1. Cambios en el índice de refracción**

Se basa en la inmovilización de la enzima correspondiente, como la uricasa [8.3], la L-glutamato deshidrogenasa [8.4] o la taurina dioxigenasa [8.5], sobre AuNPs, logrando la determinación selectiva de los respectivos analitos. Los subproductos de las reacciones enzimáticas producen un cambio en el índice de refracción del entorno de las nanopartículas de oro, lo que da como resultado un desplazamiento hacia el rojo de la banda del plasmón.

#### **8.2.1.2. Cambios en la banda de absorción del plasmón debido a la agregación de las AuNPs**

Las propiedades ópticas de las AuNPs cambian cuando las partículas se agregan y los electrones de conducción se deslocalizan. Las disoluciones de nanopartículas no agregadas son rojas, con una absorbancia máxima de alrededor de 520 nm.

Cuando se agregan, el color se vuelve azul/violeta y se observa un desplazamiento hacia el rojo a longitudes de onda alrededor de 650 nm en el espectro.

Este fenómeno se ha utilizado como base para el desarrollo de pruebas rápidas y de bajo costo para la detección de ADN o mutaciones específicas [8.6-8.8], así como para el estudio de la actividad de las enzimas relacionadas con las enfermedades humanas [8.9-8.12]. Un ejemplo es el estudio basado en AuNPs modificadas con gelatinasas (de la familia de metaloproteinasas), y utilizadas como marcadores del cáncer de vejiga [8.9].

Otro ejemplo es un biosensor colorimétrico para la determinación de mercurio (II), que permite la detección del analito en base a la acción de la exonucleasa III y la agregación de las AuNPs [8.13].

### **8.2.1.3. Formación *in situ* de AuNPs**

Hasta la fecha, no existen muchos trabajos en los que se utilice la formación “*in situ*” de nanopartículas de oro como base de métodos analíticos. Los únicos casos en los que se ha utilizado se basan en la formación de las nanopartículas con un producto de la reacción enzimática, como es el caso de la determinación de compuestos organofosforados (OP), en los que la tiocolina (TCh), producto de la reacción enzimática de la Acetilcolinaesterasa, actúa como agente estabilizador, desencadenando la formación de nanopartículas de oro con un pico de absorbancia a 520 nm. Esta señal disminuye en presencia del OP, que inhibe la actividad de la enzima, lo que dificulta la formación de las NPs. Basado en este principio, Wu et al. ha desarrollado una tira reactiva colorimétrica sobre celulosa para la determinación visual de paration (figura 8.2) [8.14].

De la misma forma, se ha seguido la hidrólisis enzimática de enzimas como la celulasa y la xilanasas para determinar su actividad, ya que los sacáridos formados

en esta reacción son capaces de reducir directamente el Au (III) para formar AuNPs [8.15].

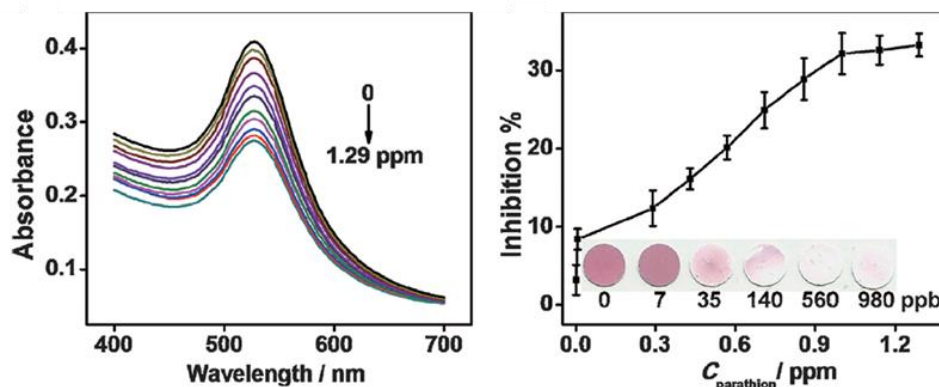


Figura 8.2: Método colorimétrico enzimático basado en la formación de AuNPs para la determinación de pesticidas organofosforados.

#### 8.2.1.4. Cambios en la fluorescencia un fluoróforo

En estos casos, aunque las nanopartículas no presentan fluorescencia, sí que pueden provocar cambios en la intensidad de fluorescencia de diferentes fluoróforos. Esto se puede conseguir, i) por agregación de las AuNPs con el compuesto fluorescente (como por ejemplo, QDots de nitruro de boro, los cuales interactúan con la tiocolina y en presencia de AuNPs forman un agregado que provoca un descenso en la fluorescencia de los QDs); ii) mediante funcionalización de las AuNPs (por ejemplo, con rodamina B (RB@AuNPs)), que se ha utilizado para la determinación de plaguicidas organofosforados y carbamatos [8.16], ya que la tiocolina que se forma en la reacción enzimática de la AChE, se une a las AuNPs liberando rodamina, produciendo así una doble respuesta, un aumento de la fluorescencia a 575 nm y un cambio de color a azul debido a la agregación de las AuNPs.

Otro ejemplo, es la determinación de colesterol [8.17], en el que las AuNPs se funcionalizan con ácido 11-mercaptoundecaicoico (11-MUDA) y la enzima,

Colesterol Oxidasa (ChOx), se une a ellas mediante la química de acoplamiento de la carbodiimida. La adición de colesterol desencadena las reacciones en cascada de la ChOx, produciendo  $H_2O_2$  como subproducto, lo que provoca la agregación de las AuNPs y la disminución la fluorescencia del marcador.

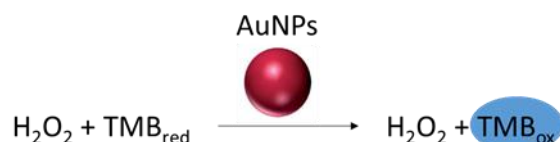
### **8.2.2. Métodos basados en la Espectroscopía Raman Mejorada en la Superficie (SERS)**

Una de las estrategias más utilizada en los ensayos de AuNPs basados en SERS se basa en el cambio de tamaño de las AuNPs (normalmente agregación/desagregación) con la reacción enzimática. Esta es la base para el estudio de la actividad enzimática de la uracil-ADN glicosilasa (UDG) [8.18] y las proteasas tripsina y trombina [8.19], que ha permitido determinar valores anormales de actividad de estas enzimas. En estos métodos, en los que las AuNPs se utilizan como herramienta de reconocimiento, las señales SERS ofrecen estrategias sencillas, sensibles y selectivas. De todas formas, para conseguir disminuir los límites de detección, las AuNPs se pueden modificar con compuestos que interaccionan con los productos o reactivos de la reacción enzimática, provocando su liberación y la consiguiente agregación de las NPs, como es el caso de la determinación de la actividad de las UGD, que consiguen mejorar significativamente la intensidad de la señal del colorante Raman (4-NTP).

Otra alternativa consiste en combinar las propiedades de mejora del SERS de las AuNPs con su capacidad de imitación de la peroxidasa para oxidar los indicadores Raman en presencia de  $H_2O_2$  [8.20]. Esta línea de trabajo se ha utilizado no sólo para la determinación de  $H_2O_2$ , si no también glucosa y lactato [8.21], mediante el acoplamiento de las enzimas correspondientes (Glucosa oxidasa y Lactato oxidasa) a las nanopartículas.

### 8.2.3. Las nanopartículas de oro como catalizadores

Una de las aplicaciones de las AuNPs que ha tenido mayor auge en los últimos años ha sido el uso de sus propiedades catalíticas como imitadores de enzimas. Es decir, en reacciones enzimáticas el nanomaterial actúa como enzima (principalmente tipo oxidasa), catalizando la reacción del analito y dando un cambio en las propiedades ópticas de un colorante o fluoróforo que está relacionado con la concentración del analito involucrado en la reacción enzimática.



*Figura 8.3: Reacción de oxidación del TMB en presencia de AuNPs*

En el caso de las AuNPs, se han utilizado como HRP-imitadores, catalizando la oxidación de un colorante (TMB, AmplexRed...) por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La actividad peroxidasa de las NPs conduce a la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la posterior oxidación del colorante (TMB pasa de incoloro a azul), permitiendo su detección.

Este mecanismo se ha utilizado en varios trabajos, que van desde la detección de virus [8.22], de K (I) [8.23] e incluso la especiación de  $\text{Hg}^{2+}$  y metilmercurio ( $\text{MeHg}^+$ ) [8.24], en este caso con nanopartículas bimetálicas de oro y platino (Pt/AuNPs) y Amplex®Red como fluoróforo.

### 8.3. Nanoclusters de oro

Los nanoclusters de oro (AuNCs), al igual que las nanopartículas, son nanoestructuras metálicas tipo core-shell formadas por agrupaciones de unos cientos de átomos (1-3 nm) y cuyos ligandos de la superficie son moléculas orgánicas con diferentes tamaños, grupos funcionales y cargas superficiales, que

interactúan directamente con el entorno y controlan su estabilidad coloidal. Este ligando actúa como agente estabilizador “*capping*” evitando su agregación.

Presentan un gran atractivo en la investigación debido a unas propiedades físico-químicas similares a las de las nanopartículas, pero, además, presentan también propiedades fluorescentes [8.25]. Estas propiedades de fluorescencia junto con su buena biocompatibilidad les han hecho ser ampliamente utilizados en variedad de aplicaciones de bioimagen, biosensores, agentes antimicrobianos y terapia del cáncer [8.26]. Además, sus propiedades fluorescentes (longitudes de onda de emisión, desplazamientos de Stokes y rendimientos cuánticos), son modulables y dependen tanto de su tamaño como de los agentes estabilizantes o ligandos utilizados durante su síntesis química [8.27].

Las estrategias de detección cuando estos nanoclusters se incorporan en determinaciones ópticas enzimáticas se basan en los diferentes mecanismos de fluorescencia: filtro interno, activación o desactivación de la intensidad de fluorescencia y transferencia de energía.

### **8.3.1. Estrategias de detección**

#### **8.3.1.1. Filtro interno**

El efecto de filtro interno (IFE) se ha utilizado principalmente para medir las actividades de las enzimas, donde el efecto puede deberse a:

1) Interacción con otros nanomateriales, como en el caso de Liu et al [8.28], donde la fluorescencia de los AuNCs es absorbida por AuNPs. Estas AuNPs están cargadas positivamente y cuando se unen a compuestos cargados negativamente (prolamina en este caso), la agregación de las AuNPs evita el filtro interno en la fluorescencia de los nanoclusters, lo que permite determinar la actividad de la enzima involucrada en la reacción.

b) Compuestos orgánicos (por ejemplo, nitrofenilfosfato) [8.29] cuyo espectro de absorción se superpone con el espectro de excitación de los AuNCs, y que se ha utilizado para medir la actividad de la fosfatasa alcalina.

### **8.3.1.2. Desactivación de la fluorescencia (estática)**

Son varias las especies pueden inducir la desactivación estática (*quenching estático*) de la fluorescencia de los AuNCs. Esta fluorescencia depende en gran medida del ligando que actúa de “*capping*” que, al mismo tiempo, está relacionado con el tipo de compuestos que podrían desactivar su fluorescencia.

Por un lado, los compuestos inorgánicos como el Cu (II) desactivan la fluorescencia de los AuNCs recubiertos con BSA porque el Cu (II) forma un complejo con los aminoácidos de la BSA. Sin embargo, si en la disolución hay un analito con mayor afinidad por el Cu (II), se produce la recuperación de la fluorescencia de los AuNCs. Este efecto se ha utilizado, por ejemplo, para determinar la actividad de telomerasa [8.30], de la tripsina [8.31] o la determinación de AChE [8.32]. Otros compuestos inorgánicos que también provocan este efecto son, el Eu (III) o el Hg (II), que se han utilizado para determinar la actividad de la proteína quinasa [8.33], de la TRA [8.34], o para la determinación de Hg (II) o Pb (II).

Por otro lado, los compuestos orgánicos, como enzimas (LDH [8.35]), tiocolina [8.36], bilirrubina [8.37], péptidos [8.38], proteínas (BSA) [8.39] o fosfato de piridoxal [8.40], se han utilizado para la determinación de actividades enzimáticas y sus inhibidores debido a su interacción con los AuNCs.

### **8.3.1.3. Desactivación de la fluorescencia (dinámica)**

La desactivación de la fluorescencia de los AuNCs debido a la interacción en el estado excitado (*quenching dinámico*) puede deberse a:



- 1) La capacidad de aceptar electrones de cualquiera de los componentes de la reacción enzimática, como en el caso de Yan et. Al [8.41], que determina plaguicidas organofosforados debido a su efecto de inhibición sobre la reacción TYR/dopamina (el dopaminocromo es el aceptor de electrones que desactiva la fluorescencia de AuNPs).
- 2) La unión de los AuNCs a péptidos [8.42], los cuales protegen el nanocluster de la desactivación de su fluorescencia que provoca el O<sub>2</sub>. Esto ha permitido la determinación de la actividad enzimática de reacciones enzimáticas en las que se consume O<sub>2</sub>.
- 3) La funcionalización de los nanoclusters de oro con compuestos que interaccionan con el analito a determinar (como por ejemplo que AuNCs funcionalizados con aminofenilborónico (APBA @ Au NCs) [8.43], que son desactivados dinámicamente por el catecol) y que también puede acoplarse a una segunda reacción enzimática para determinar la actividad de la enzima involucrada (por ejemplo, ALP).

#### **8.3.1.4. *Transferencia de energía o electrones***

La fluorescencia de los AuNCs también puede verse afectada a través del mecanismo de transferencia de electrones, como por ejemplo entre el Citocromo C y los AuNCs, que se ha utilizado para el diseño de tiras reactivas para la determinación visual (teléfono inteligente y software ImageJ) de tripsina [8.44].

La unión covalente de los AuNCs con flavoenzimas (enzimas que contienen FAD), provoca la transferencia de energía del FAD al AuNCs, por lo que la adición del analito involucrado en la reacción enzimática provoca la transformación del FAD a FADH<sub>2</sub> y, por tanto, una disminución de la transferencia de energía, y la consiguiente modificación de la intensidad de fluorescencia de los AuNCs. Este mecanismo ha servido como base para la determinación de colina y la acetilcolina

en base a su reacción enzimática con Colina Oxidasa unida covalentemente a los AuNCs [8.45].

### **8.3.1.5. Otras posibilidades de fluorescencia de AuNCs**

Además de los mecanismos de cambio de intensidad fluorescente que se han comentado, existen otros mecanismos que provocan modificación en la fluorescencia de los AuNCs y que también ha servido como base para el desarrollo de métodos enzimáticos basados en las propiedades ópticas de estos nanomateriales. Las más importantes son las siguientes:

#### **1) Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

El efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la fluorescencia de los AuNCs ha sido ampliamente estudiado ya que, dependiendo del ligando que actúa de estabilizante “capping”, su interacción con los AuNCs puede dar lugar a un aumento o disminución de la fluorescencia de éstos.

Así, se ha demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prácticamente no afecta la fluorescencia de los AuNCs de BSA (AuNCs@BSA), sin embargo, es la base de una sonda para la determinación de colesterol con colesterol oxidasa [8.46], dado que provoca la rotura de los enlaces Au-S en la superficie del AuNCs y la consiguiente disminución de su fluorescencia. El efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también puede verse amplificado por la adición de Fe (II), ya que, debido a la reacción de Fenton, los radicales tienden a desactivar la fluorescencia de los nanoclusters, que está relacionada con la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [8.47].

La presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también puede dar lugar a la determinación cuantitativa del analito involucrado en reacciones enzimáticas cuando los AuNCs se unen a enzimas y se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como consecuencia de la reacción. Por ejemplo, la unión de Glucosa Oxidasa a los nanoclusters (GOx@AuNCs) [8.48] se ha utilizado como sonda para glucosa porque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desactiva la fluorescencia de los AuNCs debido

a un cambio en la estructura de coordinación del grupo tiol, origina su liberación y, por tanto, la agregación de los AuNCs. En la misma línea, los AuNCs unidos a peroxidasa (HRP@AuNCs) han sido la base de una sonda para  $H_2O_2$  [8.49]; o a Catalasa (Cat@AuNCs) [8.50], para la determinación de glucosa y ácido úrico. Si además se les une un compuesto fluorescente (FITC-BSA@AuNCs) [8.51], se utiliza la doble señal fluorescente (del AuNCs y de la FITC) para la determinación de glucosa (glucosa oxidasa) o acetilcolina (colina oxidasa) en base a la relación Fluorescencia FITC/Fluorescencia AuNCs.

Otro efecto del  $H_2O_2$  que se ha relacionado con las reacciones enzimáticas y los AuNCs es la inhibición de la polimerización del agente estabilizante (“capping”), dando lugar a un aumento de la fluorescencia de los nanoclusters, que está relacionado con el  $H_2O_2$  generado en la reacción enzimática, y que se ha utilizado para la determinación de colina y acetilcolina con colina oxidasa [8.52].

También se ha demostrado que el  $H_2O_2$  potencia la fluorescencia de los AuNCs unidos a hemoglobina (Hb@AuNCs) [8.53] debido a una transferencia de electrones intramolecular a Hb@AuNCs cuando se produce la degradación del grupo hemo y la liberación del hierro de la Hb, lo que se ha aplicado a la determinación de glucosa con glucosa oxidasa (GOx).

## **2) Decrecimiento (etching) de las nanopartículas de oro.**

Cuando las AuNPs se someten a un proceso de decrecimiento (“etching”) debido a la acción de determinados ligandos, se produce la disminución del tamaño de las nanopartículas, originando AuNCs fluorescentes. Por tanto, el aumento de la intensidad de la emisión de AuNCs está directamente relacionado con la enzima involucrada en la reacción (figura 8.4) [8.54].

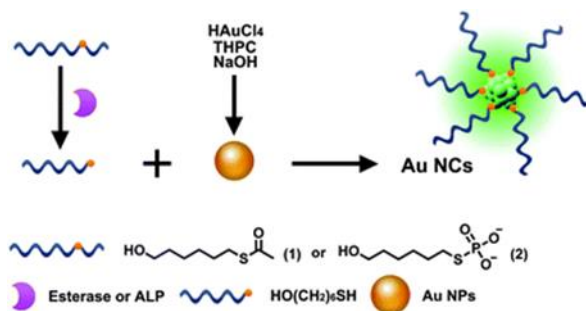


Figura 8.4. Formación de AuNCs a partir de AuNPs

Por otro lado, los AuNCs (conjugados con un anticuerpo) catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno utilizado para reducir el HAuCl<sub>4</sub> a nanopartículas de oro (AuNPs) [8.55] como una estrategia para fabricar sondas de determinación visual.

### 3) Los nanoclusters de oro como catalizadores.

Los AuNCs se han utilizado ampliamente como imitadores de enzimas, principalmente, imitadores de peroxidasa, donde el efecto catalítico de HRP se reemplaza por el del nanocluster de oro. Las ventajas de usar AuNCs como enzima se han discutido ampliamente y se basan, principalmente, en la mayor estabilidad frente a condiciones severas en comparación con la HRP. A la reacción AuNCs/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se la acopla la de oxidación de TMB a TMB<sub>ox</sub>, cuya absorbancia se mide a 650 nm.

Siguiendo este esquema, las determinaciones pueden basarse en la inhibición de la actividad catalítica, como en el caso de BSA@AuNCs, cuya actividad es inhibida por la tripsina [8.56] o cisteína [8.57]. También se puede acoplar a una segunda reacción enzimática en la que se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como la determinación de xantina con xantina oxidasa [8.58].

Otra alternativa se basa en la adición de compuestos que inhiben la fluorescencia de los nanoclusters de oro, como el Cu (II) que ligado a AuNCs se ha utilizado para incrementar la actividad mímica de AuNCs en la determinación de

glucosa [8.59]; o histamina [8.60]; o el  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , que también aumentan la actividad enzimática de los AuNCs en la determinación de glucosa [8.61].

#### 8.4. Nanorods (AuNRs)

Los nanorods de oro (AuNRs) han surgido como una alternativa a las nanopartículas de oro debido a la posibilidad de utilizarlos como sistemas de detección a más de una longitud de onda. Estas nanoestructuras tienen dos bandas plasmónicas: una longitudinal y una transversal; la primera suele rondar los 520 nm mientras que la segunda suele aparecer entre 600 y 1100 nm, dependiendo de la relación longitud:anchura del AuNR [8.62]. La modificación de las dimensiones de los AuNRs se puede lograr mediante estrategias basadas en el crecimiento o en el decrecimiento (“etching”). Estas modificaciones de las dimensiones dan lugar a un desplazamiento de la banda del plasmón, que puede utilizarse como parámetro analítico para cuantificar el analito involucrado en la reacción química.

##### 8.4.1. Tipos de estrategias

###### 8.4.1.1. Estrategias basadas en el crecimiento de los AuNRs

Una de las estrategias se basa en depositar diferentes nanocapas de metales nobles en la superficie del AuNRs [8.63-8.65], otra, en modular el crecimiento de AuNRs en presencia de una enzima (AChE) mediado por semillas de Au [8.66], que provoca un cambio gradual en la posición e intensidad de las bandas LSPR longitudinales y transversales, de acuerdo con una evolución de AuNRs a cubos y esferas (figura 8.5).



Figura 8.5: Crecimiento de AuNRs mediado por semillas de Au y AChE

#### 8.4.1.2. Estrategias basadas en el decrecimiento (Etching)

En lo que respecta a los enfoques basados en el decrecimiento de los AuNRs se pueden diferenciar en tres mecanismos [8.67]: reacción de Fenton, sustrato cromogénico y estrategias de decrecimiento mediadas por yodo, todas basadas en el uso del peróxido de hidrógeno.

Estas estrategias se han utilizado para la determinación de pesticidas organofosforados [8.68] en base a la reacción de Fenton; Cu (II) [8.69] en base a la inhibición de la oxidación del TMB; o glucosa [8.70] en base al efecto del  $\text{I}_2$  generado en la reacción sobre la estructura de los AuNRs.

Sin embargo, debido a la baja sensibilidad de los métodos basados en el aumento/decrecimiento del tamaño de los AuNRs, las investigaciones recientes están utilizando la capacidad de aumentar la señal Raman de estos nanomateriales [8.71] como técnica de detección.

### 8.5. Nanoestrellas de oro (AuNSs)

Las nanoestrellas de oro (AuNSs) son estructuras de oro plasmónicas anisotrópicas formadas por un núcleo central desde el que se extienden una serie de puntas que sobresalen. Así, esta nanoestructura muestra diferentes bandas de

plasmón superficial localizados (LSPR), mostrando un gran potencial para aplicaciones biomédicas y de biosensores [8.72]. Además, estas bandas plasmónicas, que aparecen en la región del IR cercano, pueden absorber luz de manera eficiente y convertirla en calor y utilizar su eficiencia de conversión fototérmica en el desarrollo de biosensores [8.73]. Además, se ha demostrado que estas nanoestructuras exhiben una fuerte dispersión Raman Mejorada en la Superficie (SERS) debido a que las AuNSs tienen múltiples puntas afiladas, que actúan como "puntos calientes"[8.74].

### **8.5.1. Estrategias de detección**

#### **8.5.1.1. Medida del plasmón superficial (LSPR)**

Las estrategias basadas en la detección por espectroscopía de absorción molecular se basan en el desplazamiento hacia el azul de la banda de plasmón de las AuNSs durante el crecimiento, guiado por enzimas, de nanopartículas de plata (AgNPs) en la superficie de los AuNSs [8.75]. En base a esto, se ha conseguido la determinación de glucosa mediante el cambio de color de azul a violeta y a naranja [8.76]. La misma estrategia se ha utilizado [8.77] para la detección de fosfatasa alcalina, o para la detección del antígeno prostático específico (PSA) [8.78].

#### **8.5.1.2. Medida del aumento de dispersión Raman (SERS)**

La amplificación de la señal de dispersión Raman de las AuNSs se ha para la medición cuantitativa de la actividad de la proteína quinasa A (PKA) [8.79] o glucosa en muestras de saliva [8.80].

## 8.6. Bibliografía

- [8.1] Yaqoob, S. B., Adnan, R., Rameez Khan, R. M., & Rashid, M. (2020). Gold, silver, and palladium nanoparticles: a chemical tool for biomedical applications. *Frontiers in chemistry*, 8, 376.
- [8.2] Introduction to nanoparticles and analytical devices. Thangavel Lakshmipriya, Subash C.B. Gopinath, in *Nanoparticles in Analytical and Medical Devices*, 2021.
- [8.3] Singh L, Singh R, Zhang B, Cheng S, Kumar Kaushik B, Kumar S. LSPR based uric acid sensor using graphene oxide and gold nanoparticles functionalized tapered fiber. *Opt Fiber Technol.* 2019;53. doi:10.1016/j.yofte.2019.102043
- [8.4] Sharma P, Semwal V, Gupta BD. Highly sensitive and selective localized surface plasmon resonance biosensor for detecting glutamate realized on optical fiber substrate using gold nanoparticles. *Photonics Nanostructures - Fundam Appl.* 2019;37. doi:10.1016/j.photonics.2019.100730
- [8.5] Sharma P, Semwal V, Gupta BD. A highly selective LSPR biosensor for the detection of taurine realized on optical fiber substrate and gold nanoparticles. *Opt Fiber Technol.* 2019;52. doi:10.1016/j.yofte.2019.101962
- [8.6] Xing S, Xu X, Fu P, et al. Colorimetric detection of single base-pair mismatches based on the interactions of PNA and PNA/DNA complexes with unmodified gold nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2019;181:333-340. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.05.069
- [8.7] Park C, Park H, Lee HJ, et al. Double amplified colorimetric detection of DNA using gold nanoparticles, enzymes and a catalytic hairpin assembly. *Microchim Acta.* 2019;186(1). doi:10.1007/s00604-018-3154-2



- [8.8] Valentini P, Persano S, Cecere P, Sabella S, Pompa PP. Gold nanoparticles based colorimetric nanodiagnosics for cancer and infectious diseases. In: *Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications IX*. Vol 8955. SPIE; 2014:89551E. doi:10.1117/12.2039761
- [8.9] Nossier AI, Mohammed OS, Fakhr El-deen RR, Zaghloul AS, Eissa S. Gelatin-modified gold nanoparticles for direct detection of urinary total gelatinase activity: Diagnostic value in bladder cancer. *Talanta*. 2016;161:511-519. doi:10.1016/j.talanta.2016.09.015
- [8.10] Deka J, Mojumdar A, Parisse P, Onesti S, Casalis L. DNA-conjugated gold nano-particles based colorimetric assay to assess helicase activity: A novel route to screen potential helicase inhibitors. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/srep44358
- [8.11] Li PY, Chen Y, Chen CH, Liu Y. Multi-charged bis(: P-calixarene)/pillararene functionalized gold nanoparticles for ultra-sensitive sensing of butyrylcholinesterase. *Soft Matter*. 2019;15(41):8197-8200. doi:10.1039/c9sm01795j
- [8.12] Sang F, Li G, Li J, Pan J, Zhang Z, Zhang X. A hairpin-type DNA probe for direct colorimetric detection of endonuclease activity and inhibition based on the deaggregation of gold nanoparticles. *Microchim Acta*. 2019;186(2). doi:10.1007/s00604-018-3164-0
- [8.13] Song X, Wang Y, Liu S, et al. Colorimetric and visual mercury(II) assay based on target-induced cyclic enzymatic amplification, thymine-Hg(II)-thymine interaction, and aggregation of gold nanoparticles. *Microchim Acta*. 2019;186(2). doi:10.1007/s00604-018-3193-8
- [8.14] Wu S, Li D, Wang J, Zhao Y, Dong S, Wang X. Gold nanoparticles dissolution based colorimetric method for highly sensitive detection of

organophosphate pesticides. *Sensors Actuators, B Chem.* 2017;238:427-433.  
doi:10.1016/j.snb.2016.07.067

- [8.15] Shen L, Wang C, Chen J. Photometric determination of the activity of cellulase and xylanase via measurement of formation of gold nanoparticles. *Microchim Acta.* 2017;184(1):163-168. doi:10.1007/s00604-016-1979-0
- [8.16] Liu D, Chen W, Wei J, Li X, Wang Z, Jiang X. A highly sensitive, dual-readout assay based on gold nanoparticles for organophosphorus and carbamate pesticides. *Anal Chem.* 2012;84(9):4185-4191. doi:10.1021/ac300545p
- [8.17] Nirala NR, Saxena PS, Srivastava A. Colorimetric detection of cholesterol based on enzyme modified gold nanoparticles. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2018;190:506-512. doi:10.1016/j.saa.2017.09.058
- [8.18] Wang H, Cui Y, Wang J, et al. A facile and robust SERS platform for highly sensitive and reproducible detection of uracil-DNA glycosylase using target-activated plasmonic coupling. *Sensors Actuators, B Chem.* 2019;287:535-543. doi:10.1016/j.snb.2019.02.054
- [8.19] Wu Z, Liu Y, Liu Y, et al. A simple and universal “turn-on” detection platform for proteases based on surface enhanced Raman scattering (SERS). *Biosens Bioelectron.* 2015;65:375-381. doi:10.1016/j.bios.2014.10.065
- [8.20] Joseph V, Engelbrekt C, Zhang J, Gernert U, Ulstrup J, Kneipp J. Characterizing the kinetics of nanoparticle-catalyzed reactions by surface-enhanced raman scattering. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(30):7592-7596. doi:10.1002/anie.201203526
- [8.21] Hu Y, Cheng H, Zhao X, et al. Surface-Enhanced Raman Scattering Active Gold Nanoparticles with Enzyme-Mimicking Activities for Measuring Glucose and Lactate in Living Tissues. *ACS Nano.* 2017;11(6):5558-5566. doi:10.1021/acsnano.7b00905

- [8.22] Ahmed SR, Kim J, Suzuki T, Lee J, Park EY. Detection of influenza virus using peroxidase-mimic of gold nanoparticles. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113(10):2298-2303. doi:10.1002/bit.25982
- [8.23] Chen Z, Tan L, Wang S, Zhang Y, Li Y. Sensitive colorimetric detection of K(I) using catalytically active gold nanoparticles triggered signal amplification. *Biosens Bioelectron.* 2016;79:749-757. doi:10.1016/j.bios.2015.12.110
- [8.24] Tseng CW, Chang HY, Chang JY, Huang CC. Detection of mercury ions based on mercury-induced switching of enzyme-like activity of platinum/gold nanoparticles. *Nanoscale.* 2012;4(21):6823-6830. doi:10.1039/c2nr31716h
- [8.25] Yu, P.; Wen, X.; Toh, Y. R.; Ma, X.; Tang, J. Fluorescent Metallic Nanoclusters: Electron Dynamics, Structure, and Applications. *Part. Part. Syst. Charact.* **2015**, 32 (2), 142–163. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201400040>.
- [8.26] Moriarty, P. Nanostructured Materials. *Reports Prog. Phys.* **2001**, 64 (3), 297–381. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/64/3/201>.
- [8.27] Lin, C. A. J.; Lee, C. H.; Hsieh, J. T.; Wang, H. H.; Li, J. K.; Shen, J. L.; Chan, W. H.; Yeh, H. I.; Chang, W. H. Synthesis of Fluorescent Metallic Nanoclusters toward Biomedical Application: Recent Progress and Present Challenges. *J. Med. Biol. Eng.* **2009**, 29 (6), 276–283.
- [8.28] Liu Q, Yan X, Lai Q, Su X. Bimetallic gold/silver nanoclusters-gold nanoparticles based fluorescent sensing platform via the inner filter effect for hyaluronidase activity detection. *Sensors Actuators B Chem.* 2019;282:45-51. doi:10.1016/j.SNB.2018.11.040
- [8.29] Sensitive Detection of Alkaline Phosphatase Activity with Gold Nanoclusters Based on Inner Filter Effect. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017. doi:10.1021/acsami.6b11920
- [8.30] Xu Y, Zhang P, Wang Z, Lv S, Ding C. Determination of the activity of telomerase in cancer cells by using BSA-protected gold nanoclusters as a

fluorescent probe. *Microchim Acta*. 2018. doi:10.1007/s00604-018-2734-5

- [8.31] Zhao D, Chen C, Zhao J, Sun J, Yang X. Label-free fluorescence turn-on strategy for trypsin activity based on thiolate-protected gold nanoclusters with bovine serum albumin as the substrate. *Sensors Actuators B Chem*. 2017;247:392-399. doi:10.1016/J.SNB.2017.03.031
- [8.32] Sun J, Yang X. Gold nanoclusters-Cu<sup>2+</sup> ensemble-based fluorescence turn-on and real-time assay for acetylcholinesterase activity and inhibitor screening. *Biosens Bioelectron*. 2015;74:177-182. doi:10.1016/J.BIOS.2015.06.013
- [8.33] Liu Q, Na W, Wang L, Su X. Gold nanocluster-based fluorescent assay for label-free detection of protein kinase and its inhibitors. *Microchim Acta*. 2017;184(9). doi:10.1007/s00604-017-2349-2
- [8.34] Liu P, Shang L, Li H, et al. Synthesis of fluorescent  $\alpha$ -chymotrypsin A-functionalized gold nanoclusters and their application to blot-based technology for Hg<sup>2+</sup> detection. *RSC Adv*. 2014. doi:10.1039/c4ra05686h
- [8.35] Liu J, Li HW, Wu Y. A highly selective and sensitive fluorescent probe for lactate dehydrogenase based on ultrabright adenosine monophosphate capped gold nanoclusters. *RSC Adv*. 2017;7(22):13438-13443. doi:10.1039/c7ra00158d
- [8.36] Zhang N, Si Y, Sun Z, et al. Lab-on-a-drop: Biocompatible fluorescent nanoprobe of gold nanoclusters for label-free evaluation of phosphorylation-induced inhibition of acetylcholinesterase activity towards the ultrasensitive detection of pesticide residues. *Analyst*. 2014. doi:10.1039/c4an00855c
- [8.37] Santhosh M, Chinnadayala SR, Kakoti A, Goswami P. Selective and sensitive detection of free bilirubin in blood serum using human serum albumin

stabilized gold nanoclusters as fluorometric and colorimetric probe. *Biosens Bioelectron.* 2014. doi:10.1016/j.bios.2014.04.003

- [8.38] Luo J, Rasooly A, Wang L, et al. Fluorescent turn-on determination of the activity of peptidases using peptide templated gold nanoclusters. *Microchim Acta.* 2016. doi:10.1007/s00604-015-1683-5
- [8.39] Li H, Guo Y, Xiao L, Chen B. Selective and sensitive detection of acetylcholinesterase activity using denatured protein-protected gold nanoclusters as a label-free probe. *Analyst.* 2014. doi:10.1039/c3an01736b
- [8.40] Halawa MI, Gao W, Saqib M, Kitte SA, Wu F, Xu G. Sensitive detection of alkaline phosphatase by switching on gold nanoclusters fluorescence quenched by pyridoxal phosphate. *Biosens Bioelectron.* 2017. doi:10.1016/j.bios.2017.03.073
- [8.41] Yan X, Li H, Hu T, Su X. A novel fluorimetric sensing platform for highly sensitive detection of organophosphorus pesticides by using egg white-encapsulated gold nanoclusters. *Biosens Bioelectron.* 2017. doi:10.1016/j.bios.2016.11.058
- [8.42] Wen Q, Gu Y, Tang LJ, Yu RQ, Jiang JH. Peptide-templated gold nanocluster beacon as a sensitive, label-free sensor for protein post-translational modification enzymes. *Anal Chem.* 2013. doi:10.1021/ac403308b
- [8.43] Liu Q, Li H, Jin R, Li N, Yan X, Su X. Ultrasensitive detection alkaline phosphatase activity using 3-aminophenylboronic acid functionalized gold nanoclusters. *Sensors Actuators B Chem.* 2019;281:175-181. doi:10.1016/J.SNB.2018.10.083
- [8.44] Li H, Yang M, Kong D, et al. Sensitive fluorescence sensor for point-of-care detection of trypsin using glutathione-stabilized gold nanoclusters. *Sensors Actuators B Chem.* 2019;282:366-372. doi:10.1016/J.SNB.2018.11.077

- [8.45] Martín-Barreiro A, de Marcos S, de la Fuente JM, Grazú V, Galbán J. Gold nanocluster fluorescence as an indicator for optical enzymatic nanobiosensors: choline and acetylcholine determination. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018;277. doi:10.1016/j.snb.2018.08.116
- [8.46] Chen X, Baker GA. Cholesterol determination using protein-templated fluorescent gold nanocluster probes. *Analyst.* 2013. doi:10.1039/c3an01548c
- [8.47] Yang D, Luo M, Di J, Tu Y, Yan J. Gold nanocluster-based ratiometric fluorescent probes for hydrogen peroxide and enzymatic sensing of uric acid. *Microchim Acta.* 2018;185(6). doi:10.1007/s00604-018-2823-5
- [8.48] Xia X, Long Y, Wang J. Glucose oxidase-functionalized fluorescent gold nanoclusters as probes for glucose. *Anal Chim Acta.* 2013. doi:10.1016/j.aca.2013.02.025
- [8.49] Wen F, Dong Y, Feng L, Wang S, Zhang S, Zhang X. Horseradish peroxidase functionalized fluorescent gold nanoclusters for hydrogen peroxide sensing. *Anal Chem.* 2011. doi:10.1021/ac1031447
- [8.50] Meng F, Yin H, Li Y, Zheng S, Gan F, Ye G. One-step synthesis of enzyme-stabilized gold nanoclusters for fluorescent ratiometric detection of hydrogen peroxide, glucose and uric acid. *Microchem J.* 2018. doi:10.1016/j.microc.2018.06.006
- [8.51] Ke CY, Wu YT, Tseng WL. Fluorescein-5-isothiocyanate-conjugated protein-directed synthesis of gold nanoclusters for fluorescent ratiometric sensing of an enzyme-substrate system. *Biosens Bioelectron.* 2015;69. doi:10.1016/j.bios.2015.02.002
- [8.52] Yan X, Li H, Jin R, Zhao X, Liu F, Lu G. Sensitive sensing of enzyme-regulated biocatalytic reactions using gold nanoclusters-melanin-like polymer

- nanosystem. *Sensors Actuators, B Chem.* 2019. doi:10.1016/j.snb.2018.10.009
- [8.53] Molaabasi F, Hosseinkhani S, Moosavi-Movahedi AA, Shamsipur M. Hydrogen peroxide sensitive hemoglobin-capped gold nanoclusters as a fluorescence enhancing sensor for the label-free detection of glucose. *RSC Adv.* 2015;5(42). doi:10.1039/c5ra00335k
- [8.54] Chen Y, Zhou H, Wang Y, et al. Substrate hydrolysis triggered formation of fluorescent gold nanoclusters-a new platform for the sensing of enzyme activity. *Chem Commun.* 2013. doi:10.1039/c3cc45494k
- [8.55] Zhao Q, Huang H, Zhang L, et al. Strategy to Fabricate Naked-Eye Readout Ultrasensitive Plasmonic Nanosensor Based on Enzyme Mimetic Gold Nanoclusters. *Anal Chem.* 2016;88(2). doi:10.1021/acs.analchem.5b04089
- [8.56] Wang GL, Jin LY, Dong YM, Wu XM, Li ZJ. Intrinsic enzyme mimicking activity of gold nanoclusters upon visible light triggering and its application for colorimetric trypsin detection. *Biosens Bioelectron.* 2015;64. doi:10.1016/j.bios.2014.09.071
- [8.57] Wang Y-W, Tang S, Yang H-H, Song H. A novel colorimetric assay for rapid detection of cysteine and Hg<sup>2+</sup> based on gold clusters. *Talanta.* 2016;146:71-74. doi:10.1016/J.TALANTA.2015.08.015
- [8.58] Wang X-X, Wu Q, Shan Z, Huang Q-M. BSA-stabilized Au clusters as peroxidase mimetics for use in xanthine detection. *Biosens Bioelectron.* 2011;26(8):3614-3619. doi:10.1016/J.BIOS.2011.02.014
- [8.59] Ma S, Wang J, Yang G, Yang J, Ding D, Zhang M. Copper(II) ions enhance the peroxidase-like activity and stability of keratin-capped gold nanoclusters for the colorimetric detection of glucose. *Microchim Acta.* 2019. doi:10.1007/s00604-019-3395-8

- [8.60] Liu Y, Ding D, Zhen Y, Guo R. Amino acid-mediated 'turn-off/turn-on' nanozyme activity of gold nanoclusters for sensitive and selective detection of copper ions and histidine. *Biosens Bioelectron.* 2017;92. doi:10.1016/j.bios.2017.01.036
- [8.61] Cho S, Shin HY, Kim M Il. Nanohybrids consisting of magnetic nanoparticles and gold nanoclusters as effective peroxidase mimics and their application for colorimetric detection of glucose. *Biointerphases.* 2017;12(1). doi:10.1116/1.4974198
- [8.62] Chakraborty D, Venkatesan M, Ethiraj KR, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Development of thickness-tunable gold nanorods for anti-oxidant detection. *Mater Chem Phys.* 2020; 239(July 2019):122295. doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122295
- [8.63] Lin T, Wu Y, Li Z, Song Z, Guo L, Fu F. Visual monitoring of food spoilage based on hydrolysis-induced silver metallization of au nanorods. *Anal Chem.* 2016;88(22):11022-11027. doi:10.1021/acs.analchem.6b02870
- [8.64] Fahimi-Kashani N, Hormozi-Nezhad MR. Gold Nanorod-Based Chrono-Colorimetric Sensor Arrays: A Promising Platform for Chemical Discrimination Applications. *ACS Omega.* 2018;3(2):1386-1394. doi:10.1021/acsomega.7b01780
- [8.65] Xie H, Xu P, Zhao F, et al. Plasmonic thermochromism based on a reversible. 2020. doi:10.1039/d0nr00117a
- [8.66] Coronado-Puchau, M, Saa, L, Grzelczak, M, Pavlov, V, Liz-Marzán, LM. Enzymatic modulation of gold nanorod growth and application to nerve gas detection. *Nano Today.* 2013; 8(5):461-468. doi.org/10.1016/j.nantod.2013.08.008
- [8.67] Rao H, Xue X, Wang H, Xue Z. Gold nanorod etching-based multicolorimetric



sensors: Strategies and applications. *J Mater Chem C*. 2019;7(16):4610-4621. doi:10.1039/c9tc00757a

- [8.68] Liu Y, Lv B, Liu A, et al. Multicolor sensor for organophosphorus pesticides determination based on the bi-enzyme catalytic etching of gold nanorods. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018;265:675-681. doi:10.1016/j.snb.2018.03.023
- [8.69] Xu S, Chen X, Chen X, Liang Y. Visual assay for determination of copper ions based on anti-etching of gold nanorods induced by cuprous ions. *Microchim Acta*. 2020;187(3):157. doi:10.1007/s00604-020-4149-3
- [8.70] Cheng X, Huang Y, Yuan C, Dai K, Jiang H, Ma J. Colorimetric detection of A-glucosidase activity based on the etching of gold nanorods and its application to screen anti-diabetic drugs. *Sensors Actuators, B Chem.* 2019;282(June 2018):838-843. doi:10.1016/j.snb.2018.11.097
- [8.71] Si Y, Li L, He B, Li J. A novel surface-enhanced Raman scattering-based ratiometric approach for detection of hyaluronidase in urine. *Talanta*. 2020;215(March):120915. doi:10.1016/j.talanta.2020.120915
- [8.72] Dondapati SK, Sau TK, Hrelescu C, Klar TA, Stefani FD, Feldmann J. Label-free biosensing based on single gold nanostars as plasmonic transducers. *ACS Nano*. 2010;4(11):6318-6322. doi:10.1021/nn100760f
- [8.73] Wang X, Li G, Ding Y, Sun S. Understanding the photothermal effect of gold nanostars and nanorods for biomedical applications. *RSC Adv*. 2014;4(57):30375-30383. doi:10.1039/c4ra02978j
- [8.74] Alvarez-Puebla RA, Liz-Marzán LM. Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles. *J R Soc Interface*. 2010;7(SUPPL. 4). doi:10.1098/rsif.2010.0125.focus

- [8.75] Rodríguez-Lorenzo L, De La Rica R, Álvarez-Puebla RA, Liz-Marzán LM, Stevens MM. Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth. *Nat Mater.* 2012;11(7):604-607. doi:10.1038/nmat3337
- [8.76] Moses A, Mulder DW, Vorster BC. Seedless gold nanostars with seed-like advantages for biosensing applications. *R Soc Open Sci.* 2019;6(2). doi:10.1098/rsos.181971
- [8.77] Guo Y, Wu J, Li J, Ju H. A plasmonic colorimetric strategy for biosensing through enzyme guided growth of silver nanoparticles on gold nanostars. *Biosens Bioelectron.* 2016;78:267-273. doi:10.1016/j.bios.2015.11.056
- [8.78] Liu Y, Pan M, Wang W, et al. Plasmonic and Photothermal Immunoassay via Enzyme-Triggered Crystal Growth on Gold Nanostars. *Anal Chem.* 2019;91(3):2086-2092. doi:10.1021/acs.analchem.8b04517
- [8.79] Kyaw YME, Tan EKM, Bekale L, et al. Quantitative and Label-Free Detection of Protein Kinase A Activity Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy with Gold Nanostars. *Anal Chem.* 2018;90(10):6071-6080. doi:10.1021/acs.analchem.7b05417
- [8.80] Al-Ogaidi I, Gou H, Al-kazaz AKA, et al. A gold@silica core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering biosensor for label-free glucose detection. *Anal Chim Acta.* 2014;811:76-80. doi:10.1016/j.aca.2013.12.009

## **Capítulo 9**

# **Generación *in situ* de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de tiramina.**



## 9.1. Estudios teóricos de generación de nanopartículas

### 9.1.1. Revisión de los modelos matemáticos descritos

#### 9.1.1.1. Ideas generales

Los mecanismos que regulan microscópicamente los cambios de fase, especialmente la formación de fases sólidas desde fases líquidas, tanto por procesos químicos (reacciones) como por fenómenos puramente físicos (cambio de temperatura), es un tema de gran importancia para diversas áreas de la Ciencia y la Tecnología. Ese interés radica, sobre todo, en encontrar condiciones de cambio de fase que permitan controlar, de una forma efectiva, las características y propiedades de las partículas formadas. La aparición de la nanociencia ha puesto de manifiesto la estrecha relación que existe entre el tamaño y las propiedades de un material, lo que ha incentivado a profundizar en el estudio de mecanismos ya existentes y en el desarrollo de nuevos enfoques. Por ello, cuando se realiza una revisión de bibliográfica del estado actual en el que se encuentra esta materia, es habitual encontrar dos grandes grupos de modelos [9.1]:

**1) Modelos clásicos:** Parten del mecanismo LaMer-Dinegar de los años 50. Según este mecanismo (*atom-mediated nucleation and growth*), los átomos son las piezas elementales a partir de las cuales se forman las partículas siguiendo un proceso en dos etapas:

A) Nucleación. Los iones que van a formar las partículas son químicamente reducidos a átomos; la nucleación se produce cuando la disolución se sobresatura de estos átomos ya que es el momento en el cual se puede superar la barrera energética para la formación de los núcleos. En el desarrollo de la teoría se han ido proponiendo diferentes opciones sobre relativas al desarrollo de esta etapa como la nucleación homogénea, la nucleación heterogénea o un mecanismo basado en una doble etapa de nucleación.

B) Crecimiento. Una vez producida la nucleación, ya no hay posibilidad de sobresaturación y lo que se produce es la acumulación de nuevos átomos hasta el tamaño final. Esta etapa tiene diferentes formulaciones en función de si el proceso está controlado por difusión o reacción.

A estas dos etapas se les añade una tercera:

C) Maduración (“*ripening*”). Una vez acabado el proceso (entendido como desaparición del agente generador), el nanomaterial se reorganiza para dar un producto final. Hay varios mecanismos por los cuales se produce esta maduración como la maduración digestiva o la de Ostwald.

**2) Modelos “no-clásicos”** [9.2]. En estos se sigue hablando de las etapas básicas de nucleación y crecimiento, pero parten de la base de que la pieza fundamental para la formación del nanomaterial no es el átomo. Surgen para explicar algunos hechos que se han observado durante la formación de los nanomateriales, que parecen no seguir la secuencia indicada por las clásicas. Los más conocidos son el de “Agregación de Clusters” y el de “Agregación de Complejos”. La figura 9.1 muestra un esquema de estos dos mecanismos junto con el clásico.

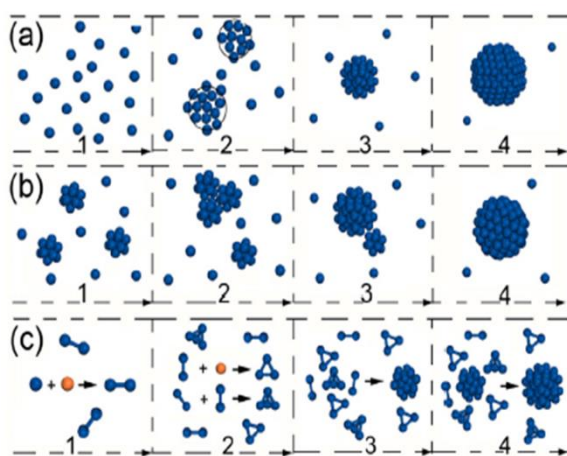


Figura 9.1: Representación de modelos clásicos y no clásicos. a) Modelo clásico, b) modelo basado en la agregación de clusters y c) modelo basado en la agregación de

*complejos. Del 1 al 4 se representa cómo evoluciona la formación de las nanopartículas a lo largo del proceso. [9.2]*

Los modelos más elaborados que explican la formación de nanopartículas de metales nobles o “quantum dots” se basan en los modelos clásicos, razón por la cual serán los considerados en adelante.

#### **9.1.1.2. Nucleación y crecimiento**

##### **A) Ecuación de Avrami**

En el año 1937, A. Kolmogorov desarrolló un modelo estadístico para explicar el cambio de volumen observado cuando se genera una segunda fase en el seno de otra como consecuencia de un proceso físico [9.3]. Su objetivo era ayudar a describir matemáticamente el enfriamiento o recristalización isoterma de metales o aleaciones con aplicación a la industria metalúrgica, muy importante en aquella época [9.4]. Dado que la publicación del modelo se realizó en una revista de habla rusa, no se tuvo conocimiento de ella en Europa Occidental y Estados Unidos, lo que explica que Johnson y Mehl llegaran a resultados similares años más tarde desconociendo el primer trabajo de Kolmogorov. Posteriormente, entre 1939-1941 [9.5], M. Avrami publicó una serie de artículos cuyo resultado final fue un modelo matemático más útil (Ecuación de Avrami) que permite explicar procesos de transformación general de una fase en otra. Aunque no se diseñó para explicar la formación de nanopartículas (se trata de una teoría de los años 40), se considera como el “modelo estándar” para la formación de este tipo de materiales y sigue teniendo una gran influencia sobre los desarrollos posteriores. Esta teoría se conoce también con el nombre KJMA (Kolmogorov-Johnson-Mehl-Avrami).

La ecuación de Avrami permite calcular, en un proceso de cambio de fase, la fracción de volumen ( $f_t$ ) que se va ocupando por la nueva fase en cada instante del proceso ( $V_t$ ) (en el caso de la formación de nanopartículas, el volumen ocupado por estas) referido al volumen que finalmente va a ocupar esa fase ( $V_\infty$ ). Este modelo no considera matemáticamente por separado las etapas de nucleación y

crecimiento; además, al tratarse de un modelo fenomenológico, existen varias formulaciones de esta ecuación, dependiendo de las condiciones impuestas para obtenerla. La ecuación 9.1 describe el más conocido y la 9.2 uno de los más usados [9.6] para nanopartículas, que será la que se utilice en esta memoria:

$$f_t = \frac{V_t}{V_\infty} = 1 - e^{-k_{AV}t^n} \quad \text{Ec. 9.1}$$

$$f_t = \frac{V_t}{V_\infty} = 1 - e^{-(k_{AV}t)^n} \quad \text{Ec. 9.2}$$

En ella,  $k_{AV}$  es la constante de velocidad del proceso conjunto de nucleación y crecimiento (constante de Avrami), y  $n$  está relacionada con la dimensionalidad de las partículas formadas (la interpretación de ambos parámetros depende de la fuente). La brillantez de este modelo radica en que es capaz de explicar, mediante una ecuación matemática sencilla, el hecho experimental de que  $f_t$  siga una curva sigmoidea. Para obtener los valores de " $k_{AV}$ " y " $n$ " es necesario disponer de valores de  $V_t$  a lo largo de la reacción. El cálculo se puede simplificar matemáticamente si se toman doble logaritmos en la ecuación 9.2:

$$\text{Ln} \left( \text{Ln} \left( \frac{V_\infty}{V_\infty - V_t} \right) \right) = n \text{Ln}(k_{AV}) + n \text{Ln}(t) \quad \text{Ec. 9.3}$$

Cuando se está estudiando la formación de nanopartículas (NP) metálicas que presentan efecto plasmón, por ejemplo NP de Au (AuNP), es frecuente seguir el proceso mediante las medidas de absorbancia de la banda de plasmón generada. En estos casos, se observa también una curva sinusoidal, por lo que se ha establecido que la Absorbancia medida sigue una ecuación similar [9.7]:

$$\frac{\text{Abs}_t}{\text{Abs}_\infty} = 1 - e^{-(k_{AV}t)^n} \quad \text{Ec. 9.4}$$

Aplicando sobre la ecuación 9.4 la modificación de la 9.3 queda:



$$\text{Ln} \left( \text{Ln} \left( \frac{\text{Abs}_{\infty}}{\text{Abs}_{\infty} - \text{Abs}_t} \right) \right) = n \text{Ln}(k_{AV}) + n \text{Ln}(t) \quad \text{Ec. 9.5}$$

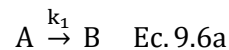
Expresión que permiten obtener los valores de  $k_{AV}$  y  $n$  a través de medidas de absorción molecular UV-visible.

## B) Modelos adaptados a Nanopartículas

### Modelo de Finke-Watsy

A lo largo de los años se han planteado diferentes esquemas que profundizan sobre la ecuación de Avrami y permiten describir de forma separada los procesos de nucleación y crecimiento. Uno de los más usados, ya que proporciona una descripción matemática relativamente sencilla del proceso, es el de Finke-Watsy. Fue desarrollado a partir de los datos obtenidos durante la formación de nanopartículas de Ir (llamadas entonces nanoclusters) por reducción con  $\text{H}_2$ , usando ciclohexano como indicador del proceso. El modelo original consideraba las dos etapas clásicas [9.8] (ver figura 9.2, etapas 1 y 2):

- ✓ La primera etapa es la formación de núcleos (B) a partir del precursor (A). Es una reacción de pseudo-primer orden ya que se considera que el reactivo reductor está en exceso.



- ✓ La segunda etapa es el crecimiento autocatalítico de núcleos y la formación de partículas. El concepto de autocatalítico quiere decir que la reacción se vuelve tanto más rápida cuanto más producto hay; viene dada por la siguiente ecuación:



Llamando  $[A]_t$  y  $[B]_t$  a la concentración de ion metálico que está en forma de partícula y la que queda libre en disolución en cada instante, se puede plantear la siguiente ecuación diferencial:

$$-\frac{d[A]_t}{dt} = \frac{d[B]_t}{dt} = k_1[A]_t + k_2[A]_t([A]_0 - [A]_t) \quad \text{Ec. 9.7}$$

Que al resolver resulta en:

$$[A]_t = [A]_0 \frac{k_1 + k_2[A]_0}{k_2[A]_0 + k_1 e^{(k_1 + k_2[A]_0)t}} \quad \text{Ec. 9.8a}$$

$$[B]_t = [A]_0 - [A]_t = [A]_0 \left( 1 - \frac{k_1 + k_2[A]_0}{k_2[A]_0 + k_1 e^{(k_1 + k_2[A]_0)t}} \right) \quad \text{Ec. 9.8b}$$

Es importante ver que aunque el proceso (ecuación 9.6b) es una simplificación de otro más extenso (formación de las especies n-atómicas) matemáticamente se puede simplificar a la ecuación 9.8b siempre que las especies sean estables (es decir que las constantes de los procesos sucesivos cumplan  $k_n < k_{n-1} < \dots < k_4 < k_3 < k_2$ ). Los autores establecen que las constantes  $k_1$  y  $k_2$  se pueden calcular de la ecuación 9.8a directamente, pero se puede simplificar algo la expresión, suponiendo que la concentración de partículas es mayor que la del ion metálico (aunque esto solo ocurre al final del proceso) y que  $k_2[A]_0 \gg k_1$ . En estas condiciones las ecuaciones 9.8a y 9.8b se pueden formular como:

$$\text{Ln} \left( \frac{[A]_0 - [A]_t}{[A]_t} \right) = \text{Ln} \frac{k_1}{k_2[A]_0} + k_2[A]_0 t \quad \text{Ec. 9.9a}$$

$$\text{Ln} \left( \frac{1 - [A]_0 + [B]_t}{[A]_0 - [B]_t} \right) = \text{Ln} \frac{k_1}{k_2[A]_0} + k_2[A]_0 t \quad \text{Ec. 9.9b}$$

### Modelo de Finke-Watsy modificado

El modelo de Finke-Watssy se ha ido depurando a lo largo de los años por los mismos u otros autores. Así, Finke et al [9.1] propusieron un mecanismo que

incluye dos nuevas etapas (figura 9.2, etapas 3 y 4), una que considera la agrupación de partículas intermedias (etapa 3) y otra, denominada de aglomeración autocatalítica, que considera el recrecimiento de una nanopartícula ya formada. Este modelo más complejo, permite un ajuste mejor a las curvas experimentales (a través de las constantes  $k_3$  y  $k_4$ ), pero no genera una solución analítica sencilla como la expresada por las ecuaciones 9.8.

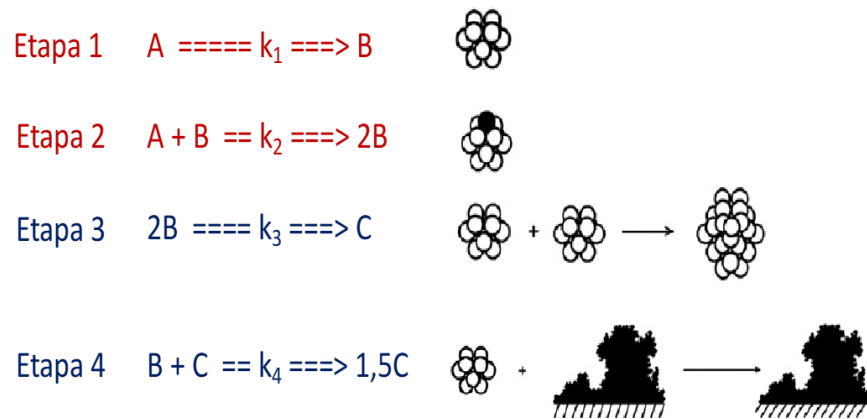


Figura 9.2: Mecanismo de Finke-Watsy de 2 y 4 etapas. [9.1]

Posteriormente, Zhou et al [9.7] propusieron su modelo denominado Redox-Cristalización (R-C). Este incluye una reacción química previa en fase líquida entre el ion metálico y un reductor (R) regido por su correspondiente constante ( $K_c$ ).

- 1) Formación del átomo metálico en disolución:  $M^n + R \xrightleftharpoons{K_c} M_{01}$
- 2) Nucleación: paso de fase líquida a sólida:  $M_{01} \xrightarrow{k_1} M_{0s}$
- 3) Crecimiento:  $M_{01} + s^* \xrightarrow{k_2} M_{0s}$

Los autores desarrollaron este modelo para explicar la formación de AuNP a partir de  $AuCl_4^-$  y ácido ascórbico como reductor. Trabajando de un modo similar a FC llegan a una ecuación que les permite relacionar la concentración total de

Au(III) con la concentración de Au que queda en forma de AuNP según la expresión:

$$[M_{0s}] = [M^{n+}]_0 \left( 1 - \frac{k_{01,a} + k_{02,a}[M^{n+}]_0}{k_{02,a}[M^{n+}]_0 + k_{01,a}e^{(k_{01,a}+k_{02,a}[M^{n+}]_0)t}} \right) \quad \text{Ec. 9.10}$$

donde  $k_{01,a}$  y  $k_{02,a}$  son las constante de nucleación y crecimiento aparentes, que vienen dadas por:

$$k_{01,a} = \alpha k_1 = \frac{K_c[R]_0}{1+K_c[R]_0} k_1 \quad \text{Ec. 9.11a} \quad k_{02,a} = \varepsilon k_2 = \frac{3M_{Au}}{\rho_{Au} r_t} k_2 \quad \text{Ec. 9.11b}$$

donde  $\alpha$  es la fracción de Au(III) que se ha reducido y  $\varepsilon$  representa el área molar de las AuNP ( $M_{Au}$  es la masa molar del Au,  $\rho_{Au}$  es la densidad del Au y  $r_t$  el radio promedio de las AuNP). Los autores ofrecen valores del orden de  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  para la  $k_1$  y  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  para  $k_2$  en la síntesis de AuNP. Esta ecuación se puede transformar en una expresión que permitió modelar la Absorbancia debida a la banda del plasmón a lo largo de la reacción de acuerdo con la ecuación:

$$Abs_t = Abs_{max} \left( 1 - \frac{k_{01,a} + k_{02,a}[M^{n+}]_0}{k_{02,a}[M^{n+}]_0 + k_{01,a}e^{(k_{01,a}+k_{02,a}[M^{n+}]_0)t}} \right) \quad \text{Ec. 9.12}$$

De nuevo es posible calcular los valores de las constantes aplicando sobre la ecuación 9.10 consideraciones análogas a las del modelo FW. Este modelo se relaciona con el modelo clásico de Avrami (ecuación 9.4) [9.9].

$$k = \text{Ln} \frac{k_2 + k_1 e^{(k_1+k_2)}}{k_2 + k_1} \quad \text{Ec. 9.13a}$$

$$n = \text{Log} \left( \frac{\text{Ln} \frac{k_2 + k_1}{k_2 + k_1 e^{100(k_1+k_2)}}}{\text{Ln} \frac{k_2 + k_1}{k_2 + k_1 e^{10(k_1+k_2)}}} \right) \quad \text{Ec. 9.13b}$$

Es claro que, desde un punto de vista matemático e incluso conceptual, existen una clara analogía entre los modelos de F-W y el R-C, y que son dos formas similares de abordar el mismo problema [9.10].

### 9.1.1.3. Maduración

En muchos estudios de formación de nanomateriales, especialmente de nanopartículas de metales nobles, se observa que el factor  $f_t$  (ecuación 9.1) o la absorbancia (ecuación 9.4) describen una representación compleja. Al principio, los resultados se ajustan bien a las curvas sinusoidales descritas según el modelo de Avrami o de FW, pero al final de la reacción se produce un incremento aparentemente continuo de ambos parámetros, como el indicado en la figura 9.3.

Este aumento se atribuye a un proceso de reacondicionamiento posterior de las partículas formadas. Se han propuesto multitud de modelos que se mueven entre dos opciones diferentes: [9.11]

**A) Maduración de Ostwald** (Ostwald ripening). Según este modelo las NP más pequeñas se disuelven y los átomos disueltos pasan a engordar las NP que quedan. Este proceso se suele describir mediante el modelo de Lifshitz, Slyozov y Wagner (LSW) según el cual el diámetro de la partícula ( $D$ ) aumenta de acuerdo a:

$$D_t - D_{OR} = k_{OR} (t - t_{OR})^{\frac{1}{n}} \quad \text{Ec. 9.14}$$

Donde  $k_{OR}$  es una constante que depende del material,  $t_{OR}$  es el momento de inicia del proceso de maduración (si solo hay maduración  $t_{OR}=0$ ) y de la  $T^a$ , y  $n$  es un parámetro que indica cómo se produce el crecimiento de la NP.

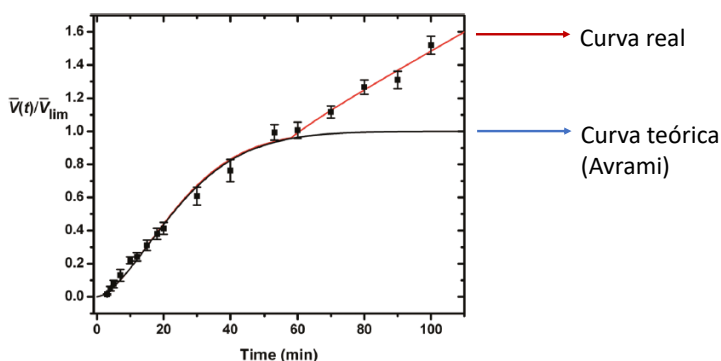


Figura 9.3: Variación teórica y real de la  $f$  durante la formación de AgNPB

**B) Coalescencia por unión orientada** [9.12]. En este caso las NP más pequeñas se unen entre sí para dar NP más grandes. El modelo que describe este proceso fue descrito, entre otros, por Huang:

$$D_t = D_0 \left( \frac{\sqrt{2} kt+1}{kt+1} \right) \quad \text{Ec. 9.15a}$$

y asume que se unen las partículas de dos en dos. Si se unieran de “n” en “n” se puede deducir fácilmente que:

$$D_t = D_0 \left( \frac{\sqrt{n} kt+1}{kt+1} \right) \quad \text{Ec. 9.15b}$$

No hay muchos artículos donde se desarrollen modelos matemáticos que incluyan la maduración con la nucleación/crecimiento. Un ejemplo, son los trabajos de Richards [9.6, 9.13] y colaboradores (a quien corresponde la figura 9.3), describen la variación de absorbancia a lo largo de la reacción a través de un modelo mixto de Avrami y Ostwald modificado ( $n=1$  en la ecuación 9.13), para explicar que la maduración de lugar a un aumento lineal de la absorbancia) según:

$$\frac{Abs_t}{Abs_0} = (1 - e^{-(kt)^n}) + \frac{(t - t_{OR})k_{OR}}{[1 + e^{-2w(t-t_{OR})}]} \quad \text{Ec. 9.16}$$

Todo el corchete del denominador es una función de inicio del proceso de maduración donde  $w$  es una constante que se elige arbitrariamente (en este modelo se le da un valor de 2 [9.13]).

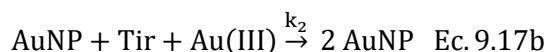
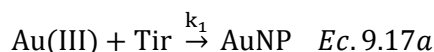
### 9.1.2. Propuesta de un modelo modificado

#### 9.1.2.1. Planteamiento general

Uno de los objetivos de esta Tesis es intentar establecer un modelo matemático básico que sirva para explicar los resultados experimentales obtenidos. Como se verá posteriormente, durante la reacción enzimática de la Tiramina con la TAO en presencia de Au(III) se obtienen unos perfiles sinusoidales debidos a la formación de AuNP. En un principio, se intentaron describir estas curvas mediante los modelos de F-W y R-C (Ec. 9.9 y Ec. 9.12) pero no se obtuvieron buenos resultados. Se piensa que este modelo presenta, dos pequeños inconvenientes a la hora de aplicarlo en esta Tesis:

- 1) Las curvas de calibración (que más tarde se mostrarán) indican que la absorbancia final ( $Abs_{max}$ ) depende de la concentración de tiramina y/o de Au(III) que se utilice. Sin embargo, la ecuación 9.12 no refleja ninguna relación entre la  $Abs_{max}$  y la concentración de analito.
- 2) Los modelos están desarrollados para el caso de que se trabaje con exceso de reductor sobre el ion metálico Au(III). Sin embargo, como se verá, en los estudios de calibración habrá un rango de analito que están por debajo de la de Au(III) y otro rango que están por encima.

El primer problema se resuelve si se considera que el reductor del Au(III), en este caso la tiramina, participa tanto en la etapa de nucleación como en la de crecimiento. De acuerdo con ello, el modelo cinético modificado de FW será:



El segundo problema se puede resolver si se desarrollan dos modelos distintos en función de si la tiramina está en exceso o en defecto respecto del Au(III), y obteniendo en cada caso el valor de Absorbancia según la ley de Lambert-Beer convencional.

### 9.1.2.2. Modelo cuando hay exceso de Au(III)

Se plantea la ecuación diferencial para la pérdida de Tir durante el proceso de acuerdo con el modelo cinético dado por las ecuaciones 9.17a y 9.17b.

$$-\frac{d[\text{Tyr}]}{dt} = k_1[\text{Au(III)}][\text{Tyr}] + k_2[\text{AuNP}][\text{Au(III)}][\text{Tyr}] \quad \text{Ec. 9.18}$$

Para resolver esta ecuación diferencial hay que minimizar las variables:

A) [AuNP]

Como se trabaja en exceso de Au(III), la [AuNP] formada vendrá dada por la tiramina que ha desaparecido ( $C_{\text{Tir}}$  es la concentración). Hay que tener en cuenta, sin embargo la estequiometría del proceso redox:



Y que cada AuNP contiene "n" átomos de Au<sup>0</sup>. Por lo tanto:

$$[\text{AuNP}] = \frac{2(C_{\text{Tyr}} - [\text{Tyr}])}{3n} \quad \text{Ec. 9.20}$$

B) [Au(III)]

Puesto que se trabaja en exceso de ion metálico se puede considerar que su concentración total ( $C_{\text{Au}}$ ) básicamente no se modifica durante la reacción:

$$[\text{Au(III)}] \approx C_{\text{Au}} \quad \text{Ec. 9.21}$$



Ahora, si las dos consideraciones hechas en las ecuaciones 9.20 y 9.21, se sustituyen en la ecuación 9.18, se obtiene una ecuación diferencial que admite solución analítica:

$$[\text{Tir}] = \frac{\frac{3k_1}{2k_{2,n}} + C_{\text{Tir}}}{1 + \frac{3k_1}{2k_{2,n}C_{\text{Tir}}} e^{C_{\text{Au}}\left(k_1 + \left(\frac{2k_{2,n}}{3}\right)C_{\text{Tir}}\right)t}} \quad \text{Ec. 9.22}$$

Una vez conocida la [Tir] se puede obtener, con la ecuación 9.20, la [AuNP] que sustituida en la ecuación de Lambert-Beer convencional, da el valor de absorbancia:

$$Abs_t = \varepsilon_{\text{AuNP}}[\text{AuNP}]_t = \varepsilon_{\text{AuNP},n} \frac{k_1}{k_{2,n}} \left( \frac{1 - e^{-C_{\text{Au}}\left(k_1 + \frac{2}{3}k_{2,n}C_{\text{Tir}}\right)t}}{e^{-C_{\text{Au}}(C_{\text{Tir}})t} + \frac{3k_1}{2k_{2,n}C_{\text{Tir}}}} \right) \quad \text{Ec. 9.23}$$

donde:

$$k_{2,n} = \frac{k_2}{n} \quad \text{Ec. 9.24} \quad \varepsilon_{\text{AuNP},n} = \frac{\varepsilon_{\text{AuNP}}}{n} \quad \text{Ec. 9.25}$$

El modelo descrito por la ecuación 9.23 resuelve el problema planteado ya que cuando la reacción termina ( $t \rightarrow \infty$ ) la Absorbancia obtenida depende del valor de la tiramina.

$$Abs_{\infty} = \varepsilon_{\text{AuNP},n} \frac{2}{3} C_{\text{Tir}} \quad \text{Ec. 9.26}$$

### 9.1.2.3. Modelo cuando hay exceso de tiramina.

En este caso se puede considerar que la concentración de tiramina permanece constante e igual a la inicial ( $C_{\text{Tyr}}$ ) y que durante la reacción [AuNP] formada viene dada por:

$$[AuNP] = \frac{C_{Au} - [Au(III)]}{n} \quad Ec. 9.27$$

La resolución de la ecuación diferencial permite calcular  $[Au(III)]_t$ , a partir de la cual (y con la ecuación 9.27) se puede obtener la  $[AuNP]_t$  y finalmente la variación de absorbancia a lo largo de la reacción.

$$Abs_t = \varepsilon_{AuNP} [AuNP]_t = \varepsilon_{AuNP,n} \frac{k_1}{k_{2,n}} \left( \frac{1 - e^{-C_{Tir}(k_1+k_{2,n}C_{Au})t}}{e^{-C_{Tir}(k_1+k_{2,n}C_{Au})t} + \frac{k_1}{k_{2,n}C_{Au}}} \right) \quad Ec. 9.28$$

Como es de esperar, en este caso, el modelo descrito por la ecuación 9.23 resuelve el problema planteado ya que cuando la reacción termina ( $t \rightarrow \infty$ ) la absorbancia obtenida depende del valor de la tiramina.

$$Abs_\infty = \varepsilon_{AuNP,n} C_{Au} \quad Ec. 9.29$$

#### 9.1.2.4. Aplicación del modelo

Durante todos los procesos de optimización que se describirán posteriormente, se obtendrán los registros  $Abs=f(t)$  a lo largo de la reacción. El valor de absorbancia máxima ( $Abs_\infty$ ) se tomará como señal analítica cuantitativa y los perfiles obtenidos se ajustarán matemáticamente a las ecuaciones 9.23 y 9.28 (dependiendo del exceso de Au(III) y tiramina), lo que permitirá el cálculo de las constantes  $k_{2,n}$ ,  $k_1$  y  $\varepsilon_{AuNP,n}$  en cada caso. Para hacer este cálculo se utilizará la extensión Solver® de Excel®; los datos se ajustarán a una expresión del tipo

$$Abs = A \left( \frac{1 - e^{-Bt}}{e^{-Bt} + C} \right) \quad Ec. 9.30$$

A partir de los valores de A, B y C se obtendrán los valores de los tres parámetros.

Con todo ello, en la figura 9.4 se muestra uno de estos ajustes, en este caso, se representa la variación de absorbancia a lo largo del tiempo en uno de los ensayos de optimización del pH de la reacción. Se puede observar como el modelo se ajusta a la curva sigmoidea obtenida de manera experimental.

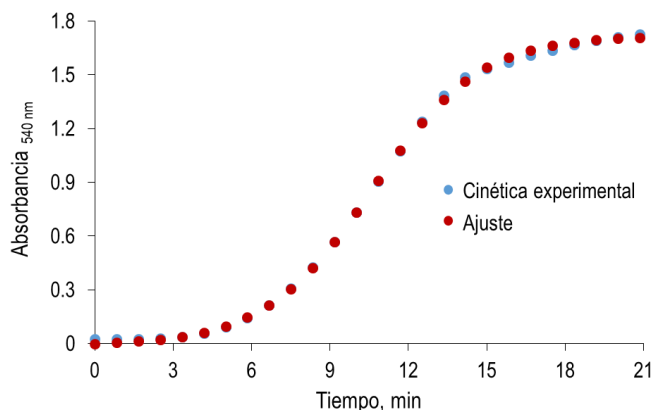


Figura 9.4: Evolución temporal de la absorbancia a 540 nm de manera experimental y calculada teóricamente.  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 5,01\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} 0,1\text{M}$  pH 7

Es importante comentar que, como puede observarse en la figura la absorbancia final tiene una cierta tendencia a aumentar paulatinamente. Este aumento es más acusado si la concentración de Au(III) está en claro exceso y se puede atribuir a la etapa de maduración comentada anteriormente.

Si bien no hay evidencias experimentales de ninguno de los dos modelos de maduración a los que se hizo referencia (Maduración de Ostwald y Coalescencia por Unión Orientada), parece claro que se produce una reorganización adicional de las nanopartículas de oro al final de la formación. Aun así, se han aplicado ambos modelos a las curvas obtenidas para las diferentes variables estudiadas, pero ninguno de ellos se ajustó adecuadamente a los resultados experimentales, por lo que no se ha realizado una discusión adicional sobre esta última parte de la curva de crecimiento.

## 9.2. Desarrollo del método enzimático: 1. Origen químico de la señal

### 9.2.1. Generación de la señal

La adición de  $\text{HAuCl}_4$  a una disolución que contiene Tiramina oxidasa (TAO) y su analito, tiramina, produce la aparición de un color violáceo (figura 9.5), que es compatible con la formación de nanopartículas de oro generadas por la reducción del Au(III) durante la reacción enzimática.

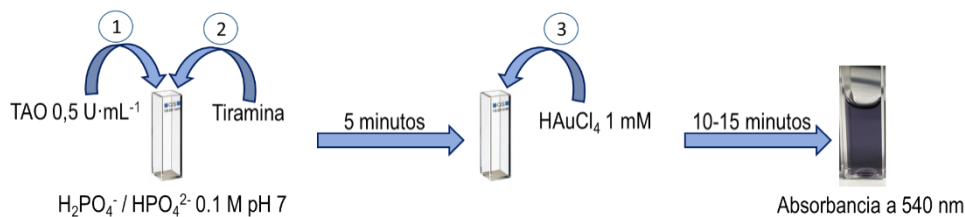


Figura 9.5: Esquema de la formación de nanopartículas de oro durante la reacción enzimática entre TAO y tiramina.

En la figura 9.6A, se muestran los cambios espectrales producidos a lo largo del tiempo. Puede observarse cómo aparece una banda en torno a 540 nm, característica de nanopartículas de oro (AuNP) [9.14] y atribuible al efecto del plasmón superficial de estas nanopartículas. En la figura 9.6B se muestra cómo es la evolución temporal de la absorbancia a 540 nm. La forma sigmoidea de esta evolución es característica de la formación de nanopartículas [9.7], y se ha relacionado con las fases de su formación (nucleación y crecimiento).

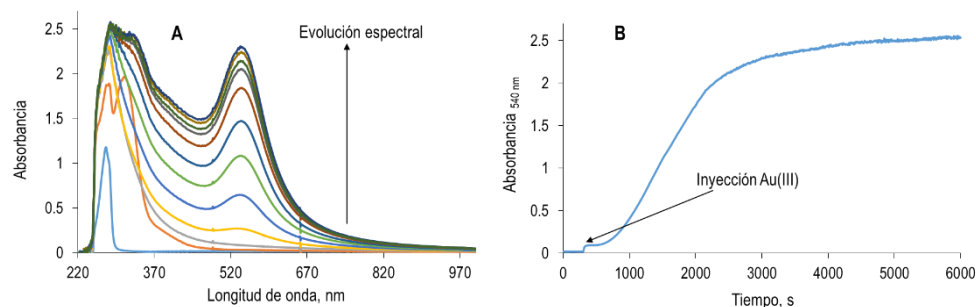


Figura 9.6: **A.** Evolución espectral de la reacción enzimática entre TAO y tiramina en presencia de Au(III). **B.** Registro cinético a 540 nm de la reacción representada en A.

### 9.2.2. Especies involucradas en la formación de las AuNP.

Antes de establecer un mecanismo global de formación, se han realizado estudios detallados con objeto de deducir qué especies son las que estarían participando en el proceso de formación de las AuNP durante la reacción enzimática. En la figura 9.7, se esquematizan todas las especies químicas; en los siguientes apartados se estudiará el papel individualizado que juega cada una de ellas.

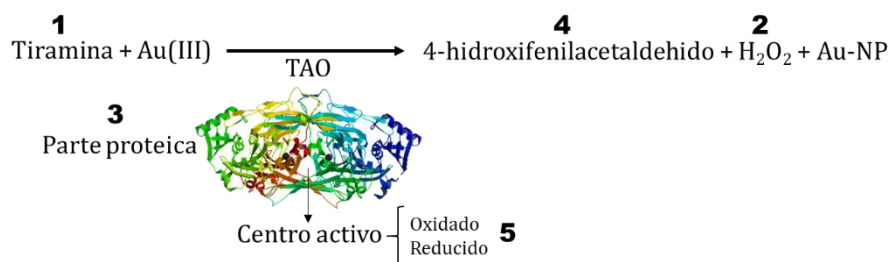


Figura 9.7: Esquema de las diferentes especies químicas que participan en la reacción enzimática de la TAO y tiramina en presencia de Au(III).

#### 9.2.2.1. Tiramina

Como se verá posteriormente, las AuNP se forman mejor cuando la reacción enzimática de la tiramina ya ha empezado (es decir, cuando su concentración es baja), lo que parece bien indicar que la tiramina no tiene una incidencia directa en

el proceso. Sin embargo, algunos autores describen la formación directa de AuNP por compuestos nitrogenados [9.15, 9.16], en particular con aminas aromáticas, por lo que se quiso probar esta opción. El mecanismo se basa en que la reducción del Au(III) a Au<sup>0</sup> va asociado a la polimerización de la amina. El polímero formado, que genera una banda de absorción en la zona de 290 nm, podría estabilizar las AuNP. La tiramina es una amina aromática y presenta capacidades reductoras, por lo que, siguiendo un mecanismo similar, podría reducir al Au(III) y, la politiramina formada, estabilizar el Au<sup>0</sup> en AuNP.

Se ha estudiado la reacción directa entre tiramina y Au(III). En la figura 9.8 se muestran los espectros de absorción de Au(III), la tiramina y una vez que se mezclan. Como se observa, la adición de Au(III) sobre la tiramina, genera una dispersión gradual (espectro c) debida a algún tipo de interacción entre ambas especies que forma turbidez en la mezcla de reacción (por ejemplo Au<sup>0</sup>). Además, a 295 nm se forma una pequeña banda diferente a la que se puede observar en los espectros individuales de ambas especies, sumado a la desaparición de las bandas a 220 nm que presentaban la tiramina y el Au(III) de manera individual, compatible con la banda del polímero anteriormente comentada. Esto podría corroborar la interacción sugerida anteriormente, en la que se forma Au<sup>0</sup> (que puede incluso deberse a la reducción de parte del Au(III) por la tiramina adicionada). Sin embargo, este ensayo descartaría que las nanopartículas formadas durante la reacción enzimática en presencia de Au(III) estuviesen sintetizadas y estabilizadas por la tiramina, y que no se forma la banda de absorción en torno a 540 nm observada en la figura 9.6A.

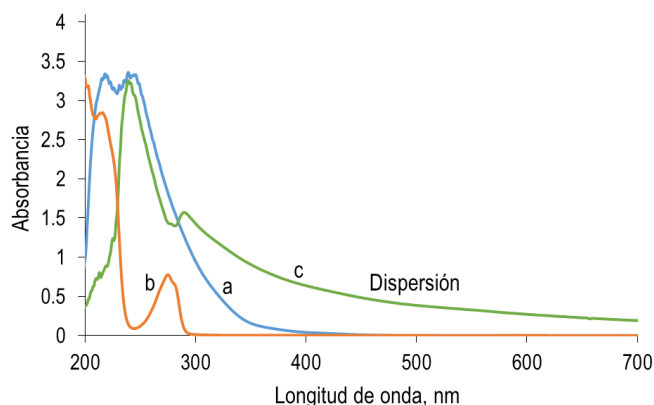


Figura 9.8: Espectros de absorción molecular de: a) Au(III) 1 mM en agua miliQ, b) Tir 0,5 mM en  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1M pH 7, c) Tir 0,5 mM, Au(III) 1 mM en  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1M pH 7.

Además, la estabilización podría deberse a la presencia de la proteína (enzima). Para ello, se han realizado mezclas de tiramina con Au(III) en presencia de albúmina o de TAO. La albúmina es añadida como sustituyente de la TAO, ya que actuaría como estabilizante proteico sin catalizar la oxidación de la tiramina, evitando así que pudiese falsear los resultados obtenidos. Antes de realizar estos ensayos, se ha comprobado que la albúmina al pH de trabajo no produce ninguna reacción paralela con el Au(III).

Como se observa en la figura 9.9, no se aprecian bandas de absorción en torno a 540 nm cuando se sustituye la TAO por albúmina. En el espectro “a” se observa una pequeñísima banda en la misma zona en la que aparecen las nanopartículas de oro sintetizadas durante la reacción enzimática (espectro b). Además, desaparece la dispersión observada en la figura 9.8, lo que puede estar indicando que las proteínas (Alb o TAO), pueden estar estabilizando una pequeña fracción de las nanopartículas formadas por la tiramina.

En este punto hay que indicar que la nanopartículas formadas por la tiramina serán una fracción todavía más pequeña que la observada en el espectro “a” de la

figura 9.9, ya que el Au(III) se adiciona 5 minutos después de que la reacción entre la tiramina y la TAO haya comenzado, lo que hace que la concentración presente de tiramina sea muy baja.

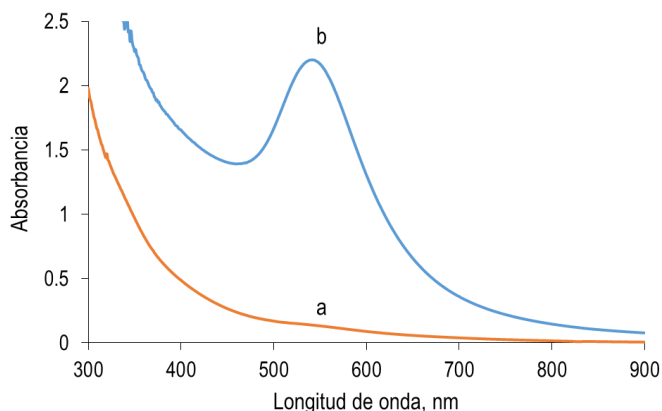


Figura 9.9: Comparación entre la reacción enzimática en presencia de Au(III) (b) y la reacción directa entre tiramina y Au(III) en presencia de albúmina (a). a)  $[Tir] = 0,7$  mM,  $[Au(III)] = 1$  mM,  $[Alb] = 0,1$  mg·mL<sup>-1</sup>. b)  $[TAO] = 0,5$  U·mL<sup>-1</sup>,  $[Tir] = 0,7$  mM  $[Au(III)] = 1$  mM.

### 9.2.2.2. Peróxido de hidrógeno

Diferentes autores han descrito que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de reducir al Au(III) y facilitar la formación de AuNP o recrear nanopartículas de oro preformadas [9.17]. Como durante la reacción enzimática se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, éste podría producir o favorecer la formación de AuNP.

Para comprobarlo, se llevó a cabo la reacción enzimática con y sin catalasa, enzima que cataliza la dismutación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>). Como se puede observar en la figura 9.10 no hay diferencias significativas en las nanopartículas formadas en presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que descarta su participación como agente de recrecimiento. La figura muestra que la presencia de catalasa ensancha un poco el espectro; como se comentará posteriormente, este efecto está relacionado con la cantidad de proteína presente en la mezcla de reacción.



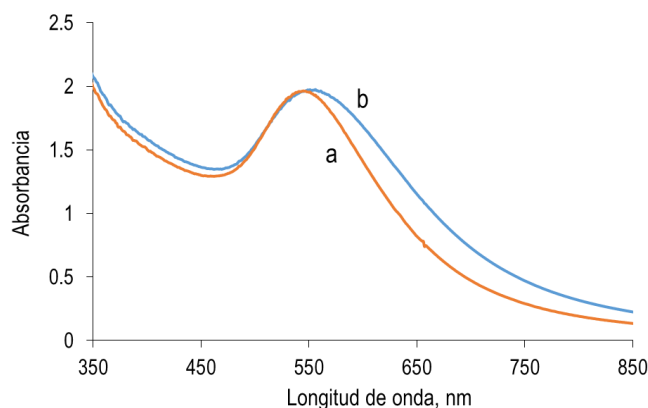


Figura 9.10: Espectros de absorción molecular de las nanopartículas de oro formadas durante la reacción enzimática entre la TAO y tiramina en presencia y ausencia de catalasa. a)  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 5\cdot 10^{-4}\text{M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ . b)  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 5\cdot 10^{-4}\text{M}$ ,  $[Au(III)]$ ,  $[Cat] = 100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 9.2.2.3. Tiramina oxidasa en su estado oxidado

Es conocido que los aminoácidos reductores de las proteínas son capaces de reducir el Au(III) y estabilizar el Au<sup>0</sup> en forma de nanomateriales (generalmente, nanoclusters) [9.15]. Sin embargo, como muestra la figura 9.11 no hay reacción directa entre la TAO y el Au(III) para producir nanopartículas. Este ensayo descarta también la participación del centro activo en su forma oxidada, hecho previsible ya que tanto el centro activo de cobre como el Au(III) se encuentran ambos en su estado oxidado, por lo que no se debería producir ninguna reacción de óxido-reducción entre ellos.

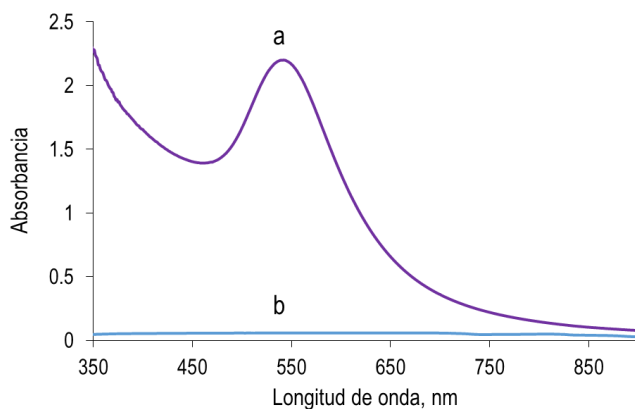


Figura 9.11: Comparación entre la reacción enzimática en presencia de Au(III) (a) y la reacción entre TAO y Au(III) (b). a)  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 7\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ . b)  $[TAO_{\text{sin Cu}}] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ .

#### 9.2.2.4. 2-(4-hidroxifenil)acetaldehido

Al igual que ha sido evaluado el peróxido de hidrógeno generado durante la reacción enzimática, es necesario estudiar de qué manera el producto de la reacción enzimática entre la TAO y la tiramina, el 2-(4-hidroxifenil)acetaldehido (Hfa), está involucrado durante el proceso de formación de las nanopartículas.

Debido a que este producto no se encuentra disponible de forma comercial, se ha realizado un primer ensayo con un producto análogo, el 4-hidroxibenzaldehido (Hba). Este compuesto difiere del producto de la reacción en un único carbono situado entre el grupo aldehído y el anillo de benceno, tal y como se muestra en la figura 9.12.

Si se realiza la reacción entre el 4-hidroxibenzaldehido con Au(III) en presencia y ausencia de TAO, no se observa la formación de nanopartículas (figura 9.13), por lo que previsiblemente, el producto de la reacción no parece estar involucrado en el proceso.

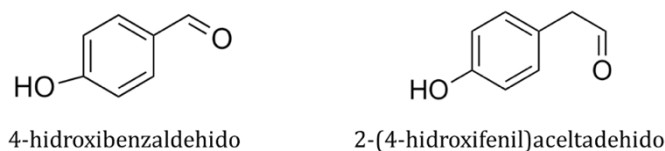


Figura 9.12: Estructuras químicas del Hba (análogo del producto de la reacción) y Hfa (producto de la reacción de la reacción).

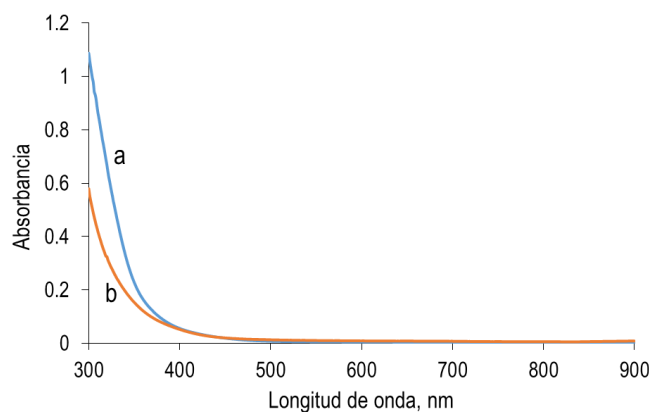


Figura 9.13: Espectro de absorción molecular en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1M pH 7 de a)  $[Hba] = 0,5$  mM,  $[Au(III)] = 1$  mM y b)  $[Hba] = 0,5$  mM,  $[TAO] = 0,5$  U·ml<sup>-1</sup>,  $[Au(III)] = 1$  mM

Todos los ensayos realizados hasta el momento parecen indicar que la única especie que queda como responsable de la formación de AuNP (ver figura 9.7) es el centro activo de la enzima en su estado reducido. Sin embargo, hay un resultado que no se puede explicar con esta hipótesis: cuando la concentración de tiramina ensayada es menor a la concentración de  $O_2$  disuelta en la mezcla de reacción ( $\approx 0,22$  mM), la enzima se encontraría en su estado oxidado en el momento de adicionar el Au(III), por lo que si el centro activo fuese el único responsable de la formación de las nanopartículas no se observaría formación de las mismas, hecho que sí que sucede. Por tanto, alguna especie más tiene que participar y la única que

no se ha comprobado es la Hfa, producto real de la reacción enzimática. Para poder evaluar la reactividad de este compuesto con Au(III) se ha sintetizado experimentalmente siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 4, apartado 4.3.2.1.

Al hacer reaccionar el Hfa sintetizado con Au(III) sí que se observa la formación de una banda absorción en torno a 600-610 nm y en un tiempo de reacción menor al observado en la reacción enzimática normal, tal y como se muestra en la figura 9.14. Esta banda (figura 9.14A, espectro “a”) proporciona un color grisáceo claro transparente, lo que podría indicar la formación de nanopartículas o estructuras nanométricas de oro, así que es necesario estudiar más a fondo la interacción de éste con el Au(III).

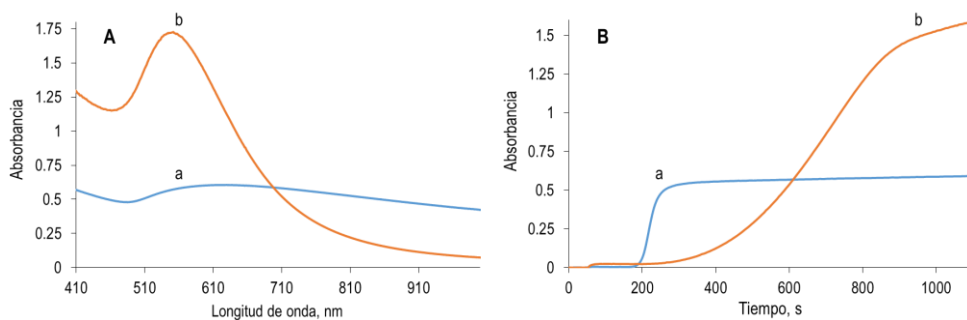
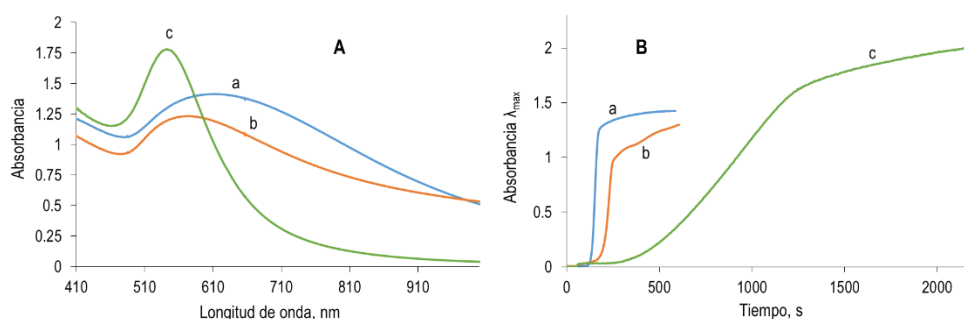


Figura 9.14: **A.** Espectros de absorción molecular en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1M pH 7 de a)  $[Hfa] = 2 \cdot 10^{-4}$  M y  $[Au(III)] = 1$  mM, b)  $[Tir] = 3 \cdot 10^{-4}$  M,  $[TAO] = 0,5$  U·mL<sup>-1</sup> y  $[Au(III)] = 1$  mM. **B.** Evolución espectral a las longitudes de onda de los máximos de absorción mostrados en A.

Dado que la banda de absorción observada al mezclar el producto de la reacción con Au(III) (espectro a) difiere significativamente del observado utilizando las mismas cantidades de tiramina durante la reacción enzimática, se ha intentado reconstruir la mezcla de reacción con las especies químicas que hay presentes en la reacción enzimática en el momento de adicionar el Au(III).

Al Hfa se le añadió el  $H_2O_2$  que se debería haber formado, así como la cantidad de tiramina en exceso que no habría reaccionado con la TAO. Para intentar sacar mayor información, se realizaron dos ensayos diferentes: en el primero se añadió apoTAO (TAO sin su centro activo, ver capítulo 4, apartado 4.3.2.4) y en el segundo TAO en su estado oxidado (en este caso no se adicionó tiramina para no interferir en la señal).

En la figura 9.15 se comparan los espectros obtenidos, así como las cinéticas de formación a la longitud de onda del máximo de absorción para cada uno de ellos; a modo comparativo se añade el espectro y la cinética que se obtiene durante la reacción enzimática normal en unas condiciones experimentales similares.



**Figura 9.15: A.** Espectros de absorción molecular en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1M pH 7 en presencia de  $[Au(III)] = 1$  mM de: a)  $[Hfa] = 0,5$  mM,  $[TAO_{sinCu}] = 0,5$  U·mL $^{-1}$ , b)  $[Hfa] = 0,5$  mM,  $[TAO] = 0,5$  U·mL $^{-1}$  y c)  $[Tir] = 0,5$  mM,  $[TAO] = 0,5$  mM. **B.** Evolución de la absorbancia máxima de los espectros de A.

En el caso de la apoenzima (espectro a) se observa una banda de absorción mucho más ancha y desplazada a longitudes de onda mayores (en torno a 620 nm), lo que indicaría mayor polidispersidad y tamaños más grandes, y además la velocidad de formación de las AuNP es muy rápida, por lo que, la parte proteica de la TAO no justifica la señal observada durante la reacción enzimática normal.

Al cambiar la apoTAO por TAO original (espectro b), el máximo de absorbancia se desplaza a menor longitud de onda (570 nm) y se reduce algo el ensanchamiento del espectro; además la velocidad de formación se retrasa un poco. Esto justifica que el Au(III) pudiera estar interactuando con el centro activo (o con los aminoácidos involucrados en la estabilización del mismo), por formación de un complejo de coordinación que estabilizara las AuNP de manera distinta a cuando no hay centro activo.

Al realizar la reacción se obtiene una banda mucho más estrecha (espectro c) y desplazada a menores longitudes de onda (540 nm), además de presentar una cinética bastante más lenta (figura 9.15B). Esto estaría indicando, que las nanopartículas formadas en un medio de reacción en el que se encuentra la enzima en su estado reducido son: 1) menos polidispersas en cuanto a tamaño y forma y 2) la cinética de la reacción parece indicar que hay involucradas otras especies químicas diferentes a los productos de la reacción.

#### **9.2.2.5. *Tiramina oxidasa en su estado reducido***

Todo lo anterior parece indicar, que aunque el producto de la reacción es importante en la formación de las nanopartículas, la enzima sigue jugando un papel crucial en la formación de las mismas durante la reacción enzimática. Para intentar demostrarlo se llevó a cabo la reacción enzimática desoxigenando las disoluciones previamente (utilizando una corriente de N<sub>2</sub> durante 20 minutos); con ello se consigue que en el momento de adicionar el Au(III) no haya O<sub>2</sub> en el medio, la enzima no puede volver a su estado inicial salvo por reducción del oro y la formación de las AuNP correspondientes.

Antes de realizar la adición de Au(III) a la mezcla de TAO y tiramina desoxigenadas, se ha comprobado mediante una tira reactiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la reacción entre la enzima y su analito no se ha producido en la extensión normal.

Como se puede observar en la figura 9.16A, al adicionar el Au(III) se forma una banda de absorción estrecha en torno a 540 nm muy similar a las obtenidas durante la reacción enzimática normal, aunque la cinética de la reacción es mucho más lenta. Esto estaría indicando, tal y como se había hipotetizado, que la enzima en su estado reducido puede utilizar el Au(III) como oxidante para su ciclo enzimático, produciéndose así la formación de las nanopartículas.

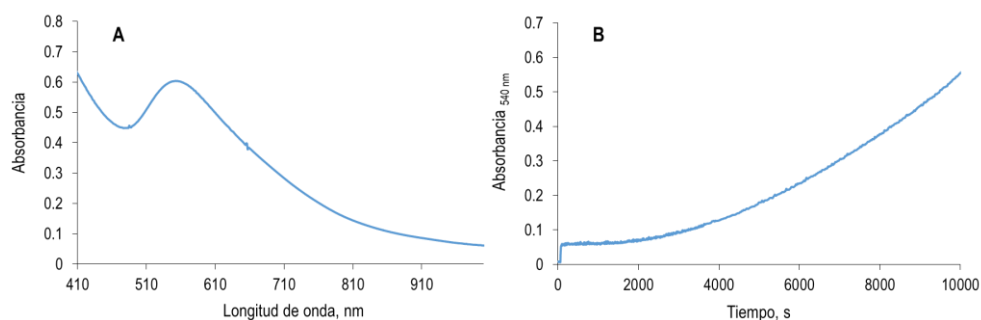


Figura 9.16: **A.** Espectro de absorción en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1M pH 7 y corriente de  $N_2$  continua.  $[TAO] = 0,48 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Tir] = 4,9 \cdot 10^{-4} M$  y  $[Au(III)] = 1 mM$ . **B.** Registro cinético a 540 nm de la reacción A.

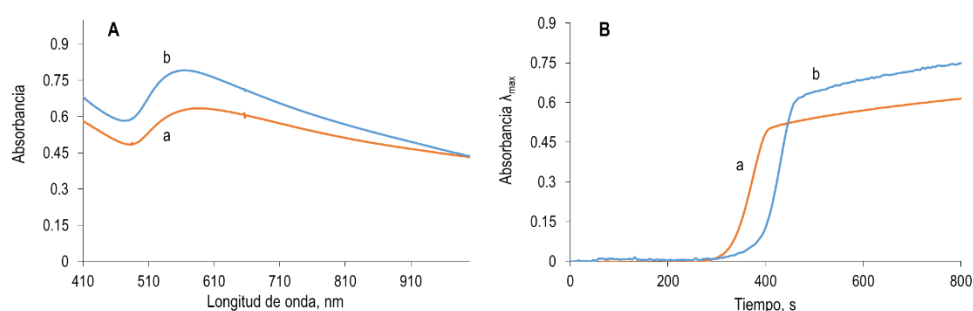
Se ha elaborado una hipótesis que podría explicar la diferencia de cinética observada en la figura 9.16B, con respecto a la reacción enzimática normal (figura 9.6B). Según ella, el Au(III) se reduce cerca del centro activo formando pequeños núcleos que ralentizan el ciclo enzimático, la aparición de Hfa y, en consecuencia, la formación de nanopartículas de oro.

#### 9.2.2.6. Conclusiones generales.

Todos estos estudios reafirman la idea de que las nanopartículas están siendo formadas gracias a la doble acción de la enzima: el centro activo es capaz de reducir el Au(III) (que estaría actuando como el  $O_2$ , si bien la afinidad de la enzima es menor para el metal) y el resto proteico estabiliza las nanopartículas.

## Capítulo 9. Generación in situ de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de tiramina

Este hecho se pone de manifiesto al observar la absorbancia de las nanopartículas formadas con concentraciones de tiramina, superiores a la cantidad de  $O_2$  disuelta; si el Au(III) no regenerase a la enzima, no se podrían observar diferencias entre estas dos concentraciones de tiramina. No obstante, cuando la concentración de tiramina es menor a la concentración de  $O_2$  disuelto ( $\approx 2,2 \cdot 10^{-4}$  M), la enzima se encuentra en su estado oxidado en el momento de adicionar el Au(III) y los espectros observados (figura 9.17) son más similares a los que se producen cuando se mezcla el producto de la reacción,  $H_2O_2$  y TAO en presencia de Au(III), lo que indicaría que es el producto de la reacción (Hfa) el principal responsable de la reducción del Au(III).



**Figura 9.17: A.** Espectros de absorción molecular en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1M pH 7 y en presencia de Au(III) 1mM de a)  $[Hfa] = 0,15$  mM,  $[H_2O_2] = 0,15$  mM,  $[TAO] = 0,5$  U·mL $^{-1}$  y b)  $[TAO] = 0,5$  U·mL $^{-1}$ ,  $[Tir] = 0,15$  mM. **B.** Evolución temporal de la longitud de onda de máxima absorción de los espectros.

Se puede establecer una hipótesis sobre el modo de actuación del Au(III) en la cinética del proceso. La TAO, tal y como se ha comentado anteriormente (capítulo 3) es una enzima que pertenece al grupo de las aminas oxidasas de cobre. El mecanismo cinético de este grupo de enzimas ha sido extensamente estudiado, e incluye dos ciclos alternativos, denominados de esfera interna y externa (figura 5.3, apartado 5.2). En el de esfera interna, el Cu(II) es reducido a Cu(I) durante la reacción enzimática, y el  $O_2$  lo oxida a su forma inicial para comenzar de nuevo el ciclo enzimático, mientras que en el esfera externa, la oxidación ocurre en el grupo



prostético (TPQ) coordinado al Cu(II), y el O<sub>2</sub> es el encargado de regenerar a este grupo orgánico.

En cualquiera de los casos, el Au(III) actuaría como el O<sub>2</sub> y oxidaría el Cu(I) a Cu(II) o el TPQ a TPQ<sub>ox</sub>, necesiéndose con ello la reacción enzimática con la tiramina para poder reducir inicialmente al Cu(II) o al TPQ<sub>ox</sub>, pudiendo actuar así el Au(III) como oxidante.

### **9.3. Desarrollo del método enzimático: 2. Optimización de las condiciones experimentales.**

Una vez que se han estudiado las especies químicas involucradas en la formación de las AuNP durante la reacción enzimática de la TAO y la tiramina y propuesto un mecanismo cinético para esa formación, se presentan los resultados obtenidos al estudiar cómo afectan diversas variables durante esta formación. Para esta optimización, se han elegido las variables que se describen a continuación como las que son necesarias controlar para poder desarrollar un método analítico reproducible y robusto.

- a. pH de la reacción.
- b. Cantidad de enzima.
- c. Cantidad de oro.
- d. Tiempo de inyección del Au(III) a la reacción TAO-tiramina.
- e. Temperatura de la reacción.

Cada una de estas variables ha sido evaluada analizando cómo modifican los siguientes parámetros analíticos:

1) longitud de onda del máximo de absorbancia que, como es sabido, indica el tamaño mayoritario en la población [9.14 y 9.18].

2) anchura de la banda del plasmón superficial [9.19]. Cuando hay AuNP de diferentes tamaños, el espectro de absorción es el envolvente de los correspondientes a los diferentes tipos de AuNP. Por este motivo, se considera que la anchura del espectro informa de la poli-dispersidad de las AuNP, especialmente, cuando la longitud de onda no cambia. También se observa cierta polidispersidad asociado a la forma de las AuNP.

3) Absorbancia máxima, como parámetro cuantitativo del método.

4) Absorbancia a lo largo del tiempo. De estos registros se obtendrán los valores de  $k_1$ ,  $k_{2,n}$  y  $\epsilon_{AuNP,n}$ . Es importante, sin embargo, considerar que la polidispersidad también afectará a estos valores, especialmente a  $\epsilon_{AuNP,n}$  y  $k_{2,n}$ . El primero, porque cuanto mayor sea la ésta, menor será la proporción de partículas del tamaño correspondiente a la longitud de onda de medida, lo que generará una “falsa” disminución del valor del parámetro. En cuanto al segundo, mayor polidispersidad indica diferentes ritmos de crecimiento (es decir,  $k_2$ ) de las AuNP formadas.

### 9.3.1. Efecto del pH

Con objeto de obtener la mayor información posible sobre las características y posibilidades de este nuevo tipo de reacción indicadora, es importante evaluar como esta se acopla adecuadamente con la reacción enzimática. La forma de hacerlo es viendo como alguna de las variables afecta a la reacción enzimática en ausencia y en presencia del indicador (Au(III)). Por esta razón el efecto del pH en la reacción ha sido estudiado comparando los resultados obtenidos tanto en la formación de las AuNP, como midiendo el consumo de  $O_2$  producido durante la reacción enzimática.

La figura 9.18, muestra los espectros finales ( $t \rightarrow \infty$ ) observados a diferentes pHs. Como se ve, el pH de la reacción es muy determinante en la formación de las

nanopartículas, ya que a pH inferiores a 6 y superiores a 9 no se observa la formación de las nanopartículas, siendo el pH óptimo 7.

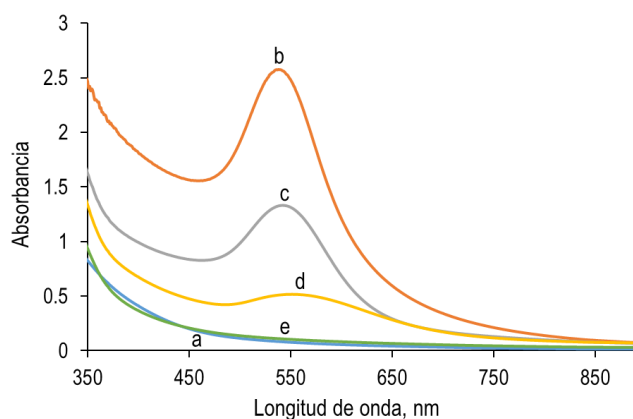


Figura 9.18: Espectros finales de absorción molecular realizados a diferentes pH.  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 5,74\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ . a) pH 6, b) pH 7, c) pH 8, d) pH 9, e) pH 10.

Comparando estos resultados con los consumos de  $O_2$  que se producen en la reacción enzimática durante el ciclo de óxido-reducción de la TAO (figura 9.19), se puede observar que también el pH 7 es el óptimo de la enzima, pero que para pH 6 y 10 sí que se produce reacción, lo que estaría indicando, que es el proceso de reducción del Au(III) el que no se estaría produciendo a estos pH. Un hecho importante a comentar es que la utilización de disolución amortiguadora TRIS inhibe totalmente la síntesis de las AuNP. Esto puede ser debido a que el TRIS al tener tres grupos amino, forma un complejo fuerte con el Au(III), lo que modificaría su potencial redox e impediría realizar la oxidación.

Capítulo 9. Generación in situ de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de tiramina

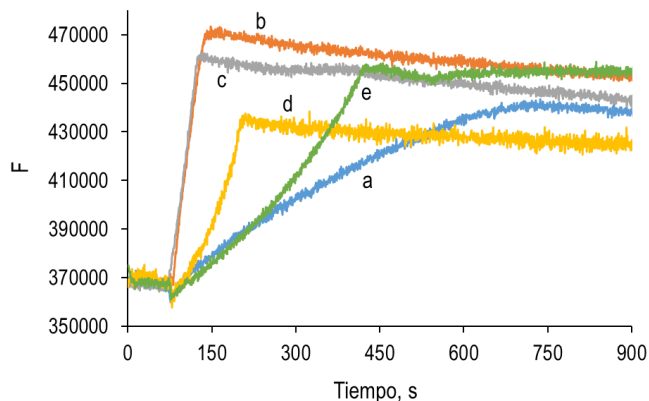


Figura 9.19: Evolución temporal de la fluorescencia del  $\text{Ru}(\text{BPY})_3$  durante la reacción enzimática de la TAO y tiramina a diferentes pH.  $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 610 \text{ nm}$ ,  $r_{exc} = r_{em} = 10 \text{ nm}$ ,  $[\text{TAO}] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{Tir}] = 5,74\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{Ru}(\text{II})] = 5,15\cdot 10^{-6} \text{ M}$ .

Por otra parte, la cinética de formación de las nanopartículas es similar para pH 7 y 8 y algo menor para pH 9 (figura 9.20), lo que indicaría que la forma química en la que se encuentra el Au(III) en estos pH no estaría afectando a la reacción enzimática.

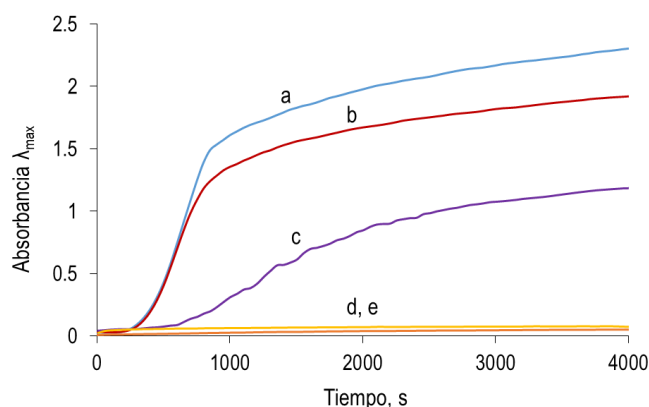


Figura 9.20: Evolución temporal de la absorbancia máxima a diferentes pH durante la formación de nanopartículas de oro en la reacción enzimática.  $[\text{TAO}] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{Tir}] = 5,74\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{Au}(\text{III})] = 1 \text{ mM}$ . a) pH 7, b) pH 8, c) pH 9, d) pH 6, e) pH 10.

A la vista de los resultados mostrados en la tabla 9.1, cabe destacar que conforme aumenta el pH de la reacción, aumenta  $k_1$ , lo que indicaría mayor velocidad de nucleación, pero sin embargo,  $k_{2,n}$  se hace menor, por lo que la velocidad de crecimiento disminuye. Entre pH 7 y 8 los valores de crecimiento son similares, pero el mayor valor de  $\epsilon$  mostrado en pH 7 hace que sea el pH óptimo para desarrollar un método lo más sensible posible. Para los pH 6 y 10 no ha sido posible hacer el cálculo matemático, ya que la evolución espectral no lo permite.

Tabla 9.1: Valores de  $k_{2,n}$ ,  $k_1$ ,  $\epsilon_{AuNP,n}$ ,  $K_{AV}$ ,  $\lambda_{max}$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $Abs_{max}$  para diferentes pH.  $[TAO] = 0,50 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 5,01\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} 0,1 \text{ M}$  pH 7-8,  $HCO_3^-/CO_3^{2-} 0,1 \text{ M}$  pH 9

pH	7	8	9
$\lambda_{max}$ , nm	545	548	562
$\Delta\lambda$ , max	57	57	95
$Abs_{max}$	2,01	1,70	0,90
$\epsilon_{\lambda_{max},n}$ , $M^{-1}S^{-1}$	5148,7	4516,8	3310,4
$k_1 (\cdot 10^3)$ , $M^{-1}S^{-1}$	70,2	115,4	177,6
$k_{2,n} (\cdot 10^{-4})$ , $M^{-2}S^{-1}$	3,65	3,23	0,94

### 9.3.2. Concentración de Tiramina Oxidasa

Una de las variables más interesantes en este estudio es la concentración de enzima. Como puede observarse en la figura 9.21, cuanto mayor es la concentración de TAO, mayor es  $\Delta\lambda$ , indicando un aumento en la polidispersidad, sin embargo, la longitud de onda del máximo de absorbancia se mantiene aproximadamente constante. Este resultado sugiere que, a pesar de que el tamaño dominante de las AuNP parece independiente de la concentración de enzima, se va formando una segunda población de AuNP de mayor tamaño. Una hipótesis que podría explicar este fenómeno es que una población de nanopartículas estaría

formándose alrededor del centro activo y otra entre las enzimas (por el aumento de concentración), estabilizándose en este segundo caso, nanopartículas de mayor tamaño (mayores longitudes de onda).

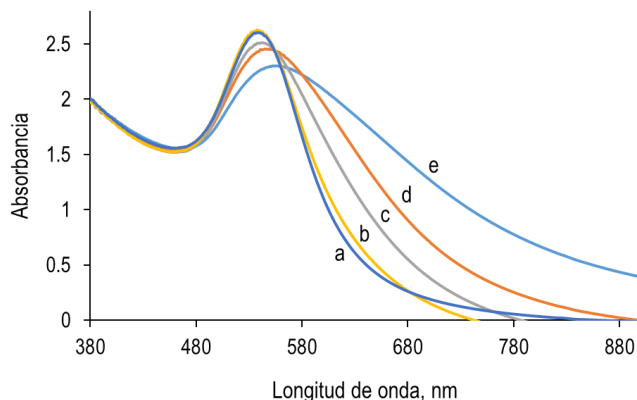


Figura 9.21: Espectros finales de absorción molecular para diferentes concentraciones de TAO.  $[Tir] = 4,08 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[Au(III)] = 1 mM$ ,  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} 0,1M$  pH 7.  $[TAO] = a) 0,2 U \cdot mL^{-1}$ ,  $b) 0,5 U \cdot mL^{-1}$ ,  $c) 1,0 U \cdot mL^{-1}$ ,  $d) 2,0 U \cdot mL^{-1}$ ,  $e) 3,0 U \cdot mL^{-1}$

Esto se ha estudiado utilizando Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). En la figura 9.22 se muestran las nanopartículas y su distribución de tamaños obtenidas con una concentración de  $0,5 U \cdot mL^{-1}$  (curva b de la figura). Como puede observarse, las nanopartículas formadas tienen una forma circular (A) y con una distribución de tamaños muy regular (B), con un tamaño medio de  $19,5 \pm 1,9 nm$ .

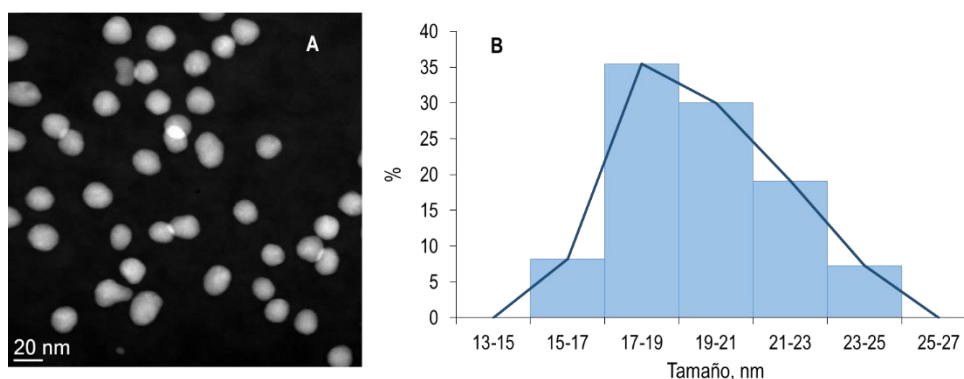


Figura 9.22: Síntesis de nanopartículas con  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 7,0\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} 0,02 \text{ M}$  pH 7. A) Imagen TEM, B) Distribución de tamaños contando 110 nanopartículas.

Sin embargo, las nanopartículas sintetizadas con una concentración de TAO de  $4 \text{ U/mL}$  presentan dos poblaciones diferenciadas, una de ellas similar a las obtenidas con  $0,5 \text{ U/mL}$  con un tamaño medio de  $20,0 \pm 1,8 \text{ nm}$  y otra mucho más grande de  $144,4 \pm 8,6 \text{ nm}$  y con una forma particular como se muestra en la figura 9.23. Esta doble población podría ser la responsable de que el espectro de absorción sea más ancho cuanto mayor sea la concentración de enzima, tal y como se observaba en la figura 9.21. Recientemente se han descrito [9.20] en la bibliografía un nuevo tipo de AuNP porosas. Las propiedades ópticas (su máximo aparece en torno  $700 \text{ nm}$ ) y el tamaño (en torno a los  $200 \text{ nm}$ ) que caracterizan a esas nuevas AuNP están en consonancia con las observadas en esta Tesis. Aquellas se obtienen usando una nanoestructura como semilla (los autores de la referencia usaron nano-octaedros de PbS), por lo que es muy posible que las AuNP aquí observadas se generen, como se ha dicho o bien alrededor de las AuNP más pequeñas o bien alrededor de las moléculas de enzima.

Por otro lado, para concentraciones iguales o menores a  $0,2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  se forma un precipitado al cabo del tiempo, que indicaría que la cantidad de enzima no es suficiente para estabilizar las nanopartículas que se están produciendo. Es por ello,

que se ha elegido una concentración de TAO de  $0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , ya que es la menor concentración en la que no ocurren problemas de precipitación y además las nanopartículas formadas presentan una banda estrecha de absorción, característica relacionada con la un tamaño y forma de nanopartículas regular.

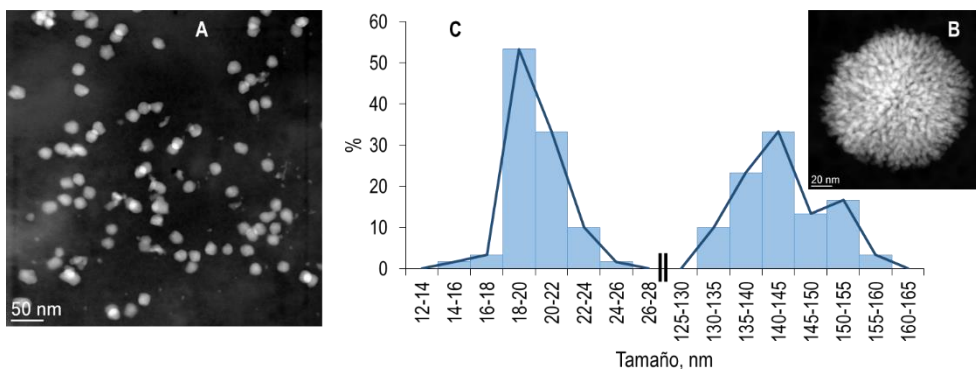


Figura 9.23: Síntesis de nanopartículas con  $[\text{TAO}] = 4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{Tir}] = 7,0\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{Au(III)}] = 1 \text{ mM}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} 0,02 \text{ M}$  pH 7. A) Imagen TEM de la población mayoritaria de nanopartículas, B) Imagen TEM ampliada de las nanopartículas grandes, C) Distribución de tamaños de las dos poblaciones de nanopartículas.

Como consecuencia de la diferencia observada en las nanopartículas sintetizadas con diferentes concentraciones de enzima, el rango de respuesta lineal del método está fuertemente influenciado por la cantidad de enzima. Como se observa más adelante, al representar la  $\text{Abs}_{\text{max}}$  frente a la concentración de tiramina adicionada, utilizando una concentración de TAO de  $0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , se obtiene la clásica respuesta lineal con una saturación a concentraciones elevadas de tiramina. Sin embargo, para una concentración de TAO de  $2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  se obtiene una curva sigmoidea.

En la tabla 9.2 se muestran los valores de las constantes del modelo matemático, así como los datos más relevantes obtenidos de los espectros de absorción de cada una de las concentraciones de enzima ensayadas. Lo más llamativo, respecto al



modelo matemático, es que disminuir la concentración de enzima, se observa como aumenta de manera progresiva la  $k_1$ , mientras que la  $k_{2,n}$  se comporta de manera inversa, es decir, disminuyendo conforme disminuye la cantidad de enzima. Esto parece indicar que la enzima pudiese estar actuando en el crecimiento de los núcleos preformados de oro y no en la reducción inicial del Au(III), lo que justificaría algunas de las observaciones experimentales indicadas en el apartado anterior. Además es destacable, tal y como se observaba en la figura 9.21, cómo la  $\Delta\lambda$  disminuye considerablemente conforme disminuye la enzima.

Tabla 9.2: Valores de  $k_{2,n}$ ,  $k_1$ ,  $\epsilon_{AuNP,n}$ ,  $K_{AV}$ ,  $\lambda_{max}$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $Abs_{max}$  para diferentes concentraciones de TAO.  $[Tir] = 4,08 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[Au(III)] = 1 mM$  y  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} 0,1 M$  pH 7.

[TAO], U·mL <sup>-1</sup>	4	2	1	0,50	0,25	0,13
$\lambda_{max}$ , nm	555	545	543	538	538	↓
$\Delta\lambda$ , max	193	122	94	67	56	↓
$Abs_{max}$	2,310	2,640	2,800	2,920	2,674	↓
$\epsilon_{\lambda_{max,n}}$ , M <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup>	4100	4600	5520	5820	6030	6950
$k_1$ ( $\cdot 10^3$ ), M <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup>	7,3	5,5	7,8	21,1	96,0	192
$k_{2,n}$ ( $\cdot 10^{-4}$ ), M <sup>-2</sup> S <sup>-1</sup>	9,1	9,6	7,1	7,8	4,7	1,8

\* ↓ precipita

### 9.3.3. Concentración del Au(III)

La figura 9.24, muestra que hasta una concentración de 1 mM de Au(III) en disolución, la absorbancia máxima de la banda del plasmón aumenta progresivamente, sin variar la longitud de onda del máximo, y sin una distorsión notable de la misma. Para una concentración de 3 mM, la cantidad de oro es demasiado elevada; esto produce, por un lado, una absorbancia muy alta (en los niveles de la luz parásita, lo que distorsiona los valores obtenidos) y por otra,

mucha dispersión, pudiéndose observar en el espectro a de la figura 9.24 una línea base elevada con respecto al resto de concentraciones de Au(III).

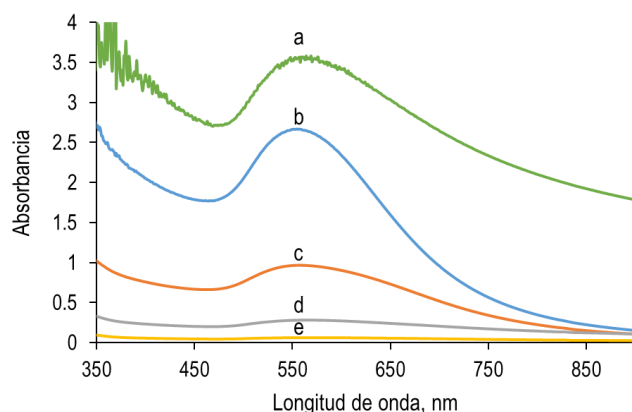


Figura 9.24: Espectros de absorción molecular tras la reacción de formación de nanopartículas de oro durante la reacción enzimática de la TAO y tiramina con diferentes cantidades de Au(III).  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 4,95\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} 0,1 \text{ M}$  pH 7,  $[\text{Au(III)}] = \text{a) } 2 \text{ mM}$ ,  $\text{b) } 1 \text{ mM}$ ,  $\text{c) } 0,33 \text{ mM}$ ,  $\text{d) } 0,11 \text{ mM}$ ,  $\text{e) } 33 \mu\text{M}$ .

Tabla 9.3: Valores de  $k_{2,n}$ ,  $k_1$ ,  $\epsilon_{\text{AuNP},n}$ ,  $K_{AV}$ ,  $\lambda_{\text{max}}$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $\text{Abs}_{\text{max}}$  para diferentes cantidades de Au(III).  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 4,95\cdot 10^{-4} \text{ M}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} 0,1 \text{ M}$  pH 7.

[Au (III)], mM	2,00	1,00	0,63	0,32	0,16	0,08	0,04
$\lambda_{\text{max}}$ , nm	563	556	559	564	565	563	565
$\Delta\lambda$ , max	155	112	135	140	144	150	165
$\text{Abs}_{\text{max}}$	2,130	2,170	1,720	0,970	0,640	0,350	0,130
$\epsilon_{\lambda_{\text{max}},n}$ , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	8370	7920	6410	4160	3700	4250	3220
$k_1 (\cdot 10^3)$ , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	2,8	9,5	126	852	392	391	78
$k_{2,n} (\cdot 10^{-4})$ , $\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	1,73	5,20	10,0	81,8	52,6	49,4	87,8

En la tabla 9.3 se muestran los valores obtenidos al aplicar el modelo cinético a las diferentes concentraciones de Au(III). Aparentemente no se observa una tendencia clara en cuanto a las constantes de velocidad, ya que inicialmente, tanto

$k_1$  como  $k_{2,n}$ , aumentan conforme disminuye la cantidad de Au(III) adicionada, pero posteriormente, disminuyen bruscamente a partir de 0,32 mM. Un dato que permanece casi inalterable es la longitud de onda del máximo de absorción, indicando que no depende de la concentración de Au(III) en el medio de reacción.

#### **9.3.4. Tiempo de inyección del Au(III) en la reacción entre TAO-tiramina**

Un parámetro que es necesario tener muy en cuenta es el orden de adición de los reactivos. Si se adiciona el Au(III) antes de que tenga lugar la reacción entre la tiramina y la TAO, la cinética de reacción es muy lenta, por este motivo el procedimiento más eficaz es mezclar en la cubeta la enzima (TAO) y el sustrato (tiramina), dejarlos reaccionar durante un tiempo ( $t_{espera}$ ) y posteriormente añadir el Au(III). En la figura 9.25 se muestran los perfiles cinéticos obtenidos midiendo la variación de absorbancia a lo largo del tiempo ( $Abs_{max}$  vs  $t$ ) obtenidos para diferentes  $t_{espera}$ .

Como puede observarse, para  $t_{espera}$  menores a 1 minuto, la cinética de la reacción es muy lenta, de hecho si  $t_{espera}=0$  la reacción práctica no transcurre en un tiempo razonable. Además, hay un óptimo a 5 minutos; un tiempo superior a este también perjudica la reacción.

Capítulo 9. Generación in situ de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de tiramina

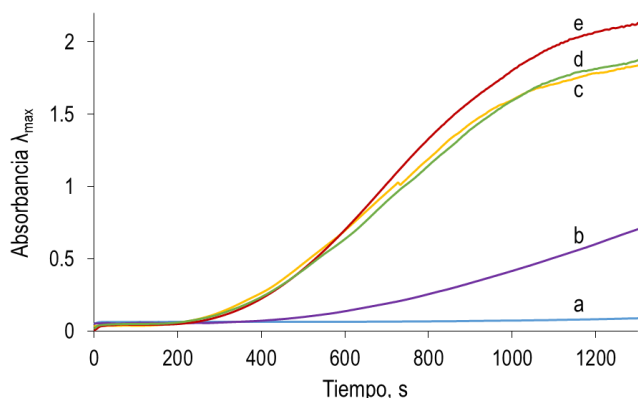


Figura 9.25: Evolución temporal de la absorbancia máxima de las nanopartículas de oro formadas durante la reacción enzimática para diferentes  $t_{espera}$  del Au(III).  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 5,57\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $H_2PO_4/HPO_4^{2-} 0,1M$  pH 7. a) 0 min, b) 1 min, c) 3 min, d) 8 min, e) 5 min.

Estos resultados son muy interesantes como base del mecanismo de la reacción enzimática. El hecho de que se observe una cinética más rápida si se deja que la reacción transcurra antes de añadir el Au(III), enfatiza el papel que tiene el producto (Hfa) en la formación de las AuNP. Pero, por otro lado, el efecto negativo que se obtiene a tiempos bajos es también muy llamativo. Una hipótesis que podría explicar estas diferencias es que para tiempos menores a 1 minuto la TAO sigue reaccionando con la tiramina y por tanto la cantidad de enzima en su estado oxidado es casi despreciable. En este caso, el Au(III) y el  $O_2$  competirían por oxidar al centro activo, siendo más rápido el Au(III), lo que formaría núcleos alrededor de la enzima; si estos núcleos dificultaran la reacción, los sucesivos ciclos enzimáticos serían cada vez más lentos, disminuyendo la velocidad de formación de Hfa, dando perfiles cinéticos con tiempos mayores.

Por el contrario, si el Au(III) actúa como oxidante una vez las AuNP ya están formadas, el  $Au^0$  que se va generando se utilizaría en recrecer estas AuNP y no afectaría a la actividad de la enzima. Con ello, se podría decir que las partículas de

enzima que reaccionan con el Au(III) para formar las nanopartículas, pierden actividad y por ello, si no se deja que reaccione previamente con la tiramina, la reacción se puede hacer muy lenta. Los resultados de la tabla 9.4 muestran que las constantes de velocidad obtenidas a diferentes tiempos van en la línea de confirmar estas hipótesis. También parecen indicar que las características espectroscópicas de las AuNP ( $\epsilon_{AuNP,n}$ ) no parecen verse afectadas por  $t_{espera}$ .

*Tabla 9.4: Valores de  $k_{2,n}$ ,  $k_1$ ,  $\epsilon_{AuNP,n}$ ,  $K_{AV}$ ,  $\lambda_{max}$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $Abs_{max}$  para diferentes tiempos de inyección del Au(III).  $[TAO] = 0,52 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $[Tir] = 5,60\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} 0,1 \text{ M pH } 7$ .*

Tiempo, s	0	60	180	300	480
$\lambda_{max}$ , nm	552	540	542	547	544
$\Delta\lambda$ , max	193	61	84	108	86
$Abs_{max}$	1,85	2,05	1,89	2,16	1,93
$\epsilon_{\lambda_{max,n}}$ , $M^{-1}S^{-1}$	5094,8	5727,2	5064,8	5866,1	5251,7
$k_1 (\cdot 10^3)$ , $M^{-1}S^{-1}$	37,5	136,2	182,0	127,0	164,1
$k_{2,n} (\cdot 10^{-4})$ , $M^{-2}S^{-1}$	0,25	0,80	2,41	2,54	2,34

### 9.3.5. Temperatura de la reacción.

La reacción de formación de nanopartículas, a temperatura ambiente, se produce aproximadamente en 10-15 minutos. Aunque parezca un tiempo largo, es importante contextualizarlo adecuadamente. En primer lugar, este tiempo es mucho menor comparado con otros reportados por métodos de síntesis convencionales [9.21], donde la formación de nanopartículas suele necesitar al menos 10-12 horas; este tiempo de formación de nanopartículas de oro estaría en el orden de los considerados métodos de síntesis “in situ” [9.22]. En segundo lugar, la mayoría de los métodos analíticos desarrollados con el uso de nanopartículas,

suelen sintetizar las nanopartículas para posteriormente utilizarlos en reacciones química de interés, por lo que la metodología es más tediosa; en el método que se expone a lo largo de este capítulo, la síntesis y determinación analítica sucede a la vez, simplificando así el esquema analítico.

No obstante, con objeto de mejorar la velocidad del análisis, se ha evaluado cómo afecta la temperatura al desarrollo de la reacción. El rango de temperaturas elegido fue de 20°C a 60°C. En la figura 9.26 se muestran los perfiles cinéticos de la formación de nanopartículas de oro durante la reacción enzimática para estas temperaturas. Como puede observarse, un aumento de temperatura lleva asociado un aumento considerable en la velocidad de la reacción. Si se aumenta demasiado (60°C, curva e), las nanopartículas se forman en menos de 3 minutos, sin embargo, terminan precipitando. Esto puede ser debido a que la enzima se encuentre parcialmente desnaturalizada y no sea capaz de estabilizar las nanopartículas formadas.

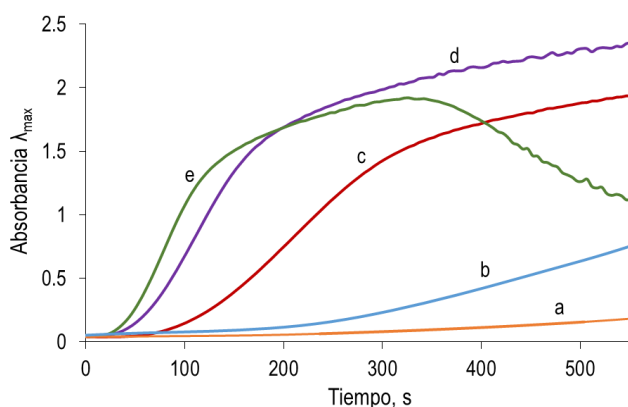


Figura 9.26: Evolución temporal de la absorbancia a 540 nm a diferentes temperaturas durante la formación de nanopartículas de oro en la reacción enzimática.  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 7,94\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1M pH = 7. a) 20°C, b) 30°C, c) 40°C, d) 50°C, e) 60°C

En la tabla 9.5 se observan los datos obtenidos mediante el modelo cinético-matemático para diferentes temperaturas, gracias al cual se ha podido verificar la coherencia de las constantes cinéticas calculadas con la ecuación de Arrhenius, obteniéndose unos resultados que se ajustan significativamente a dicha ecuación (tabla 9.6). Como era de esperar, tanto  $k_1$  como  $k_{2,n}$  aumentan conforme lo hace la temperatura, ya que al tratarse de constantes cinéticas, están influenciadas por el valor de la temperatura de trabajo. A partir de las ecuaciones de Arrhenius se pueden calcular las energías de activación para los procesos de nucleación y crecimiento, obteniendo valores de  $43,8 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$  y  $84,2 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$  respectivamente que son algo mayores que los obtenidos por otros autores [9.23] para la síntesis de AuNP a partir de una reacción química convencional.

Tabla 9.5: Valores de  $k_{2,n}$ ,  $k_1$ ,  $\varepsilon_{AuNP,n}$ ,  $K_{AV}$ ,  $\lambda_{max}$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $Abs_{max}$  a diferentes temperaturas.  $[TAO] = 0,52 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 7,93\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} = 0,1 \text{ M}$  pH = 7.

T, °C	20	30	40	50
T, K	293	303	313	323
$\lambda_{max}$ , nm	540	539	542	540
$\Delta\lambda$ , nm	76	80	69	58
$\varepsilon_{\lambda_{max,n}}$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	4518	4670	3303	3453
$k_1 (\cdot 10^3)$	325	540	800	1840
$k_{2/n} (\cdot 10^{-4})$	0,59	1,52	7,23	12,4

Tabla 9.6: Ajustes de la ecuación de ecuación de Arrhenius para  $k_1$ ,  $k_{2,n}$

Constantes	Ecuación	R
$k_1$	$\ln(k_1) = 17 - 5271/T$	0,966

$k_{2,n}$	$\ln (k_2/n) = 43 - 10140 /T$	0,974
-----------	-------------------------------	-------

#### 9.4. Desarrollo del método enzimático: 3. Caracterización de las nanopartículas de oro. Cálculo del rendimiento de la reacción.

La primera característica que se puede estimar es el tamaño de las nanopartículas formadas. La Teoría de Mie establece una relación entre la longitud de onda del máximo de  $\epsilon$  y el diámetro de la AuNP. Esta relación teórica se ha observado también experimentalmente por diferentes autores, que incluso han desarrollado ecuaciones empíricas que permiten establecer una relación entre ellas. En un artículo publicado por Haiss et al [9.14], se propone la ecuación 9.31 según la que el diámetro de partículas esféricas se puede determinar con un error del 3% para partículas que estén en el rango de 35-110 nm:

$$d = 46,3 \ln \left( \frac{\lambda_{spr} - 512}{6,53} \right) \quad \text{Ec. 9.31}$$

Donde  $\lambda_{spr}$  es la longitud de onda de máxima absorción del espectro. Si el tamaño es menor, entre 5 y 50 nm, se puede calcular el diámetro de nanopartículas esféricas con un error en torno al 11 % utilizando:

$$d = e^{(3 \cdot \frac{A_{spr}}{A_{450}} - 2,2)} \quad \text{Ec. 9.32}$$

donde  $A_{450}$ , es la absorbancia obtenida a 450 nm y  $A_{spr}$  es la absorbancia obtenida a  $\lambda_{spr}$ . Se han desarrollado otras ecuaciones empíricas para realizar estas estimaciones, como la propuesta por Klebtshov [9.18] que da resultados análogos a los de Haiss

$$d = \frac{\sqrt{\lambda_{spr} - 517} - 1}{0,06} \quad (\lambda_{spr} > 523) \quad \text{Ec. 9.33a}$$



$$d = 3,75 + 7,5 * 10^{-5}(\lambda_{spr} - 500)^4 \quad (\text{si } \lambda_{spr} < 523) \quad \text{Ec. 9.33b}$$

Aplicando 9.32 a las nanopartículas representadas en las figuras 9.23 y 9.24, cuyos espectros de absorción son los que se muestran en la figura 9.28, se obtienen los resultados que se representan en la tabla 9.7, los cuáles han sido comparados con los obtenidos utilizando las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

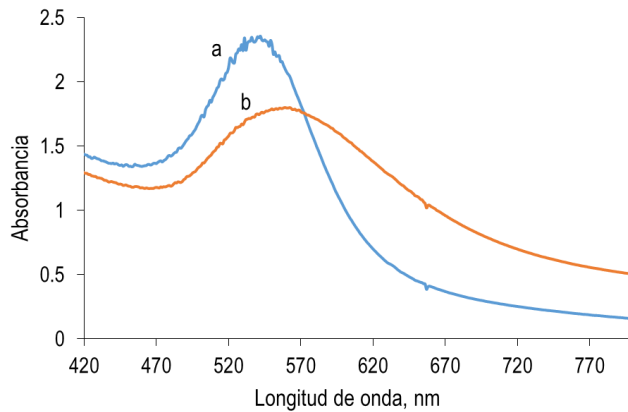


Figura 9.27: Espectros finales de absorción molecular de las nanopartículas sintetizadas a dos concentraciones de TAO.  $[Tir] = 6,98 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[Au] = 1 mM$ ,  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} 0,02M$   $pH = 7$  y  $[TAO] = a) 0,5 U \cdot mL^{-1}$ ,  $b) 4,0 U \cdot mL^{-1}$

Una vez obtenido el diámetro de las nanopartículas formadas, se puede calcular el número de átomos de oro en cada nanopartícula (N) según [9.24]:

$$N = \frac{\pi \cdot \rho \cdot D^3}{6 \cdot M} \quad \text{Ec. 9.34}$$

Donde  $\rho$  es la densidad del oro (considerando una estructura cúbica centrada en las caras),  $M$  es la masa atómica del oro y  $D$  es el diámetro de las nanopartículas calculado en nm. Esta ecuación se puede sustituir por los valores constantes quedando de manera simplificada como la ecuación 9.35.

$$N = 30,9 \cdot D^3 \quad \text{Ec. 9.35}$$

Una vez conocido el promedio de átomos de oro presente en las nanopartículas, se puede calcular el rendimiento de la reacción de formación de nanopartículas de oro a partir del oro adicionado al comienzo de la reacción. Para ello, es necesario calcular la concentración de nanopartículas formadas durante la reacción. Esto se consigue utilizando la Ley de Lambert-Beer, conociendo el coeficiente de extinción molar de las nanopartículas de oro. Este parámetro se puede encontrar tabulado en varias fuentes, en este caso, se ha obtenido de [9.14].

Como se observa en la tabla 9.7, los valores obtenidos mediante el cálculo teórico a partir de los espectros de absorción molecular y los obtenidos mediante TEM son consistentes si la concentración de enzima es  $0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Sin embargo, los valores obtenidos cuando la concentración de enzima es elevada ( $4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) no se ajustan a los observados por TEM. La razón principal de esta diferencia puede ser debida a que el modelo se ajusta bien si la banda de absorción obtenida es estrecha, haciendo que la forma y el tamaño de las nanopartículas sea homogéneo. Como ya se había visto anteriormente, cuando la concentración de TAO es grande, el espectro es más ancho, lo que indicaba cierta polidispersidad, haciendo que el modelo matemático asociado a los espectros de absorción calcule unos valores que no concuerdan con los valores reales observados por TEM.

*Tabla 9.7: Comparación del diámetro teórico y experimental (TEM) para dos concentraciones de TAO diferentes. Rendimiento de la formación de las nanopartículas de oro durante la reacción enzimática.*

[TAO]	$0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$	$4,0 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$
Abs <sub>450</sub>	1,353	1,192
Abs <sub>spr</sub>	2,351	1,801
d, nm (teórico)	20,3	10,3*
d, nm (TEM)	$19,5 \pm 1,9$	$20,0 \pm 1,8$ y $144,4 \pm 8,6$

N	229090,13	33760,91
$C_{NP}$ , mol·L <sup>-1</sup>	$4,346 \cdot 10^{-9}$	$1,938 \cdot 10^{-8}$
Rendimiento	99,5	65,4

\* La polidispersidad no se puede observar en el cálculo teórico y el rendimiento ha de ser menor porque no tiene en cuenta las partículas grandes

## 9.5. Desarrollo del método enzimático: 4. Características analíticas e interferencias

### 9.5.1. Efecto de la concentración de TAO en la calibración.

La tabla 9.8 resume las condiciones óptimas encontradas durante el estudio de optimización.

Tabla 9.8: Condiciones óptimas para la formación de AuNP.

Variables	[TAO], U·mL <sup>-1</sup>	[Au(III)], mM	pH	T <sub>espera</sub> , min	T <sup>a</sup> , °C
Condiciones	0,5	1	7	5	40

Como se ha indicado en el apartado 1.3.3.2, se ha querido evaluar la respuesta analítica del método desarrollado utilizando dos concentraciones diferentes de enzima; la idea es establecer un marco experimental que permita poder extrapolar los resultados obtenidos a otros sistemas enzimáticos que funcionaran de manera similar al desarrollado en este capítulo.

En la figura 9.28 se muestran los valores experimentales obtenidos para las dos concentraciones diferentes de TAO, 0,5 U·mL<sup>-1</sup> (concentración óptima) y 2 U·mL<sup>-1</sup>. Como se puede observar la calibración presenta una tendencia diferente en ambos casos. Si la concentración es 0,5 U·mL<sup>-1</sup> se obtiene una respuesta lineal al comienzo y posteriormente se satura la señal, sin embargo cuando la concentración es de 2

$\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  se obtiene una relación sigmoidea entre la concentración de tiramina y la señal de absorbancia.

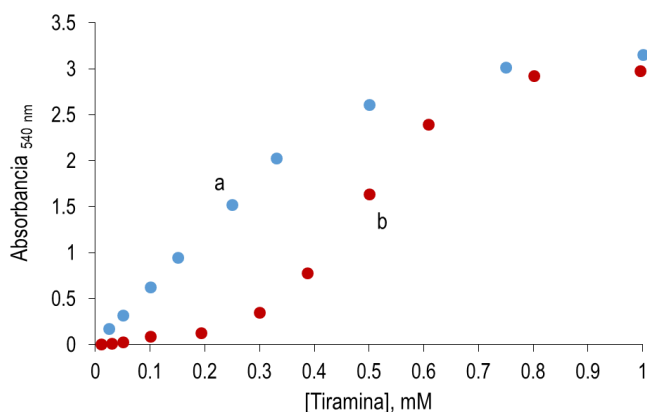


Figura 9.28: Relación entre la absorbancia a 540 nm y la concentración de tiramina presente en la reacción utilizando dos concentraciones de enzima.  $[\text{Au(III)}] = 1 \text{ mM}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} = 0,1 \text{ M pH } 7$ , a)  $[\text{TAO}] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , b)  $[\text{TAO}] = 2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$

Aunque la concentración óptima de TAO estudiada en la optimización del método es  $0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , se ha querido evaluar la curva sigmoidea obtenida con  $2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TAO para estudiar su posible linealización utilizando las ecuaciones matemáticas correspondientes a este tipo de curvas.

Las curvas sigmoideas son, en realidad, muy frecuentes en Química Analítica, especialmente cuando se utilizan representaciones logarítmicas en inmunoensayo [9.25 y 9.26]. En estos casos, es frecuente ajustar matemáticamente los resultados a las denominadas “curvas logísticas” de 4 o 5 parámetros, aunque siempre que es posible se utiliza la de 4 parámetros, que es la empleada en esta Tesis y viene dada por:

$$Y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} \quad \text{Ec. 9.36}$$

Cada uno de los parámetros de esta función se relacionan con los siguientes parámetros experimentales: Y es la absorbancia obtenida para cada una de las concentraciones, D es la absorbancia máxima obtenida, es decir, la absorbancia límite para concentraciones elevadas de tiramina, A representa la absorbancia mínima, C es la concentración a mitad de altura (punto de inflexión), X representa la concentración y B es un parámetro adimensional que se denomina factor de forma y que tiene relación con la curvatura. En este tipo de representaciones la reacción matemática entre la variable dependiente (y) e independiente (x) se puede simplificar si se conocen los valores de A y D (mínimo y máximo de la representación respectivamente). Reordenando la ecuación 9.36 y tomando logaritmos se obtiene una expresión matemática que se ajusta a una línea recta al representar  $\log \frac{Y-A}{D-Y}$  frente a  $\log X$ :

$$\log \frac{Y - A}{D - Y} = B \cdot \log X - B \cdot \log C \quad \text{Ec. 9.37}$$

En la figura 9.29 se puede observar cómo los valores experimentales se ajustan a una tendencia lineal al utilizar la ecuación 9.37. El rango de respuesta lineal de la curva sigmoidea alcanza valores de concentración más elevados (0,19-0,61 mM) que el propio rango de respuesta lineal cuando la concentración de enzima es baja. Esto puede utilizarse si las concentraciones esperadas de tiramina en muestras fuesen más altas, ya que permitiría, utilizando ambas calibraciones, tener un rango de concentraciones más amplio.

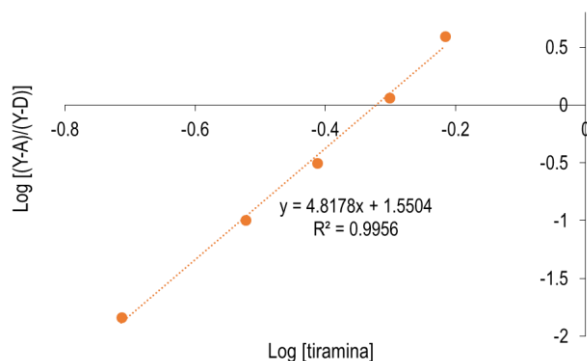


Figura 9.29: Representación logarítmica de la curva sigmoidea

### 9.5.2. Efecto de la temperatura

Además del estudio de la curva sigmoidea, se ha querido evaluar la respuesta lineal obtenida con  $0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TAO a dos temperaturas diferentes, para así abarcar diferentes escenarios de aplicación. Trabajando en las condiciones óptimas dadas en la tabla 9.8, exceptuando la  $T^a$ , las características analíticas encontradas se indican en la tabla 9.9. En ella se recogen los rangos de respuesta lineal del método, el límite de detección (LD), así como la DER asociada a uno de los valores la calibración para las dos temperaturas estudiadas ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Además en la figura 9.30 se muestran las rectas de regresión lineal de cada una de las temperaturas.

Puede observarse como los rangos de respuesta lineal para ambas temperaturas, así como las pendientes de las rectas, son muy similares entre ambas calibraciones, lo que indicaría que la temperatura apenas afecta en las características analíticas del método.

Tabla 9.9: Características analíticas obtenidas utilizando  $0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TAO y  $1 \text{ mM}$  de Au(III).

Temperatura, $^\circ\text{C}$	20	40
-------------------------------	----	----

Rango lineal, $\mu\text{M}$	9,5 - 330	11,5 - 400
LD, $\mu\text{M}$	2,9	3,4
DER, % (250 $\mu\text{M}$ , n=5)*	5,6	6,0

\*La DER ha sido calculada para todos los puntos de la recta de calibración, disminuyendo desde 11,3% (20°C) y 11,8% (40°C) para 25  $\mu\text{M}$  hasta 3,2% (20°C) y 4,0% (40°C) para 330  $\mu\text{M}$ .

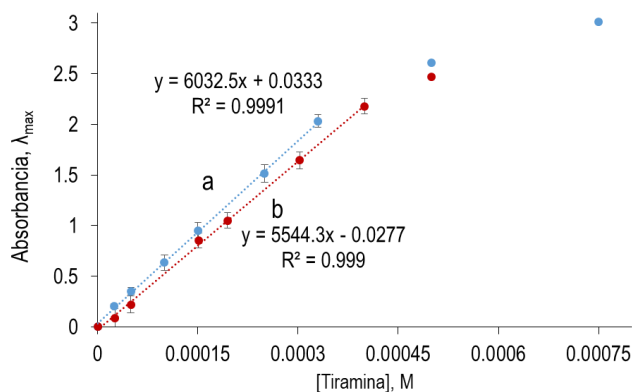


Figura 9.30: Rectas de calibración para dos temperaturas de reacción diferentes.  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} 0,1 \text{ M}$  pH 7, a) 20°C, b) 40°C

Para las diferentes concentraciones ensayadas en la calibración a 20°C se han calculado los valores de las constantes cinéticas aplicando el modelo matemático desarrollado en el apartado 9.1.2, mostrándose en la tabla 9.10.

Tabla 9.10: Valores de  $k_{2,n}$ ,  $k_1$ ,  $\epsilon_{AuNP,n}$ ,  $K_{AV}$ ,  $\lambda_{max}$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $Abs_{max}$  para diferentes  $[Tir]$  con  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} 0,1 \text{ M}$  pH 7.

$[Tir]$ , mM	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
$\lambda_{max}$ , nm	553	557	577	574	578
$\Delta\lambda$ , nm	114	122	144	144	149
$\epsilon_{\lambda_{max},n}$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	7780	7740	6820	8140	5490
$k_1$ (*103), $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	40,3	12,8	2,8	4,5	2,9

$k_{2,n} (*10^{-4}) , M^{-2}s^{-1}$	3,3	6,9	14,2	7,2	6,2
-------------------------------------	-----	-----	------	-----	-----

Como se puede observar en la tabla anterior hay varias tendencias que caben ser destacadas. La primera de ellas es que la longitud de onda para valores de tiramina mayores a la  $[O_2]$  disuelto son similares, sin embargo cuando la cantidad de tiramina es menor a ese  $O_2$ , se desplaza la longitud de onda hacia la derecha, siendo dichos espectros más similares a los que se obtienen cuando se realizaba la reacción con el producto de la reacción con Au(III) en presencia de TAO, además de que los espectros son más anchos (mayores valores de  $\Delta\lambda$ ). Por otro lado, la  $k_1$  calculada lleva una tendencia descendente conforme la concentración de tiramina disminuye hasta llegar una concentración en la que prácticamente es constante. Por último, se observa que la tendencia de  $k_{2,n}$  no es clara, ya que inicialmente aumenta conforme disminuye la concentración de tiramina hasta alcanzar un valor máximo cercano a la  $[O_2]$  disuelto, para posteriormente disminuir conforme disminuye la concentración de tiramina. La interpretación química real de estas variaciones es difícil de establecer en este momento y sería necesario realizar estudios adicionales, especialmente para comprobar si los valores de las  $k$  son correctos.

### 9.5.3. Estudio de interferencias

#### 9.5.3.1. Reactividad de otras aminas biógenas

Una vez que el método ha sido puesto a punto y se han estudiado los parámetros que intervienen en la cinética de formación de las nanopartículas de oro durante la reacción enzimática, se han estudiado las posibles interferencias que pudiesen ocasionar otras aminas biógenas presentes en muestras reales y que acompañan en la mayoría de los casos a la tiramina. Las aminas biógenas elegidas para este estudio son: putrescina, cadaverina e histamina, ya que estas aminas son las que aparecen en mayor cantidad en las muestras reales [9.27] y por tanto serían las



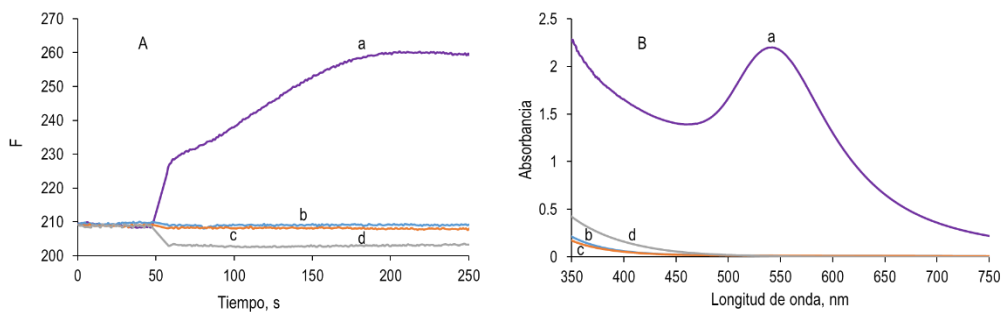
que podrían causar interferencias a la hora de determinar tiramina con este método.

Como es sabido, las especies interferentes pueden actuar a través de dos mecanismos: 1) generando señal analítica similar a la que produce el analito, 2) actuando sobre la cinética de reacción del analito. En este apartado se mostrara la reactividad de las AB en el sistema analítico estudiado.

Para ello, se realizó el estudio del consumo de  $O_2$  por parte de la enzima y así conocer la especificidad enzimática y por otro la síntesis de las nanopartículas en presencia de ellas. En la figura 9.31A se observa como cambia la concentración de  $O_2$  de la disolución cuando putrescina (b), cadaverina (c) o histamina (d) son sometidas a la reacción enzimática con TAO, en comparación con la variación que se observa en el caso de la tiramina (a). Como se ve, el hecho de que no hay consumo de  $O_2$  con las tres AM indica que la única amina que reacciona con la TAO a pH 7 es la tiramina, por lo que la enzima es muy específica a este pH.

Por otro lado, en la figura 9.31B muestra como varía la absorbancia de las (hipotéticas) AuNP a lo largo del tiempo cuando las tres aminas son sometidas a reacción enzimática en presencia de Au(III), en comparación con la tiramina. Se demuestra cómo ninguna de las aminas biógenas consideradas interferentes son capaces de formar las nanopartículas en presencia de TAO. Este hecho es lógico desde el punto de vista catalítico, ya que si no reaccionan con la enzima, no consiguen actuar sobre el centro activo y por tanto el Au(III) no participa en el reacción, siendo imposible la formación de las nanopartículas.

## Capítulo 9. Generación in situ de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de tiramina



*Figura 9.31: Estudio de especificidad en la reacción de TAO con aminas biógenas. A: mediante el consumo de  $O_2$  durante el ciclo catalítico. B: durante la formación de nanopartículas.*

### 9.5.3.2. Interacciones de las AB con tiramina durante la reacción.

Como se ha dicho, la otra opción es que afectan al proceso de formación de las nanopartículas por parte de la tiramina cuando están presentes en el medio de reacción. Para ello, se han realizado mezclas por parejas para saber si alguna de ellas puede modificar la formación de nanopartículas producida por la tiramina.

#### A) Cadaverina y putrescina

En la figura 9.32 se muestran los perfiles para las mezclas de tiramina y putrescina/cadaverina. Como se observa, no hay diferencias en el máximo de absorción (alcanzan la misma absorbancia), sin embargo la reacción se vuelve más lenta, sobre todo en el caso de la cadaverina. Este hecho, podría ser debido a que los grupos aminos de estas diaminas estarían acomplejando al Au(III), haciéndolo menos accesible en la reacción.

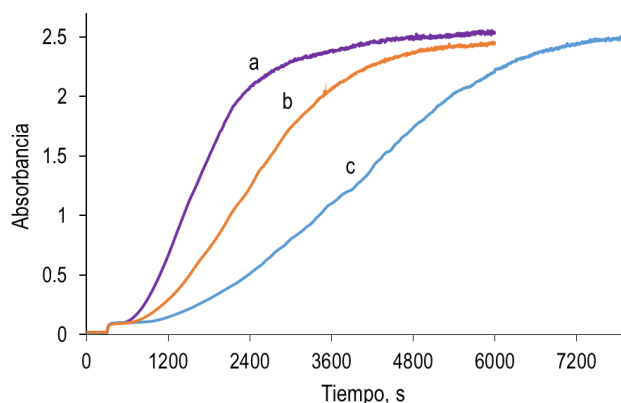


Figura 9.32: Evolución temporal de la absorbancia máxima durante la síntesis de nanopartículas en presencia y ausencia de diaminas.  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[\text{Au(III)}] = 1 \text{ mM}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} = 0,1 \text{ M}$  pH 7, a)  $[\text{Tir}] = 7,16\cdot 10^{-4} \text{ M}$ , b)  $[\text{Tir}] = 7,16\cdot 10^{-4} \text{ M}$  y  $[\text{Put}] = 6,97\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{Tir}] = 7,16\cdot 10^{-4} \text{ M}$  y  $[\text{Cad}] = 6,97\cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

Partiendo de la hipótesis de que pudieran estar formando un complejo con el Au(III), parece lógico que la cadaverina siendo una diamina con un carbono más en la parte hidrocarbonada que la putrescina, pueda tener mayor movilidad espacial para coordinarse al Au(III), actuando como mejor ligando bidentado. Este hecho ha sido descrito para complejos de estas diaminas con Ag(I) [9.28].

Como se trata de un problema cinético, se ha planteado realizar un estudio de la temperatura de reacción para ver si es posible eliminar esta interferencia.

En este estudio se ha llevado a cabo la reacción a tres temperaturas diferentes en presencia y ausencia de las diaminas. En la figura 9.33 se recogen los perfiles cinéticos obtenidos.

## Capítulo 9. Generación in situ de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de tiramina

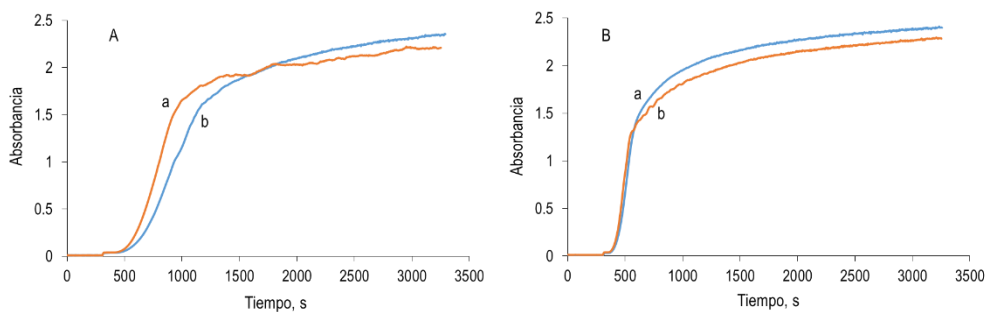


Figura 9.33: Evolución temporal de la absorbancia máxima de las nanopartículas formadas en presencia de cadaverina a dos temperaturas diferentes. **A:** 30°C. **B:** 40°C.  $[TAO] = 0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $[Tir] = 5,01\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Cad] = 5,04\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-} 0,1 \text{ M}$  pH 7.

De este estudio, se puede observar cómo la putrescina y la cadaverina dejan de ser interferentes cuando se trabaja a temperaturas superiores a 40°C, ya que no se observan diferencias en los perfiles de la reacción de la tiramina con o sin diaminas. Este hecho podría estar verificando que se trataba de una interferencia cinética, donde las diaminas estarían interactuando con el Au(III), haciendo más lento el proceso de formación de las nanopartículas. Al aumentar la temperatura, la constante cinética aumenta, lo que se contrarresta el efecto de las diaminas. Con ello, sería necesario trabajar a 40°C en muestras reales para evitar interferencias de estas diaminas.

### B) Histamina

La histamina se comporta de manera distinta a las diaminas estudiadas anteriormente. En este caso cuando se realizan mezclas con tiramina, se observa que la absorbancia máxima obtenida es menor conforme aumenta la relación de histamina frente a tiramina en la mezcla (figura 9.34A). Esto estaría indicando que no se trata de una interferencia cinética, por lo que como cabría esperar un aumento de temperatura no soluciona dicha disminución de absorbancia. Además

esta disminución de la  $Abs_{max}$  es lineal respecto a la concentración de histamina presente en la mezcla (figura 9.34B).

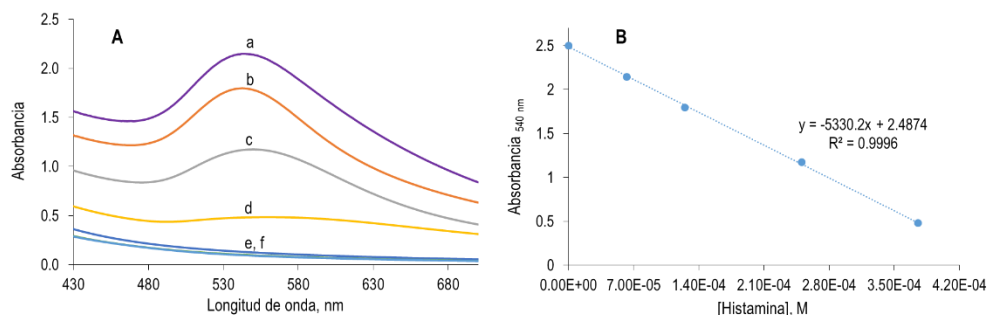


Figura 9.34: **A.** Espectros de absorción molecular de la formación enzimática de nanopartículas de oro en presencia de diferentes cantidades de histamina.  $[TAO] = 0.49 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Tir] = 5,7\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[Au(III)] 1 \text{ mM}$ , a)  $6,2\cdot 10^{-5} \text{ M}$ , b)  $1,2\cdot 10^{-4} \text{ M}$  c)  $2,5\cdot 10^{-4} \text{ M}$  d)  $3,7\cdot 10^{-4} \text{ M}$  e)  $5,6\cdot 10^{-4} \text{ M}$  f)  $8,7\cdot 10^{-4} \text{ M}$ . **B.** Relación de la absorbancia máxima obtenida en A respecto a la [histamina].

Para elucidar el comportamiento de la histamina, se han realizado diversos estudios. Lo primero que se pretende conocer es si esta disminución de señal es dependiente de la cantidad de histamina o de la relación histamina-tiramina. Para ello se hicieron diversas mezclas en las que la relación histamina-tiramina era constante pero la cantidad de tiramina, y por tanto la de histamina, era diferente entre ellas. Los resultados son los que se muestran en la figura 9.35.

## Capítulo 9. Generación in situ de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de tiramina

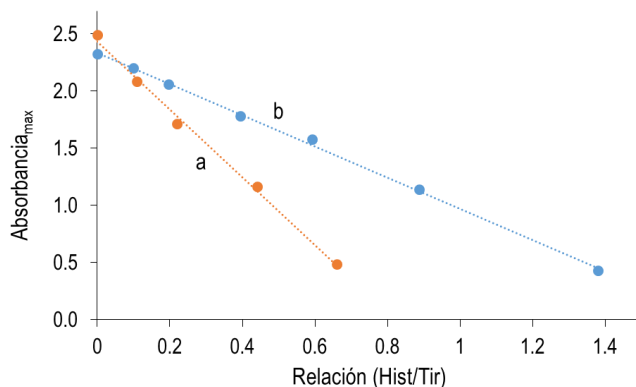
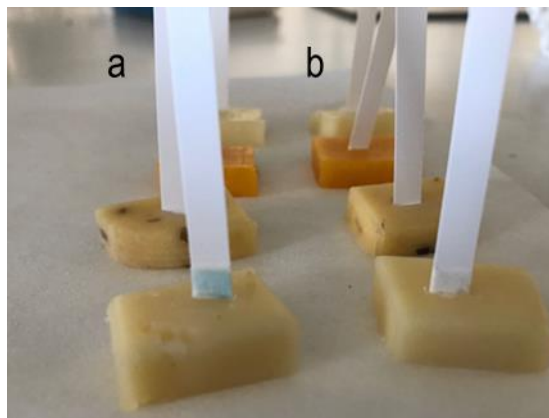


Figura 9.35: Estudio de la relación Tir/His para dos concentraciones de Tir. a)  $5,7 \cdot 10^{-4}$  M, b)  $3,8 \cdot 10^{-4}$  M.

Como puede observarse, la disminución de señal no es dependiente de la relación de hist/Tir, ya que para dos concentraciones iniciales de tiramina distintas, se obtienen dos pendientes distintas, indicando que la disminución de señal observada depende de la cantidad de histamina absoluta presente en la muestra. Este hecho hace que sea necesario conocer la concentración de histamina previamente a la determinación de la tiramina, lo que haría que dejase de ser un método rápido de análisis.

Es por ello que debido a que la histamina puede ser un interferente importante y que no es fácil de eliminar en las muestras reales, haciendo necesario una separación cromatográfica, eliminando así la principal ventaja de un método rápido de análisis, se ha optado por aplicar el método desarrollado a muestras que tengan un contenido de tiramina muy superior a histamina, al menos un orden de magnitud. Con ello y tras la búsqueda bibliográfica de posibles muestras afines a nuestros objetivos [9.28 y 9.29], se ha elegido el queso como muestra de referencia, donde la cantidad de tiramina suele ser mayor al de otras aminas biógenas, por lo que puede servir para aplicar el método desarrollado. Antes de aplicar el método colorimétrico, se realizó un *screening* con diversos quesos

comerciales, utilizando tiras rápidas de peróxido modificadas, tal y como se indica en el capítulo 4, apartado 4.3.3.2, siendo el queso con mayor cantidad de tiramina el emmental, tal y como se puede observar en la figura 9.36.



*Figura 9.36: Reacción con tira reactiva de peróxido directamente en diferentes quesos. a) con TAO adicionada y b) sin adicionar TAO*

## **9.6. Desarrollo del método enzimático: 5. Aplicación en muestra real**

Como se ha comentado anteriormente, se ha elegido un queso Emmental como muestra real a la que aplicar el método desarrollado. Lo primero que se ha de hacer es obtener una muestra líquida en la que se hayan extraído las aminas biógenas. Para ello se ha realizado el tratamiento de muestra (figura 4.8) explicado en el capítulo 4 apartado 4.3.3.3.

Esta muestra real ha sido analizada de manera paralela por el departamento de Sanidad Pública del Gobierno de Aragón. Este departamento tiene desarrollado un método de referencia HPLC-MS-MS validado para la determinación de aminas biógenas en alimentos [9.30]. Gracias a su colaboración ha sido posible evaluar el método colorimétrico puesto a punto utilizando nanopartículas de oro.

## Capítulo 9. Generación in situ de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de tiramina

La muestra extraída se intentó inicialmente determinar directamente con el método desarrollado a 40°C para evitar la interferencia de otras aminas biógenas, sin embargo, no se obtuvo una señal analítica correcta para su interpolación. Esto podría haber sido debido a que la matriz del extracto de la muestra pudiese estar interfiriendo, debido a otros compuestos químicos extraídos a la fase acuosa.

Para corregir este problema, se realizó una adición estándar, para que así se pudiese eliminar la interferencia de matriz, que posiblemente se estuviese dando por otros componentes presentes en el queso. La recta de adición estándar es la que se muestra en la figura 9.37. La pendiente de la recta de adición estándar es similar a la pendiente sin la adición de muestra, por lo que se puede concluir que no hay interferencias proporcionales. La concentración en la muestra de queso obtenida es de  $93 \pm 14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $n=5$ ). Este valor se ha comparado con el valor de aportado por el Servicio de Salud Pública ( $86 \pm 13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  con  $n=3$ ) y se ha conseguido demostrar que no existen diferencias significativas entre los dos métodos.

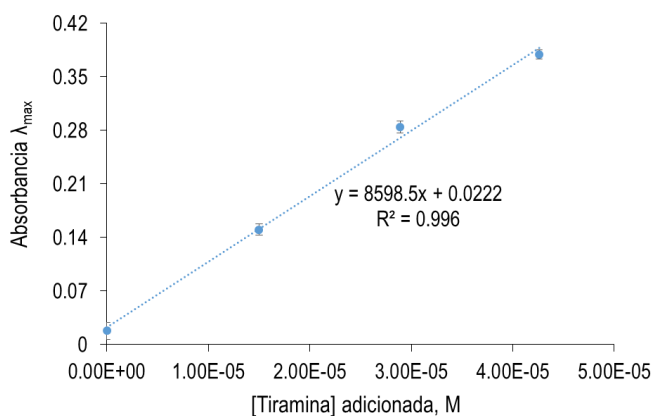


Figura 9.37: Recta de adición estándar para la determinación de tiramina en el extracto de queso emmental. [TAO]  $0,48 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,





## 9.7. Bibliografía

- [9.1] E. E. Finney and R. G. Finke, "Nanocluster nucleation and growth kinetic and mechanistic studies: A review emphasizing transition-metal nanoclusters," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 317, no. 2, pp. 351–374, 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2007.05.092.
- [9.2] N. T. K. Thanh, N. Maclean, and S. Mahiddine, "Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution," *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 15, pp. 7610–7630, 2014, doi: 10.1021/cr400544s.
- [9.3] A. Amirjani and D. F. Haghshenas, "Modified Finke-Watzky mechanisms for the two-step nucleation and growth of silver nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 29, no. 50, p. 505602, 2018, doi: 10.1088/1361-6528/aae3dd.
- [9.4] A. A. Burbelko, E. Fraś, and W. Kapturkiewicz, "About Kolmogorov's statistical theory of phase transformation," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 413–414, pp. 429–434, 2005, doi: 10.1016/j.msea.2005.08.161.
- [9.5] M. Avrami, "Granulation, phase change, and microstructure kinetics of phase change. III," *J. Chem. Phys.*, vol. 9, no. 2, pp. 177–184, 1941, doi: 10.1063/1.1750872.
- [9.6] S. P. Shields, V. N. Richards, and W. E. Buhro, "Nucleation control of size and dispersity in aggregative nanoparticle growth. A study of the coarsening kinetics of thiolate-capped gold nanocrystals," *Chem. Mater.*, vol. 22, no. 10, pp. 3212–3225, 2010, doi: 10.1021/cm100458b.
- [9.7] Y. Zhou *et al.*, "Quantitative nucleation and growth kinetics of gold nanoparticles via model-assisted dynamic spectroscopic approach," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 407, pp. 8–16, 2013, doi: 10.1016/j.jcis.2013.06.027.

- [9.8] M. A. Watzky and R. G. Finke, "Transition metal nanocluster formation kinetic and mechanistic studies. A new mechanism when hydrogen is the reductant: Slow, continuous nucleation and fast autocatalytic surface growth," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 43, pp. 10382–10400, 1997, doi: 10.1021/ja9705102.
- [9.9] Y. Zhou, W. Lin, F. Yang, W. Fang, J. Huang, and Q. Li, "Insights into formation kinetics of gold nanoparticles using the classical JMAK model," *Chem. Phys.*, vol. 441, pp. 23–29, 2014, doi: 10.1016/j.chemphys.2014.07.001.
- [9.10] M. A. Watzky and R. G. Finke, "Gold Nanoparticle Formation Kinetics and Mechanism: A Critical Analysis of the 'redox Crystallization' Mechanism," *ACS Omega*, vol. 3, no. 2, pp. 1555–1563, 2018, doi: 10.1021/acsomega.7b01772.
- [9.11] A. L. Brazeau and N. D. Jones, "Growth mechanisms in nanocrystalline lead sulfide by stopped-flow kinetic analysis," *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 47, pp. 20246–20251, 2009, doi: 10.1021/jp907270x.
- [9.12] F. Huang, H. Zhang, and J. F. Banfield, "Two-stage crystal-growth kinetics observed during hydrothermal coarsening of nanocrystalline ZnS," *Nano Lett.*, vol. 3, no. 3, pp. 373–378, 2003, doi: 10.1021/nl025836+.
- [9.13] V. N. Richards, N. P. Rath, and W. E. Buhro, "Pathway from a molecular precursor to silver nanoparticles: The prominent role of aggregative growth," *Chem. Mater.*, vol. 22, no. 11, pp. 3556–3567, 2010, doi: 10.1021/cm100871g.
- [9.14] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig, "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 11, pp. 4215–4221, 2007, doi: 10.1021/ac0702084.

- [9.15] J. D. S. Newman and G. J. Blanchard, "Formation of gold nanoparticles using amine reducing agents," *Langmuir*, vol. 22, no. 13, pp. 5882–5887, 2006, doi: 10.1021/la060045z.
- [9.16] BAI, James, et al. Using the enzymatic growth of nanoparticles to create a biosensor. An undergraduate quantitative analysis experiment. *Journal of chemical education*, 2009, vol. 86, no 6, p. 712.
- [9.17] Zhao Q, Huang H, Zhang L, et al. Strategy to Fabricate Naked-Eye Readout Ultrasensitive Plasmonic Nanosensor Based on Enzyme Mimetic Gold Nanoclusters. *Anal Chem*. 2016;88(2). doi:10.1021/acs.analchem.5b04089
- [9.18] KHLEBTSOV, Nikolai G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. *Analytical chemistry*, 2008, vol. 80, no 17, p. 6620-6625.
- [9.19] V. A. Bogatyrev, L. A. Dykman, B. N. Khlebtsov, and N. G. Khlebtsov, "Measurement of Mean Size and Evaluation of Polydispersity of Gold Nanoparticles from Spectra of Optical Absorption and Scattering," *Opt. Spectrosc. (English Transl. Opt. i Spektrosk.*, vol. 96, no. 1, pp. 128–135, 2004, doi: 10.1134/1.1643997.
- [9.20] J. Hu, R. Jiang, H. Zhang, Y. Guo, J. Wang, and J. Wang, "Colloidal porous gold nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 10, no. 39, pp. 18473–18481, 2018, doi: 10.1039/c8nr06149a.
- [9.21] O. Seitz *et al.*, "Preparation and characterisation of gold nanoparticle assemblies on silanised glass plates," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 218, no. 1–3, pp. 225–239, 2003, doi: 10.1016/S0927-7757(02)00594-0.
- [9.22] S. K. Sivaraman, S. Kumar, and V. Santhanam, "Monodisperse sub-10nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method - The

- role of chloroauric acid," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 361, no. 2, pp. 543–547, 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.06.015.
- [9.23] M. Luty-Błocho, M. Wojnicki, and K. Fitzner, "Gold Nanoparticles Formation via Au(III) Complex Ions Reduction with L-Ascorbic Acid," *Int. J. Chem. Kinet.*, vol. 49, no. 11, pp. 789–797, 2017, doi: 10.1002/kin.21115.
- [9.24] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, and Q. Huo, "Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 58, no. 1, pp. 3–7, 2007, doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.08.005.
- [9.25] Y. Hayashi *et al.*, "Precision, Limit of Detection and Range of Quantitation in Competitive ELISA," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 5, pp. 1295–1301, 2004, doi: 10.1021/ac0302859.
- [9.26] J. W. A. Findlay and R. F. Dillard, "Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays," *AAPS J.*, vol. 9, no. 2, pp. E260–E267, 2007, doi: 10.1208/aapsj0902029.
- [9.27] Martuscelli, Maria; Esposito, Luigi; Mastrocola, Dino. Biogenic Amines' Content in Safe and Quality Food. 2021
- [9.28] D. M. Linares *et al.*, "Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products," *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. MAY, pp. 1–10, 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00180.
- [9.29] A. Ščavničar, I. Rogelj, D. Kočar, S. Köse, and M. Pompe, "Determination of biogenic amines in Cheese by Ion chromatography with tandem mass spectrometry detection," *J. AOAC Int.*, vol. 101, no. 5, pp. 1542–1547, 2018, doi: 10.5740/jaoacint.16-0006.
- [9.30] ITE-FQ080-02: determination of biogenic amines by HPLC-MS/MS. Public health laboratory, Government of Aragón (Spain).



## **Capítulo 10.**

# **Generación *in situ* de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de putrescina y cadaverina**







## 10.1. Desarrollo del método enzimático: 1. Origen químico de la señal

### 10.1.1. Generación de la señal.

Aunque el objetivo principal de este capítulo es evaluar si el método desarrollado en el capítulo anterior, para tiramina, se puede aplicar a la determinación de otras aminas biógenas que se oxidan por mecanismos similares, también se quieren estudiar y establecer diferencias (si las hay) con el método colorimétrico descrito en el capítulo 9. El horizonte final es evaluar si puede ser propuesto como un método indicador general para reacciones enzimáticas basadas en oxidoreductasas.

Y, en efecto, la adición de  $\text{HAuCl}_4$  a una disolución que contiene DAO con cualquiera de los dos sustratos produce la aparición de un color violáceo-rojizo, similar al descrito para la reacción de la tiramina, compatible con la formación de nanopartículas de oro (AuNP) que se han formado por la reducción del Au(III). En este caso, la velocidad de la reacción de formación de las nanopartículas es bastante más lenta que la observada con la TAO y tiramina. Sin embargo, se pone de manifiesto algo que no se pudo observar al utilizar colorante (sección II), y es que la velocidad de la reacción con Put y con Cad es muy distinta. En la figura 10.1 se puede observar cómo la velocidad de formación, en idénticas condiciones de reacción para las dos diaminas, es más rápida para la reacción con Cad.

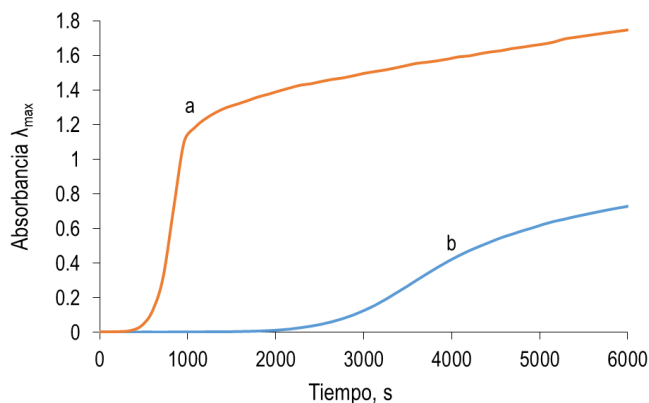


Figura 10.1: Registro cinético de la formación de nanopartículas de oro durante la reacción de la DAO con Cad o Put en presencia de Au(III).  $[DAO] = 0,49 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ , a)  $[Cad] = 8,0\cdot 10^{-4} \text{ M}$ , b)  $[Put] = 8,0\cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

Con objeto de elucidar el motivo de este comportamiento, es necesario estudiar qué especies químicas de la reacción enzimática están involucradas en la formación de las nanopartículas. No obstante, el hecho de que las velocidades de formación de las nanopartículas de oro durante la reacción con DAO sean diferentes al utilizar Put y Cad, hace pensar que, también en este caso, los productos de la reacción tienen un peso importante.

### 10.1.2. Especies químicas involucradas en la formación de AuNP

Teniendo en cuenta los participantes en la reacción enzimática, las especies químicas que pueden estar involucradas en la explicación de este comportamiento son las que se muestran en la figura 10.2. En ella se esquematizan las diferentes hipótesis planteadas según las especies químicas que podrían estar involucradas en el proceso de formación de las nanopartículas. En los siguientes apartados se estudiará de manera individualizada la posible participación de cada una de ellas.

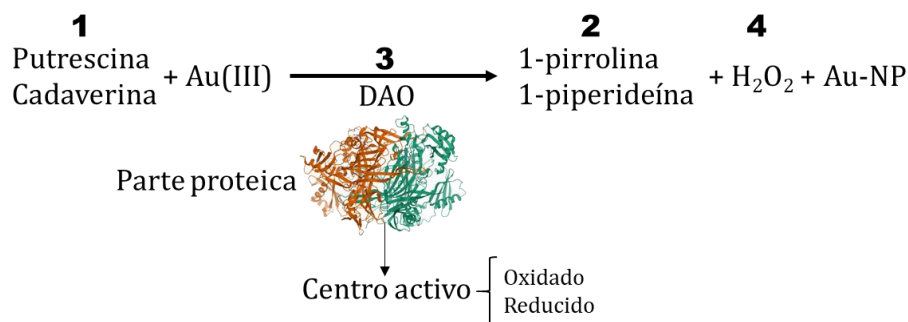


Figura 10.2: Esquema de las diferentes especies químicas involucradas en la reacción de formación de las AuNP.

### 10.1.2.1. Putrescina y cadaverina

Por otro lado es necesario estudiar si la putrescina y cadaverina pueden, por si mismas, ser responsables últimos de la formación de las nanopartículas. Para ello es necesario comprobar dos hipótesis diferentes. La primera de ellas es si las diaminas podrían realizar la reducción, sin necesidad de la enzima, y la segunda es si la enzima podría estar involucrada en la estabilización de las nanopartículas, sin necesidad de intervenir el centro activo, utilizando solamente la parte proteica de ésta para estabilizar las nanopartículas de oro que se estuviesen formando.

Al realizar la reacción directa entre las diaminas y el Au(III) no se observa ninguna banda de absorción ni la presencia de turbidez/precipitado (figura 10.3), por lo que se descarta que tengan la capacidad reductora suficiente para reducir al Au(III) en las condiciones experimentales estudiadas. Este hecho diferencia estos dos analitos con respecto a la tiramina estudiada en el apartado 9.2.2.1 del capítulo 9, donde se observaba cierta reducción por parte de la tiramina.

Aunque no se ha observado la reducción del Au(III) por parte de las diaminas, se ha querido comprobar si al añadir albúmina al medio de la reacción se pudiesen estabilizar estructuras de oro reducido que no se hubiesen podido observar previamente. Al añadir albúmina como sustituyente de la DAO (figura 10.3),

tampoco se observa ningún cambio espectral en presencia de Au(III), por lo que quedan totalmente descartadas las hipótesis de que las diaminas, por sí solas, puedan estar involucradas en la formación de las nanopartículas.

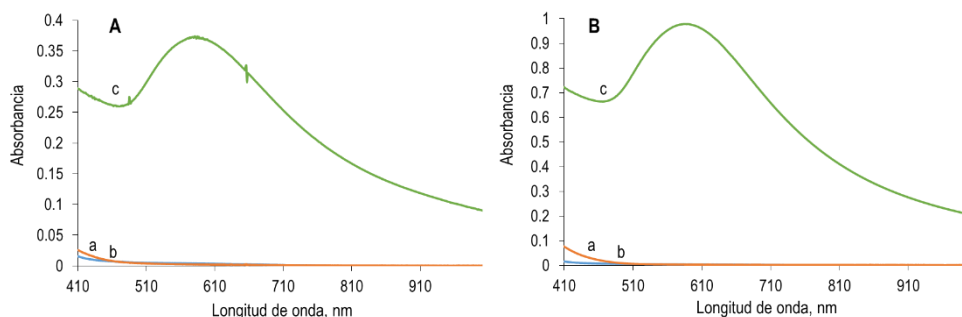


Figura 10.3: Espectros de la reacción entre las diaminas, DAO, Au(III) en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8. **A.** Estudio de Put. a) sin DAO, b) con  $[Alb] = 0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , c)  $[Put] = 4,97\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[DAO] = 0,51 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ . **B.** Estudio de Cad. a) sin DAO, b) con  $[Alb] = 0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , c)  $[Cad] = 4,97\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[DAO] = 0,51 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$

### 10.1.2.2. Productos cíclicos: 1-pirrolina y 1-piperideina

#### A) Antecedentes

Como se ha indicado en el capítulo 4, la velocidad de la reacción de la DAO con ambas ABs es similar. Esto se puede confirmar comparando la velocidad de consumo de oxígeno de cada una de estas aminas biógenas, en la reacción con la DAO, utilizando para ello el método descrito en el apartado 4.3.8 del capítulo 4 (figura 10.4). Se puede observar que ambas diaminas reaccionan de manera casi instantánea y además son prácticamente iguales en sus perfiles cinéticos.

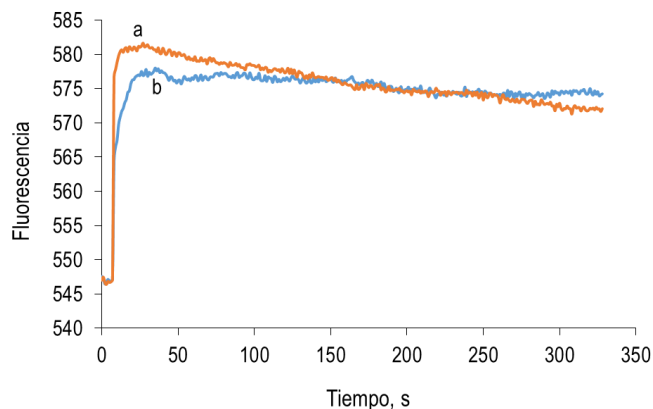


Figura 10.4: Perfil cinético del consumo de  $O_2$  durante la reacción enzimática de la DAO ( $0,5 U \cdot ml^{-1}$ ) y Put/Cad ( $4,0 \cdot 10^{-5} M$ ) medido mediante la fluorescencia de una sal de Ru(II) ( $1,4 \cdot 10^{-5} M$ ).  $\lambda_{exc} = 450 nm$ ,  $\lambda_{em} = 610 nm$ ,  $r_{exc} = r_{em} = 5 nm$ .

### B) Ciclado de los productos de la reacción

Ambos productos de reacción, formados tras la desaminación oxidativa, son los que se muestran en la figura 10.5. Inicialmente se forman los aldehídos, sin embargo, posteriormente ambos aldehídos sufren una ciclación interna con la consiguiente eliminación de una molécula de agua [10.1 y 10.2], produciéndose los productos finales mostrados en la misma figura.

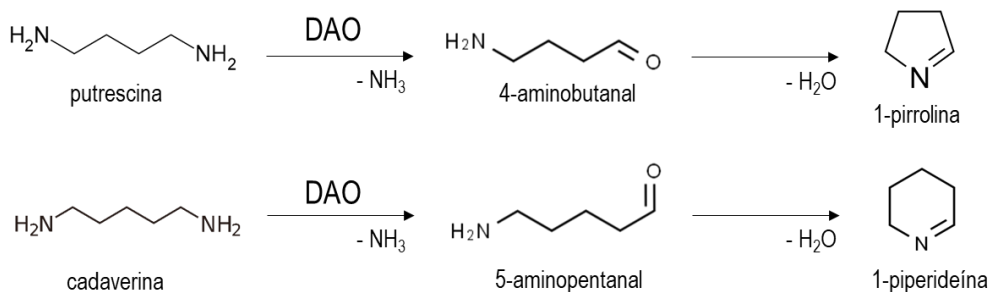
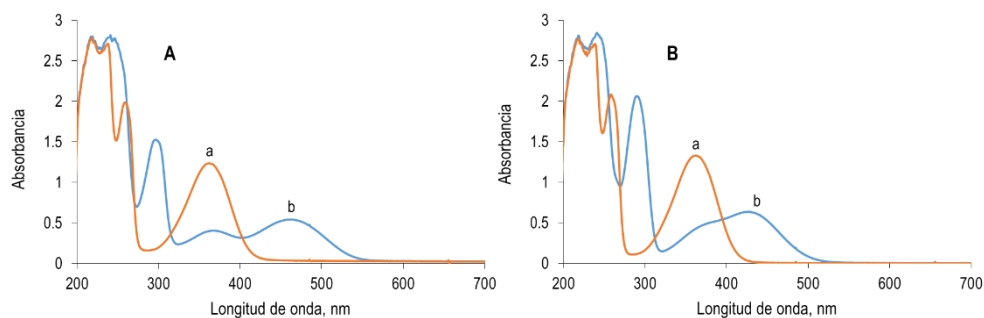


Figura 10.5: Esquema de los productos de la reacción entre la DAO y putrescina o cadaverina.

Para verificar la formación de estos compuestos cíclicos, se ha realizado un ensayo utilizando *o*-aminobenzaldehído, tal y como se describe en el capítulo 4, apartado 4.3.1.5. Los espectros de los productos formados tras la adición del *o*-aminobenzaldehído a la reacción enzimática, son los que se muestran en la figura 10.6.



*Figura 10.6: Espectros de absorción molecular al principio y al final de la reacción entre DAO ( $1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y las diaminas, en presencia de *o*-aminobenzaldehído ( $1,57\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ). **A.** Cad ( $5,0\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) a) espectro inicial, b) espectro final. **B.** Put ( $4,98\cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) a) espectro inicial, b) espectro final.*

Puede observarse que se han formado los compuestos derivados de la condensación con el *o*-aminobenzaldehído, lo que quiere decir que los aldehídos correspondientes a la reacción de las diaminas con la DAO terminan formando los productos ciclados tras el ataque intramolecular de la amina terminal al aldehído. Estos resultados son consistentes con lo que se esperaba obtener. Además, comparando los perfiles cinéticos de ambas reacciones (figura 10.7), se muestra cómo apenas se pueden observar diferencias entre los dos, en lo que a tiempos de formación se refiere (las diferencias de absorbancia son debidas a que la  $\epsilon$  es distinta para ambas especies). Esto nos llevaría a pensar que las diferencias observadas en cinética de formación de las nanopartículas de oro deben ser por alguna interacción de los ciclos durante el proceso de formación de estos nanomateriales, y no por la ausencia de uno de ellos respecto al otro, ya que ambos

se forman en la misma extensión. El tiempo requerido para la formación de estos compuestos coloreados es bastante mayor al observado en la reacción directa de la DAO con las diaminas (figura 10.4), lo que estaría indicando que, o bien la reacción de ciclación de los aldehídos es lenta o la formación del producto coloreado necesita de tiempos de reacción largos. Sea cual sea el motivo, esta reacción permite afirmar que la formación de 1-pirrolina y 1-piperideína está ocurriendo en el seno de la reacción enzimática.

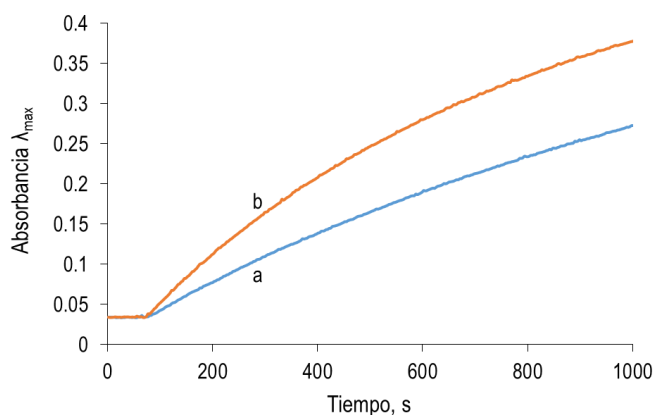


Figura 10.7: Perfil cinético de la absorbancia a la longitud de onda del máximo tras la adición de *o*-aminobenzaldehído a la reacción de la DAO con: a) Put (420 nm), b) Cad (465 nm).

Para aclarar el papel que pueden tener los productos de la reacción en la formación de AuNP fue necesario formar y aislar dichos productos (ver capítulo 4 apartado 4.3.2.1).

Lo primero es saber si esos productos por si mismos son capaces de reducir el Au(III). Tal y como se observa en la figura 10.8, el producto de la cadaverina (1-piperideína) sí es capaz de reducir al Au(III) y formar una banda de absorción en torno a 660 nm. Esta banda de absorción es muy ancha y origina en la cubeta de reacción un color grisáceo, que puede indicar la formación de alguna estructura molecular distinta a las nanopartículas descritas en la figura 10.3B (espectro c).



Además, se puede ver como el producto de la putrescina (1-pirrolina) muestra una reducción del Au(III) con menos rendimiento y más lenta (registros a de las figuras 10.8A y 10.8B), lo que estaría en consonancia con la cinética observada para la formación de nanopartículas cuando se hace reaccionar DAO con putrescina. Esto podría indicar, que los productos cíclicos de la reacción enzimática podrían estar involucrados en la formación de nanopartículas y por ello la reacción de la cadaverina con DAO en presencia de Au(III) es mucho más rápida, tal y como se observa en la cinética de la 1-piperideína con Au(III).

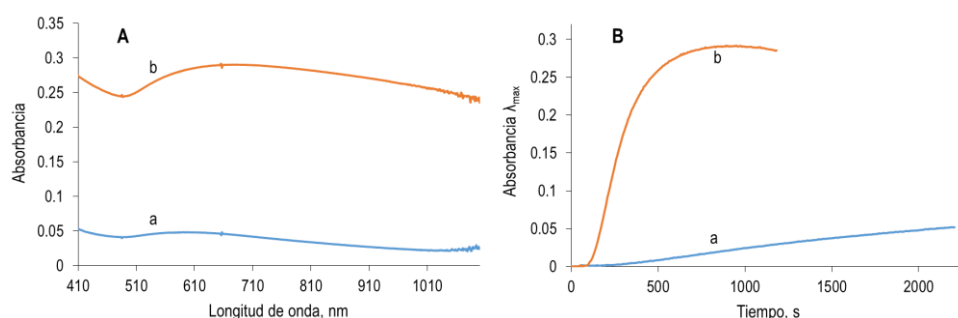


Figura 10.8: Estudio de los productos de reacción con Au (III) en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[Au(III)] = 1$  mM. a)  $[1\text{-pirrolina}] = 0,5$  mM, b)  $[1\text{-piperideína}] = 0,5$  mM. **A.** Espectros de absorción. **B.** Registros cinéticos.

Para la medida de las cinéticas de estas formaciones se ha tenido en cuenta que podría estar involucrado algún proceso fotocatalítico, por lo que se han realizado las medidas incluyendo el filtro (ver figura 6.2, apartado 6.2.1.1) y sin incluirlo, además de realizar las medidas por separado en oscuridad para poder verificar este hecho. No se han observado apenas diferencias entre poner el filtro o no, además de que las reacciones llevadas a cabo en ausencia de luz han seguido reaccionando de la misma manera.

La conclusión es que los productos de la reacción son capaces de producir la reducción del Au(III) a Au<sup>0</sup>, pero no de estabilizarlos en forma de AuNP.

### **10.1.2.3. Importancia de la DAO**

En la sección previa se ha puesto de manifiesto que los productos de la reacción son responsables de la reducción del Au (III) al Au<sup>0</sup>, así como de la diferencia observada entre la Cad y la Put. Sin embargo, no explican todo el proceso, en particular, la formación de las AuNP a partir de Au<sup>0</sup>; es necesario saber qué papel juega la DAO en la formación de las nanopartículas. Cabrían dos hipótesis:

1) La primera de ellas es que la DAO sólo actúa en estabilizando el oro reducido en forma de nanopartículas. En este caso, el centro activo de la enzima solamente actúa formando los productos de la reacción, pero sin participar en el proceso de reducción del Au(III).

2) La segunda es que la DAO sea necesaria en la reducción del oro mediante su centro activo, actuando en este caso también como reductor necesario, como ya se había visto en el capítulo 9, en el caso de la TAO.

Cabría, por supuesto, una tercera que sería la suma de las contribuciones de ambas hipótesis. A continuación se analizaran ambas hipótesis.

#### **A) Hipótesis 1: La enzima como estabilizador de las AuNP**

Para comprobarlo, se ha realizado la síntesis de nanopartículas con los productos de la reacción en presencia de la DAO y se han comparado con la síntesis de nanopartículas directamente con los productos cíclicos y con la reacción enzimática. Los espectros obtenidos al final de la reacción se muestran en la figura 10.9 y los registros cinéticos de dichas reacciones en la figura 10.10.

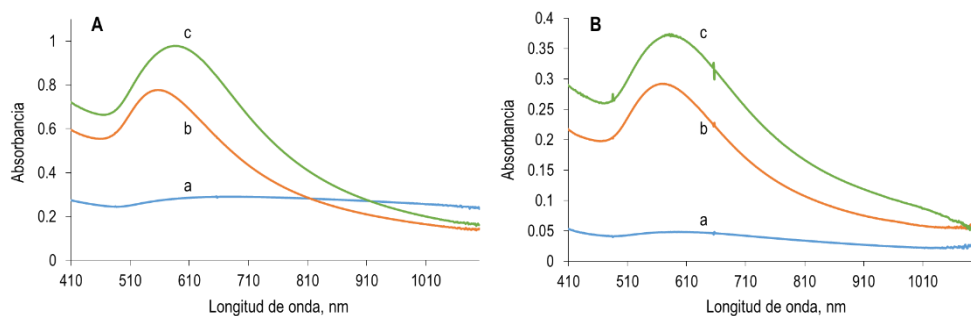


Figura 10.9. Espectros de los productos en  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[Au(III)] = 1$  mM. a) productos b) productos,  $[DAO] = 0,51 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[H_2O_2] = 2,21 \cdot 10^{-4} M$ , c) reacción ordinaria. A. [1-piperidina] = 0,5 mM. B. [1-pirrolina] = 0,5 mM

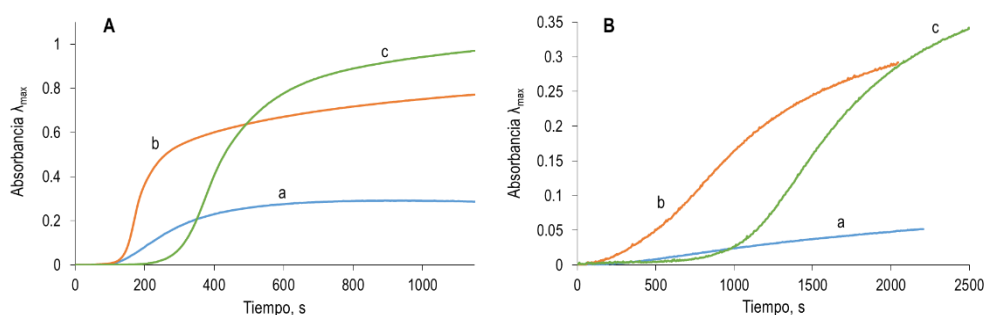


Figura 10.10: Registros cinéticos asociados a las mezclas mostradas en la figura 10.9.

Como se observa, al mezclar los productos cíclicos,  $H_2O_2$  y DAO en presencia de Au(III), se obtiene un espectro de absorción (registros b) más parecido al que se obtiene durante la reacción enzimática (registros c), pero aun así se observan diferencias entre ellos, tanto en el caso de la cadaverina, como en el de la putrescina. Lo que se observa de manera clara es que la presencia de la enzima cambia totalmente la forma del espectro, ya que los correspondientes a la reacción entre sólo los productos cíclicos y el Au(III) (registros a) son muy diferentes a las otras dos reacciones donde la DAO está presente, por lo que queda demostrado que la participación de la enzima es necesaria en la formación de las nanopartículas observadas durante la reacción enzimática.

Si nos fijamos en la cinética de los espectros mostrados anteriormente (figura 10.10), se puede observar un hecho que ya se había puesto de manifiesto en el caso de la TAO y es que la cinética de la reacción enzimática completa (c) es la más lenta de todas. Esto puede ser debido a que una vez que la enzima está en su estado reducido y se adiciona el Au(III), éste comienza a actuar como oxidante, devolviendo a la enzima a su estado inicial, pero formando estructuras de oro reducido alrededor de la enzima que ralenticen los posteriores ciclos enzimáticos (las AuNP actúan de inhibidores). También se pone de manifiesto un hecho que ya se habría destacado anteriormente, y es que la velocidad con cadaverina es mucho mayor que con putrescina (registros c de las figuras 10.10A y 10.10B), tardando esta primera diamina en torno a 10 minutos en alcanzar la zona de maduración (incremento posterior de la señal de las AUNP observado tras la curva sigmoidea), mientras que la reacción con putrescina tarda al menos 40-50 minutos en alcanzar esa misma zona.

En cuanto a las otras dos cinéticas se observa que la velocidad de formación con los productos cíclicos en presencia de enzima es la más rápida. Un aspecto que llama la atención es que en ausencia de enzima la señal parece estabilizarse a un valor final con menor deriva por maduración.

Los resultados parecen indicar, por tanto, que la acción de la DAO no se limita solo a estabilizar el Au en forma de sin necesidad de utilizar el centro activo. Para poder corroborar esta hipótesis se ha sustituido la DAO por albúmina, ya que serviría de modelo proteico, pero sin el centro activo que posee la DAO. Tal y como se puede observar en la figura 10.11, en los registros en los que se ha utilizado albúmina (a), no se obtiene la misma señal que al utilizar DAO (b). Esto puede ser debido a algún tipo de interacción del centro activo con el Au(III) o a que los aminoácidos superficiales de la DAO tienen unas mejores características para estabilizar las nanopartículas que se están formando. Sea cual sea la explicación para estas diferencias, es evidente que la DAO juega un papel importante en la

formación de las nanopartículas, además de servir como estabilizante de las mismas.

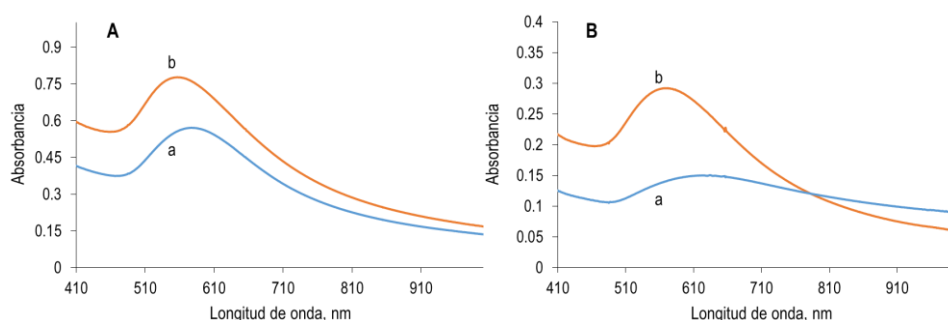


Figura 10.11: Comparación de las AuNP formadas con DAO o con Albúmina en disolución amortiguadora  $H_2PO_4/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[Au(III)] = 1$  mM a)  $[Alb] = 0,1$  mg·mL<sup>-1</sup>, b)  $[DAO] = 0,51$  U·mL<sup>-1</sup>. **A.**  $[Cad] = 4,99 \cdot 10^{-4}$  M. **B.**  $[Put] = 4,97 \cdot 10^{-4}$  M.

### B) Hipótesis 2: La enzima participa en la reducción del Au(III)

La otra hipótesis es que la enzima esté involucrada en el proceso de reducción del Au(III). En este punto es importante recordar que el Au(III) se añade cinco minutos después de la mezcla entre la DAO y los analitos, es decir, cuando la reacción enzimática ya se ha producido, al menos parcialmente. Para que esta hipótesis fuera real sería necesario que en el momento de la adición del Au(III) el centro activo de la enzima se encuentre reducido para que así este actúe como oxidante (tal y como lo haría el O<sub>2</sub> en el ciclo catalítico, figura 5.3, apartado 5.2) y así se produjera la reducción necesaria para la formación de las nanopartículas de oro.

Para que esto ocurriera es necesario llevar a cabo la reacción usando concentraciones de diaminas superiores a la necesaria para consumir todo el O<sub>2</sub> presente en el medio ( $2,2 \cdot 10^{-4}$  M) e impidiendo que éste vuelva a entrar en la disolución desde el exterior.

Como se puede observar en la figura 10.12, para dos concentraciones de diaminas superiores a la concentración de  $O_2$  disuelto, se observan diferencias, por lo que, cabe pensar que el centro activo de la enzima sí está actuando en el proceso de reducción del Au(III). En ambos casos, las especies químicas presentes son la enzima en su estado reducido, el  $H_2O_2$ , que se encontrará en la misma cantidad porque depende del  $O_2$  disuelto, que habrá sido consumido antes de adicionar el Au(III) y por último la cantidad de producto formado, que si no actuase el Au(III) como regenerador, sería el mismo en ambos casos.

En definitiva, queda probado que la DAO actúa a través de los dos mecanismos indicados. Por un lado, estabiliza el Au en forma de AuNP y por otro facilita la formación de Au<sup>0</sup> mediante su centro activo.

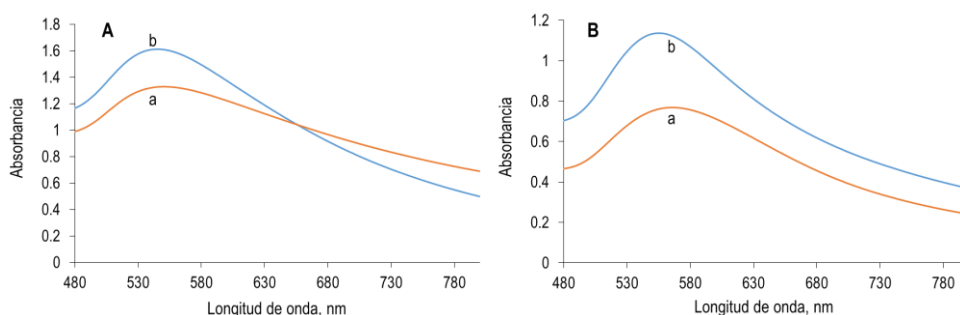


Figura 10.12: Comparación de espectros para dos concentraciones superiores a la  $[O_2]$  disuelta en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[DAO] = 0,50$   $U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1$  mM. **A:** Cad a)  $7,97 \cdot 10^{-4}$  M, b)  $4,03 \cdot 10^{-4}$  M. **B:** Put a)  $8,01 \cdot 10^{-4}$  M, b)  $3,96 \cdot 10^{-4}$  M.

#### 10.1.2.4. $H_2O_2$ generado durante la reacción

En la reacción de la tiramina con TAO, el  $H_2O_2$  no participaba en la formación de las nanopartículas, pero debido a que la formación de estas es, en este método, más lenta, puede suceder que el  $H_2O_2$  sí tenga un efecto apreciable durante la reacción,

ya que según describen varios autores (comentado en el capítulo 9), puede estar involucrado en procesos de crecimiento o incluso agregación de nanopartículas.

Para ello se han hecho tres ensayos. El primero ha sido comprobar si el  $H_2O_2$  con DAO y en presencia de Au(III) era capaz de formar las nanopartículas, es decir, un blanco de reacción con peróxido añadido. En segundo ha sido añadir catalasa a la reacción enzimática completa (DAO con diaminas en presencia de oro); esta enzima es capaz de eliminar los  $H_2O_2$  de manera muy efectiva y por tanto en el momento en el que se añade el Au(III), se habrán eliminado los  $H_2O_2$  generados en el ciclo catalítico. En tercer lugar, se ha añadido  $H_2O_2$  a la mezcla que contiene los productos cíclicos de las diaminas, DAO y Au(III). En la figura 10.13, se muestran los espectros obtenidos para estos ensayos, utilizando la reacción con cadaverina como modelo.

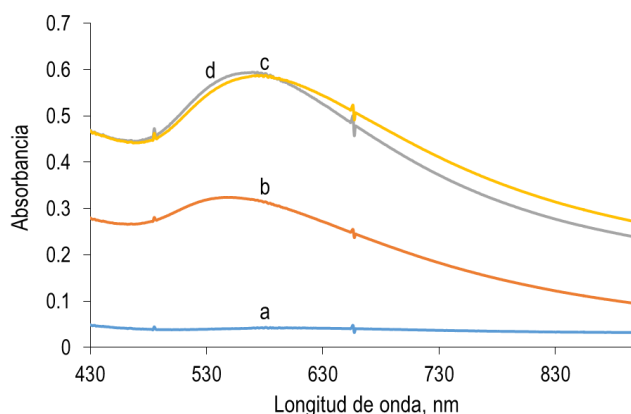


Figura 10.13. Estudio del papel del  $H_2O_2$  en la formación de las AuNP en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[Au(III)]$  1 mM,  $[H_2O_2]$  = 0,15 mM. a)  $[DAO]$  = 0,51  $U \cdot mL^{-1}$ , b)  $[Cat]$  = 0,011  $mg \cdot mL^{-1}$ ,  $[Cad]$  = 0,14 mM, c)  $[1\text{-piperideína}]$  = 0,15 mM, d)  $[Cad]$  = 0,14 mM

Como se puede observar, la reacción directa entre DAO y Au(III) en presencia de  $H_2O_2$  (espectro a) no forma las AuNP, sin embargo, cuando se añade catalasa a la reacción enzimática de DAO/Cad/Au(III) se observa cómo sí que se forman AuNP (espectro b) con menor valor de absorbancia que la reacción enzimática

(espectro c). En este caso, podemos afirmar cómo el  $H_2O_2$  presente en la reacción sí que afecta a la formación de las AuNP. Esto se corrobora cuando añadimos la 1-piperideína (producto cíclico de la cadaverina) junto con DAO,  $H_2O_2$  y Au(III) (espectro d), ya que el espectro obtenido es muy similar al de la reacción enzimática, en este caso, como la concentración de  $O_2$  consumida es menor a la concentración de  $O_2$  disuelta en la disolución, los espectros obtenidos son prácticamente idénticos, ya que en estas condiciones, la enzima se encuentra en sus estado oxidado original.

Los perfiles cinéticos de los espectros mostrados anteriormente son lo que se describen en la figura 10.14. Como se puede observar, la cinética de la reacción en la que se ha añadido catalasa (registro a) es más lento que los demás, por lo que el  $H_2O_2$  podría estar acelerando la reducción del Au(III). La cinética de la reacción ordinaria (registro c) y la de la reacción de la 1-piperideína,  $H_2O_2$ , DAO y Au(III) (registro b) son muy similares.

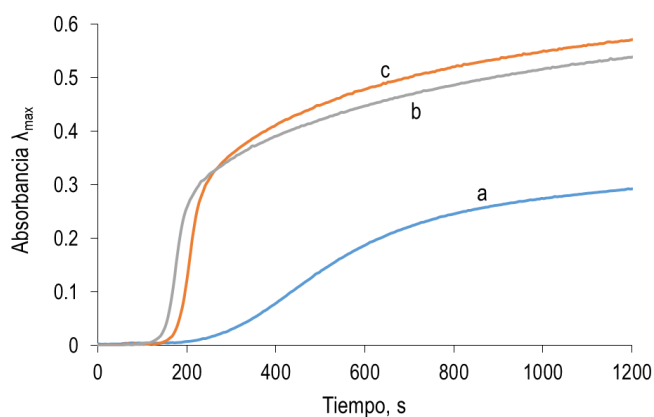


Figura 10.14: Espectros cinéticos asociados a las mezclas de la figura 10.13 a excepción de la reacción entre DAO,  $H_2O_2$  en presencia de Au(III).



### 10.1.3. Modelo matemático

El modelo teórico desarrollado para el caso de la formación de AuNP durante la reacción de la Tiramina con la TAO también tiene validez para la determinación de Put y Cad. En este caso, se trabaja siempre con exceso de reductor (analito) por lo que la ecuación que rige el modelo cinético será:

$$Abs_t = \varepsilon_{AuNP,n} \frac{k_1}{k_{2,n}} \left( \frac{1 - e^{-C_{Au,o} \left( k_1 + \frac{2}{3} k_{2,n} C_{tir,o} \right) t}}{e^{-C_{Au,o} C_{tir,o} t} + \frac{3k_1}{2k_{2,n} C_{tir,o}}} \right) \quad Ec. 10.1$$

Para demostrarlo, en la figura 10.15 (superior) se observa el ajuste de este modelo para concentraciones de Cad de  $1,03 \cdot 10^{-4}$  M y  $6,85 \cdot 10^{-4}$  M respectivamente; la línea roja se obtuvo a partir de la ecuación del modelo (con los valores de  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $n$  y  $\varepsilon$  ajustados) y la línea azul indica los puntos experimentales obtenidos. En la parte inferior se muestran los correspondientes ajustes lineales obtenidos al representar los valores de Absorbancia experimentales (eje "y") con los derivados de la ecuación del modelo (eje "x").

Capítulo 10: Generación *in situ* de nanopartículas de oro para la determinación enzimática de putrescina y cadaverina

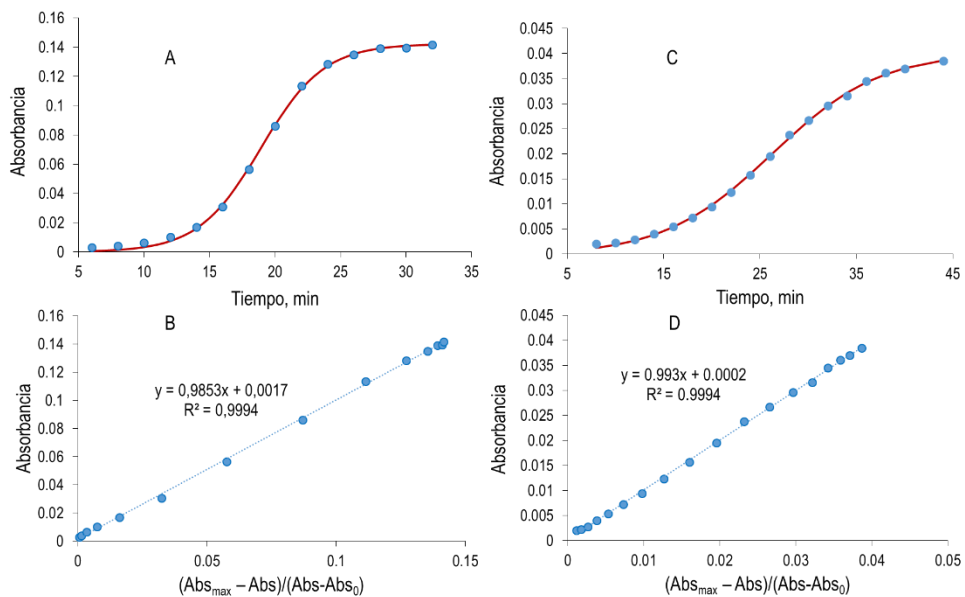


Figura 10.15. Registros  $Abs=f(t)$  obtenidos para dos concentraciones de Cad y su linealización. **A y B:**  $[Cad] = 1,03 \cdot 10^{-4} M$ , **C y D:**  $[Cad] = 6,85 \cdot 10^{-5} M$

Lo mismo se indica en la figura 10.16 para dos concentraciones de Put de  $6,03 \cdot 10^{-4} M$  y  $3,96 \cdot 10^{-4} M$  respectivamente.

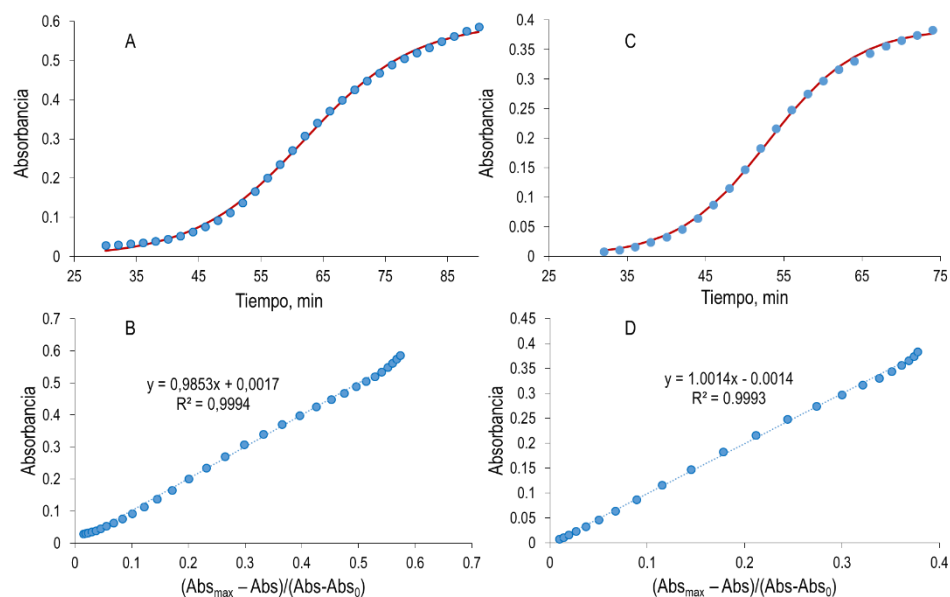


Figura 10.16: Registros de  $Abs = f(t)$  obtenidos para dos concentraciones de Cad y su linealización. **A y C:**  $[Put] = 6,03 \cdot 10^{-4} M$ , **B y D:**  $[Put] = 3,96 \cdot 10^{-4} M$

A lo largo del trabajo se ha hecho también un estudio (menos exhaustivo que en el caso de la tiramina, dado que no se han calculado las constantes de Avrami), del ajuste de los resultados obtenidos durante el proceso de optimización a este modelo para las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Se indicaran los valores en forma logarítmica para mayor claridad.

## 10.2. Desarrollo del método enzimático: 2. Optimización de las condiciones experimentales

A continuación, se detallan los parámetros de la reacción que han sido estudiados para conseguir las mejores propiedades analíticas en la formación de las nanopartículas durante la reacción enzimática. Los estudios se han realizado usando solamente Cad como analito.

### a. pH de la reacción

- b. Cantidad de DAO
- c. Cantidad de Au(III)
- d. Temperatura

### 10.2.1. pH de la reacción

Es necesario encontrar un pH que maximice, por un lado, la velocidad de reacción de la DAO con las diaminas (mediante el consumo de O<sub>2</sub>, explicado en el capítulo 4, apartado 4.3.1.3) y por otro, la velocidad de formación de las nanopartículas (figura 10.17) cuando se lleva a cabo la reacción enzimática en presencia de oro.

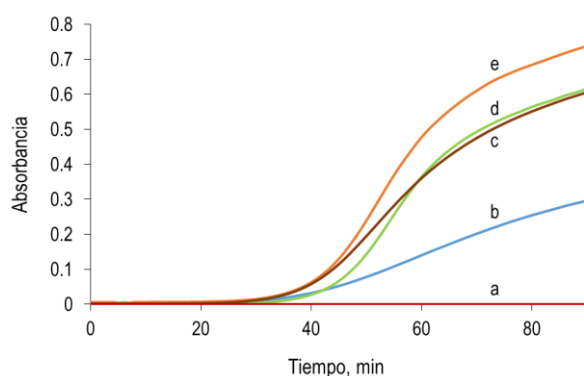


Figura 10.17: Estudio del pH en disoluciones amortiguadoras de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 0,1 M. [DAO] = 0,50 U·mL<sup>-1</sup>, [Au(III)] = 1 mM, [Put] = 6,00·10<sup>-4</sup> M. pH = a) 6, b) 9, c) 10, d) 7, e) 8.

Como se observa en la figura 10.17 el comienzo de la formación de nanopartículas es muy similar a pH 8 y 10, sin embargo a pH 8, la absorbancia final es mayor, lo que indicaría que el método sería más sensible a ese pH. Como ya sucedía en el caso de las nanopartículas formadas en la reacción de TAO, a pH 6 no hay reacción, lo que verifica que a ese pH debe haber alguna incompatibilidad con el Au(III), ya que a ese pH la DAO (al igual que la TAO) sí que realiza el ciclo catalítico. A pH 7 se termina obteniendo la misma señal que a pH 10, sin embargo

el comienzo de la reacción es algo más lento, sin embargo este pH era el óptimo en la reacción de la TAO, lo que indica que el centro activo de la enzima debe estar más accesible para la TAO a pH 7 que para la DAO. La diferencia tan significativa en la señal de pH 9 puede ser debida a la utilización de  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  en vez de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , que pueden interactuar de manera distinta con el Au(III), haciendo que el Au(III) se encuentre en alguna forma química menos reactiva que con  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ .

De este estudio se llega a la conclusión de que, aunque el pH óptimo de la enzima sea 7, es mejor trabajar a pH 8, por lo que se tomará este pH como el óptimo a partir de ahora. En la siguiente tabla (tabla 10.1) se muestran los valores de  $k_1$ ,  $k_{2n}$  y  $\epsilon$  obtenidos con los correspondientes perfiles cinéticos a los diferentes valores de pH estudiados.

Tabla 10.1: Valores de los parámetros del modelo para los diferentes pH.

pH	7	8	9	10
Log $\epsilon$	3,1	3,2	3,0	3,1
Log $k_2$	4,1	3,9	3,5	3,9
Log $k_1$	-3,5	-3,3	-2,1	-3,1

Los valores de constantes de velocidad de formación y crecimiento de las AuNP no son muy dependientes del pH; a pH 9 se observan valores distintos del resto ( $k_1$  algo mayor y  $k_{2,n}$  algo menor) debido al cambio de fosfato por carbonato. Estos resultados son cualitativamente similares a los que se observaron con la tiramina.

Finalmente, un aspecto importante es la concentración de la disolución amortiguadora usada. Se ha insistido en que la interacción entre el Au(III) y el fosfato (o el amortiguador usado), es determinante a la hora de facilitar el proceso redox, dado que afecta a las propiedades oxidantes del metal. Para ver esta influencia con mayor claridad, se han hecho ensayos disminuyendo la

concentración de fosfatos en la disolución amortiguadora, pero manteniendo el pH constante en 7. Así, al pasar de una concentración de fosfato de 0,1M a 0,03M la absorbancia final disminuye aproximadamente a la mitad; si se rebaja a 0,01M la absorbancia final disminuye hasta casi la cuarta parte; finalmente, si se usa una concentración total de 0,0035 M la absorbancia prácticamente desaparece.

### 10.2.2. Cantidad de DAO

Uno de los parámetros que mayor influencia tenía en los espectros de absorción de las nanopartículas formadas con TAO, era la cantidad de enzima utilizada durante la reacción (capítulo 9, apartado 9.3.2). Tal y como se muestra en la figura 10.18, la concentración de DAO utilizada afecta a tanto a la longitud de onda del máximo de absorción como a la anchura del espectro. Para poder compararlos de manera visual, se han dividido todos los espectros entre la absorbancia obtenida a 470 nm, para así eliminar las diferencias respecto a la línea base por la diferente concentración de DAO adicionada.

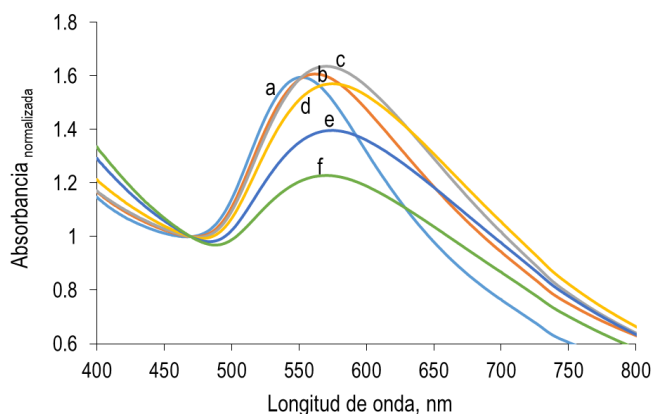


Figura 10.18: Estudio de diferentes concentraciones de DAO en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$ ,  $[Put] =$ ,  $[DAO] = a) 0,2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , b)  $0,5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , c)  $1,0 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , d)  $2,0 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e)  $3,0 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , f)  $3,9 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$

Al igual que lo observado en el caso de la TAO, al aumentar la concentración de enzima, se obtienen espectros más anchos y con menor absorbancia, lo que podría estar indicando mayor nivel de polidispersidad en las nanopartículas formadas. Además, el máximo de absorbancia se desplaza hacia longitudes de onda mayores, lo que, de acuerdo con la bibliografía, podría traducirse en nanopartículas de mayor tamaño.

En cuanto a su efecto en la cinética de la reacción, a la longitud de onda del máximo de absorbancia, se puede observar que a mayor concentración de DAO, menor es la velocidad de formación de las nanopartículas (figura 10.19). Para las concentraciones más elevadas de enzima (4 y 3 U·mL<sup>-1</sup>), inicialmente, tras la adición del Au(III) se genera cierta turbidez en la disolución, que se traduce en un aumento de la línea base. Esto indicaría que el Au(III) estaría formando algún complejo con los aminoácidos de la enzima, ya que es el único parámetro que ha cambiado a lo largo del ensayo, lo que se traduciría en una menor accesibilidad del Au(III) para reaccionar con el centro activo de la enzima o con los productos cíclicos de la reacción enzimática y así poder reducirse antes de formar las nanopartículas.

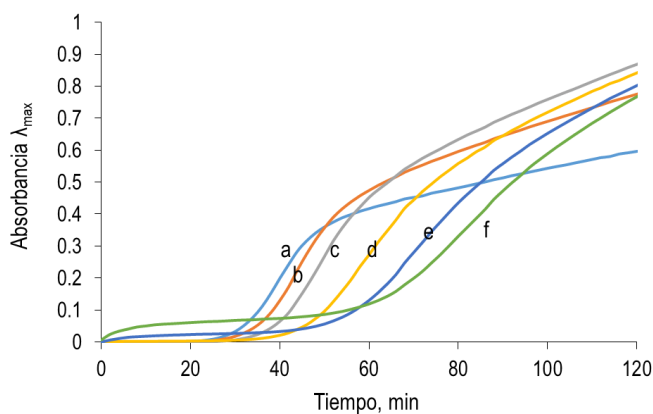


Figura 10.19. Registros cinéticos asociados a la figura 10.18.

El efecto en la cinética se puede observar también en los valores de las constantes de velocidad de los procesos de nucleación y crecimiento (tabla 10.2). Los resultados muestran que el efecto de la concentración en la velocidad es importante para valores altos de concentración de enzima, en los que la velocidad de crecimiento ( $\log k_2$ ) se hace menor. El efecto de la concentración en  $\log k_1$  es menor sistemático. La absorptividad molar crece ligeramente con la concentración de enzima.

Tabla 10.2: Valores de los parámetros del modelo en función de [DAO].

[DAO], U·mL <sup>-1</sup>	0,2	0,5	1	2	3	4
Log $\epsilon$	3,025	3,104	3,125	3,149	3,260	3,373
Log $k_2$	4,137	4,101	4,088	3,986	3,765	3,562
Log $k_1$	-3,067	-3,184	-3,463	-3,358	-2,599	-2,071

Con todo ello la concentración óptima de enzima se ha fijado en 0,5 U·mL<sup>-1</sup>, ya que para concentraciones menores, la absorbancia alcanzada es menor, lo que limitaría la sensibilidad del método. Usando mayores concentraciones de enzima se pueden conseguir señales más altas, aunque produce un gasto de enzima comparativamente mayor; además, la velocidad de formación de las AuNP es menor, y hay riesgo de aparición de precipitado.

### 10.2.3. Cantidad de Au(III)

En la figura 10.20 se representa la velocidad de formación de las nanopartículas para diferentes concentraciones de Au(III) adicionado. Se observa cómo la velocidad de formación aumenta al aumentar la concentración de Au(III), sin embargo, para concentraciones mayores de 1 mM de Au(III), después de comenzar la formación de las nanopartículas, la absorbancia comienza a decaer debido a la precipitación de las partículas, lo que indicaría que esas cantidades de Au(III) son excesivamente elevadas. Además también se observa como la absorbancia máxima



obtenida es mayor para mayor concentración de Au(III). Este hecho es razonable, ya que habría mayor cantidad de Au(III) para formar nanopartículas, y por tanto aumenta la absorbancia asociada a éstas últimas. Con todo ello, la cantidad de Au(III) se establece en 1 mM.

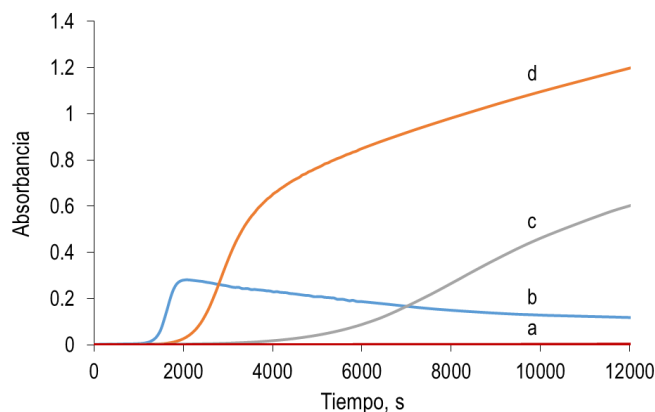


Figura 10.20: Estudio de la concentración de Au(III) en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[DAO] = 0,5 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Put] = 6,00 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[Au(III)] = a) 0,1 mM, b) 2 mM, c) 0,33 mM, d) 1 mM$ .

La tabla 10.3 muestra los cambios en los valores de  $k_1$ ,  $k_{2n}$  y  $\epsilon$  en función de la concentración de enzima usada. No hay datos suficientes para asegurar un comportamiento definido de los valores de estas constantes con la concentración y sería necesario realizar más experiencias.

Tabla 10.3: Valores de los parámetros del modelo en función de la  $[Au(III)]$

[Au], mM	2,0	1,0	0,33
Log $\epsilon$	2,882	3,210	3,288
Log $k_2$	4,092	4,125	4,327
Log $k_1$	-4,975	-3,342	-1,883

### 10.2.4. Temperatura

La velocidad de formación de nanopartículas durante la reacción de la DAO con las diaminas es más lenta que su análoga de la TAO con tiramina. Por ello, es necesario elevar la temperatura para conseguir aumentar la cinética de la reacción. En la figura 10.21, se muestran los perfiles cinéticos para diversas temperaturas. Como se observa, la velocidad de formación a una temperatura de 30 °C es bastante lenta, tardando al menos 30 minutos en comenzar las nanopartículas a formarse, sin embargo este tiempo se reduce aproximadamente a la mitad cuando se trabaja a 40°C, siendo casi instantáneo al trabajar a 60°C. Sin embargo, aunque en esta gráfica no se aprecie, si la cantidad de cadaverina es superior, trabajando a 60°C se han observado problemas de precipitación, por lo que se ha decidido establecer 45°C como temperatura óptima.

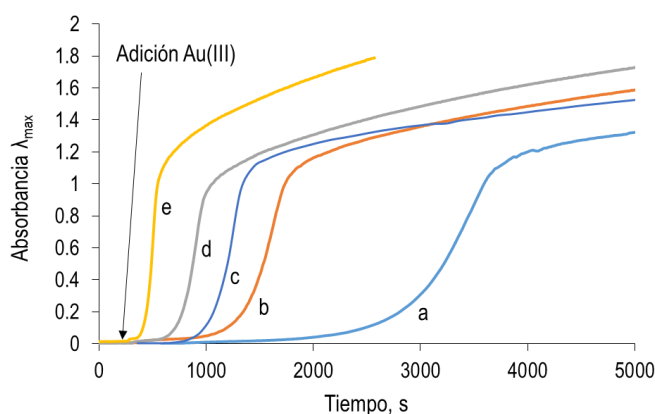


Figura 10.21: Estudio de la temperatura en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[DAO] = 2,0 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Cad] = 5,91 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[Au(III)] = 1 mM$ ,  $T^a = a)$  30°C, b) 40°C, c) 45°C, d) 50°C, e) 60°C.

Este aumento neto de velocidad de la reacción se materializa en los valores de las constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_{2n}$ , como se indica en la tabla 10.4 para la Cad.

Tabla 10.4: Valores de las constantes del modelo a diferentes temperaturas.

Temperatura, °C	30	40	50	60
$k_2$	7331,9	23540	49050,9	113533,7
$k_1$	0,0000542	0,00336	0,0112	0,174

Al igual que en el caso de la tiramina, los valores se ajustan al modelo de Arrhenius de acuerdo con las siguientes ecuaciones.

$$Lnk_2 = 38,8 - \frac{9050}{T}; r = 0,994 \quad Ec. 10.2 \quad Lnk_1 = 75,5 - \frac{25730}{T}; r = 0,96 \quad Ec 10.3$$

Si se comparan estos valores con los obtenidos para la tiramina, se observa que la dependencia de  $lnk_2$  con la  $T^a$  sigue una ecuación similar, mientras que la de  $lnk_1$  es muy diferente, ya que el valor de la  $E_a$  para el caso de la Cad ( $2,13 \cdot 10^5 \text{ Jul} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) es mayor que para la tiramina ( $4,37 \cdot 10^4 \text{ Jul} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Estos resultados parecen indicar que el efecto del analito va más asociado a la reacción de reducción que al posterior crecimiento de la AuNP.

### 10.3. Desarrollo del método enzimático: 3. Características analíticas e interferencias

#### 10.3.1. Características analíticas

Una vez que se han optimizado las variables físico-químicas de la reacción se han evaluado las características analíticas del método. Para ello se han realizado rectas de calibración para cada una de las diaminas por triplicado. En la siguiente figura (figura 10.22) se muestra uno de los estudios de calibración realizado con cada analito.

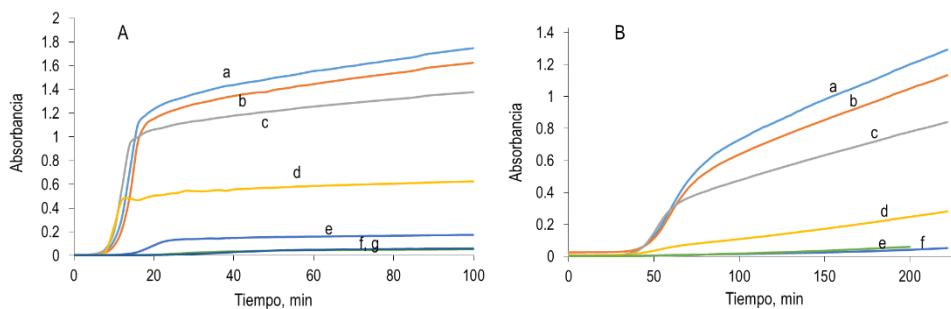


Figura 10.22: Estudio de calibración para Cad (A) y Put (B) en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[DAO] = 2,0 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 mM$ ,  $T^a = 45^\circ C$

Se puede apreciar, una vez más, la diferencia de cinética de ambos analitos. Para la Cad el tiempo necesario para empezar a ver las AuNP es mucho menor, el tiempo para alcanzar el punto de inflexión es mucho más pequeño y el ripening posterior al máximo es mucho menos acusado.

Se pueden utilizar diferentes parámetros de medida para el estudio de calibración. En el caso de la Cad se ha elegido la señal a los 100 s con objeto de incluir a los puntos de concentración más baja; para la Put es necesario medir a un tiempo mayor para conseguir una sensibilidad comparable (se ha utilizado 200 min). En la figura 10.23 se muestran las curvas obtenidas, utilizando las condiciones óptimas:  $[DAO] = 0,5 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 mM$ , disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8 y un tiempo de espera para la adición de Au(III) de 5 minutos. Como se observa se obtienen curvas sigmoideas, por lo que es necesario linealizar utilizando la función logística, la cual ya ha sido desarrollada en el apartado 9.5.1 del capítulo 9 y que daba lugar a la expresión:

$$\log \frac{Abs - A}{D - Abs} = B \cdot \log[AB]_0 - B \cdot \log C \quad Ec. 10.4$$

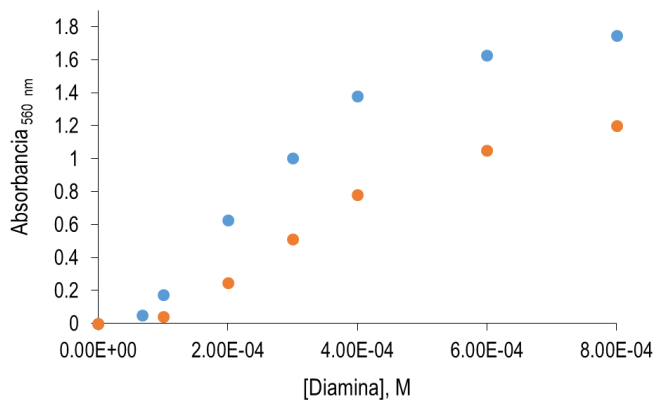


Figura 10.23: Relación entre la absorbancia a 560 nm y la [diaminas] en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8, [DAO] = 0,5 U·mL<sup>-1</sup>, [Au(III)] = 1 mM. a) Put, b) Cad.

Tras la linealización de ambas curvas sigmoideas se obtienen las rectas representadas en la figura 10.24, donde se observa que la pendiente de ambas es muy similar, indicando que, en las condiciones de trabajo indicadas (100 min y 200 min para Cad y Put respectivamente), la sensibilidad del método es muy similar para ambas diaminas.

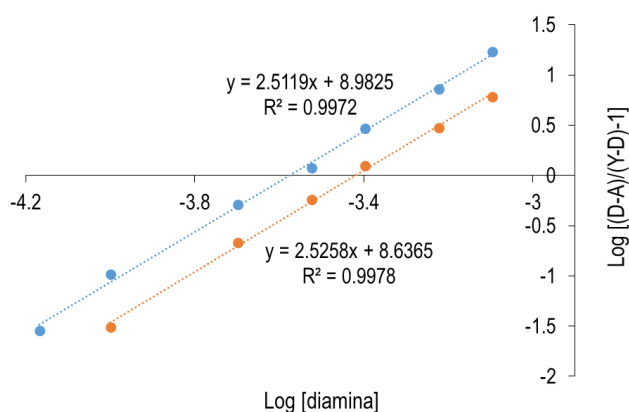


Figura 10.24: Linealización de la curva sigmoidea de la figura 10.23.

A partir de los registros cinéticos obtenidos durante el estudio de calibración, se han calculado los valores de las  $k_1$ ,  $k_{2n}$  y  $\epsilon$  para las diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos mostraron que para un mismo analito las diferencias no parecían muy dependientes de la concentración, lo que permitió calcular un valor promedio y una desviación estándar representativa de cada constante (tabla 10.5). Al comparar los resultados promedio de la Cad con los de la Put se observa que mientras la  $k_1$  es estadísticamente similar para ambos el valor de  $\log k_2$  es 1 una unidad superior (10 veces mayor) para la Cad. Esto indica que la velocidad de formación de núcleos es similar en ambos pero que cambia su velocidad de crecimiento, siendo más efectiva para el caso de la Cad, lo que explica su mayor velocidad de reacción. Un hecho, cuya relevancia se mostrará después, es que el tiempo al que aparece el punto de inflexión en la representación  $Abs=f(t)$  (ver figura 10.22) para cada amina parece ser independiente de su concentración, aunque es muy diferente de una a la otra.

Tabla 10.5: Similitud de las constantes para Put y Cad.

Diamina	Log $k_1$	Log $k_2$	Log $\epsilon$
Putrescina	$-1,30 \pm 0,42$	$5,42 \pm 0,23$	$2,90 \pm 0,15$
Cadaverina	$-1,17 \pm 0,34$	$6,45 \pm 0,41$	$3,29 \pm 0,12$

### 10.3.2. Interferencias de otras aminas biógenas

#### 10.3.2.1. Estudios previos

Al igual que sucedía en el caso de las nanopartículas sintetizadas durante la reacción enzimática de la TAO y la tiramina, hay que tener en cuenta el efecto de otras aminas biógenas que pudiesen estar presentes en muestras reales. Para ello se han elegido la tiramina y la histamina como posibles interferentes, así como las presencia de ambas diaminas a la vez.

Lo primero que es necesario tener presente es la especificidad de la DAO a pH 8, ya que se trata del pH de trabajo optimizado. En la figura 10.25 se muestra el

registro cinético del consumo de O<sub>2</sub> de la DAO utilizando el método descrito en el apartado 4.3.1.3 del capítulo 4.

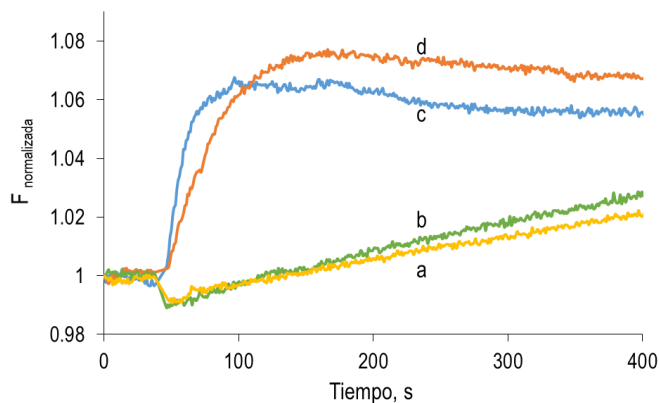


Figura 10.25: Perfiles cinéticos del consumo de O<sub>2</sub> de diferentes AB en disolución amortiguadora de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0,1 M pH 8, [DAO] = 1,1 U·mL<sup>-1</sup>, [AB] = 5,2·10<sup>-5</sup> M [Ru(II)] = 1,5·10<sup>-5</sup> M a) Tir, b) His, c) Cad, d) Put.

Se observa como las diaminas reaccionan mucho más rápido que la tiramina y la histamina, aunque estas dos aminas también producen cierta reacción, ambas con una tendencia similar, haciendo que en el momento de añadir el Au(III) (5 minutos desde el comienzo de la reacción enzimática), sí que hayan reaccionado parcialmente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la DAO durante ese tiempo tendrá preferencia por las diaminas y si la concentración de ambas es elevada, la DAO consumiría todo el O<sub>2</sub> sin apenas reaccionar con histamina o tiramina.

Además de conocer la especificidad de la DAO para el pH óptimo, también es necesario saber si en las condiciones de reacción, la tiramina e histamina, podrían formar nanopartículas de oro.

### 10.3.2.2. Tiramina

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, cabría esperar que la tiramina diera lugar a una banda pequeña (el producto de la reacción enzimática de la tiramina con TAO genera AuNP). Sin embargo, lo que se observó al mezclar tiramina con DAO y Au(III) fue la formación de un precipitado. Esto sería un problema en una muestra real en la que se quisieran analizar las diaminas en presencia de tiramina. Por ello se ha querido estudiar si este precipitado se forma siempre o sólo cuando no hay otras aminas en el medio de reacción.

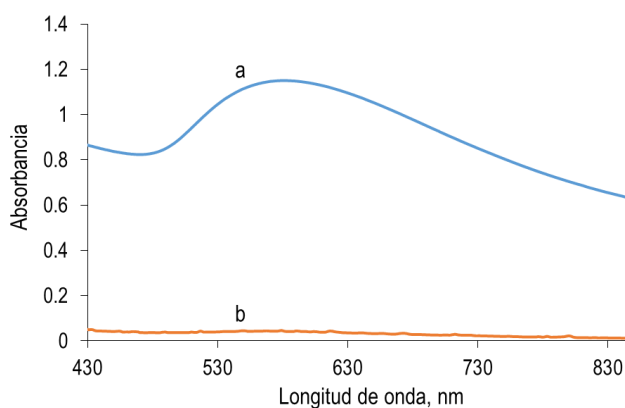


Figura 10.26: Espectros de las AuNP formadas con cadaverina en presencia de tiramina (b) o ausencia de la misma (a) en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[DAO] = 0,5 U \cdot mL^{-1}$ ,  $[Au(III)] = 1 mM$ ,  $[Cad] = 2,95 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[Tir] = a) 0 M, b) 3,05 \cdot 10^{-4} M$ .

En la figura 10.26, se muestran los espectros de absorción de la reacción enzimática con Cad en presencia y ausencia de tiramina. Lo primero que hay que destacar es que no se forma ningún precipitado al añadir el Au(III), por lo que ese problema está resuelto, siempre y cuando la tiramina no sea la única amina biógena presente en la reacción de la DAO en las condiciones optimizadas. Sin embargo, se observa como en la reacción en la que hay presente tiramina, la señal



desaparece por completo, lo que hace indicar que la tiramina debe de estar interactuando con el Au(III), haciendo que no se formen las nanopartículas.

Este tipo de interferencia es muy similar a la observada por la histamina en la formación de AuNP con TAO y tiramina (apartado 9.5.3, del capítulo 9). Cuando la concentración de tiramina se reduce unas 20 veces ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  M) con respecto a la concentración de cadaverina, se obtienen señales similares. Esto limitaría la aplicabilidad del método a muestras reales que tuviesen una cantidad de diaminas al menos 20 veces mayor que de tiramina situación que, por otro lado, es la más frecuente.

### 10.3.2.3. Histamina

Dado que la histamina tiene cierta capacidad de reacción con la DAO, se ha querido comprobar si la histamina podría formar AuNP en presencia de DAO y Au(III). En la figura 10.27 se muestran los espectros obtenidos para este ensayo. Como puede observarse, la histamina no es capaz de formar AuNP en las condiciones en las que lo hace la cadaverina. El registro b tiene una cierta turbidez ocasionada por la interacción de la histamina con el Au(III).

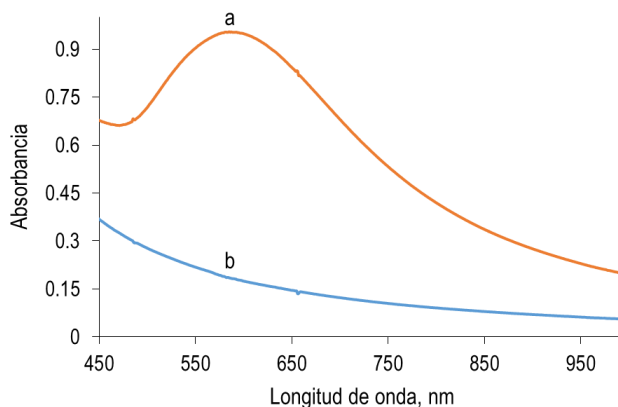


Figura 10.27: Formación de AuNP con histamina en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8, [DAO] = 0,48 U·mL<sup>-1</sup>, [Au(III)] = 1 mM, a) [Cad] = 4,93·10<sup>-4</sup> M, b) [His] = 4,97·10<sup>-4</sup> M.

Lo siguiente es ver cómo afecta la histamina a la señal obtenida en la reacción con cadaverina. En la figura 10.28 se observa, tal y como se había visto en el apartado 9.5.3, del capítulo 9, que la histamina reduce la señal de absorbancia, indicando que en presencia de histamina, las AuNP apenas se forman. La cantidad mínima de histamina que puede haber en la disolución sin que afecte al método es 1 μM, es decir, dos órdenes de magnitud menor que la de cadaverina o putrescina. Con ello es necesario aplicar el método a muestras en las que las aminas principales sean las diaminas y apenas haya presencia de histamina o tiramina.

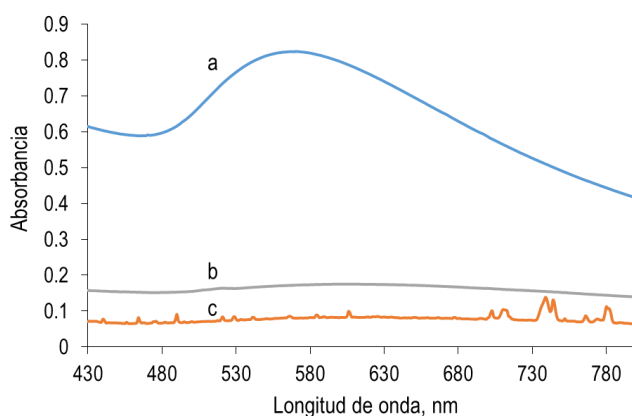


Figura 10.28: Influencia de la histamina en la formación de las AuNP en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8, [DAO] = 0,5 U·mL<sup>-1</sup>, [Au(III)] = 1 mM, [Cad] = 2,97·10<sup>-4</sup> M, [His] = a) 0 M, b) 3,32·10<sup>-5</sup> M, c) 9,86·10<sup>-5</sup> M

#### 10.4. Desarrollo del método enzimático: 4. Primeros estudios sobre la determinación de Put y Cad: determinación semicuantitativa.

Como ya se ha indicado, una de las principales características de la determinación de Put y Cad por este método es la diferencia de sus registros

cinéticos y, por tanto, la posibilidad de poder determinarlas de forma aislada. En este trabajo no se ha llegado conseguir una determinación cuantitativa selectiva de cada una de ellas pero si se han hecho una serie de estudios iniciales que han permitido una determinación semi-cuantitativa y que marcarán la pauta para posibles investigaciones posteriores.

Teniendo en cuenta que los perfiles obtenidos para ambas aminas son muy distintos, lo que teóricamente cabría esperar al someter a la reacción una mezcla de ambas, es que primero reaccionara la Cad y después la Put. Así, la figura 10.29 muestra los perfiles cinéticos experimentales obtenidos para una disolución de Put (verde) y otra de Cad (amarillo) de concentraciones  $2 \cdot 10^{-4}$  M. La línea con los puntos en azul corresponde a la suma de las dos, que es la que teóricamente debería haberse obtenido al llevar a cabo la reacción sobre una mezcla de ambas que tuviera esas mismas concentraciones; la primer parte del perfil, solo debería corresponder a la Cad, dado que en esa zona la Put aún no habría empezado a dar AuNP observables, mientras que la variación observada en la parte final debería informar de la cantidad de Put, ya que la Cad debería dar una señal más o menos constante. Sin embargo, el resultado experimental obtenido corresponde a la línea de puntos rojos. No hay una zona del registro que se pueda atribuir a cada una de las aminas biógenas, ni zonas donde haya claramente un efecto aditivo de las señales. Donde mejor se detecta este comportamiento “anómalo” es en los puntos de inflexión: no se obtienen dos puntos de inflexión distintos correspondientes a cada una de las aminas biógenas, sino un único punto que se encuentra a un tiempo intermedio.

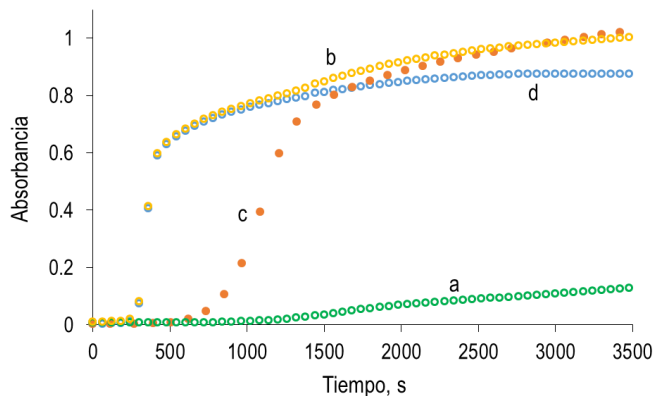


Figura 10.29: Perfiles cinéticos obtenidos en condiciones óptimas para: a)  $[Put] = 1,0 \cdot 10^{-4} M$ , b)  $[Cad] = 1,0 \cdot 10^{-4} M$ , c)  $[Cad] = [Put] = 1,0 \cdot 10^{-4} M$ , d) Suma de los registros a y b

Este resultado dificulta mucho la posibilidad de hacer una determinación individual de una de ellas o la determinación simultánea de ambas.

Hay varias posibles vías futuras que se pueden usar para abordar la determinación de ambas especies en mezclas. Se pueden usar métodos de calibración multivariante, como Regresión sobre Componentes Principales (PCR) o Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS); estos métodos dan lugar a buenos resultados por lo general, pero se pierde un poco el sentido químico de las variables que se están usando para la cuantificación (y su posible actuación sobre ellas). Alternativamente, se pueden utilizar métodos de calibración basados en regresión por mínimos cuadrados usando solo dos variables; en este caso es importante elegir dos variables que sean capaces de diferenciar adecuadamente los dos analitos.

A la vista de las representaciones obtenidas con las rectas de calibrado, un parámetro que puede resultar interesante es el tiempo al que aparece el punto de inflexión. Este tiempo puede calcularse por derivación del modelo matemático que describe los perfiles de absorbancia [1], dando lugar a la expresión:

$$t_i = \frac{1}{C_{Au,0} \left( k_1 + \frac{2}{3} k_{2,n} C_{BA,0} \right)} \operatorname{Ln} \left( \frac{2k_{2,n} C_{BA,0}}{3k_1} \right) \quad Ec 10.5$$

Aunque el valor de la concentración de AB afecta a dicho tiempo, se ve que su incidencia aparece en el numerador y denominador de dicha expresión, por lo que parece que ambos efectos se contrarrestan de alguna manera. En la siguiente tabla (tabla 10.6) se pueden ver los valores de estos tiempos obtenidos en el estudio de calibración para cada amina (experimentales) y los obtenidos a partir de la ecuación 10.5 para cada concentración.

Tabla 10.6: Puntos de inflexión teóricos y experimentales para Put y Cad.

[Put], M	t <sub>inf.</sub> Teórico, min	t <sub>inf.</sub> Exp, min	[Cad], M	t <sub>inf.</sub> Teórico, min	t <sub>inf.</sub> Exp, min
8,01·10 <sup>-4</sup>	62	58	7,97·10 <sup>-4</sup>	17	12
6,03·10 <sup>-4</sup>	62	60	1,03·10 <sup>-4</sup>	15	16
3,96·10 <sup>-4</sup>	53	52	6,00·10 <sup>-4</sup>	14	14
2,07·10 <sup>-4</sup>	56	54	1,97·10 <sup>-4</sup>	8	10
			4,03·10 <sup>-4</sup>	9	12
$\bar{t}_{inf} = t_0$	58,3	56,0	$\bar{t}_{inf} = t_0$	12,6	12,8
s <sub>inf</sub>	4,5	3,6	s <sub>inf</sub>	3,9	2,3

Como se aprecia, los puntos de inflexión de la Cad aparecen en torno a los 13 minutos, independientemente de la concentración, mientras que los de la Put aparecen en torno a 56 minutos también casi independientes de la concentración; a estos tiempos se les denominarán t<sub>0,Cad</sub> y t<sub>0,Put</sub>. El análisis de los resultados muestra además que los valores experimentales y los teóricos son estadísticamente similares.

En la figura 10.30 se pueden ver los registros Abs=f(t) derivados correspondientes a los estudios de calibración anteriormente mostrados; a la izquierda se muestra

el de la Cad y a la derecha el de la Put, en el que se aprecian gráficamente estos resultados.

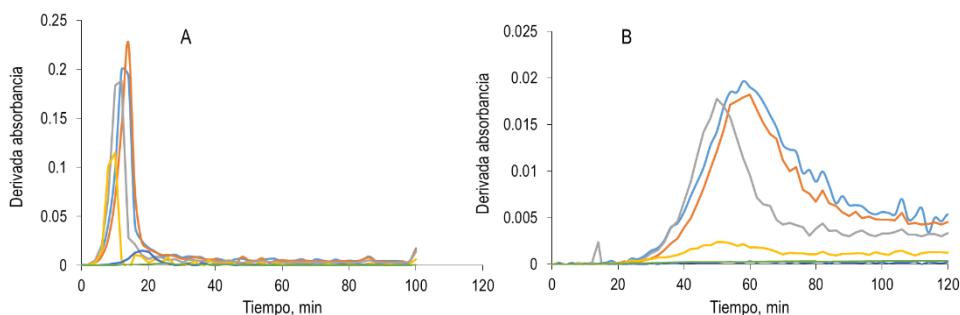


Figura 10.30: Perfiles cinéticos derivados correspondientes a los puntos de la recta de calibrado. **A:** Cad, **B:** Put

De acuerdo con estos resultados y con lo observado anteriormente, se puede establecer, de forma empírica, que el tiempo del punto de inflexión observado para una mezcla de aminas ( $t_{i,m}$ ) se obtendría ponderando los tiempos  $t_{0,Put}$  y  $t_{0,Cad}$  por las concentraciones de cada una de ellas ( $[Cad]_m$  y  $[Put]_m$ , respectivamente) en la mezcla, según:

$$t_{i,m} = \frac{t_{0,Put}[Put]_m + t_{0,Cad}[Cad]_m}{[Put]_m + [Cad]_m} \quad \text{Ec. 10.6}$$

Donde los valores de  $t_{0,Cad}$  y  $t_{0,Put}$  son, como se ha dicho, conocidos o fácilmente medibles con patrones. A partir de esta ecuación se puede desarrollar un método para obtener de forma aproximada (semi-cuantitativa), las concentraciones de Put y Cad en una muestra mediante experimentos de adición estándar de uno de los dos componentes. Para ello se obtendría el punto de inflexión para la mezcla, que vendría dado por la ecuación 10.6, y el punto de inflexión ( $t_{i,1}$ ) tras adicionar una concentración conocida de un patrón de ellos, por ejemplo Put ( $[Put]_1$  es la concentración de patrón añadida), que vendría dado por:

$$t_{i,1} = \frac{t_{0,Put}([Put]_m + [Put]_1) + t_{0,Cad}[Cad]_m}{([Put]_m + [Put]_1) + [Cad]_m} \quad \text{Ec. 10.7}$$

Reorganizando las dos ecuaciones queda:

$$\frac{(t_{i,1} - t_{i,m})(t_{0,Put} - t_{0,Cad})}{(t_{i,1} - t_{0,Cad})(t_{0,Put} - t_{i,1})} = \frac{[Put]_1}{[Put]_m} \quad \text{Ec. 10.8}$$

En esta ecuación todos los datos son conocidos, excepto la  $[Put]_m$ . Si en lugar de hacer una sola adición de Put patrón, se hacen varias, se dispondría de varias parejas de puntos ( $[Put]_j, t_{i,j}$ ) lo que permitiría hacer una determinación más precisa. Así, representando:

$$\frac{(t_{i,j} - t_{i,m})(t_{0,Put} - t_{0,Cad})}{(t_{i,j} - t_{0,Cad})(t_{0,Put} - t_{i,j})} = f([Put]_j) \quad \text{Ec. 10.9}$$

la pendiente de la recta daría la concentración de Put en la muestra ( $[Put]_m$ ). También combinando las ecuaciones 10.6 y 10.7 se puede llegar a ecuaciones similares a 10.8 y 10.9, pero para la determinación del otro componente, Cad.

$$\frac{(t_{i,j} - t_{i,m})(t_{0,Put} - t_{0,Cad})}{(t_{0,Put} - t_{i,m})(t_{0,Put} - t_{i,j})} = \frac{[Put]_j}{[Cad]_m} \quad \text{Ec. 10.10}$$

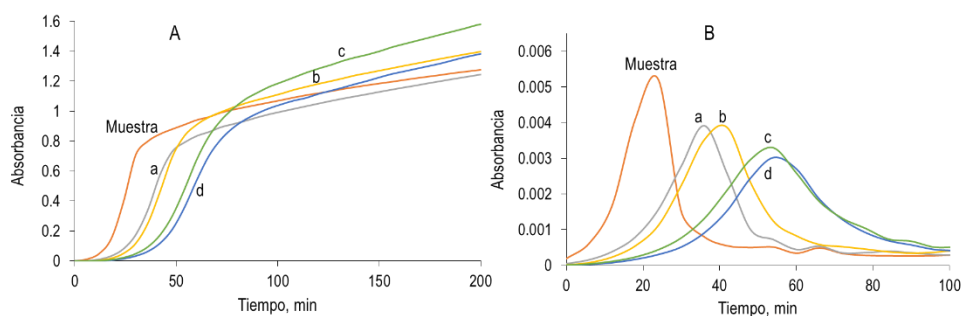
Finalmente, se puede hacer también la adición estándar con Cad, en lugar de Put, y se llegaría a ecuaciones similares para determinar Put y Cad.

$$\frac{(t_{i,j} - t_{i,m})(t_{0,Cad} - t_{0,Put})}{(t_m - t_{0,Cad})(t_{i,j} - t_{0,Cad})} = \frac{[Cad]_j}{[Put]_m} \quad \text{Ec. 10.11}$$

$$\frac{(t_{i,j} - t_{i,m})(t_{0,Cad} - t_{0,Put})}{(t_{0,Put} - t_m)(t_{i,j} - t_{0,Cad})} = \frac{[Cad]_j}{[Cad]_m} \quad \text{Ec. 10.12}$$

Es importante recalcar que la ecuación 10.6 es empírica y que se ha considerado que los valores de puntos de inflexión de los patrones son independientes de la concentración, lo cual no es totalmente cierto. Además, estos valores dependerán del estado particular en el que se encuentre la enzima, por lo que pueden variar de un lote a otro. Por ello, es conveniente obtener los valores de  $t_{0,Cad}$  y  $t_{0,Put}$  antes de llevar a cabo la determinación concreta a partir de uno de los patrones.

Para hacer una primera evaluación de este método y mostrar la fiabilidad de la ecuación 10.6, se ha hecho un ensayo en el que se ha mantenido constante la concentración de Cad y se ha ido variando la de Put, de acuerdo con el esquema indicado en la tabla siguiente. La primera de las mezclas se ha considerado la mezcla problema y el resto son adiciones de Put. También se ha medido una disolución solo de Put y otra solo de Cad para actualizar los tiempos  $t_{0,Cad}$  y  $t_{0,Put}$ . Los registros  $Abs=f(t)$  obtenidos y sus correspondientes espectros derivados se indican en la figura 10.31.



*Figura 10.31: Perfiles cinéticos y sus derivados obtenidos en las condiciones óptimas para mezclas de Put y Cad. La disolución "muestra" contiene  $3,0 \cdot 10^{-4}$  M de Cad y  $1,0 \cdot 10^{-4}$  M de Put. El resto de las disoluciones contienen  $3,0 \cdot 10^{-4}$  de Cad y a)  $3,0 \cdot 10^{-4}$  M, b)  $5,0 \cdot 10^{-4}$  M, c)  $7,0 \cdot 10^{-4}$  M y d)  $9,0 \cdot 10^{-4}$  M de Put.*



Tabla 10.7: Composición de las disoluciones del ensayo y valores de los puntos de inflexión para las mezclas y los patrones.

Disolución	Muestra	a	b	c	d
[Cad], M	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$
[Put], M	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^{-4}$	$9,0 \cdot 10^{-4}$
[Put] <sub>patrón</sub> , M*	-----	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-4}$
T <sub>inflexión</sub> , min	22,9	35,7	40,6	53,7	55,6

Los valores obtenidos de  $t_{0,Cad}$  y  $t_{0,Put}$  fueron 10,5 min y 79,5 min respectivamente

\*Concentraciones de patrón añadidas una vez descontada la de la muestra

Las rectas de regresión obtenidas para la determinación de Put y Cad con las ecuaciones 10.8 y 10.10 junto, con los correspondientes valores de concentración derivados de ellas (tabla 10.8) fueron:

$$\frac{(t_{i,1} - 22,9)(79,5 - 10,5)}{(t_{i,1} - 79,5)(79,5 - t_{i,1})} = 10515 [Put]_{\text{patrón}} - 0,2125; r = 0,96 \quad \text{Ec. 10.13}$$

$$\frac{(t_{i,j} - 22,9)(79,5 - 10,5)}{(79,5 - 22,9)(79,5 - t_{i,j})} = 2497 [Put]_j - 0,2125; r = 0,96 \quad \text{Ec. 10.14}$$

Tabla 10.8: Resultados obtenidos para las muestras de Put y Cad.

Analito	Concentración muestra	DER	Error
Putrescina	$4,0(\pm 0,8) \cdot 10^{-4}$ M	20 %	33%
Cadaverina	$4,0(\pm 0,8) \cdot 10^{-5}$ M	20 %	8%

Como se puede apreciar, el método es sencillo y rápido, pero permite solo hacer una determinación semi-cuantitativa de ambas sustancias. Uno de los estudios futuros a desarrollar es una validación más exhaustiva del método así como ensayar las posibles alternativas de determinación conjunta basadas en métodos multivariados.

## 10.5. Bibliografía

- [10.1] B. Holmstedt, L. Larsson, and R. Tham, "Further studies of a spectrophotometric method for the determination of diamine oxidase activity," *BBA - Biochim. Biophys. Acta*, vol. 48, no. 1, pp. 182–186, 1961, doi: 10.1016/0006-3002(61)90530-3.
- [10.2] B. Bolmstedt, R. Tham, "A spectrophotometric method for determination of Diamine oxidase (DAO) activity" *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 45, pp. 152-163, 1959, doi: 10.1111/j.1748-1716.1959.tb01687.x

## **Capítulo 11.**

**Estudio de las condiciones para  
la formación de nanoclusters.  
Determinación fluorimétrica de  
tiramina para su reacción con  
Au(III)**



## **11.1. Estudio de la reacción entre tiramina y Au(III)**

### **11.1.1. Origen de la señal**

Como se ha indicado en la Introducción, muchas proteínas, como la albúmina, son capaces de generar nanoclusters de oro (AuNC) a través de un proceso que supone la reducción del ión metálico, por acción de aminoácidos reductores de la proteína como la tirosina y el triptófano (con potenciales de reducción por debajo de 1 V [11.1]), y la posterior estabilización del metal en forma de nanoestructura. Este proceso es lento (en torno a 24 horas) y requiere de un medio básico. Como la tiramina tiene una capacidad reductora similar a la tirosina [11.2], se pensó que la acción de ésta sobre la mezcla de Au(III) y albúmina podría acelerar el proceso y/o suavizar las condiciones necesarias (pH menos básico), lo que permitiría desarrollar un método de determinación de tiramina basado en la formación de AuNC.

Durante estos ensayos preliminares se hicieron una batería de pruebas usando diferentes procedimientos que involucraban cambios en las concentraciones de los participantes, longitudes de onda de medida, tiempos de reacción, y otras. Finalmente, se observó que la albúmina no participaba en el proceso de formación de los posibles nanoclusters.

Hay varios aspectos que se deben resaltar de este resultado:

1) La tiramina sí parece acelerar la reacción de formación de los AuNC como se esperaba, dado que en ausencia de analito y en las condiciones de trabajo la albúmina sola no reacciona con el Au(III).

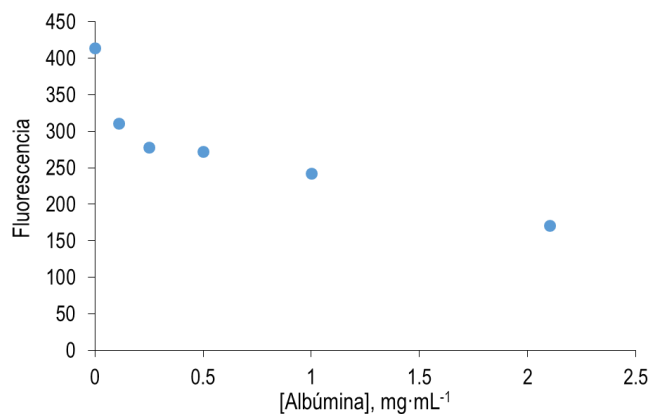
2) Como es sabido [11.3, 11.4], los AuNC pueden dar dos tipos de fluorescencia en función de los orbitales involucrados en la transición que la produce, que a su vez depende del tipo de estructura externa que presenten. Cuando en la fluorescencia se encuentran involucrados los átomos que forma parte del

revestimiento, se espera que la longitud de onda aparezca en la zona del final del visible o incluso en el NIR, con desplazamientos Stokes y tiempos de vida largos; cuando solo se encuentran involucrados átomos internos (normalmente transiciones Au-Au), la fluorescencia depende mucho del tamaño de los AuNC aunque suele aparecer más en la zona UV-visible, con desplazamientos Stokes y tiempos de vida de fluorescencia cortos, que es el tipo de fluorescencia observado en este caso.

3) La fluorescencia observada no es estable y decae poco a poco a lo largo del tiempo, lo que indica que las estructuras que se están formando no son estables en las condiciones de medida utilizadas. Esto es compatible con estructuras tipo nanoclusters no estabilizadas y es consistente con la  $\lambda$  observada.

En definitiva, los resultados sugieren que si bien la tiramina es capaz de acelerar la reducción del Au(III) como se perseguía, la albúmina presente no consigue estabilizar las estructuras.

El paso siguiente fue estudiar el efecto que tenía cambiar la concentración de albúmina, tanto sobre las longitudes de onda de fluorescencia, como en la estabilización de los AuNC. Como se muestra en la figura 11.1, los resultados obtenidos fueron sorprendentes ya que mostraron que la albúmina apenas afectaba a ambas cosas e, incluso la fluorescencia seguía observándose en ausencia de albúmina.



*Figura 11.1: Señales de intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones de albúmina en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  pH 8,  $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$  y  $[Tir] = 5,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .  $W_{ex} = 10 \text{ nm}$ ,  $W_{em} = 20 \text{ nm}$ ,  $V = 600 \text{ V}$ ,  $\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$ .*

### 11.1.2. Caracterización del fluoróforo

La figura 11.2 es un espectro 3D en el que se puede tener una visión más clara de la fluorescencia mostrada por la mezcla de reacción. Muestra que la fluorescencia de los AuNC viene restringida a una zona caracterizada por una longitud de onda de excitación máxima en torno a 320 nm y una longitud de onda de emisión máxima en torno a 410 nm. Los espectros de excitación y emisión clásicos y representativos se muestran en la figura 11.3.

Pero para caracterizar sin ambigüedades que las señales obtenidas son debidas a AuNC, es necesario poner de manifiesto un hecho importante. Para ello hay que considerar de nuevo la estructura química de la tiramina (se recuerda en la figura x4). En ella, el grupo funcional que puede estar actuando como reductor es el hidroxilo del fenol. Una vez oxidado, el compuesto químico puede sufrir una condensación con otra molécula de tiramina que haya sufrido el mismo proceso de oxidación, lo que haría que se produjese un subproducto tipo dímero. Este dímero

podría seguir creciendo a través de reacciones con nuevos Au(III) para dar lugar a la formación de una politiramina [11.5].

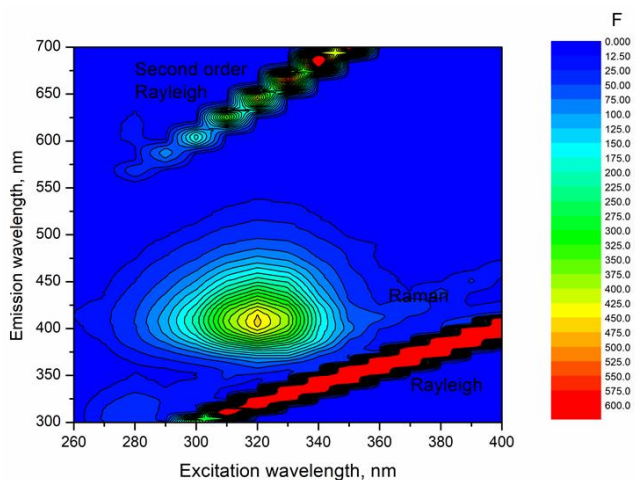


Figura 11.2: Registro cinético de la formación de nanopartículas de oro durante la reacción de la DAO con Cad o Put en presencia de Au(III). [DAO] = 0,49 U·ml<sup>-1</sup>, [Au(III)] = 1 mM, a) [Cad] = 8,0·10<sup>-4</sup> M, b) [Put] = 8,0·10<sup>-4</sup> M. Condiciones instrumentales como las indicadas en la figura 11.1.

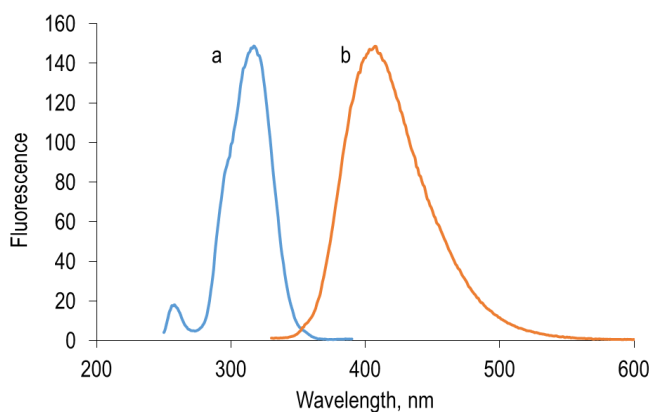


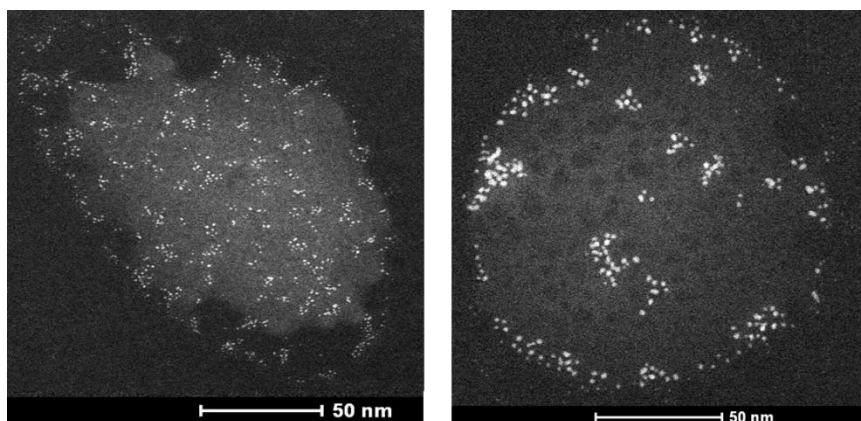
Figura 11.4: a) Espectro de excitación con  $\lambda_{em} = 410$  nm. b) Espectro emisión con  $\lambda_{ex} = 320$  nm. Los espectros han sido realizados en H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0,1 M pH 8, [Au(III)] = 1 mM y [Tir] = 1,03·10<sup>-3</sup> M.  $W_{ex} = W_{em} = 10$  nm,  $V = 600$  V



Un estudio bibliográfico posterior, indicó que este dímero, que ha sido definido previamente descrito como producto de la reacción entre la tiramina y la HRP [11.6], tiene una peculiaridad muy relevante para este trabajo y es que presenta fluorescencia en la misma región que se ha mostrado en la figura 11.4. Esto plantea la duda de si realmente se están formando AuNC durante la reacción y si son ellos los responsable de la fluorescencia observada. Se realizaron una serie de ensayos destinados a responder a estas cuestiones.

En primer lugar, se intentó separar el dímero de los AuNC usando estrategias basadas en ultrafiltración y exclusión molecular. En el primer caso se observó fluorescencia, muy similar, en las dos fracciones del ultrafiltrado (que deberían corresponder al dímero y a los AuNC respectivamente); en el segundo no se consiguió observar una separación nítida entre ambos.

En segundo lugar, se analizó por microscopía el resultado de la reacción. Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (STEM) se muestran en la figura 11.5.



*Figura 11.5: Imágenes de STEM correspondientes a la reacción de tiramina y Au(III) en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,01 M pH 8.  $[Tir] = [Au(III)] = 1$  mM*

Como puede observarse, aparecen claramente definidas estructuras compatibles con AuNC con un tamaño medio comprendido entre los 2-3 nm; la

estructura de macropartícula sobre la que estos AuNC se sitúan se han identificado como artefactos de la microscopía debido sobre todo a la disolución amortiguadora usada. Aunque estas imágenes demuestran sin ambigüedad la formación de los AuNC, todavía pueden aparecer dudas debido al procedimiento usado para obtenerlas. Para realizar los STEM es necesario preparar la muestra con antelación a la medida, dado que se realizan en un servicio de microscopía externo a la estructura del grupo. El procedimiento requiere preparar las muestras el día anterior, añadir la disolución sobre una rejilla de Cu y dejar secar durante unas 24 horas. Esto implica que, aunque el STEM demuestra la existencia de AuNC estos han podido formarse a posteriori (sobre las rejillas) y pueden no ser responsables de la señal de fluorescencia. Por ello se hicieron nuevos ensayos utilizando una técnica de microscopía que permitiera seguir la formación de los AuNC en tiempo real como lo es la Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM).

Esta técnica se puede aplicar directamente sobre un medio de reacción líquido y aunque requiere un tiempo mínimo de 4 minutos para obtener cada imagen nítida (es decir, la frecuencia de obtención de imágenes es de 4 minutos), da una mejor aproximación de lo que está ocurriendo en tiempo real en la reacción. La figura 11.6 muestra precisamente la imagen obtenida transcurridos esos primeros cuatro minutos de reacción. En ella se aprecia la aparición de AuNC justo desde el principio de la reacción, lo que permite asegurar que estas nanoestructuras están formadas cuando aparecen las señales de fluorescencia y permite relacionarlas biunívocamente. Se volverá más adelante sobre las AFM para explicar resultados adicionales.

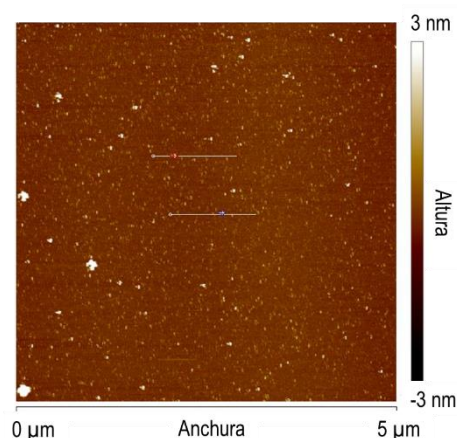


Figura 11.6: Imagen de AFM en las condiciones de la figura 11.5

Hay un último aspecto que es necesario considerar. Como se sabe, los AuNC, al igual que las AuNP tienen tendencia a agregarse para formar estructuras mayores hasta precipitar. Para evitarlo, es necesario que en el medio exista un agente de estabilización (*capping*), es decir, un compuesto químico que forme una capa protectora de la estructura y genere repulsiones con las de las estructuras vecinas. No se ha hecho un estudio detallado dirigido a establecer la estructura de esa capa externa pero se puede hipotetizar que el dímero indicado anteriormente puede ayudar a la estabilización. No obstante, se ha descrito que muchas de las disoluciones amortiguadoras frecuentemente usadas en la formación de estas nanoestructuras son capaces de actuar como agentes *capping*, si bien no todas inducen la misma estabilidad. En diversos estudios se ha mostrado que los fosfatos [11.7-11.11] se encuentran dentro de estas sustancias capaces de estabilizar las nanoestructuras como indica la figura 11.7, si bien su fuerza estabilizadora es de las más bajas.

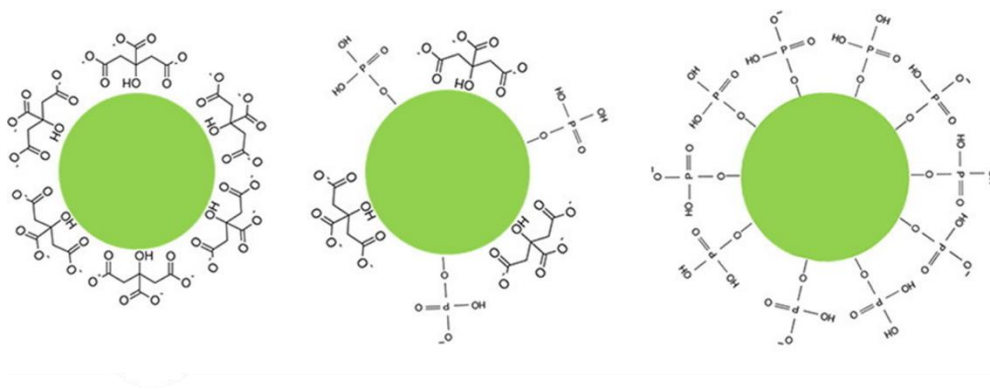


Figura 11.7: Diferentes formas de estabilización de nanoestructuras con fosfato [11.10]

Como resultado de estos estudios:

1) Se ha demostrado que la reacción entre la tiramina y el Au(III) produce AuNC. La fluorescencia observada es compatible tanto con estas nanoestructuras como con la ditiramina que se forma simultáneamente en la reacción. Es importante en este momento considerar de nuevo la señal mostrada en la figura 11.1. El decaimiento observado indica que la sustancia fluorescente está desapareciendo, lo que se puede atribuir a una desestabilización parcial de los AuNC formados, dado que el dímero formado es estable [11.6]. Por ello, lo más probablemente es que la fluorescencia que se esté observando sea una mezcla de ambas con un fuerte componente de los AuNC y un valor residual del dímero.

2) La estabilización de los AuNC formados se puede justificar tanto por la disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  como por el dímero de tiramina.

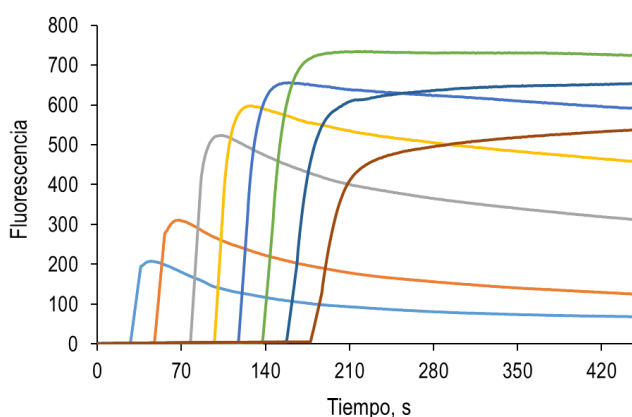
A continuación se va a desarrollar el proceso de optimización del método para poder utilizar esta característica como base analítica de la determinación de tiramina sin utilizar ningún reactivo químico auxiliar, sólo el Au(III).

## 11.2. Optimización del método dependiente del tiempo

### 11.2.1. Estabilidad de los AuNC formados: efecto del tiempo

Uno de los aspectos más llamativos es que la señal de fluorescencia disminuye muy rápidamente desde el inicio de la reacción hasta llegar a estabilizarse a un valor bastante bajo. El primer objetivo de esta optimización fue encontrar unas condiciones que permitieran tener una señal estable desde el principio de la reacción (que afecta a la precisión) y lo más alta posible (que afecta a la sensibilidad). Tras realizar varios estudios se llegó a la conclusión de que uno de los parámetros determinantes a la hora de estabilizar la señal obtenida es la forma en la que se mezclaban los reactivos (Au(III) y fosfato) y los lapsos de tiempos que transcurren entre ellos.

En este sentido resultó determinante que primero se mezclara el Au(III) y la disolución amortiguadora  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  y, transcurrido un tiempo de contacto, se añadiera el analito. En la figura 11.8 se muestran los registros cinéticos para diferentes tiempos de contacto Au(III)/fosfato antes de ser adicionada la tiramina.

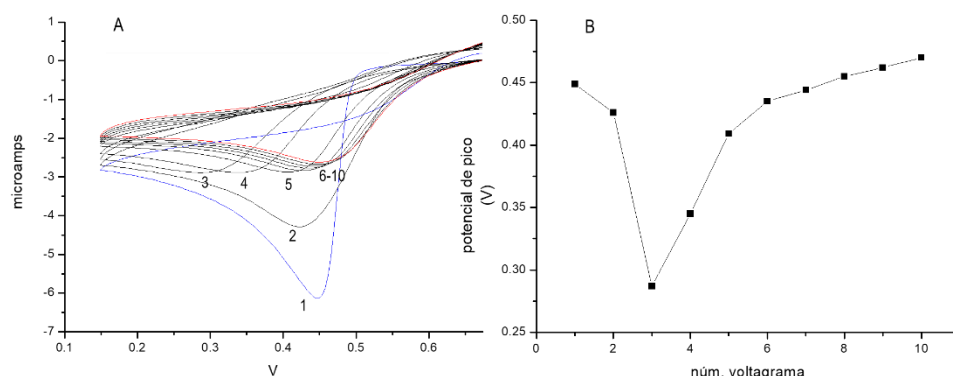


*Figura 11.8: Registro cinético de la fluorescencia (condiciones figura 11.1) a diferentes tiempos de inyección de tiramina. Disolución amortiguadora  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  0,1 M pH = 8,  $[\text{Au(III)}] = 1 \text{ mM}$ ,  $[\text{Tir}] = 1,02 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . El aumento de la señal coincide con el de inyección de Tir.*

Como puede observarse, si el tiempo previo a la inyección de tiramina es pequeño, la señal tiene una intensidad baja y decae a lo largo del tiempo. Conforme se aumenta el tiempo de contacto entre la disolución amortiguadora y el Au(III) se observa como la señal se intensifica, llegando un momento en el que la señal se estabiliza sin decaer. Si se utilizan tiempos de contacto superiores, se observa que la señal obtenida es más baja pero que, a diferencia de lo que ocurría a tiempos menores, esta va aumentando ligeramente con el tiempo en vez de disminuir.

Se establecieron varias hipótesis que permitieran explicar este comportamiento; la más consistente para por considerar que es necesario formar alguna especie química concreta entre el Au(III) y la disolución amortiguadora (fosfato), que modifique el potencial redox del Au(III) de tal forma que lo haga más fácilmente reducible por parte de la tiramina. Para intentar obtener más información se realizaron una serie de estudios en paralelo mediante voltametría cíclica.

La figura 11.9 muestra los voltagramas secuenciales obtenidos cuando el Au(III) (que originalmente está en forma de  $\text{AuCl}_4^-$ ) se lleva al pH adecuado con disolución amortiguadora de fosfato. Los voltagramas indican la aparición de un pico de reducción del Au(III) en torno a 0,45 V, cuyo potencial va disminuyendo a lo largo del tiempo para posteriormente volver al valor de potencial inicial (estos cambios se recogen en las figuras 11.9A y 11.9B); simultáneamente el valor de la intensidad de corriente del pico va disminuyendo a lo largo del tiempo. Estos resultados muestran que existe algún tipo de interacción entre el Au(III) y el fosfato que modifica su capacidad redox, y que dicha interacción va cambiando con el tiempo.



*Figura 11.9: A: Secuencia temporal de los voltagramas obtenidos para una mezcla de Au(III)(1 mM) y  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M. B: Evolución temporal del potencial de reducción del Au(III).*

*La diferencia entre cada voltagrama es de 1 minuto.*

Se realizaron nuevos ensayos, esta vez sobre la reacción Tiramina/Au(III). El objetivo era obtener simultáneamente valores de fluorescencia y de voltametría cíclica con objeto de establecer un paralelismo entre los cambios observados en ambos. Los resultados no fueron muy clarificadores ya que junto con los picos voltamétricos correspondientes al Au(III) se observaron los debidos a la tiramina, pero sin poder establecer una relación biunívoca clara entre ellos.

Una vez esclarecido el efecto del tiempo de mezcla, se optimizaron diversas variables de las que puede depender esta formación, para que así las estructuras formadas sean estables y se consiga la mayor sensibilidad posible. Las variables que se han tenido en cuenta han sido las siguientes:

- 1) Composición de la disolución amortiguadora.
- 2) pH de la disolución amortiguadora.
- 3) Concentración de Au(III).

### **11.2.2. Composición de la disolución amortiguadora**

Cuando la reacción se lleva a cabo en TRIS, no se produce fluorescencia (figura 11.10). Esto puede ser debido a que, en estas condiciones, los complejos de Au(III)

formados estabilizan al reactivo y lo hacen más difícilmente reducible por la tiramina.

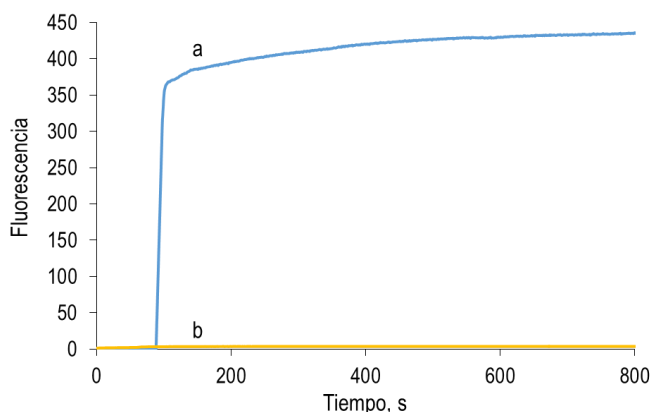


Figura 11.10: Comparación de la reacción entre Au(III) y tiramina en diferentes tipos de disoluciones. a) disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8. b) disolución amortiguadora TRIS 0,1 M pH 8.

Para poder verificar este hecho, se han estudiado los potenciales de reducción del Au(III) en estos medios mediante voltamperometría cíclica. En la figura 11.11 se muestra cómo el potencial de reducción del Au(III) en presencia de la disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8 se ha desplazado hacia potenciales mayores en comparación con el potencial en agua miliQ. Esto indica que el Au(III) es más fácilmente reducible. Este hecho puede ser determinante para poder formar las estructuras observadas en las imágenes STEM de la figura 11.5.



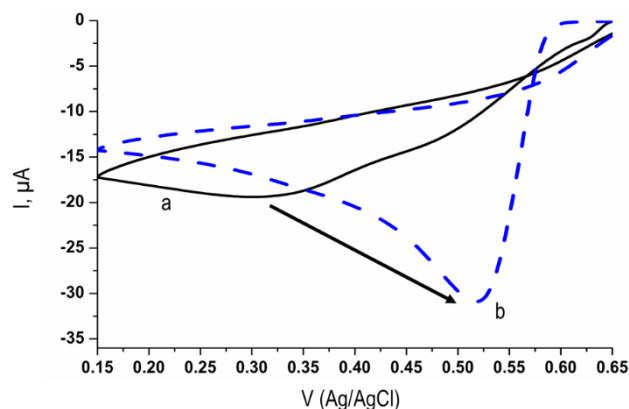


Figura 11.11. Voltagramas correspondientes al Au(III) realizadas en dos disoluciones amortiguadoras. a) TRIS, b)  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$

### 11.2.3. pH de la disolución amortiguadora

Una vez que se ha demostrado que es necesario utilizar disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  se ha querido comprobar cuál es el pH óptimo para que la reacción sea lo más sensible posible. Para ello se han estudiado los diferentes pH para los que los iones fosfato son capaces de amortiguar con mayor o menor fuerza. En la figura 11.12 se muestran las emisiones correspondientes para cada uno de ellos. Como se observa, el pH óptimo sería 8, que si bien es un pH un poco justo, la capacidad amortiguadora del fosfato todavía se mantiene.

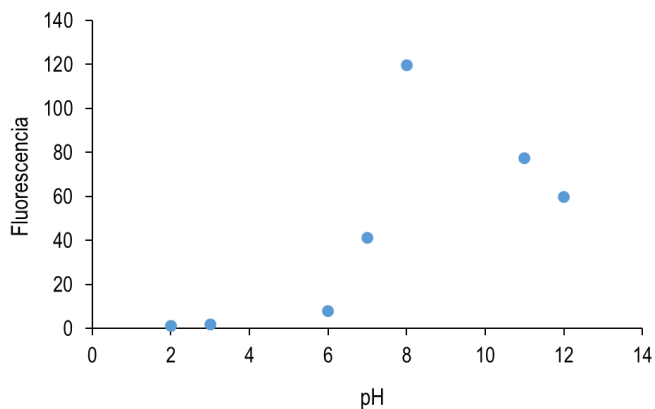


Figura 11.12. Fluorescencia de la reacción entre Au(III) y Tir para diferentes pH. Condiciones como las indicadas en la figura 11.1

#### 11.2.4. Concentración de Au(III)

El último parámetro a optimizar es la concentración de Au(III) empleada. En la figura 11.13 se muestran los registros cinéticos de la fluorescencia a 410 nm para diferentes concentraciones de Au(III). Como se puede observar, la concentración óptima de Au(III) es 1 mM.

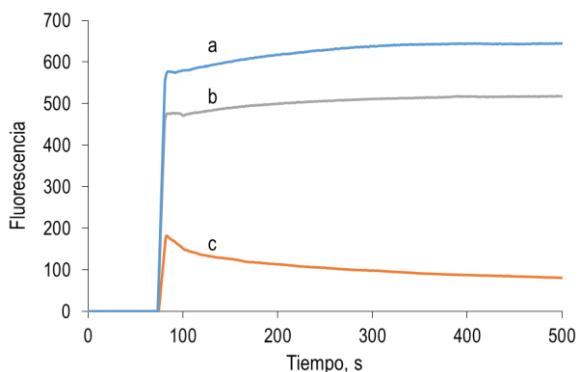


Figura 11.13: Registros cinéticos de la fluorescencia generada entre Au(III) y Tir para diferentes concentraciones de Au(III) en  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,1 M pH 8,  $[Tir] = 1$

mM, [Au(III)] = a) 1 mM, b) 0,5 mM, c) 2 mM. Condiciones instrumentales indicadas en la figura 11.2

### 11.2.5. Características analíticas del método

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de la señal de fluorescencia observada, se obtuvieron las propiedades analíticas del método. En la figura 11.14 se muestra la recta de calibración de este método. En ella las intensidades de fluorescencia se han normalizado para hacerlas independientes de las condiciones instrumentales, siguiendo la ecuación 11.1. [11.12] Para ello, en todos los ensayos no se han observado cambios en las condiciones espectrales de la fluorescencia. En la tabla 11.1 se muestran las características analíticas del método.

$$F_{norm} = \frac{F}{W_{ex}^2 \cdot W_{em}^2}$$

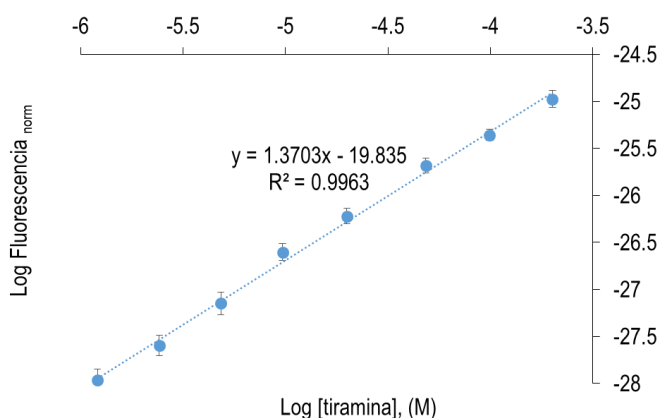


Figura 11.14: Relación entre la fluorescencia y la concentración de tiramina en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,01 M pH 8, [Au(III)] = 0,1 mM. Rango de [Tir]:  $2,01 \cdot 10^{-4} - 1,21 \cdot 10^{-6}$  M.

Tabla 11.1: Características analíticas del método.

Recta de calibrado	$F_{\text{norm}} = 0,0605 \cdot [\text{Tir}] - 0,1788 ; r = 0,998$
Rango	$6,0 \cdot 10^{-7} - 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M.}$
LD	$2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
DER, n = 5	Desde 1,8 % ( $3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) hasta 4,4% ( $1 \cdot 10^{-6}$ )

### 11.2.6. Estudio de interferencias

Se estudió el efecto de otras aminas sobre la señal de fluorescencia obtenida, en concreto cadaverina, putrescina e histamina. En la tabla 11.2 se muestran las intensidades de fluorescencia obtenidas cuando se hace reaccionar cada una de ellas junto con la tiramina con diferentes relaciones de concentración, para así poder evaluar la extensión en la pérdida de fluorescencia que generan cada una de ellas.

Tabla 11.2: Señales obtenidas para diferentes mezclas de AB con Tir.  $[\text{Tir}] = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . Condiciones instrumentales indicadas en 11.1.

Relaciones AB : Tir	F Tir	F Tir + Cad	F Tir + Put	F Tir + Hist
Relación 1:1	179,3	178,4	178,2	132
Relación 5:1	179,3	168,1	172,1	88,9
Relación 10:1	179,3	103,5	102,4	23,8

Como se puede observar, la señal de la tiramina cuando hay presente putrescina o cadaverina no se ve afectada hasta que la concentración de las diaminas es 10 veces superior a la de la tiramina, que es frecuente en muestras de productos

lácteos fermentados, como queso. Por el contrario, la interferencia que produce la histamina es mucho más enérgica. Como se ve, se trata de una interferencia negativa y, en principio, proporcional por lo que se podría resolver por adición estándar. El origen de la interferencia puede estar en la formación de complejos entre la histamina y el Au(III), dado que es similar al que se produce en el método enzimático.

### **11.3. Optimización del método independiente del tiempo**

#### **11.3.1. Efecto de la concentración de fosfato**

Los estudios anteriores han permitido poner a punto un procedimiento para la determinación de tiramina por generación de AuNC. El problema más importante de este método es que el tiempo de contacto previo entre el Au(III) y el fosfato, antes de añadir la tiramina, afecta mucho al valor de señal, lo que puede limitar su aplicación práctica. La situación ideal es conseguir que la señal obtenida no dependa del tiempo de mezcla de los reactivos entre sí o con el analito. Por ello, se planteó un nuevo estudio de optimización con el objetivo de encontrar unas condiciones de trabajo en las que la señal obtenida fuera independiente de ese tiempo.

Como se ha mostrado en la figura 11.11, el Au(III) forma algún tipo de complejo con los iones hidrógenofosfato o dihidrógenofosfato de manera que es más fácilmente reducible, por tanto, si la relación entre las concentraciones de la disolución amortiguadora y del Au(III) se hacen más grandes, es decir, si hay mayor exceso de amortiguador con respecto al Au(III), ese tiempo de premezcla se debería hacer menor. Esto viene avalado por algunos hechos adicionales: 1) en la bibliografía se pueden encontrar antecedentes del efecto que tiene una alta concentración de fosfato en la estabilización de AuNC [11.9] y 2) además, los

estudios realizados por voltametría demostraron que el cambio observado en el potencial de reducción del Au(III), anteriormente indicado en la figura 11.11, disminuía al aumentar la concentración de fosfato de disolución amortiguadora con respecto al Au(III), el tiempo de premezcla se debería hacer menor.

Para ello se ha realizado un barrido de concentraciones de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  con el Au(III) y la tiramina constantes. Como se había teorizado, tal y como puede observarse en la figura 11.15, a mayor concentración de la disolución amortiguadora, menor es el tiempo de premezcla necesario para obtener la mayor señal posible y estable a lo largo del tiempo. Se ha elegido 0,25 M como concentración óptima, ya que produce la mayor señal y además, en su preparación no se produce cristalización por la elevada concentración salina.

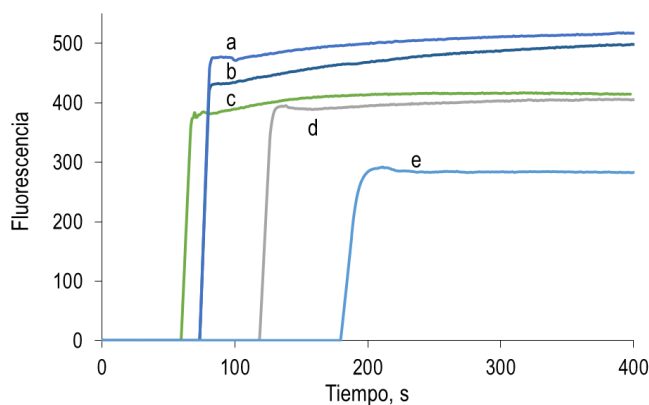


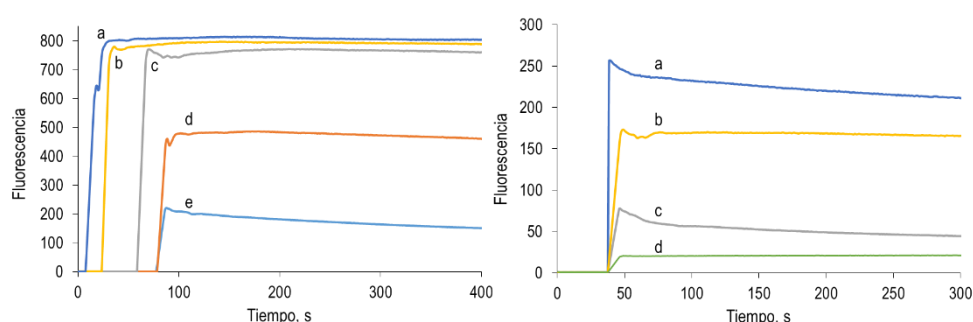
Figura 11.15: Registros cinéticos de la reacción entre Au(III) y Tir para diferentes concentraciones de la disolución amortiguadora de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  pH 8.  $[\text{Au(III)}] = 1 \text{ mM}$ ,  $[\text{Tir}] = 1 \text{ mM}$ ,  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] = \text{a) } 0,25 \text{ M, b) } 0,5 \text{ M, c) } 1 \text{ M, d) } 0,1 \text{ M, e) } 0,01 \text{ M}$ . Condiciones instrumentales como la figura 11.1.

### 11.3.2. Efecto de la concentración de Au(III)

A partir de esta concentración de disolución amortiguadora se ha realizado un nuevo estudio del efecto del Au(III) para ver si es posible disminuir el tiempo de

premezcla, considerando que al disminuir esta se consigue un efecto similar: aumentar la proporción fosfato/Au(III). Los resultados dados en la figura 11.16A muestran que disminuyendo esta concentración disminuye el tiempo óptimo de mezcla y aumenta la señal, e incluso, para una concentración de Au(III) de 0,05 mM, el tiempo de premezcla óptimo es prácticamente despreciable.

En estas condiciones resulta incluso posible cambiar el orden de adición, es decir, añadir el Au(III) sobre una disolución que contiene la tiramina y el fosfato. Este cambio aproxima la metodología a una situación de trabajo más convencional, en la que el reactivo (Au(III)) se añadiría sobre una disolución de analito amortiguada.



*Figura 11.16: Registros cinéticos obtenidos para la reacción con diferentes concentraciones de Au(III). A: Au(III) añadido antes que Tir. [Au(III)] = a) 0,05 mM, b) 0,1 mM, c) 0,5 mM, d) 1 mM, e) 2 mM. B: Au(III) añadido después de Tir. [Au(III)] = a) 0,5 mM, b) 0,1 mM, c) 0,05 mM, d) 0,01 mM. Condiciones experimentales como las indicadas en la figura 11.2.*

Tal y como muestra la figura 11.16B, cuando la concentración de Au(III) es de 0,01 mM se obtiene una señal estable y óptima desde el principio, sin ningún tipo de perturbación. Aunque la señal, es comparativamente, más baja que las otras mezclas probadas, al tratarse de un método de fluorescencia se puede compensar la disminución cambiando las anchuras de las rendijas de excitación y emisión (siempre que no incremente la dispersión Rayleigh), así como el voltaje del fotomultiplicador, pudiendo realizar medidas con mayor sensibilidad, donde tal y

como se puede observar, la fluorescencia es directamente proporcional al cuadrado de la anchura de las rendijas y al voltaje elevado al número de etapas de amplificación, tal y como se recoge en la ecuación 11.1

### **11.3.3. Confirmación de la existencia de AuNC**

Como se ha indicado antes, previamente al estudio de optimización se despejó la duda sobre si el origen de la fluorescencia observada era de los AuNC mediante estudios de microscopia. Al haber cambiado de forma tan drástica las condiciones de trabajo podrían aparecer nuevas dudas sobre este origen. Por ello se hizo un nuevo estudio por AFM de las especies que se forman durante la reacción en estas condiciones. En la figura 11.17 se muestra la secuencia de imágenes de AFM obtenidas a lo largo de la reacción Au(III)/Tiramina llevada a cabo en estas condiciones. Como se puede ver, ya desde el principio de la reacción se forman AuNC. El tamaño de estos nanoclusters no cambia con el tiempo, como se observa en las señales de fluorescencia y es compatible con los tamaños observados en STEM.



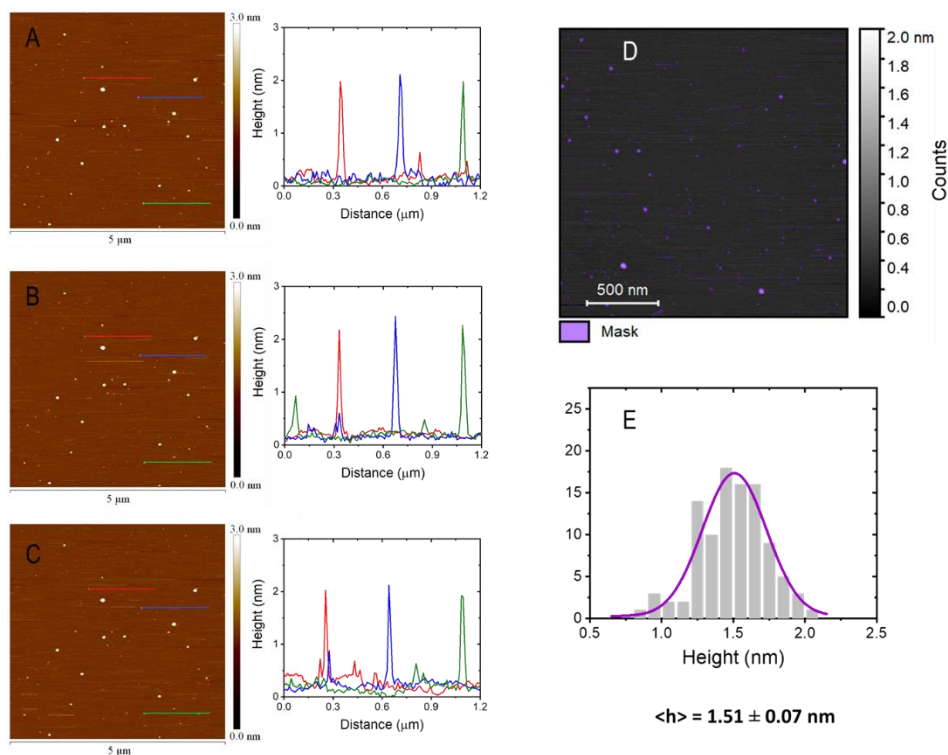


Figura 11.17: Registros temporales obtenidos mediante AFM durante la reacción. **A:** 4 min, **B:** 32 min, **C:** 100 min, **D:** imagen tratada para cálculo del tamaño y **E:** distribución de alturas.  $[Tir] = 0,1 \text{ mM}$ ,  $Au(III) = 0,01 \text{ mM}$  en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,25 M pH 8.

#### 11.3.4. Características analíticas del método

En la figura 11.18 se muestra la relación de la fluorescencia normalizada según la anchura de rendija y el voltaje utilizado, frente a la concentración de tiramina. Ambos ejes están en escala logarítmica para darle el mismo peso a los diferentes puntos, ya que las concentraciones difieren en dos órdenes de magnitud. A su vez en la tabla 11.3 se recogen las características analíticas asociadas.

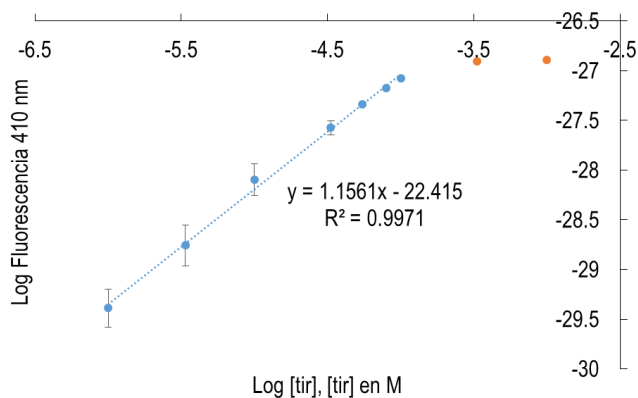


Figura 11.18: Relación entre la fluorescencia y la concentración de tiramina en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,01 M pH 8,  $[Au(III)] = 0,5$  mM. Rango de  $[Tir]$ :  $1,0 \cdot 10^{-6} - 1,0 \cdot 10^{-4}$  M.

Tabla 11.3: Características analíticas del método.

Recta de calibrado	$F_{norm} = 0,0011 \cdot [Tir] - 0,0011$ ; $r = 0,999$
Rango	$5,0 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^{-4}$ M.
LD	$2 \cdot 10^{-7}$ M
DER, n = 5	Desde 1 % ( $3 \cdot 10^{-5}$ M) hasta 3,5% ( $1 \cdot 10^{-6}$ )

### 11.3.5. Estudio de interferencias.

#### A) Sustancias similares a la tiramina

Una vez que establecida una metodología que permite realizar las medidas sin tener en cuenta los tiempos de premezcla, se han querido estudiar otros compuestos químicos con estructura similar a la tiramina. De esta forma se puede establecer con más fiabilidad la reacción química que se produce entre el Au(III) y la tiramina, indicada en la reacción 11.1, comprobando que el grupo hidroxilo tipo fenol es el que está implicado en la reducción del Au(III). Además, se han incluido

compuestos similares con grupos amino, para intentar deducir si son necesarios para la estabilización posterior de los nanoclusters formados.

En la figura 11.19, se muestran los registros cinéticos obtenidos para diferentes compuestos químicos, así como su estructura química, para poder hacer la discusión de manera más sencilla. Como se puede observar, los dos únicos compuestos químicos que no presentan señal de fluorescencia son la feniletilamina y fenilalanina, que son los dos únicos que no tienen un grupo hidroxilo tipo fenol, por lo que queda demostrado la necesidad de tener este grupo químico potencialmente reductor del Au(III). También llama la atención como la señal del fenol es la más baja de todas, siendo el único compuesto que no tiene un grupo amina, por lo que se podría hipotetizar que estos grupos pueden estar participando en la estabilización de las nanoestructuras que se generan durante la reacción.

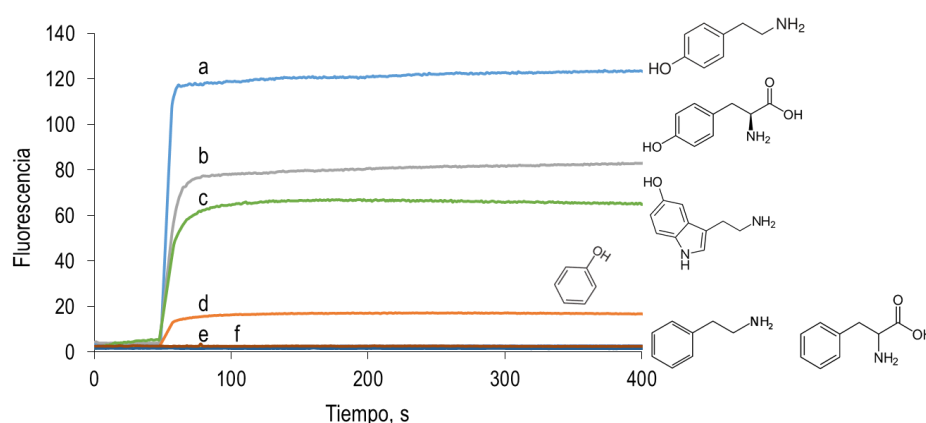


Figura 11.19: Registros cinéticos de la reacción entre Au(III) y diferentes compuestos químicos estructuralmente similares a la tiramina. Disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,25 M pH 8,  $[Au(III)] = 0,01$  mM,  $[X] = 1$  mM. a) X = tiramina, b) X = tirosina, c) X = serotonina, d) X = fenol, e) X = feniletilamina, f) X = fenilalanina.

### B) Efecto de otras aminas biógenas

Con las conclusiones extraídas del estudio anterior se puede prever que las aminas biógenas que acompañan más frecuentemente a la tiramina en muestras reales, es decir, putrescina, cadaverina e histamina, no deberían reducir al Au(III) ya que ninguna de ellas presenta un grupo hidroxilo tipo fenol. En la figura 11.20 se muestran los registros cinéticos para estas aminas. Tal y como se esperaba, ninguna de ellas presenta señal de fluorescencia, por lo que no actúan como reductores del Au(III).

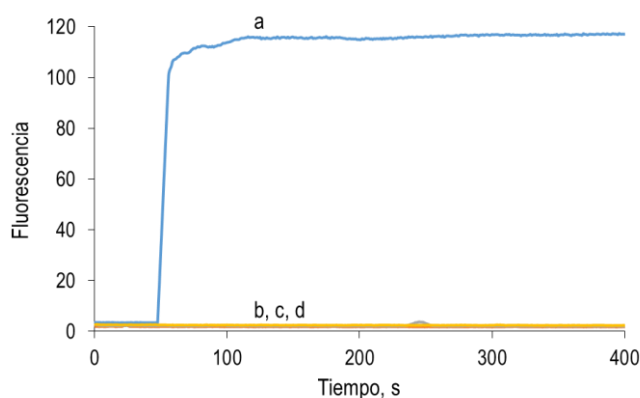
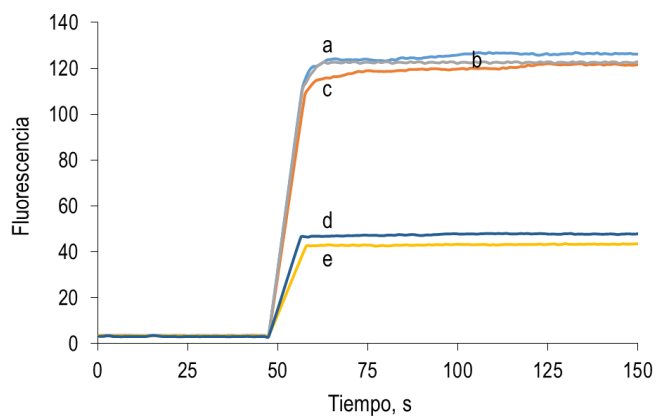


Figura 11.20: Registros cinéticos de la reacción entre Au(III) y diferentes aminas biógenas en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,25 M pH 8,  $[Au(III)] = 0,01$  mM,  $[AB] = 1$  mM. a) AB = Tir, b) AB = Put, c) AB = Cad, d) AB = His.

Pero aunque no actúen como reductores, es necesario estudiar que le sucede a la señal de la tiramina cuando estas aminas biógenas se encuentran presentes, ya que en las muestras reales todas ellas van a estar juntas. En la figura 11.21 se muestran los registros para diferentes parejas de aminas biógenas, todas ellas con tiramina.



*Figura 11.21: Registros cinéticos de la reacción entre Au(III) y diferentes mezclas de aminas biógenas en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,25 M pH 8,  $[Au(III)] = 0,01$  mM,  $[AB] = 1$  mM. a) AB = Tir, b) AB = Tir+Put, c) AB = Tir+Cad, d) AB = Tir+His, e) Tir+Put+Cad+His.*

Como se puede observar, la putrescina y la cadaverina apenas afectan a la señal final. Teniendo en cuenta que en estas mezclas las concentraciones de las aminas biógenas están en proporción 1:1 y que en las muestras reales la cantidad de tiramina es superior a la de estas diaminas, no es necesario considerarlas interferentes.

En el caso de la histamina sí que hay una clara interferencia, ya que la señal disminuye drásticamente, además de que la cinética de reacción (pendiente inicial tras la adición de las aminas) es algo menor. Como ya había ocurrido en otras secciones de la tesis, la histamina parece que forma complejos con el Au(III), impidiendo que la reducción de éste por la tiramina ocurra en la misma extensión. Para ello se ha querido estudiar los potenciales de reducción del Au(III) en presencia de histamina mediante voltimetría cíclica (figura 11.22).

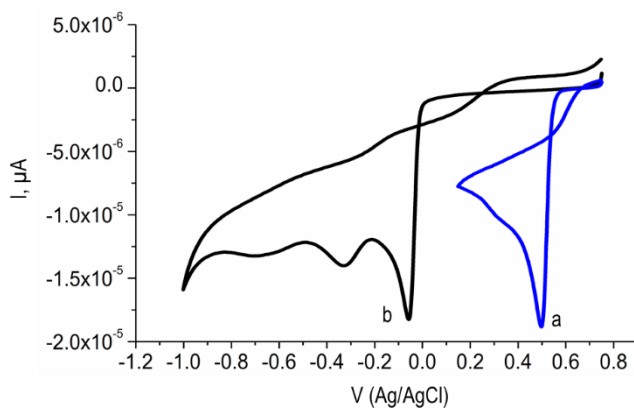


Figura 11.22: Voltamperograma cíclico del Au(III) en disolución amortiguadora de  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,01 M pH 8 con y sin histamina.  $[Au(III)] = 1$  mM. a) Sin hist. b)  $[His] = 0,1$  mM

Como puede observarse, al añadir histamina al Au(III), los picos del voltamperograma se han desplazado hacia la izquierda, aproximadamente, 0,6 V, lo que indica que el Au(III) es más difícilmente reducible. Este hecho es el que se ha plasmado en los registros de fluorescencia y por eso la señal obtenida es mucho menor cuando hay histamina en el medio de reacción.

Para poder sistematizar la interferencia de la histamina y así tenerla presente en futuros trabajos con Au(III) se ha comparado la disminución de esta señal que produce la histamina con el descenso que generan otros compuestos con estructura química similar, como son la histidina y el imidazol. En la figura 11.23 se muestran las intensidades de la fluorescencia a 410 nm para diferentes relaciones de tiramina en comparación con esos compuestos. Aunque el imidazol genera un descenso de señal, este descenso se hace más notable cuando se le añade la cadena lateral con el grupo amino o aminoácido, por lo que este tipo de cadenas laterales sumado al efecto del heterociclo debe ser la que consigue complejar al Au(III) de manera intensa.

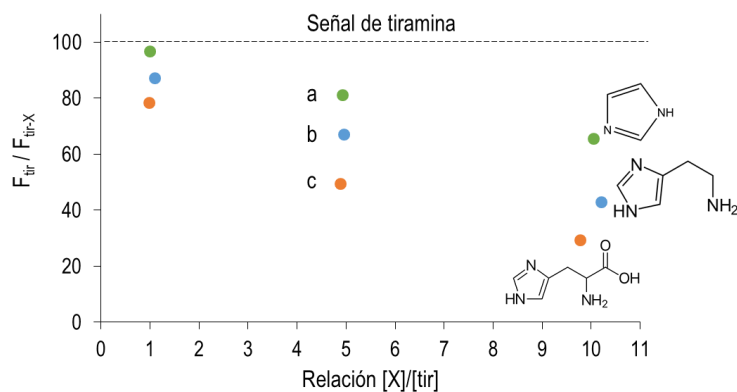


Figura 11.23: Cociente entre las señales de fluorescencia a 410 nm de la tiramina con y sin los compuestos X, relacionadas con el cociente de sus concentraciones. Disolución amortiguadora  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  0,25 M pH 8,  $[Tir] = 1,02 \cdot 10^{-5}$  M. a) X = imidazol, X = histamina, X = histidina.

Una posible forma de disminuir la interferencia de la histamina sería aumentando la concentración de Au(III) y así compensar la pérdida provocada por el acomplejamiento. Sin embargo, como se ha visto en el método anterior, en el que se utiliza una mayor concentración de reactivo, el problema de la interferencia persiste, además de complicar el método de análisis.

#### 11.4. Aplicación a una muestra real

Una vez evaluada la linealidad y el rango de respuesta de este método se ha aplicado a una muestra real. Para ello, y dado que no se disponía de muestra de extracto de atún proporcionado por el Departamento de Salud Pública de Aragón, se ha sintetizado una muestra que contuviese las mismas aminas que habían sido analizadas en esa muestra, añadiendo las mismas concentraciones. Cuando se mide la fluorescencia de una alícuota de esta muestra sintética, se observa que la concentración de tiramina determinada es menor a la real, cometiendo un error con respecto a la concentración real del 18 %, debido a la interferencia de la histamina. Para intentar disminuir este error en la determinación se ha planteado una adición estándar. Antes de ello es necesario comprobar que efectivamente

Capítulo 11: Estudio de las condiciones para la formación de nanoclusters. Determinación fluorimétrica de tiramina para su reacción con Au(III)

existen diferencias significativas entre la recta de adición estándar y la calibración normal. Para ello se han comprobado las pendientes de ambas (figura 11.24) y efectivamente existen interferencias proporcionales, por lo que la adición estándar debería poder reducirlas. Al realizar la extrapolación se obtiene un valor para la muestra de  $1,97 \cdot 10^{-6}$  M para la tiramina, siendo el valor real de  $2,14 \cdot 10^{-6}$  M. Si evaluamos estos valores mediante un test t, se arroja un valor de  $t_{\text{calculada}}$  de 2,11 frente a una  $t_{\text{tabulada}}$  de 4,30 con 2 grados de libertad, por lo que no existen diferencias significativas, aceptando dicho valor como valor real. Este resultado valida la utilización de este método para la determinación de tiramina en muestras, como la de atún, en la que la interferencia de la histamina se puede solventar.

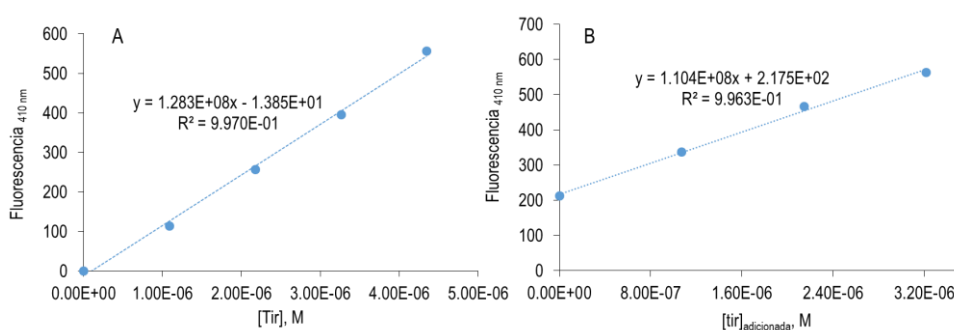


Figura 11.24. **A:** Relación entre la fluorescencia y la [Tir] en las mismas condiciones que en la adición estándar. **B:** Adición estándar de la muestra sintética con diferentes adiciones de tiramina.



## 11.5. Bibliografia

- [11.1] Warren, J. J., Winkler, J. R. & Gray, H. B. Redox properties of tyrosine and related molecules. *FEBS Lett.* 586, 596–602 (2012).
- [11.2] Chakkarapani, L. D. & Brandl, M. Carbon screen-printed electrode coated with poly (Toluidine blue) as an electrochemical sensor for the detection of tyramine. 8171 (2020).
- [11.5] Abrahão, O. *et al.* Tyramine electropolymerization revisited by DFT and experimental study. *J. Mol. Struct.* 1037, 200–208 (2013).
- [11.6] Mura, A. *et al.* Tyramine oxidation by copper/TPQ amine oxidase and peroxidase from *Euphorbia characias* latex. *Arch. Biochem. Biophys.* 475, 18–24 (2008).
- [11.7] Liu, K., He, Z., Curtin, J. F., Byrne, H. J. & Tian, F. A novel, rapid, seedless, in situ synthesis method of shape and size controllable gold nanoparticles using phosphates. *Sci. Rep.* 9, 1–13 (2019).
- [11.8] Nangia, Y. *et al.* Facile biosynthesis of phosphate capped gold nanoparticles by a bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia*. *Appl. Phys. Lett.* 94, (2009).
- [11.9] Jimmy Huang, P. J. *et al.* Good's buffers have various affinities to gold nanoparticles regulating fluorescent and colorimetric DNA sensing. *Chem. Sci.* 11, 6795–6804 (2020).
- [11.10] Afshinnia, K. & Baalousha, M. Effect of phosphate buffer on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles induced by monovalent and divalent electrolytes. *Sci. Total Environ.* 581–582, 268–276 (2017).
- [11.11] Ahmed, S. R. *et al.* Synthesis of Gold Nanoparticles with Buffer-Dependent Variations of Size and Morphology in Biological Buffers. *Nanoscale Res. Lett.* 11, 1–11 (2016).

Capítulo 11: Estudio de las condiciones para la formación de nanoclusters. Determinación fluorimétrica de tiramina para su reacción con Au(III)

**[11.127]** Ingle Jr, James D., and Stanley R. Crouch. "Spectrochemical analysis." (1988).

# **IV**

## **Conclusiones**

**1)** Las propiedades espectroscópicas intrínsecas de la DAO y/o HRP no son suficientes para desarrollar un método analítico lo suficientemente sensible y selectivo para la determinación de putrescina y cadaverina en muestras que contengan otras aminas biógenas.

**2)** Aunque el uso de colorantes permite corregir las limitaciones asociadas al empleo de las propiedades intrínsecas de la DAO y HRP para la determinación de aminas, no está exento de diversos problemas a la hora de su utilización. Los más importantes son: 1) Fotooxidación del ABTS. 2) Dismutación del ABTS<sub>ox</sub>. 3) Reducción del ABTS<sub>ox</sub> por el HRP (aminoácidos reductores). 4) Otro problema que presenta el ABTS, asociado a la determinación de las aminas biógenas es la reducción del ABTS<sub>ox</sub> por acción de los productos de las aminas (aldehídos). Esta tesis ha permitido elaborar un modelo cinético que permite tener en cuenta todas estas reacciones y ha proporcionado una estrategia para minimizarlas, permitiendo determinar putrescina y cadaverina de forma óptima en muestras de pescado.

**3)** A raíz del estudio del modelo cinético, se han obtenido unas condiciones experimentales que permiten la regeneración controlada del ABTS<sub>ox</sub>. Esto permitiría su uso como base de un sistema de monitorización de putrescina y cadaverina.

**4)** Se ha conseguido establecer un primer acercamiento al uso del ABTS<sub>ox2</sub> con fines analíticos. Esto puede ser muy interesante a la hora de implantar un método colorimétrico en muestras con alto contenido proteico.

**5)** Al sustituir el ABTS por TMB, se ha conseguido desarrollar unos soportes sólidos basados en celulosa que permiten la determinación de putrescina y cadaverina mediante sistemas basados en medida de imagen (teléfono inteligente), permitiendo así simplificar el proceso y poderlo proyectar a futuras aplicaciones domésticas.

**6)** Se ha desarrollado un modelo que permite relacionar la señal de color (RGB) con la concentración de analito y las características del sistema de medida.

**7)** Esta tesis ha demostrado que es posible utilizar la generación de nanopartículas de oro como sistema indicador colorimétrico en métodos enzimáticos de análisis.

**8)** Se ha estudiado en detalle el mecanismo por el cual se forman las nanopartículas de oro durante la reacción enzimática. Los resultados indican que el producto de la reacción (aldehído) tiene un papel importante en la síntesis de éstas, aunque importantes para su formación cuando se trabaja en defecto de O<sub>2</sub> durante la reacción.

**9)** A partir del estudio teórico del proceso se ha desarrollado un modelo basado en Finke-Watsy que permite describir la variación de absorbancia en función del tiempo según las constantes de los procesos de nucleación y crecimiento.

**10)** El sistema indicador desarrollado en esta tesis, basado en la generación de nanopartículas de oro, evita el uso de HRP-colorante, con todos los problemas que lleva asociados. En contraposición no es tan sensible, es más largo y en el caso de la determinación de aminos biógenos, la histamina provoca un efecto interferencial, que puede ser solucionado en función de la aplicación del método que se quiera llevar a cabo.

**11)** Se ha desarrollado y optimizado satisfactoriamente un método colorimétrico para la determinación de tiramina, utilizando la generación de nanopartículas *in situ* de oro durante la reacción enzimática del analito con la Tiramina oxidasa.

**12)** La formación de nanopartículas de oro aspira a ser un método indicador general en determinaciones enzimáticas colorimétricas. Para ello se ha demostrado su aplicabilidad en la determinación de putrescina y cadaverina con

DAO. En este caso, y a diferencia del sistema indicador HRP-colorante, es posible diferenciar putrescina de cadaverina y determinar ambas, al menos, de manera semi-cuantitativa.

**13)** El uso de nanomateriales para aplicaciones analíticas es un campo que está comenzando a desarrollarse. Es posible que muchas reacciones, no necesariamente enzimáticas, generen nanoestructuras, que al no buscarse, no se hayan detectado. Un ejemplo es la determinación de tiramina mediante la formación de nanoclusters de oro, la medida de su fluorescencia y su aplicación en muestras reales. Esta tesis pone de manifiesto que las condiciones necesarias para formarlas y utilizarlas analíticamente son muy específicas.



**V**

**Artículos**



# A label-free platform for dopamine biosensing

Jesús Navarro<sup>1</sup>, Javier Galbán<sup>\*,1</sup> & Susana de Marcos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Analytical Biosensors Group, Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, Aragón Institute of Nanoscience, University of Zaragoza, 50009-Zaragoza, Spain

\* Author for correspondence: [jgalban@unizar.es](mailto:jgalban@unizar.es)

**Aim:** This work presents a label-free platform for dopamine (DA) monitoring based on the spectroscopic properties of laccase. **Results:** Working in batch mode, DA ranging from 25 to 250  $\mu\text{M}$ , can be determined without the interference of norepinephrine and epinephrine. Laccase immobilized in a polyacrylamide film is the basis of a platform for the label-free determination of DA. The linear range goes from 100 to 900  $\mu\text{M}$  with an RSD of 5.3% and a film lifetime of more than 30 measurements. The biosensors also permit the DA + epinephrine + norepinephrine determination. **Conclusion:** The method permits the determination of DA and the total concentration of the three neurotransmitters, and could be used for DA monitoring in urine samples.

First draft submitted: 27 July 2017; Accepted for publication: 20 October 2017; Published online: 15 December 2017

**Keywords:** dopamine • laccase • optical biosensor

Optical biosensors continue to represent a challenging field of research [1]. This is largely due to two important factors: the rapid development of new antibodies, aptamers and others biomolecules, which can be used as bioreceptors with the appropriate capabilities of selectivity and stability (after integration in a solid support); and the development of new transduction schemes giving suitable sensitivity and concentration response ranges.

However, to date most of these biosensors have been devised as disposable systems and can only be used once. If the purpose of the research is the design of a biosensor for the continuous monitoring of an analyte (especially in clinical or pharmaceutical samples), bioreagents need to have two additional properties [2]: reversibility (after interacting with the analyte) and autoindicating capacity, in other words, optical properties that reversibly change during the recognition event. Biosensors having these properties are usually known as label free (or reagentless). These requirements greatly limit the number of available bioreagents or the analytical techniques to be used.

Enzymes may be suitable for this purpose [2]. First, as catalyzers they are reversible in nature. Second, some of them have spectroscopic autoindicating properties (intrinsic or acquired after chemical modification) and can be used as label-free systems. Third, in some types of enzymatic reactions, the necessary cosubstrate can be supplied by the sample itself, as with hydrolytic enzymes ( $\text{H}_2\text{O}$ ) and oxidase-type enzymes ( $\text{O}_2$ ).

All enzymes have intrinsic absorption or fluorescence properties due to their amino-acids (especially tyrosine and tryptophan) [3], but these properties can only be used for label-free systems in very few cases. Additional optical properties may come from the coenzyme of which three different families can be mentioned, those belonging to the flavoenzymes group containing a flavine derivative (as FAD) [4,5], heme-proteins [6,7] and copper-containing proteins [8], these last being the subject of this paper.

Copper-containing proteins comprise a very important group of enzymes involved in oxidation–reduction reactions [9]. In these proteins, copper atoms are coordinated to two or more aminoacid-forming sites, which are given different names (T types) depending on the geometric and electronic configuration of the site: T1 (one Cu atom coordinated to two histidines, one cysteine and another one or two ligands), T2 (one Cu atom coordinated to two histidines or glutamines) and T3 (two copper atoms, each of which is coordinated to two histidines). T1 gives rise to an absorption band at about 600 nm conferring a blue color to the protein (blue proteins). T3 produces an absorption band at about 330 nm and also fluorescence at about 450 nm [10]. No spectroscopic properties have been found for T2. Laccase (Lac) is a copper-containing protein (usually extracted from many types of fungus and

bacteria), which catalyzes the oxidation of different families of compounds by O<sub>2</sub> [11]. It is a multicenter copper protein containing four copper atoms (in T1, T2 and T3 sites). During the reaction, the substrate is oxidized in the T1, and then the electrons are transferred to the T2/T3 where oxygen is reduced to water. The maximum at 600 nm could be used for label-free systems, but it has been scarcely used. This is because the enzyme is usually applied in electroanalytical biosensors. Lac is prone to present several isoenzymes, some of which lack the blue color (they are called yellow or white Lac) [12]. The reason for this remains unclear, but the kinetic behavior of the enzyme does not change (it may even be more active than the blue one). Tyrosinase is another well-known copper-containing protein which is also involved in oxidation–polymerization reactions of monophenols and catechols, but only containing a T3 site.

Dopamine (DA) is an important natural catecholamine found in the CNS of mammals. It plays a critical role as a neurotransmitter (Ner) in the cardiovascular, renal and hormonal systems [13]. DA acts on the transmission of messages to different parts of the brain to coordinate body movements. Changes in the concentration of DA can involve serious brain diseases such as schizophrenia and Parkinson's [14]. Consequently, DA levels may be a marker of vital importance for biomedical diagnostics.

Analytical methods for DA and catecholamines have been frequently reviewed [10,15–16]. DA has interesting intrinsic spectroscopic (absorption and fluorescence) [17] and electrochemical [18] properties, however, considering the low sensitivity and selectivity usually required it is necessary: combining the detection with separation techniques, especially liquid chromatography [19,20]; the use of derivatization methods for fluorescence [21]; an adequately modified electrode [22] for amperometry; and especially by coupling the analyte to enzymatic reactions [10] using tyrosinase [23] and Lac [24]. In fact, the enzymatic reaction with Lac has been defined as a methodology for avoiding interferences in the determination of catecholamine by electrochemical biosensors [25].

During the last few years, several optical sensors approaches for DA determination have been proposed, most of them based on nanomaterials [26,27], specially graphene quantum dots [28–30], carbon dots [31] or gold nanomaterials [32–34]. These sensors present, in general, very good sensitivity. Nevertheless, in most of them, the sensing principle (charge transfer quenching, ionic interaction) do not include a molecular recognition event (as it occurs if bioreagents are used), so the selectivity could be compromised. Moreover, the most of these systems are not actually label free (because they require additional reagents for sensing) and, as far as we know, none of them are reversible, which limit their use as continuous monitoring systems.

DA levels in blood or urine are usually very low; however, after L-dopa pharmaceuticals administration for Parkinson treatment, the concentration in urine reach very high values and biosensors for the accurate monitoring elimination of DA are needed [35,36]. This paper proposes an optical biosensor for DA based in the label-free capability of yellow Lac.

## Materials & methods

### Apparatus

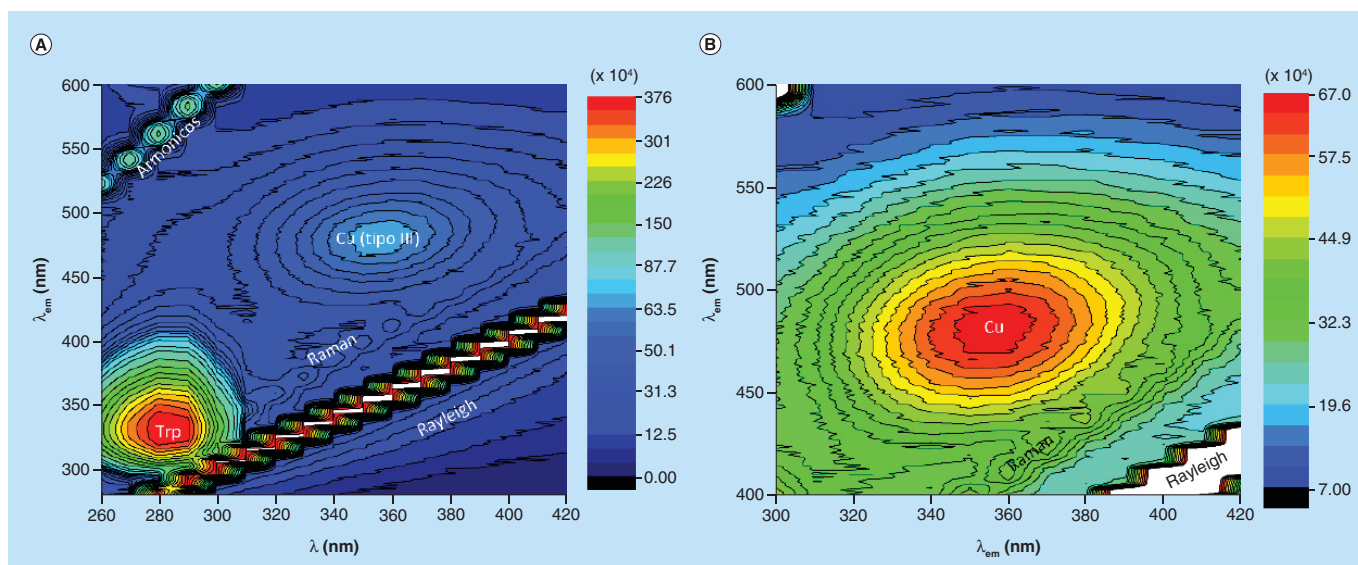
Absorption measurements were carried out with an Agilent 8453 UV–visible photodiode array spectrophotometer (1 nm slit; Agilent, CA, USA). Fluorescence measurement and contour plot (3D) spectral measurements were carried out with a Photon Technology International (PTI) Time Master fluorescence spectrometer (TM-12/2003).

### Reagents

Laccase from *Trametes versicolor* (12.9 U·mg<sup>-1</sup>, EC 1.10.3.2) (Lac), tyrosinase from mushroom 3130 U·mg<sup>-1</sup>, EC 1.11.18.1), dopamine hydrochloride (DA), epinephrine hydrochloride (Epi), norepinephrine hydrochloride (NorEpi), acrylamide and N,N'-methylenebisacrylamide, were purchased from Sigma-Aldrich [37] (MI, USA) and used as received. N,N,N',N''-tetramethylethylenediamine (TEMED) was purchased from BioRad (CA, USA) [38]. All other reagents and organic solvents were of analytical grade and used as received.

### Absorbance measurements

Lac solution in phosphate buffer (pH 6.0; 0.1 M) or acetate buffer (pH 4.5; 0.1 M; 2 ml) were added to a quartz cell (1-cm path length), and the absorbance at the working wavelengths (400 and 480 nm) began to be monitored. Then 20 µl of the corresponding DA solution was added.



**Figure 1.** 3D fluorescence spectrum obtained with a  $150 \text{ Uml}^{-1}$  tyrosinase solution (pH = 6, phosphate buffer). The graph (A) shows the whole spectrum, indicating the fluorescence due to the aminoacids, especially Trp and that of the T3 copper center. The graph (B) shows the section corresponding to the T3 fluorescence enlarged. Trp: Tryptophan.

### Sensor film preparation (label-free platform) & measurements

A polyacrylamide film containing immobilized Lac was prepared following a previously described procedure [13] after optimizing the enzyme concentration (27.1 mg of Lac – 350 U – were dissolved in 800  $\mu\text{l}$  of acetate solution) and located in a flow cell designed in the laboratory (Supplementary Figure 1). This flow cell is placed in the cuvette compartment of the spectrophotometer. The acetate buffer solution (pH 4.5; 0.1 M) was used as the carrier flow and 1.5 ml of DA of different concentrations was injected.

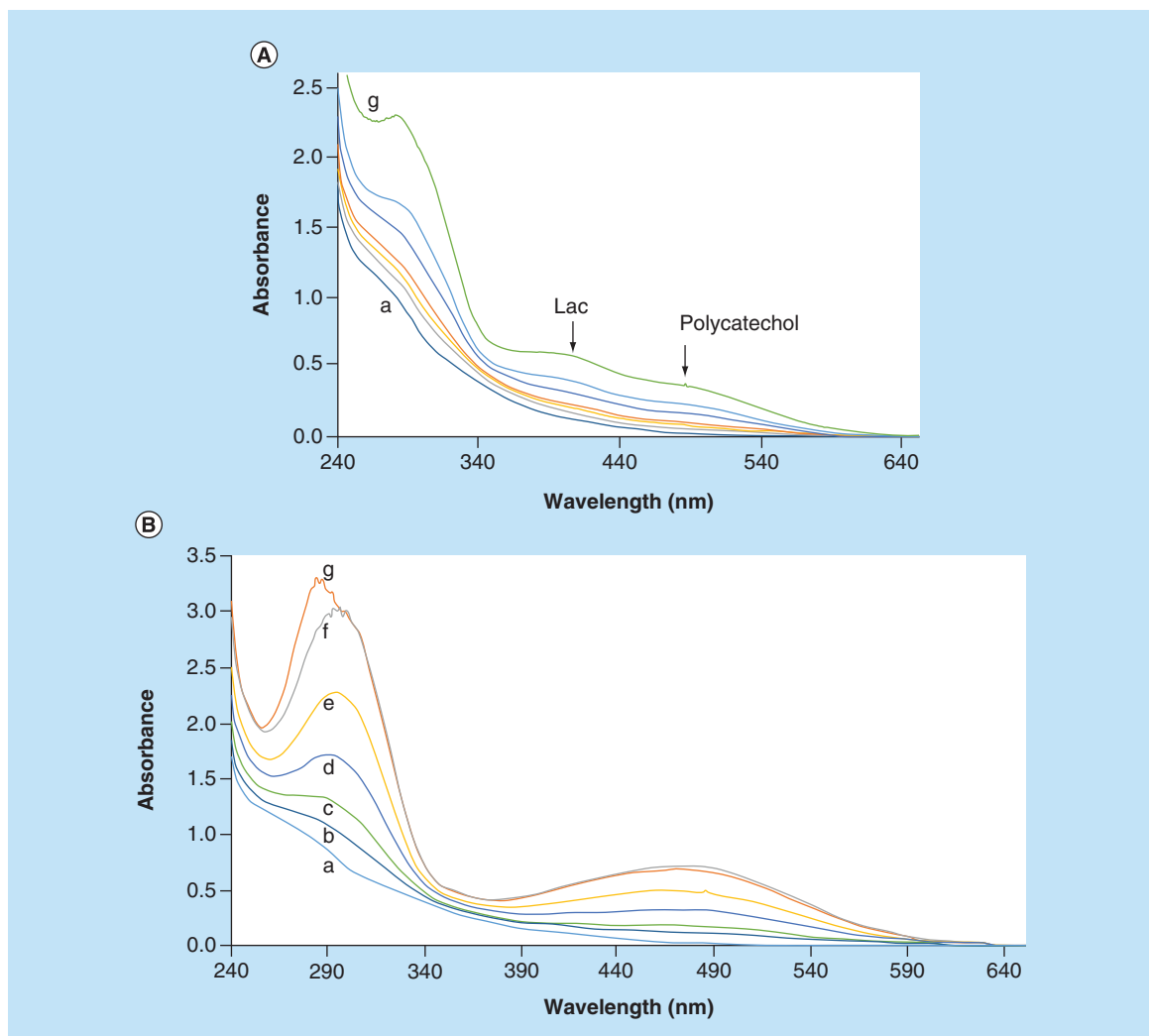
## Results & discussion

### Enzyme selection

At first, two copper enzymes were considered, Lac and tyrosinase. Both enzymes catalyze the oxidation–polymerization reaction of catechols, yielding polycatechols which strongly absorb in the range of 450–500 nm. DA, as a catechol, also gives this type of compound, so the absorption of the polydopamine (PDop) can be used as the analytical signals for this analyte determination. We were especially interested in developing a sensor for DA determination based on the intrinsic spectroscopic properties of the bioreagent, so we tested the intrinsic properties of both enzymes. However, we also tested the capabilities of the PDop absorption.

Tyrosinase was assayed first. The molecular absorption of the free enzyme did not show any recognizable maximum in the UV–visible region (apart from those of the aminoacids). After the reaction with DA, absorption bands at 300 and 480 nm due to PDop were observed, but there were no additional changes due to the enzyme (Supplementary Figure 2). By measuring the absorbance of PDop at 480 nm, the DA was determined in the concentration range from  $1 \times 10^{-5}$  to  $2.5 \times 10^{-4}$  M (Supplementary Figure 3) with a  $K_m = 1.15$  mM. Also, the fluorescence properties of the tyrosinase were tested. An emission maximum at 450 nm (excitation maximum at 355 nm) was observed (Figure 1). During the enzymatic reaction with DA, this fluorescence decreased, but this was not due to the intrinsic fluorescence variation of the enzyme but to the inner filter effect caused by the PDop. These fluorescence changes also permitted the DA determination in a concentration range from  $1 \times 10^{-5}$  up to, at least,  $1 \times 10^{-4}$  M (Supplementary Figure 4).

The molecular absorption spectra obtained for Lac corresponded to a yellow copper-containing enzyme. This showed the common aminoacids absorption in the UV region (200 and 280 nm) and a maximum at 400 nm due to the metal center of Cu [8]. In this case, fluorescence was not observed. During the enzymatic reaction with DA, the appearance of the maximum at 480 nm due to the PDop formation was significant but interestingly the absorbance at 400 nm also changed, due to the formation of the reduced form of Lac, indicating that the intrinsic absorbance of this enzyme could be used for monitoring the enzymatic reaction (Figure 2).

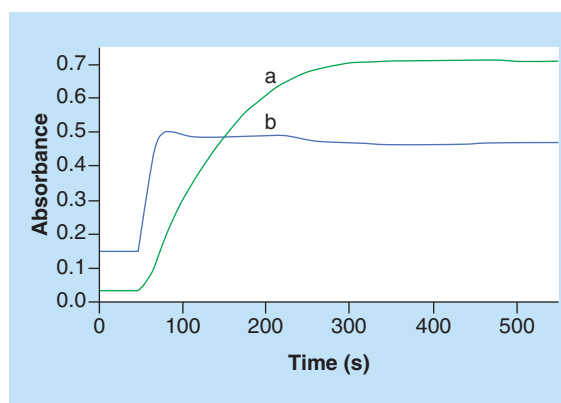


**Figure 2. Molecular absorption spectra obtained, after reaching the equilibrium, during dopamine calibration studies.** The maxima at 400 (Lac) and 480 nm (polycatechols) are marked. **(A)** The conditions used were as follows: pH = 4.5 (0.1 M acetate buffer) and  $16.4 \text{ U ml}^{-1}$  Lac. DA concentrations: a (lowest)  $0 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $25 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $50 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $75 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $150 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $250 \text{ }\mu\text{M}$ ; g (highest)  $400 \text{ }\mu\text{M}$ . **(B)** The conditions used were: pH = 6.0 (0.1 M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  buffer) and  $16.4 \text{ U ml}^{-1}$  Lac. DA concentrations: (a)  $0 \text{ }\mu\text{M}$ ; (b)  $25 \text{ }\mu\text{M}$ ; (c)  $52 \text{ }\mu\text{M}$ ; (d)  $76 \text{ }\mu\text{M}$ ; (e)  $150 \text{ }\mu\text{M}$ ; (f)  $250 \text{ }\mu\text{M}$ ; (g)  $400 \text{ }\mu\text{M}$ . DA: Dopamine; Lac: Laccase.

### Lac studies in batch

It was ascertained from the bibliography that Lac works effectively at a pH ranging from 4 to 7. Previous assays indicated that the optimum working conditions were obtained at pH 6.0 phosphate buffer (0.1 M) and pH 4.5 acetate buffer (0.1 M), the main difference between both pHs is the kinetic rate. Figure 3 compares the kinetic records at these two pHs and measuring at two wavelengths, 400 (Lac intrinsic absorption) and 480 nm (PDop absorption). It can be seen how at pH 6.0 both, the PDop is quickly formed and the increase in the absorbance at 480 nm prevents the absorbance at 400 nm being observed. However, at pH 4.5, the PDop is formed very slowly, so the changes due to the enzyme are observed and the determination can be carried out at both wavelengths. This difference in the progress of the reaction has led to the study of two methodologies for the determination of DA, based on PDop formation (480 nm) or Lac intrinsic (400 nm) absorbance.

When working at pH = 4.5, the variation of the intrinsic absorbance of the Lac at 400 nm can be followed. Before determining the analytical capabilities of the method, the effect of the enzyme concentration was first optimized. Table 1 shows the variation of the analytical signal  $\Delta\text{Abs}_{400}$  ( $\text{Abs}_{\text{max},400} - \text{Abs}_{\text{min},400}$ ) during the reaction, with the concentration of Lac ranging from 4.0 to  $63.0 \text{ U ml}^{-1}$ . From these results, a concentration of  $16.4 \text{ U ml}^{-1}$



**Figure 3.** Variation of absorbance of laccase ( $16.4 \text{ U ml}^{-1}$ ) with time during the enzymatic reaction with dopamine ( $2.52 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). (a) reaction at 400 nm and  $\text{pH} = 4.5$ ; (b) reaction at 480 nm and  $\text{pH} = 6.0$ .

**Table 1.** Variation of the analytical signal  $\Delta \text{Abs}_{400}$  ( $\text{Abs}_{\text{max},400} - \text{Abs}_{\text{min},400}$ ) during the reaction, with the concentration of laccase (acetate buffer  $\text{pH} 4.5$ ,  $0.1 \text{ M}$  and dopamine  $0.25 \text{ mM}$ ).

Lac concentration ( $\text{U ml}^{-1}$ )	$\Delta \text{Abs}_{400 \text{ nm}}$	Time <sup>†</sup> (s)
4	0.163	850
8	0.153	300
16	0.162	120
32	0.169	70
64	0.173	40

<sup>†</sup>Time necessary to reach the maximum.  
Lac: Laccase.

**Table 2.** Analytical figures of merit for the dopamine determination at 400 (intrinsic absorbance) and 480 nm (polydopamine absorbance).

Figures of merit	$\text{pH} 6, 480 \text{ nm}$	$\text{pH} 4.5, 480 \text{ nm}$	$\text{pH} 4.5, 400 \text{ nm}$
Calibration line	$2728x^{\dagger} + 0.0184$	$832x^{\dagger} + 0.0038$	$1128x^{\dagger} + 0.000$
Lineal range	$25\text{--}250 \mu\text{M}$	$25\text{--}150 \mu\text{M}$	$25\text{--}250 \mu\text{M}$
RSD ( $n = 5$ )	3.4%	4.1%	4.2%

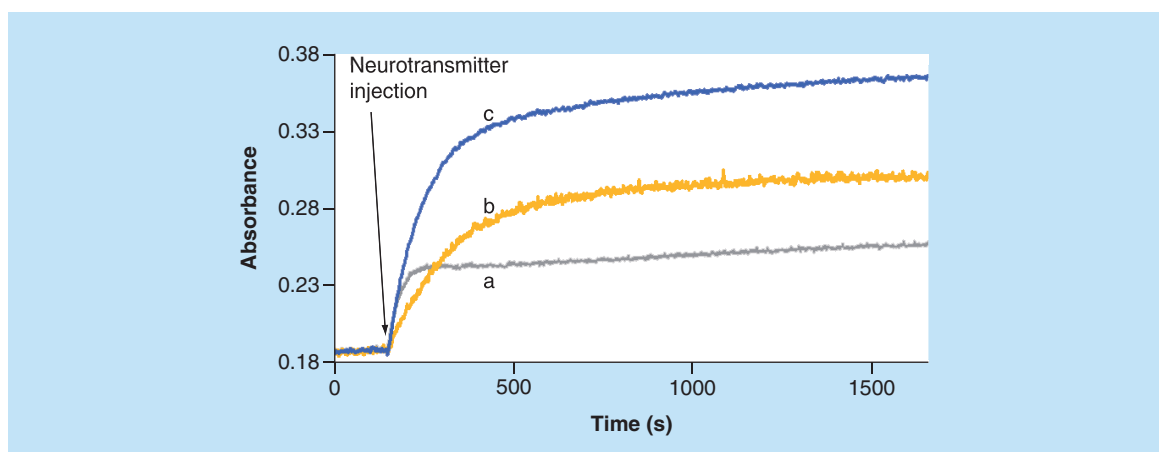
<sup>†</sup> 'x' being dopamine concentration in M, in the calibration line.

was selected as the optimum (for working in equilibrium methods) because the changes at 400 nm are sufficiently fast and the changes at 480 nm do not cause interference. The effect of the buffer composition (acetate, phosphate, etc.) and its concentration ( $0.1 \text{ M}$ ,  $0.01 \text{ M}$ ) was also studied. However, no differences were observed in any case. The analytical characteristics of the enzymatic method based on the intrinsic absorption of Lac in the optimal conditions are summarized in Table 2. The spectra obtained for the calibration points are shown in Figure 2A.

Working at  $\text{pH} = 4.5$  also permits the determination of DA, but measuring in this case the PDop absorption (at 480 nm). However, if this alternative is to be used, better results are obtained by working at  $\text{pH} = 6.0$ . The analytical capabilities of this method using the previously optimized Lac concentration ( $16.4 \text{ U ml}^{-1}$ ) are also shown in Table 2 and the spectra of the calibration study in Figure 2B. The Michaelis–Menten constant obtained for Lac ( $K_{m,\text{Lac}}$ ) in these conditions was  $1.94 \text{ mM}$  (Supplementary Figure 5), which is comparable to that obtained by other authors in similar experimental conditions [39]. As can be seen, working at  $\text{pH} = 6$  the sensitivity is higher than at  $\text{pH} 4.5$  and it could be an interesting alternative for DA determination in batch.

As stated above, DA is a Ner of the CNS where other catechol Ner such as Epi and NorEpi may also appear. For many biological applications, the total concentration of Ner is more important than the individual concentrations.

For this reason, the response of these compounds to Lac was also studied. To do this, the variation of  $\text{Abs}_{400 \text{ nm}}$  with the two Ner was obtained in a concentration of around  $0.05 \text{ mM}$  (which is within the linear range of Lac-DA). As can be seen in Figure 4, either Epi or NorEpi react with Lac but at a reaction rate much lower than DA. We also studied the response of Lac with different solutions containing NorEpi, Epi and DA at different relationships. To maximize the DA response against the two other catecholamines, measurements were made in kinetic mode.



**Figure 4.** Effect of norepinephrine and epinephrine on the dopamine signal. Variation of absorbance of Lac ( $16.4 \text{ U ml}^{-1}$  in acetate buffer [pH 4.5;  $0.1 \text{ M}$ ]) at  $400 \text{ nm}$  after the addition of (A) DA  $50 \text{ }\mu\text{M}$ ; (B) NorEpi  $50 \text{ }\mu\text{M}$  and Epi  $50 \text{ }\mu\text{M}$ ; (C) DA  $50 \text{ }\mu\text{M}$ , NorEpi  $50 \text{ }\mu\text{M}$  and Epi  $50 \text{ }\mu\text{M}$ . DA: Dopamine; Epi: Epinephrine; Lac: Laccase; NorEpi: Norepinephrine.

**Table 3.** Selective determination of dopamine in synthetic samples of urine containing the three neurotransmitters in the molar ratio found in biological fluids in patients with normal and abnormal contents.

Figures of merit	DA, standard	Normal samples	Abnormal samples
Calibration line	$400.5x + 0.0063$	$398.6x + 0.0073$	$410.1x + 0.016$
Lineal range	$25\text{--}250 \text{ }\mu\text{M}$	$25\text{--}250 \text{ }\mu\text{M}$	$30\text{--}250 \text{ }\mu\text{M}$
RSD (n = 5)	4.2%	4.3%	4.2%

DA is determined measuring  $d\text{Abs}_{400\text{nm}}$  (x being dopamine concentrations in M, in the calibration lines).  
DA: Dopamine; Lac: Laccase; Ner: Neurotransmitter.

**Table 4.** Total neurotransmitters determination in synthetic samples of urine containing the three neurotransmitters in the molar ratio found in biological fluids in patients with normal and abnormal contents

Figures of merit	Ner, standard	Normal samples	Abnormal samples
Calibration line	$2728x + 0.018$	$2756x + 0.002$	$2804x + 0.025$
Lineal range	$25\text{--}250 \text{ }\mu\text{M}$	$25\text{--}250 \text{ }\mu\text{M}$	$25\text{--}250 \text{ }\mu\text{M}$
RSD (n = 5)	3.4%	3.8%	3.8%

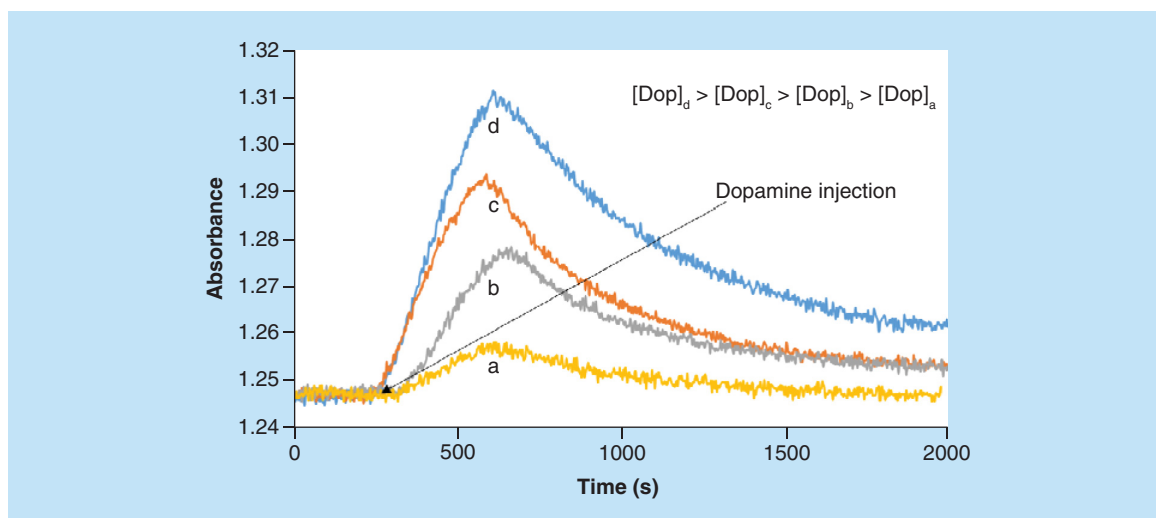
Ner are determined measuring the  $\delta\text{Abs}_{480}$  (polydopamine absorbance) when the equilibrium is reached.  
Ner: Neurotransmitter.

It was found that it is possible to determine DA in the presence of the two other Ner measuring the reaction changes at  $400 \text{ nm}$  during the first  $30 \text{ s}$  ( $d\text{Abs}_{400} = \Delta\text{Abs}_{400}/\Delta t_{30}$ ), if the DA/(NorEpi + Epi) ratio is 1 or higher. Moreover, the total Ner concentration can also be calculated from the total absorbance variation at  $480 \text{ nm}$   $\Delta\text{Abs}_{480}$  ( $\Delta\text{Abs}_{480} = \text{Abs}_{480,\text{max}} - \text{Abs}_{480,0}$ ) observed during the reaction.

Two calibration studies were performed using synthetic urine samples containing normal (2.5) and pathological (1.5) DA/(NorEpi + Epi) ratios usually found in this type of fluid (e.g., ClinCheck<sup>®</sup> [40]), and the results were compared with those obtained using synthetic samples containing the same concentration of DA alone (Tables 3 & 4). The slopes of the calibration lines obtained measuring  $d\text{Abs}_{400}$  (Table 3) were statistically similar (95%) for DA and the synthetic urine samples containing Ner, indicating that DA determination can be carried out without the interference of the Epi and NorEpi. Moreover, the slopes of the calibration lines obtained using  $\Delta\text{Abs}_{480}$  (Table 4) were also statistically similar (95%), which permits using this parameter for the total Ner determination.

### Label-free platform

Lac was immobilized in polyacrylamide films as the basis of the biosensor platform. Lac was entrapped during the polymerization of acrylamide and bis-acrylamide following the procedure described above [7] (see 'Sensor film preparation' section). The Lac film was placed in a homemade flowcell (Supplementary Figure 1) and the changes



**Figure 5.** Variation of absorbance (at 400 nm) of a polyacrylamide laccase film (350 U) at different concentrations of dopamine. Flow of  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$  and 3 min injection in acetate buffer (pH 4.5; 0.1 M). DA concentrations: (a)  $120 \mu\text{M}$ ; (b)  $360 \mu\text{M}$ ; (c)  $600 \mu\text{M}$ ; (d)  $840 \mu\text{M}$ . DA: Dopamine.

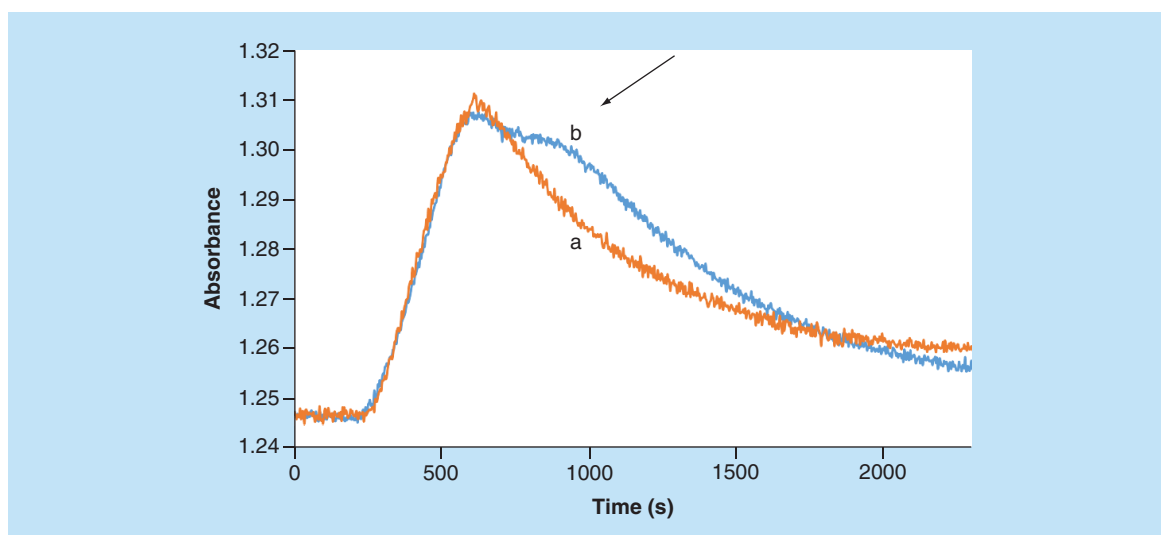
in absorbance at 400 nm with time were measured, using the acetate buffer (pH 4.5; 0.1 M) as the carrier solution at a flow rate of  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$ .

Figure 5 shows the absorbance changes at the chosen wavelength (400 nm) obtained during a calibration study. The lower sensitivity of this continuous methodology (compared with the method in solution) was expected due to the measurement procedure and the immobilization of the enzyme. The reversibility of the enzyme and thus the continuous monitoring of the reactions were achieved thanks to the re-oxidation of the enzyme with the oxygen dissolved in solution.

The analytical characteristics of the methodology were studied by injecting 1.5 ml of the desired solution in the carrier solution. This showed a linear range for DA, which goes from 100 to up least  $900 \mu\text{M}$ , and an RSD of 5.3% when measuring both the peak height (H) and peak area (S) of the transient signal. The  $K_m$  obtained for Lac in the solid phase was 8.04 mM (Supplementary Figure 6), which is, at the light of the experimental results, higher than that in solution. The lifetime of the sensor film was about 1 week; during this time, 32 measurements were carried out using solutions containing  $560 \mu\text{M}$  DA, and a relative standard deviation (RSD) of about 8% was obtained ( $n = 32$ ). From this measurement a diminution in sensitivity was observed which was statistically different from those previously obtained.

The response of the biosensor film in the presence of NorEpi and Epi in ratios similar to those of the urine synthetic samples, described in the previous section, was also studied (with the Ner ratio found in normal or abnormal biological fluids) and compared with those of solutions containing only DA. Figure 6 shows the variation in  $\text{Abs}_{400 \text{ nm}}$  with time of the biosensor film for a solution containing only DA and another solution with the synthetic sample (in both cases, the concentration of DA is the same). It can be observed that the changes in absorbance during the first seconds and until the signal reaches the maximum values (H) are the same in both cases. However, some differences were observed in the regeneration process (S). These differences could be assumed to be due to the different reaction rates of Lac with these Ner. As has been seen in the batch measurements, the DA reaction is faster and therefore the initial change can be assumed to be due only to this compound. Subsequently, the NorEpi or Epi reacts and leads to a second oxidation process, as can be deduced from the shape of the signal. The changes in the initial signal were evaluated and related to the concentration of DA in the sample.

These results suggest that both DA alone and total Ner can be determined from the analytical signal. According to this, the H and the S of the signal should be dependent on the DA concentration, and the total DA + NorEpi + Epi concentrations, respectively. In order to test this, calibration studies were performed using solutions containing DA alone and solutions containing the three Ner in proportions similar to that of the pathological Ner/DA ratio. The results are summarized in Table 5. As can be seen, no significant differences ( $p = 0.05$ ) were obtained in the slope of the calibration lines obtained using H, which allows the DA determination in the presence of NorEpi and



**Figure 6.** Effect of norepinephrine and epinephidrine on dopamine signal in the optical sensor. Variation of absorbance (at 400 nm) of a polyacrylamide Lac film (350 U) with (a) DA 840  $\mu\text{M}$ ; (b) DA 840  $\mu\text{M}$ , NorEpi 500  $\mu\text{M}$  and Epi 100  $\mu\text{M}$  (flow rate 0.5 ml  $\text{min}^{-1}$ , 3 min injection in acetate buffer [pH 4.5; 0.1 M]). DA: Dopamine; Epi: Epinephrine; Lac: Laccase; NorEpi: Norepinephrine.

**Table 5.** Comparison of the analytical characteristics of the label-free platform for the determination of dopamine (by measuring  $\Delta \text{Abs}_{400}$ ) and the total neurotransmitter (by measuring area) in standard and synthetic urine samples containing abnormal concentrations (x being DA or neurotransmitter concentrations in M).

Figures of merit	H, DA	H, Ner	S, DA	S, Ner
Calibration line	$76.5x + 0.00$	$73.0x + 0.00$	$54826x - 0.5$	$56454x - 6$
Lineal range	100–900 $\mu\text{M}$	100–900 $\mu\text{M}$	100–900 $\mu\text{M}$	100–900 $\mu\text{M}$
RSD (n = 5)	5.3%	5.8%	4.7%	5.4%

DA: Dopamine; Ner: Neurotransmitter.

Epi. Moreover, neither were significant differences observed between the slope of the calibration lines using S for DA and DA + NorEpi + Epi, indicating that the S could be used for the total Ner determination. In both cases the RSD values are lower than 6%.

## Conclusion

A label-free platform for DA determination has been developed based on the intrinsic properties of the enzyme Lac during its enzymatic reaction. The method was first optimized in batch and afterward the enzyme was entrapped into a polyacrylamide film, the basis of the label-free platform. The response is only dependent on the analytical signal of the enzyme involved in the reaction. This platform present two important advantages compared with other previously reported optical sensor for DA: it is based on a real label-free bioreceptor and it can be used in continuous mode. The method has been optimized for DA determination in the presence of other Ner such as NorEpi and Epi, two compounds that are usually found in the same samples as DA, with good results. Moreover, it has also been possible to determine the total concentration of the three Ner.

## Future perspective

From the results given, the biosensor described in this paper can be applied for DA monitoring in urine samples coming from patients being treated with L-dopa. According to the results, the device is able to give a measurement in about 15 min, during about 7.5 h (considering that 32 measurements could be done with the same film). Alternatively, the system permits making a measurement every 60 min during more than 1 day, which is the time usually programmed for drug elimination studies. This could be one of the most interesting applications of this methodology.



In our opinion, the field of biosensors is going to develop toward systems which are able to continuously monitor the analyte concentration, instead of single-use systems, and this type of biosensor is only possible if the biological receptor can be used several times without the necessity of a regeneration step. The use of the intrinsic spectroscopic properties of enzymes is a very interesting possibility. However, this requires having reliable information about the kinetic of the enzyme to be used as a basis of the system.

#### Executive summary

- The possibilities offered by the use of the intrinsic spectroscopic properties of tyrosinase and laccase as label-free systems for dopamine (DA) determination without the interference of other neurotransmitters have been studied. Laccase gives better analytical capabilities.
- Using this enzyme, DA can be determined in a batch mode, working at 400 nm and after setting the pH to 4.5. However, the best possibilities of the system are obtained after immobilizing the enzyme into a polyacrylamide film (label-free platform).
- The transient analytical signals obtained with this label-free platform are reversible, at least, during 32 cycles. From each transient signal, it is possible to determine both DA (from the peak height of the signal) and the DA + epinephrine + norepinephrine (from the area of the signal) concentrations in the same measurement.
- The analytical capabilities of this system permit its use for pharmacokinetics studies of DA elimination through urine.

#### Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: [www.future-science/doi/suppl/10.4155/bio-2017-0161](http://www.future-science/doi/suppl/10.4155/bio-2017-0161)

#### Financial & competing interests disclosure

This work was supported by the MINECO of Spain (projects CTQ2012-34774 and 2016-76846R); the Gobierno de Aragón (DGA-FEDER) (Research Group E-74); the Gobierno de Aragón and the Fondo Social Europeo (grant J Navarro). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

#### References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

1. Wang X, Wolfbeis OS. Fiber-optic chemical sensors and biosensors (2013–2015). *Anal. Chem.* 88, 203–227 (2016).
  2. Galbán J, Sanz-Vicente I, Ortega E, del Barrio M, de Marcos S. Reagentless fluorescent biosensors based on proteins for continuous monitoring systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 3039–3054 (2012).
  3. Permyakov EA. *Luminescent Spectroscopy of Proteins*. CRC Press, FL, USA, (1993).
  4. Trettnak W, Wolfbeis OS. A fully reversible fiber optic glucose biosensor based on the intrinsic fluorescence of glucose oxidase. *Anal. Chim. Acta* 221, 195–203 (1989).
  5. Galban J, Sanz-Vicente I, Navarro J, de Marcos S. The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review. *Methods Appl. Fluoresc.* 4, 042005 (2016).
  6. Astuti Y, Topoglidis E, Cass AG, Durrant JR. Direct spectroelectrochemistry of peroxidases immobilised on mesoporous metal oxide electrodes: towards reagentless hydrogen peroxide sensing. *Anal. Chim. Acta* 648, 2–6 (2009).
  7. Sanz V, de Marcos S, Galbán J. A reagentless optical biosensor based on the intrinsic absorption properties of peroxidase. *Anal. Chim. Acta* 502, 7–13 (2004).
- **Represents an update of the different biochemical reagents which have been used for label-free biosensor. The analytical figures of merit and the most interesting applications of continuous monitoring systems based on these type of receptors are also reviewed.**
  - **A very interesting introductory book for studying the intrinsic fluorescence of the enzymes (in the UV zone) and their biochemical applications.**
  - **It is the seminal paper dealing with the utilization of the FAD fluorescence properties of flavoproteins for optical biosensors development.**
  - **From many papers dealing with the optical properties of the different peroxidase species, this paper undoubtedly relates their electrochemistry and the spectrophotometric properties.**
  - **Details the procedure for the preparation of a label-free platform similar to that used in this paper.**

8. Sanz J, de Marcos S, Galbán J. Autoindicating optical properties of laccase as the base of an optical biosensor film for phenol determination. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 351–359 (2012).
9. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2563–2605 (1996).
10. Ribeiro JA, Fernandes PMV, Pereira CM, Silva F. Electrochemical sensors and biosensors for determination of catecholamine neurotransmitters: a review. *Talanta* 160, 653–679 (2016).
11. Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: a never ending story. *Cell. Mol. Life. Sci.* 67, 369–385 (2010).
- **Compiles important aspects related with the scientific and industrial aspects of the laccase, including information about different families of this enzyme.**
12. Xu F. Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production, and applications. In: *Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Flickinger MC, Drew SW (Eds). John Wiley & Sons, NY, USA, 1545–1554 (1999).
13. Schultz W. Multiple functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288 (2007).
14. Scatron B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* 275, 321–328 (1983).
15. Yusoff N, Pandikumar A, Ramaraj R, Lim HN, Huang NM. Gold nanoparticle based optical and electrochemical sensing of dopamine. *Microchim. Acta* 182, 2091–2114 (2015).
16. van Staden JF, van Staden RI. Flow-injection analysis systems with different detection devices and other related techniques for the *in vitro* and *in vivo* determination of dopamine as neurotransmitter. A review. *Talanta* 102, 33–43 (2012).
17. Wang HY, Sun Y, Tang B. Study on fluorescence property of dopamine and determination of dopamine by fluorimetry. *Talanta* 57, 899–907 (2002).
18. Chen SM, Peng KT. The electrochemical properties of dopamine, epinephrine, norepinephrine, and their electrocatalytic reactions on cobalt(II) hexacyanoferrate films. *J. Electroanal. Chem.* 547, 179–189 (2003).
19. van Schoorsa J, Viaeneb J, van Wanseele Y *et al.* An improved microbore UHPLC method with electrochemical detection for the simultaneous determination of low monoamine levels in *in vivo* brain microdialysis samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127, 136–146 (2016).
20. de Benedetto GE, Fico D, Pennetta A *et al.* A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98, 266–270 (2014).
21. Seto D, Maki T, Soh N, Nakano K, Ishimatsu R, Imato T. A simple and selective fluorometric assay for dopamine using calcein blue-Fe<sup>2+</sup> complex fluorophore. *Talanta* 94, 36–43 (2012).
22. Wang Y, Xiao Y. Glassy carbon electrode modified with poly(dibromofluorescein) for the selective determination of dopamine and uric acid in the presence of ascorbic acid. *Microchim. Acta* 178, 123–130 (2012).
23. Bujduveanu MR, Yao W, Le Goff A *et al.* Multiwalled carbon nanotube-CaCO<sub>3</sub> nanoparticle composites for the construction of a tyrosinase-based amperometric dopamine biosensor. *Electroanalysis* 25, 613–619 (2013).
24. Cesarino I, Galesco HV, Moraes FC, Lanza MRV, Machado SAS. Biosensor based on electrocodeposition of carbon nanotubes /polypyrrole/laccase for neurotransmitter detection. *Electroanalysis* 25, 394–400 (2013).
25. Quan D, Shin W. Amperometric detection of catechol and catecholamines by immobilized laccase from DeniLite. *Electroanalysis* 16, 1576–1582 (2004).
26. Ding L, Qin ZW, Xiang CL, Zhou G. Novel fluorescent organic nanoparticles as a label-free biosensor for dopamine in serum. *J. Mat. Chem. B* 5, 2750–2756 (2017).
27. Rasheed P, Lee JS. Recent advances in optical detection of dopamine using nanomaterials. *Microchim. Acta* 184, 1239–1266 (2017).
- **Represents an update of the state of the art for dopamine determination using optical sensors based on nanomaterials.**
28. Chen XQ, Zheng N, Chen SF, Ma Q. Fluorescence detection of dopamine based on nitrogen-doped graphene quantum dots and visible paper-based test strips. *Anal. Methods* 9, 2246–2251 (2017).
29. Zhao JJ, Zhao LM, Lan CQ, Zhao SL. Graphene quantum dots as effective probes for label-free fluorescence detection of dopamine. *Sens. Actuators B* 223, 246–251 (2016).
30. Zhou X, Ma PP, Wang AQ *et al.* Dopamine fluorescent sensors based on polypyrrole/graphene quantum dots core/shell hybrids. *Biosens. Bioelectron.* 64, 404–410 (2015).
31. Qu KG, Wang JS, Ren JS, Qu XG. Carbon dots prepared by hydrothermal treatment of dopamine as an effective fluorescent sensing platform for the label-free detection of Iron(III) ions and dopamine. *Chem. Eur. J.* 19, 7243–7249 (2013).
32. Wang HB, Zhang HD, Chen Y, Huang KJ, Liu YM. A label-free and ultrasensitive fluorescent sensor for dopamine detection based on double-stranded DNA templated copper nanoparticles. *Sens. Actuators B* 220, 146–153 (2015).
33. Wang P, Xia M, Liang O *et al.* Label-free SERS selective detection of dopamine and serotonin using graphene-Au nanopyramid heterostructure. *Anal. Chem.* 87, 10255–10261 (2015).

34. Luo YH, Ma L, Zhang XH, Liang AH, Jiang ZL. SERS detection of dopamine using label-free acridine red as molecular probe in reduced graphene oxide/silver nanotriangle sol substrate. *Nano. Res. Lett.* 10, 230–234 (2015).
35. Davidson DF. Elevated urinary dopamine in adults and children. *Ann. Clin. Biochem.* 42, 200–207 (2005).
  - **This is a very important reference for understanding how the dopamine concentration levels in urine change after L-dopa ingestion in patients.**
36. Davidson DF, Grosset K, Grosset D. Parkinson's disease: the effect of L-dopa therapy on urinary free catecholamines and metabolites. *Ann. Clin. Biochem.* 44, 364–368 (2007).
  - **This is a very important reference for understanding how the dopamine concentration levels in urine change after L-dopa ingestion in patients.**
37. Sigma Aldrich. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
38. BioRad. [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)
39. Frasconi M, Favero G, Boer H, Koivula A, Mazzei F. Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 899–908 (2010).
40. Recipe. ClinChek urine controls information (Biogenic Amines section). [www.recipe.de/en/products\\_qa\\_chek\\_cont.html](http://www.recipe.de/en/products_qa_chek_cont.html)



TOPICAL REVIEW

## The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review

To cite this article: Javier Galbán *et al* 2016 *Methods Appl. Fluoresc.* 4 042005

View the [article online](#) for updates and enhancements.

### You may also like

- [Interfacial Behavior of Fluorescent Species Associated with Dendritic Polymers at Polarized Liquid-Liquid Interfaces](#)  
Hiroki Sakae, Masataka Fujisawa, Hirohisa Nagatani *et al.*
- [Metabolic activity and intracellular pH in induced pluripotent stem cells differentiating in dermal and epidermal directions](#)  
Svetlana A Rodimova, Aleksandra V Meleshina, Ekaterina P Kalabusheva *et al.*
- [Polyacrylamide-based phantoms of human skin for hyperspectral fluorescence imaging and spectroscopy](#)  
V.V. Shupletsov, E.A. Zherebtsov, V.V. Dremine *et al.*

### Recent citations

- [Thanvaporom Kleekayai and Richard J. FitzGerald](#)
- [Competition between Photoinduced Electron Transfer and Resonance Energy Transfer in an Example of Substituted Cytochrome c-Quantum Dot Systems](#)  
Jakub Sawski *et al*
- [Excitation-scanning hyperspectral video endoscopy: enhancing the light at the end of the tunnel](#)  
Craig M. Browning *et al*

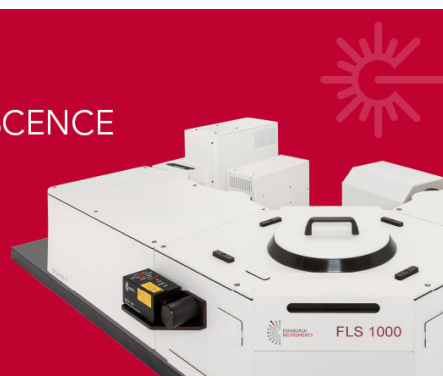


EDINBURGH  
INSTRUMENTS

**EXPERTS IN  
FLUORESCENCE.**

edinst.com

**FLS1000**  
PHOTOLUMINESCENCE  
SPECTROMETER



# Methods and Applications in Fluorescence



## TOPICAL REVIEW

# The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review

RECEIVED  
21 August 2015

REVISED  
27 October 2016

ACCEPTED FOR PUBLICATION  
15 November 2016

PUBLISHED  
19 December 2016

Javier Galbán, Isabel Sanz-Vicente, Jesús Navarro and Susana de Marcos

Faculty of Sciences, Analytical Chemical Department, Analytical Biosensors Group (GBA), Institute of Nanoscience of Aragón, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

E-mail: [jgalban@unizar.es](mailto:jgalban@unizar.es)

**Keywords:** FAD fluorescence, flavoenzymes, optical biosensors, enzyme kinetic, intrinsic and induced fluorescence

## Abstract

This review (with 106 references) mainly deals with the analytical applications of flavin-adenine dinucleotide (FAD) fluorescence. In the first section, the spectroscopic properties of this compound are reviewed at the light of his different acid–base, oxidation and structural forms; the chemical and spectroscopic properties of flavin mononucleotide (FMN) and other flavins will be also briefly discussed.

The second section discusses how the properties of FAD fluorescence changes in flavoenzymes (FvEs), again considering the different chemical and structural forms; the glucose oxidase (GOx) and the choline oxidase (ChOx) cases will be commented.

Since almost certainly the most reported analytical application of FAD fluorescence is as an auto-indicator in enzymatic methods catalysed by FvE oxidoreductases, it is important to know how the concentrations of the different forms of FAD changes along the reaction and, consequently, the fluorescence and the analytical signals. An approach to do this will be presented in section 3.

The fourth part of the paper compiles the analytical applications which have been reported until now based in these fluorescence properties. Finally, some suggestions about tentative future research are also given.

In the last decades, the research related to optical chemical (bio)sensors has undergone an exponential increase. The final purpose of this investigation is the development of efficient and autonomous systems capable of continuous monitoring (bio)chemical parameters in clinical, environmental, food or industrial samples [1–5].

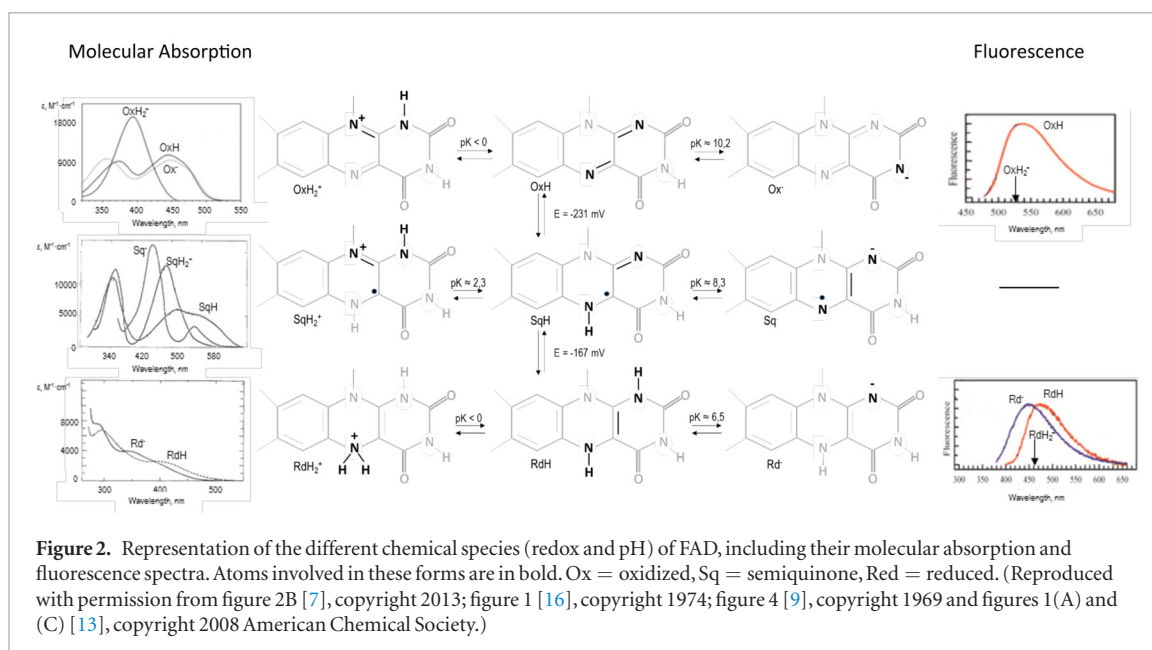
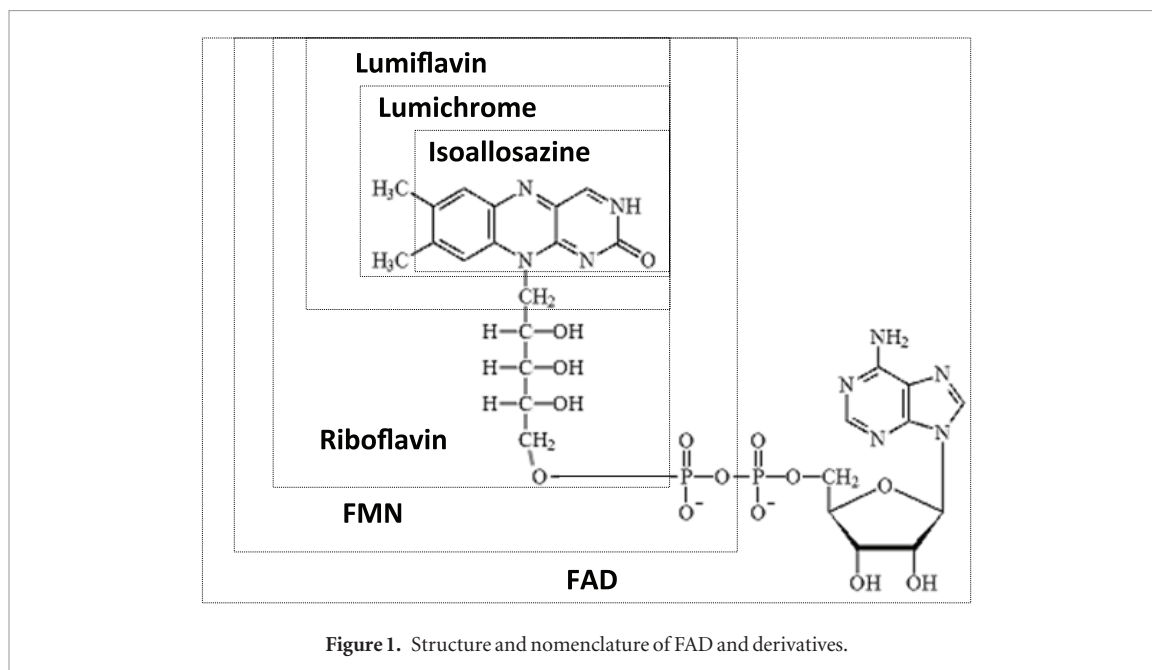
To do that, the main target is the selection of the (bio)receptor which should have the appropriate selectivity, sensitivity, concentration range response. In addition, it should be also stable after integration in a solid support. Although the literature gives examples of (bio)receptors which are chemically adequate, there is a lack of efficient and autonomous systems capable of continuous monitoring the (bio)chemical parameter. This is because the (bio)receptor should also meet some additional requirements:

1. It is strongly advisable that the (bio)receptor has transducer capacity. For optical continuous monitoring systems this usually means that the receptor (or any of the samples components),

should have molecular absorption or fluorescence properties that change during the recognition event. That is, they should be auto-indicated systems.

2. It is also highly desirable for the recognition event to be represented as a single reaction between (bio)receptor and the analyte, which simplifies the system and facilitates its autonomy.
3. It should be easily regenerated, or preferably auto-regenerated, after the reaction. Regeneration should be complete (100%), otherwise the bio(receptor) lifetime becomes reduced and the (bio)chemical systems quickly loses its calibration.

Using the analytical possibilities that the flavoenzymes (FvEs) offer they can circumvent the three above-mentioned drawbacks. As will be discussed along the paper, the FvEs are enzymes containing a flavin nucleotide (FMN or FAD) (figure 1) as a prosthetic group that show fluorescence (and absorption) properties which



change during the enzymatic reaction; in addition, they are regenerated after the reaction by the oxygen in solution and thus avoid the necessity to couple any other dye or indicator to follow the enzymatic reaction. Then, they can be considered as label-free receptors.

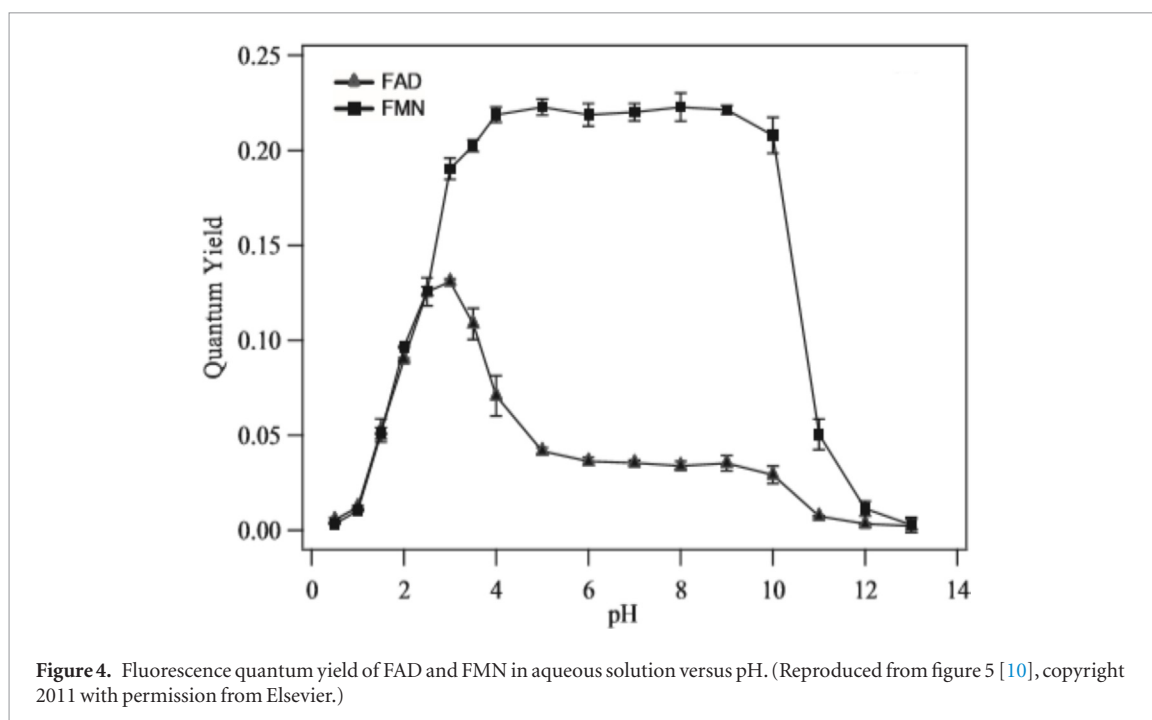
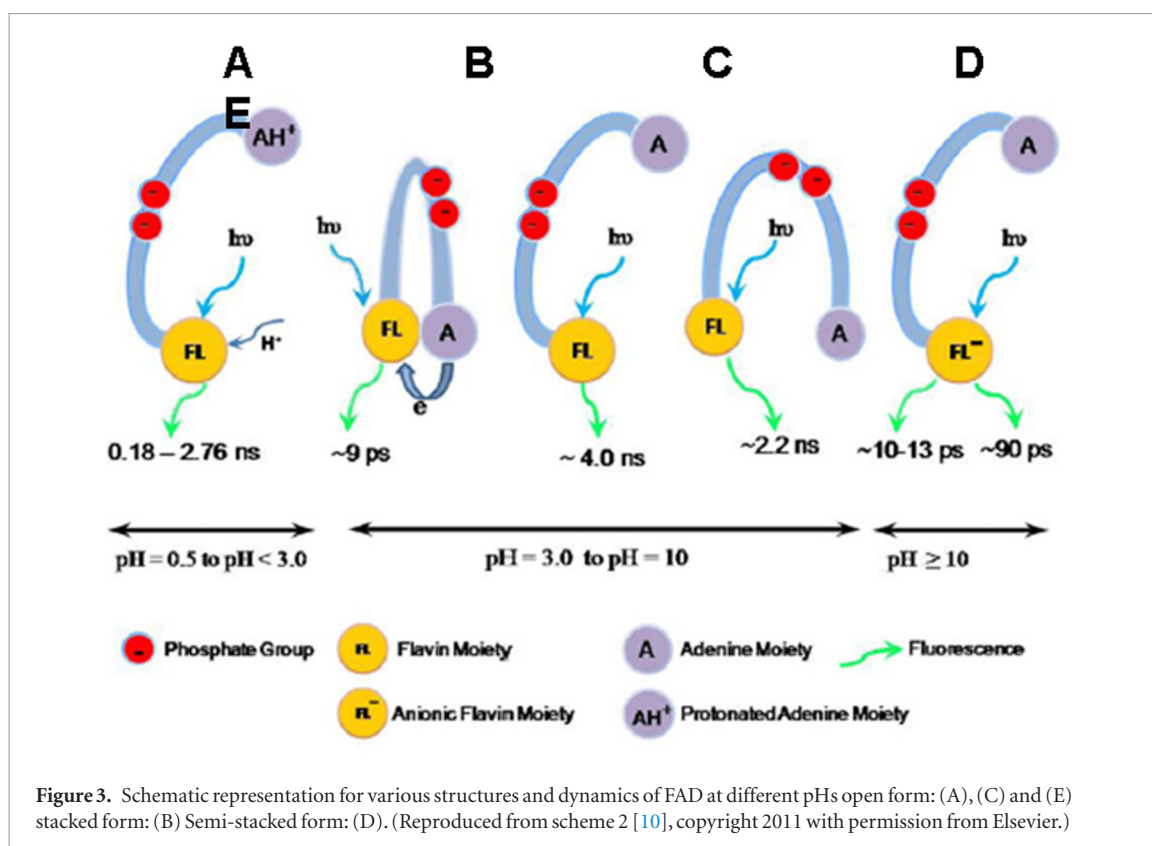
In this paper we review the fluorescence properties of free FAD (and other flavins), how they change when the flavins take part of FvEs and the applications of FAD fluorescence, especially in analytical methods.

## 1. Spectroscopic properties of flavins

### 1.1. General ideas

The spectroscopic properties of all the components of the flavin family are similar because they have in common the isoalloxazine system which is responsible for these properties [6]. Due to this system, flavins have three different oxidation states: oxidized

(quinone), half-reduced (semiquinone) and reduced (hydroquinone). Moreover, each oxidation state has three acid–base forms (cationic, neutral and anionic) depending on the pH [6]. Figure 2, shows the different oxidation states and the acid–base forms; the atoms involved in the redox and the acid–base processes are highlighted. This figure also shows the spectra characterizing the UV–vis molecular absorption and fluorescence of each species. It should be noted that the semiquinone state is unstable in solution [7] (only the absorption spectra for this species have been reported), while the reduced form needs a strongly reducing environment in order to be stabilized. Although all the forms have their chemical interest, the most important are those predominant at physiological pH values and in oxidized state. The following nomenclature will be used throughout the manuscript: subscripts ‘ox’, ‘sq’ and ‘rd’ will be used for oxidized, semiquinone and



reduced forms respectively:  $\text{H}_2\text{Ox}^+$ ,  $\text{HOx}$ ,  $\text{Ox}^-$  for acid, neutral and anionic oxidized forms (the same for 'rd' and 'sq' oxidation states).

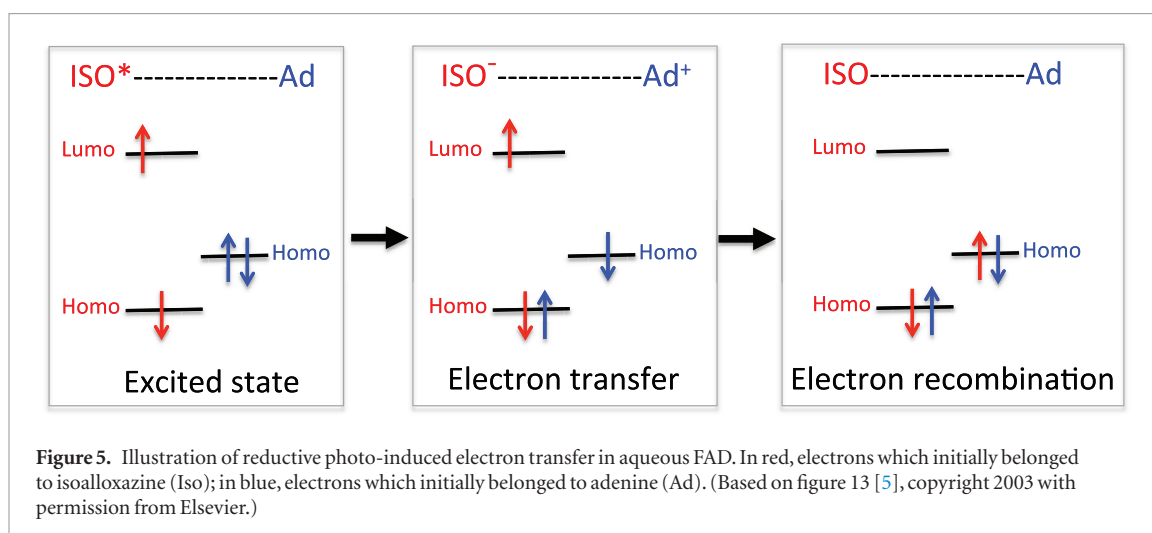
Absorption spectra are influenced by both redox potential of the isoalloxazine system and by the pH [8–10], but are almost independent of the flavin skeleton (FAD, FMN, riboflavin) [11], because in the same oxidation state and acid–base form, they have similar absorption spectra; for example, riboflavin, lumiflavin, FMN and FAD present all bands at 450 and 370 nm with

similar molar absorptivities (around 12 000 and 11 000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  respectively). The fluorescence of flavins appears mainly in the neutral form. The cationic form is practically non-fluorescent and the anionic form is weakly fluorescent [9, 10].

## 1.2. Oxidized forms

Although the molecular absorption properties of most flavins are very close to each other, the fluorescence properties are different, especially those of FAD





(lumiflavin, riboflavin, FMN, FAD quantum yields are 0.29, 0.27, 0.22, 0.04 and average lifetimes are 5.2, 5.06, 4.70, 2.27 ns respectively) [8–10, 12, 13]; this is mainly due to the adenine ring. This ring may be folded over the isoalloxazine system, resulting in a less fluorescent conformation [8, 12, 14]. This is the so-called stacked conformation in opposition with the open conformation (figure 3).

In order to understand how these conformational changes affect the fluorescence changes in the oxidized state, the quantum yields and lifetimes of  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  have been studied in solution at different pH values [8, 12] (figure 4). Below pH 1, the amount of the cationic form is considerable and therefore the fluorescence is weak. In the pH range of 1–2.5, the low fluorescence is explained by considering that the N5 pK in excited state is about 2.5. Up to this pH there are no differences between the FAD and other flavins. However, in the pH range from 3 to 10, the differences between FAD and flavins are important. In this pH interval the stacked conformation is predominant due to the dipolar attraction between the isoalloxazine system and the adenine system, and photo-induced electron transfer (ET) occurs from adenine to isoalloxazine; in the open conformation this process does not occur because the distance (ribityl bridge) between the electron donor (adenine) and the electron acceptor (isoalloxazine) is too large; figure 5 shows the schematic photo-induced ET in FAD. These interactions reduce the quantum yield of  $\text{FAD}_{\text{ox}}$ . Above pH 10, the deprotonation of N3, whose pK is 9.75, reduces the fluorescence of both FAD and flavins.

Lifetime studies of  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  and  $\text{FMN}_{\text{ox}}$  permit giving additional conclusions about the prevalence of the  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  conformers [8, 10] (figure 3). So, below pH 2.5, there is a single exponential decay with a progressive increase in lifetime from 0.18 to 2.76 ns. The lifetime is still lower than the neutral form of any flavin, because in this pH range protonation of N5 in the excited state occurs (pk 2.5). In the pH range from

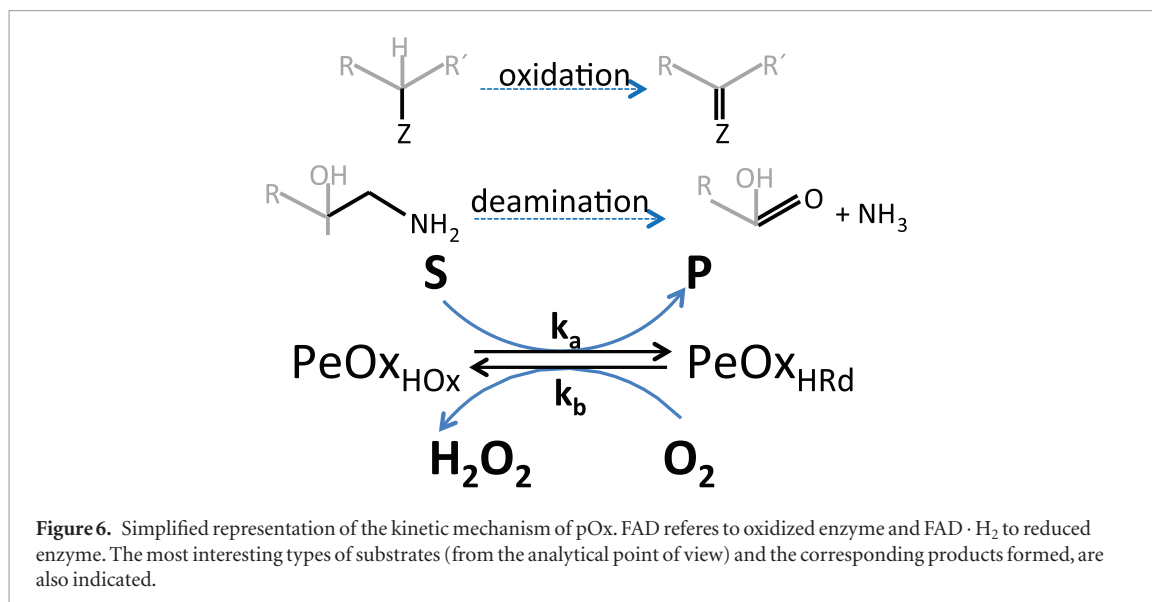
3 to 9 there is a biexponential decay. The first component has a lifetime of 2.2 ns and the second between 3.5 and 4.0 ns. The longer life corresponds to an open  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  conformer because  $\text{FMN}_{\text{ox}}$  has a similar value (the small differences are attributed to an extra phosphate group in  $\text{FAD}_{\text{ox}}$ ). The smaller lifetime is caused by a semi-stacked form that interacts with the adenine but not optimally, since the closed form of  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  has a much lower lifetime, 5–9 ps [15]. Above pH 10, there is a new component of 90 ps. This component is due to deprotonation of the  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  (adenine ring), which is not observed in the other flavins.

Finally, FAD and FMN tend to form dimers in solution [16]. The absorption and fluorescence spectra of these dimers are similar to those of the corresponding monomers; however, they produce an additional lifetime component (about 30 ps) and their molar absorptivities are smaller.

### 1.3. Reduced forms

There are few studies about the fluorescence of the reduced state of flavins in solution. After borohydride addition, an emission spectrum of 3,4-dihydrolumiflavin was obtained with the excitation wavelength at 405 nm and the emission wavelength at 475 nm [17]. Other studies of modified flavins in reduced state have shown that it is necessary to work with rigid media at a low temperature in order to observe the fluorescence [18].

First emission spectra of  $\text{FADH}_{\text{rd}}$  and  $\text{FAD}_{\text{rd-}}$  were measured by Kao *et al* [13]. The excitation wavelength was 360 nm and the emission wavelength 455 nm for anionic hydroquinone and 480 nm for neutral hydroquinone. In this study it was demonstrated that the fluorescence of the reduced state in solution was lesser than the fluorescence of reduced flavoproteins. In addition the deactivation of anionic reduced flavin (both those coming from FMN and FAD) was very fast. Upon 325 nm excitation, the fluorescence transient at 450 nm emission exhibits multiple decay dynamics in 5.0 ps (84%), 31 ps (13%) and 2.0 ns (3%).



## 2. Flavin groups in FvEs: spectroscopic properties

### 2.1. Types of FvEs

Flavoproteins and, consequently FvEs, refers to a very huge protein family containing flavin groups [19, 20]; according to a survey by Nacheroux *et al* published in 2011 [21], 276 flavoproteins were fully characterized and information from another 98 (unclassified or incompletely classified) were also been compiled from data obtained after reviewing the three most popular protein databases [22]: BRENDA, Protein Data Bank and Enzyme Structures Database. FvEs are involved in various biological processes [23], but most of these entries corresponded to oxidoreductases (91%), while smaller fractions corresponded to transferases (4.3%), lyases (2.9%), isomerases (1.4%) and ligases (0.4%) [20]. The majority of them contained FAD (about, 75%) and the remainder contained FMN; no flavoproteins containing just riboflavin were described.

The flavin group can be covalently attached to the flavoprotein (only about a 10% of all oxidoreductases) or tightly (but non covalently) attached [24, 25]. In the first case, flavin is always linked in the position 8 $\alpha$ , and in some cases the enzyme is linked by two sites in positions 8 $\alpha$  and 6 $\alpha$ . In the second case, flavin usually interacts across the phosphate group to the FvE.

The redox transformations that FvEs catalyze are typically oxidations, and according to the stoichiometry and the mechanism of the enzymatic reaction, oxidoreductases are usually split into two categories: monooxygenases (MOx) and pure oxidase (pOx). pOx are, by far, the most important for biotechnological and analytical applications, probably due to the fact that they only require O<sub>2</sub> as co-substrate for the real substrate oxidation. In biotechnology they present potential interest in pharmaceutical, fine-chemical and food industries. Regarding to analytical chemistry, there are several kinds commercially available for clinical and biological interesting substrates (analytes), and many

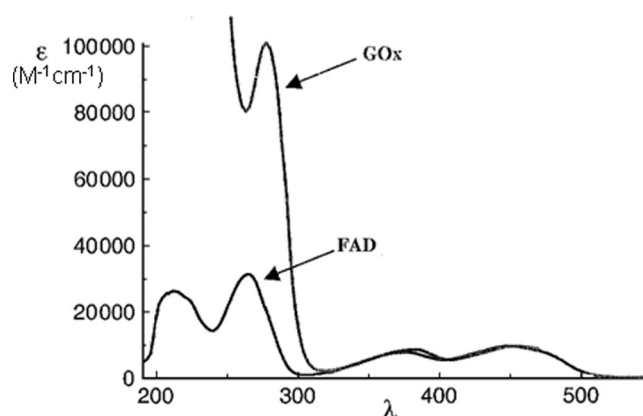
of those enzymes are stable or increase their stability after immobilization, so they are easier to implement in analytical sensors. This review is especially devoted to pOx, but MOx will also be briefly commented.

### 2.2. Chemical and structural aspects of pure oxidases

pOx contain generally FAD as cofactor. The whole enzymatic process they catalyze consists of two steps [25, 26]. In the first, often called the ‘reductive half reaction’, the FAD<sub>ox</sub> becomes reduced to FAD<sub>rd</sub> after oxidizing the substrate (S) to the final product (P). In the second, the ‘re-oxidative half reaction’, the FAD<sub>rd</sub> is oxidized back to FAD<sub>ox</sub>, usually by the O<sub>2</sub> present in the medium (figure 6).

Different types of substrates can suffer oxidation reactions mediated by pOx the most important being oxidative deamination and the oxidation of –ZH groups (Z = O, N, S) [27]. To the first group belong, for example, (D or L)-amino-acid oxidase (DAAO, LAAO) or monoamine oxidase (MAO-A, MAO-B) and, to the second group belong enzymes such as glucose oxidase (GOx), choline oxidase (ChOx), alcohol oxidase (AOx), cholesterol oxidase (COx) or lactate oxidase (LOx).

According to literature [25], this type of oxidoreductases can be classified in several families, the more relevant in the context of this review being the glucose-methanol-choline oxidoreductase family (GMC) and the amino oxidase family (AO). This classification arises from the structural similarities between members of the same family. For example, enzymes belonging to GMC share [25, 28] a conserved N-terminal domain where FAD is binding to the protein (by the phosphate of the ADP), a less conserved C-terminal domain where the substrate binds, a histidine critically involved in both half-reactions, a similar molecular mechanism for the reaction (the transfer of the hydride ion from the substrate to the FAD) and the same position for the substrate linking to FAD (N5). Taking all of these coincidences into account, a similar environment for FAD



**Figure 7.** Molecular absorption spectra obtained, expressed as molar absorptivity, for GOx ( $4.0 \times 10^{-5}$  M, *A. niger*) and FAD ( $8.0 \times 10^{-5}$  M). As each GOx contains two FAD molecules, the total concentration of FAD in both solutions is the same.

could be expected in the GMC family and also a similar behaviour of their fluorescence during the corresponding enzymatic reactions, but in fact this does not happen.

### 2.3. Chemical properties of FAD in pure oxidases

The most important differences between the properties of flavins when they are free or when they are taking part of FvEs in general, or pOx in particular, can be summarised as follows:

1. Their normal potential values appreciably change. For example, the standard reduction potential ( $E_0$ ) of the redox pair  $\text{FAD}_{\text{ox}}/\text{FAD}_{\text{rd}}$  could shift between  $-400$  to  $60$  mV depending on the FvEs [29]; as with free FAD,  $E_0$  in FvEs depend on the pH [30, 31]. The consequence is that the semiquinonic forms of the flavins, which are almost non-existent for free flavins are stabilized in some proteins so that their spectroscopic properties can be observed [32]. At physiological pH neutral and anionic semiquinone can be found, the pK being around 8.5.
2. Normally, the acid–base pK values of the oxidized or the reduced forms do not change appreciably (less than 1 pK values), but exceptions have been described [18]. Obviously, many FvE are not stable at extreme pH values. When proteins are brought to these values they denaturalize, so the properties observed correspond to these of the free forms. Considering the pK values given in figure 2, this is especially important for the oxidized forms; only the neutral oxidized species are stable. Similarly, only the basic and neutral reduced forms are stable. Regarding the semiquinonic forms, in some cases (such as glucose oxidase, GOx), the pK is about 8.5, but in other proteins the pK shifts to higher or lower values, so only one of the species is stabilized in the whole range of pH [33].

3. The information about the spectroscopic properties, especially fluorescence, of FvE is scattered throughout the literature. It is very difficult to find a complete description of the fluorescence of the different redox and acid–base forms corresponding to the same protein (we were not able to find one example). Consequently, and although spectra will be given here, it is not clear if there are representative spectra of each redox or acid–base forms for FvEs.
4. In addition to the conventional redox or acid–base forms previously described, FvE can also produce additional chemical states to those of the three redox forms indicated; these are the so-called charge-transfer states (CTS) resulting from intermediate electronic distribution. These states appear especially in oxidase FvE and are a consequence of complexes between the active centre of the enzymes and the substrates.

Let us review the information about the properties of the specific oxidation states of these proteins.

### 2.4. Spectroscopic properties of FAD in pure oxidases

#### 2.4.1. Oxidized form

The molecular absorption properties of flavins do not greatly change when they form part of a FvE. For example, figure 7 shows the molecular absorption spectra of both glucose oxidase ( $\text{GOx}_{\text{Hox}}$ ) and a free  $\text{FAD}_{\text{Hox}}$  concentration equivalent to that present in GOx. As can be seen, neither its maximum wavelength nor its molar absorptivity greatly changes. Fluorescence is a different story. In general, slight changes in the fluorescence wavelength are observed in different flavins, but the fluorescence intensity changes. There are two main reasons:

- (1) It becomes quenched by the environment surrounding the flavin, especially by specific groups of some aminoacids. In several studies

carried out at femtosecond scale on FvE, it has been observed that quenching is mainly due to ET from tryptophan or tyrosine to flavins, leading to its half-reduction reaction [34]. However, this quenching greatly changes from one FvE to another. For example, GOx fluorescence is greatly quenched by ET from two tryptophan and two tyrosine units close to the flavin [35] and FAD<sub>Hox</sub> in ChOx gives a fluorescence intensity about 50 more intense than that of FAD<sub>Hox</sub> in GOx [36].

- (2) Some authors have attributed this high quenching effect not only to the aminoacids, but also to the prevalence of the stacked or the semi-stacked forms (commented above) instead of the open form when FAD is part of a protein [37]. According to this, the structure of the protein should play a very important role in this quenching/folding effect.

Fluorescence lifetimes of FAD in FvEs contain similar components and values that those indicated in section 1.2 [13] for the free flavin, excepting that due to the dimer species.

As has been indicated above, many biochemical studies have been performed in order to obtain the type of linking between the FAD and the pOx skeleton (covalent or not), about the structure of the proteins (structural motif) and how the FAD is located in it (FvE families). One could guess that all of these structural reasons will affect on the predominant FAD form in the protein (stacked or open), and the rigidity/planarity of the isoalloxazine system, and consequently the fluorescence quantum yield. For example, the covalent link could restrict the FAD fold, so the open form could be the predominant, and the fluorescence quantum yield should be higher in these proteins; ChOx (covalent link) and GOx (non-covalent link), are consistent with this hypothesis. However, as far as we know, studies trying to establish correlations between FAD<sub>ox</sub> fluorescence and structural considerations of pOx have yet not been presented.

#### 2.4.2. Semiquinone forms

The molecular absorption spectra of semiquinones have been known for a long time. Massey and Palmer published in 1966 [38] the absorption spectra of the neutral and anionic semiquinone forms of FAD of GOx which they obtained after GOx irradiation in an anaerobic medium and in the presence of EDTA; these findings were later confirmed by other authors [39, 40]. The mechanism through which the semiquinone species is formed using EDTA has been extensively studied. For GOx and many other FvEs, the process takes place by a direct ET from EDTA to the excited state of the oxidized form. For some enzymes having several FAD units, the process follows a two-step mechanism: first, one flavin in the excited-state is reduced by EDTA; second, a reduced and an oxidized

flavin molecules comproportionate to the semiquinone form [38, 41]. There are other procedures for obtaining the semiquinone species, but the EDTA method and that using dithionite, are usually described as the most efficient [42]. The molecular absorption spectra of many other semiquinone FvEs have been reported [43–45] and they essentially fit with that of GOx, so they should be considered sufficiently representative.

Regarding the fluorescence, recently Zhong *et al* [13, 46] have done an exhaustive study about this subject. They used cryptochrome and photolyase (FAD containing), and flavodoxine (FMN containing) as FvE models and were able to obtain some spectroscopic properties of these species.

Figure 8(A) shows the excitation and fluorescence spectrum of the neutral semiquinone of flavodoxine. The fluorescence spectrum shows a broad maximum at about 700 nm, and the excitation maxima are consistent with those found for GOx. The fluorescence decay is mono-exponential with a lifetime of about 230 ps. The authors indicated that the spectrum for the neutral semiquinone of photolyase was similar to this. This figure also shows the spectroscopic properties for the anionic semiquinone. In this case, the excitation spectrum also fits with that obtained for GOx, and the fluorescence spectrum shows a maximum at 510 nm. The fluorescence decay curve is tri-exponential with lifetimes of 2.2 (41%), 30 (35%) and 530 (24%) ps.

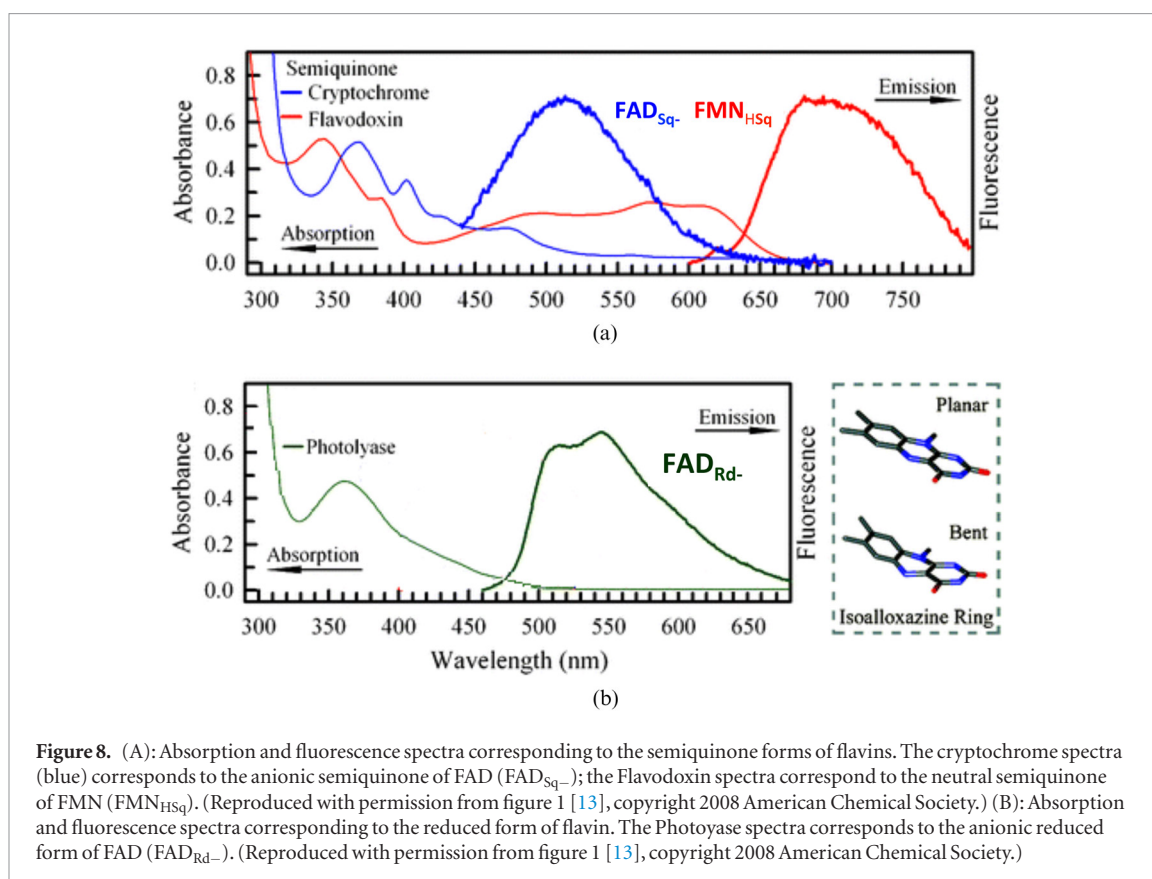
Spectra for the semiquinone forms of other FvEs have scarcely been shown. Gadda *et al* [47] obtained the fluorescence spectra for the anionic semiquinone of FAD in ChOx showing a fluorescence maxima at 452 nm, which does not exactly fit with that shown in figure 8(A).

#### 2.4.3. Reduced form

As occurs with the fluorescence of reduced flavins in solution, contradictory results are found in scientific literature. In general it is assumed that the reduced forms present low fluorescence. However, very few specific studies aimed at obtaining reliable results can be found. The most celebrated papers were published by Ghisla, Massey *et al* in the 1970s [18, 41, 48, 49]. They showed that the absorption spectra of reduced FvEs suffer a slight bathochromic displacement of about (5–20 nm) compared to the free reduced flavin, indicating a change in the planarity of their structure. Figure 8(B) shows a representative excitation and fluorescence spectra of the reduced-anionic form of the Photolyase.

Fluorescence lifetimes of the reduced forms in FvEs are longer than those indicated in section 1.3 [13] for the free reduced flavin.

Structural studies have also been carried out to examine how the planarity of the isoalloxazine system is modified during the corresponding enzymatic reaction. As will be shown later, many oxidase reactions follow a molecular mechanism involving the formation of –NH intermedia in the N5 atom. The angles defined by the N10–N5–hydrogen-bond donor and N10–N5–C



**Figure 8.** (A): Absorption and fluorescence spectra corresponding to the semiquinone forms of flavins. The cryptochrome spectra (blue) corresponds to the anionic semiquinone of FAD (FAD<sub>Sq-</sub>); the Flavodoxin spectra correspond to the neutral semiquinone of FMN (FMN<sub>HSq</sub>). (Reproduced with permission from figure 1 [13], copyright 2008 American Chemical Society.) (B): Absorption and fluorescence spectra corresponding to the reduced form of flavin. The Photolyase spectra corresponds to the anionic reduced form of FAD (FAD<sub>Rd-</sub>). (Reproduced with permission from figure 1 [13], copyright 2008 American Chemical Society.)

atoms show how this planarity is affected and a bent form appears (figure 8(B)). Fraaije and Mattevie [29], compiling data for 11 FIP, showed that their corresponding angles ranged from 116° to 170°; this planarity should be related to the fluorescence quantum yield of this form, but we have not found references dealing with this. Studies also showed that the reduced FvE are in general less fluorescent than the corresponding oxidized forms, but with maxima at similar wavelengths; similar results were obtained for FAD and FMN. Interestingly, these authors described the case of lactate oxidase which shows higher fluorescence intensity in the reduced form than in the oxidized. As far as we know, no more examples of this behaviour have been described.

#### 2.4.4. Other states

Flavins are able to generate inter- or intra-molecular charge-transfer compounds (CTC). Since they do not belong, formally, to any specific oxidation state, the absorption properties of these compounds are usually different to those of oxidized, reduced or semiquinone [33, 50–52], but we have not found information about fluorescence of these species.

### 2.5. Monooxygenase FvEs

MOx sub-classes are also a very huge group of FvEs, containing FAD or FMN. As a difference of pOx, they use O<sub>2</sub> but these act by transferring only one oxygen atom to the substrate, the other being liberated mainly as water. MOx catalyses the oxidation reaction of xenobiotic substrates (i.e. substances which are not present in the living organism, such as drugs or

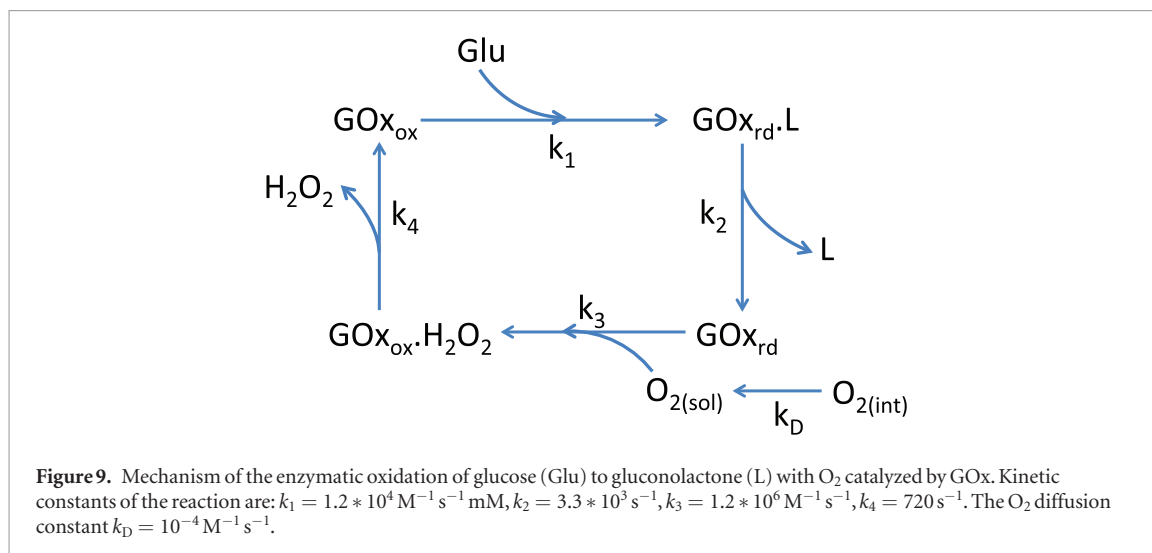
antibiotics) [53]. In order to do this, MOx requires a second substrate (external monooxygenase) to transfer the other O atom, usually NADPH or NADH. The need for this second substrate complicates the analytical method so these enzymatic reactions are not popular from the analytical point of view.

An exception to this behaviour is the lactate monooxygenase, whose mechanism is quite unusual [53–55]. This enzyme catalyses the oxidation of lactate by O<sub>2</sub>, following a similar route excepting that the second substrate necessary for the process is the pyruvate, a product of the reaction (internal monooxygenase). This simplifies the mechanism and made the reaction very useful for developing analytical methodology. In addition, the reduced form presents a higher fluorescence than the oxidized

## 3. Specific studies of enzymes: GOx and ChOx

### 3.1. Glucose oxidase

GOx is, perhaps, the most frequently used enzyme for analytical purposes, either in electrochemical and optical methods, in both batch determinations and biosensors [56–58]. This enzyme is able to catalyse the oxidation of different monosaccharides (glucose, mannose, galactose, xylose) by O<sub>2</sub> according to the general pOx given in figure 6. The full mechanism of the reaction with substrates fits with the substituted-enzyme mechanism (ping-pong) according to figure 9. In this mechanism it has been taken into account that in an open system the O<sub>2</sub> is supplied continuously by the



environment surrounding the chemical system ( $K_D$  is the diffusion constant).

In the case of glucose (Glu), some authors have also considered that the first step is an equilibrium, but the kinetics as a whole is not substantially affected by this. The kinetic constants for the Glu reaction have been measured several times [59–61]; the values given in figure 9 caption can be considered representatives.

From these data it is deduced that the kinetic of the whole process is driven by the  $k_1$ ; for substrates different from Glu the  $k_1$  values are much lower (about 3000 times lower) [57, 58, 60], so the interferences caused by other monosaccharides on Glu can usually be neglected. GOx can be obtained from different sources [57, 58], however most companies offer GOx from *Aspergillus niger*. No substantial differences in the kinetic mechanism have been established between GOx coming from different organism, but the relative values of the constants are different each other [22].

To know how the fluorescence of the enzyme changes during the enzymatic reaction and how this can be related to the Glu concentration, the differential equation system describing the evolution of the four species appearing in figure 9 have to be set out and solved. Unfortunately, it is not possible to get an analytical solution of this system, but using a powerful computational package such as Mathematica™ or others [62, 63] a numerical solution can be obtained. The following conclusions are derived from this numerical solution:

1. The concentrations of the intermediates  $GOx_{rd} \cdot L$  and  $GOx_{ox} \cdot H_2O_2$  can be neglected, so the mechanism of the reaction can be simplified a two-step reaction as shown in figure 6, where:

$$\begin{aligned} k_a &= k_1 = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \\ k_b &= k_3 = 1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}. \end{aligned} \quad (1)$$

Therefore, only the fluorescence coming from  $GOx_{ox}$  and  $GOx_{rd}$  species need to be taken into account along the reaction.

2. Considering the kinetic constants, only when the  $[Glu]_0 > [O_2]_0$  the concentration of  $GOx_{ox}$  changes along the reaction, i.e. Glu concentrations lower than that of  $O_2$  cannot be measured using GOx fluorescence.

When the differential equation system is solved for different Glu concentrations fulfilling that  $[Glu]_0 > [O_2]_0$ , results such as those given in figure 10 are observed. Considering that the  $GOx_{ox}$  presents both a higher molar absorptivity and quantum yield than  $GOx_{rd}$ , these figures also represent how the fluorescence intensity will change during the enzymatic reaction. As can be seen, when the glucose is added, an instantaneous small decrease in the  $[GOx_{ox}]$  is observed (an initial equilibrium between  $GOx_{ox}/GOx_{rd}$  is established); after a given time ( $t_a$ ) the  $[GOx_{ox}]$  begins to decrease appreciably until the whole the enzyme is in the reduced form. From here, the reaction continues and when the whole glucose is consumed the  $GOx_{ox}$  is again fully recovered (not shown in figure 10).

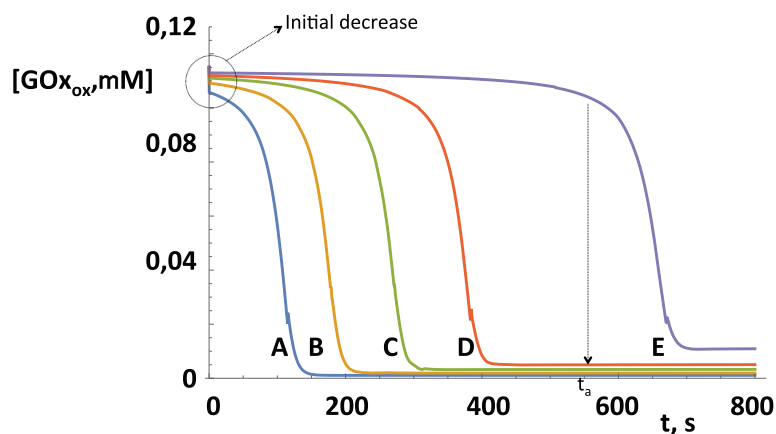
From the analytical applications point of view two parameters can be related to the Glu concentration:

- (1) The concentration of the oxidized form just after the Glu addition ( $[GOx_{ox}]_{t=0}$ ):

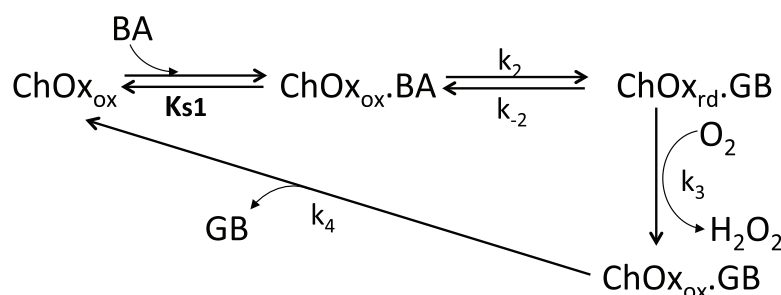
$$[GOx_{ox}]_{t=0} = [GOx]_0 \frac{k_b [O_2]_0}{k_a [Glu]_0 + k_b [O_2]_0}. \quad (2)$$

- (2) The time required for the  $[GOx_{ox}]$  starts to decrease ( $t_a$ ) [64]:

$$t_a = \frac{1}{k_a [GOx]} \ln \left[ \frac{[Glu]_0}{[Glu]_0 - [O_2]_0} \right] \quad (3a)$$



**Figure 10.** Simulated calculation of the concentration of the [GOx] during the enzymatic reaction for different glucose concentrations. Conditions used:  $[\text{GOx}]_0 = 1.15 \times 10^{-7} \text{ M}$ . Glucose concentrations (mM): A = 2.0; B = 1.2; C = 0.80; D = 0.60; E = 0.40. Rate constants as indicated in figure 9. The circle shows the instantaneous small decrease in the  $[\text{GOx}_{\text{ox}}]$  for the different glucose concentrations. The  $t_a$  value for the E solution is also shown.



**Figure 11.** Mechanism of the enzymatic oxidation of betaine aldehyde (BA) to glycine betaine (GB) with  $\text{O}_2$  catalyzed by ChOx. Constants of the reaction are:  $K_{s1} = 0.45 \text{ mM}$ ,  $k_2 = 135 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-2} \approx \text{slow}$ ,  $k_3 = 53.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_4 \approx \text{very fast}$ . The  $\text{O}_2$  diffusion constant  $k_D = 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

$$t_a = \frac{[\text{O}_2]_0}{k_a [\text{GOx}] [\text{Glu}]_0}. \quad (3b)$$

Equation (3b) is a simplified version of (3a), which can be used when  $[\text{Glu}]_0 > 10^{-3} \text{ M}$  [65].

In the next section, the analytical applications of the intrinsic properties of GOx for glucose determination will be reviewed. Methods based on molecular absorption fit well with the proposed model. For those based on fluorescence, most authors observed that the intensity increases (instead of decreasing) when the enzyme is in the reduced form, which is the opposite behaviour to that expected.

In order to explain this behaviour we have made additional assays. First, we observed that the concentration of the GOx necessary to observe fluorescence has to be very high because of its low quantum yield; this would produce an inner filter effect when fluorescence is being measured. Second, when the enzyme is in the reduced form, its molecular absorption spectrum (obtained using a spectrophotometer) agrees with the expected; however the fluorescence excitation spectrum corresponds to that of the oxidized form and the intensity is slightly higher.

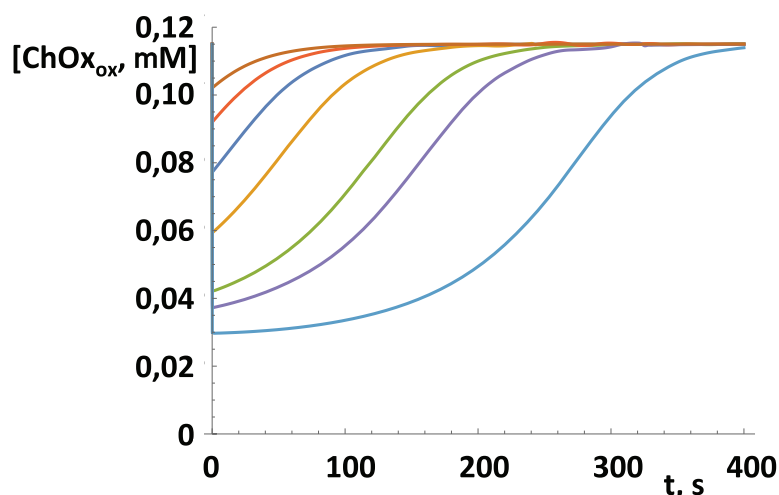
These results can be accounted for considering that the enzyme is photooxidized by the excitation light

of the fluorimeter. Obviously this process will only be produced in the volume of the cell which is being illuminated, but in the rest of the solution the enzyme will be in the reduced form. In addition, the increase in the fluorescence intensity can be account for considering the inner filter effect caused for the higher concentration used; when the enzyme is reduced due to the enzymatic reaction, the inner filter effect decrease and the fluorescence of the photooxidized GOx increases.

### 3.2. Choline oxidase

ChOx is also a very well-known enzyme which catalyses choline (Ch) oxidation in two steps. First, Ch is oxidized to betaine aldehyde (BA) and later to glycine betaine (GB); both steps fulfil the general scheme given in figure 6. One  $\text{O}_2$  molecule is involved in each step so two  $\text{O}_2$  molecules are consumed in the whole reaction. This reaction is very important from the analytical point of view, not only for BA or Ch determination but also for lipids-containing Ch determination (phosphatidylcholine, phosphorylcholine, choline phosphate). In this case the ChOx reaction has to be coupled with a hydrolytic enzymatic reaction.

Gadda *et al* have studied this reaction in depth [66, 67]. For BA they obtained a model as shown in figure 11. Despite ChOx belongs to the GMC family, the



**Figure 12.** Simulated calculation of the concentration of the [ChOx] during the enzymatic reaction for different BA concentrations. Conditions used:  $[\text{ChOx}]_0 = 1.15 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $K_D = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Betaine Aldehyde (mM): A = 0.005; B = 0.01; C = 0.02; D = 0.04; E = 0.08; F = 0.1; G = 0.15. Rate constants as indicated in figure.

kinetic of the reaction does not follow a conventional ping-pong mechanism, as that of GOx. The intermediate ChOx forms appearing during the reaction are  $\text{ChOx}_{\text{ox}} \cdot \text{GB}$ ,  $\text{ChOx}_{\text{rd}} \cdot \text{GB}$  and  $\text{ChOx}_{\text{ox}} \cdot \text{GB}$ .

By applying the same methodology than as with GOx, the simulation of the variation of the enzyme form concentrations during the reaction, gives the following conclusions:

1. The concentrations of the intermediates  $\text{ChOx}_{\text{ox}} \cdot \text{Ba}$  and  $\text{ChOx}_{\text{ox}} \cdot \text{GB}$  are negligible. Again the mechanism of the reaction can be simplified to a two-step reaction, similar to that given in figure 9 but replacing the reduced form by  $\text{ChOx}_{\text{rd}} \cdot \text{GB}$ ; it is important to consider that, from the spectroscopic point of view the spectral properties of this species and that of the pure reduced form ( $\text{ChOx}_{\text{rd}}$ ) are expected to be nearly the same. For this case, it can be demonstrated that:

$$K_a = \frac{k_7}{k_{s1}} = 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (4)$$

$$k_b = k_9 = 5.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}.$$

2. According to the kinetic constants the re-oxidative half-reaction is now faster, so it is not necessary to use BA concentrations higher than that of the  $\text{O}_2$  for observing concentration changes in the oxidized and reduced forms.

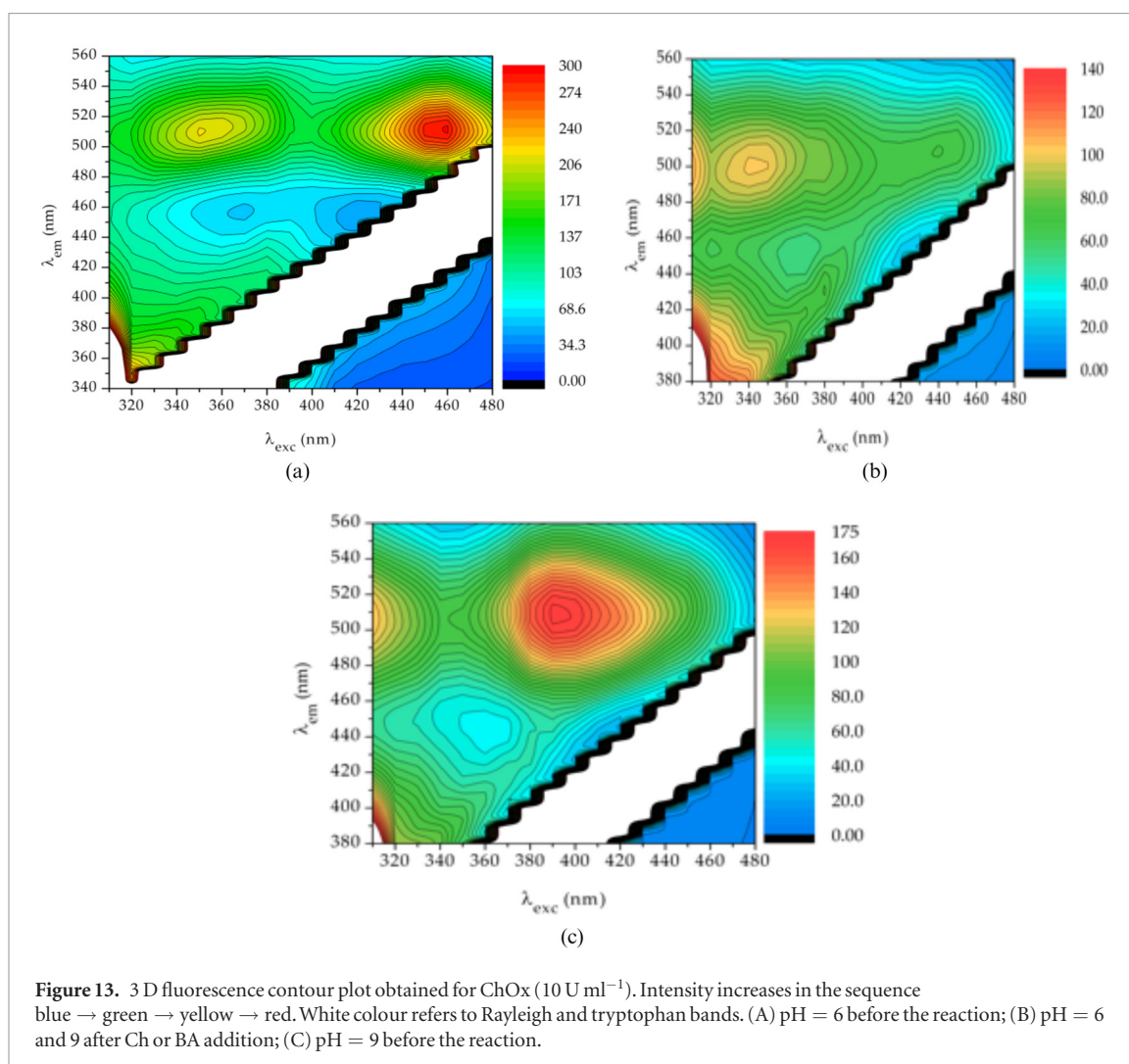
After solving the differential equation system for different BA concentrations ( $[\text{BA}]_0 < [\text{O}_2]_0$ ), the  $[\text{ChOx}_{\text{ox}}]$  variation during the enzymatic reaction such as those given in figure 12 are observed. Again, the molar absorptivity and quantum yield of the

oxidized form are higher than those of the reduced form, so the fluorescence intensity changes similarly to that of  $[\text{ChOx}_{\text{ox}}]$ . The enzyme concentration at the beginning of the reaction ( $[\text{ChOx}_{\text{ox}}]_{t=0}$ ) also follows the equation (2), so the fluorescence intensity measured in this moment can be used as the analytical parameter.

We have also studied the spectroscopic properties of choline oxidase (ChOx, from both *Alcaligenes sp* and *Arthrobacter globiformis*) [36] during the enzymatic oxidation reaction of both, BA and Ch to GB, and also we find a remarkable behaviour of the ChOx fluorescence. Figure 13(A) shows the 3D spectra obtained with ChOx at pH = 6 before the reaction (FAD oxidized) and figure 13(B) shows the 3D spectra after the addition of a very high excess of BA (or Ch), when the enzyme is in the reduced form. As can be seen, the spectroscopic properties of both, the oxidized and the reduced forms of ChOx fit very well with those of the free FAD; especially the fluorescence of the reduced form is clearly observable. In both cases the absorption spectra fit, with the fluorescence excitation.

When the ChOx solution is brought to the optimum pH of the reaction (pH = 9), the 3D spectrum before the BA addition (figure 13(C)), indicates that both excitation maxima had suffered a hypochromic shift of about 50 nm (maximum at about 400 nm), without changes in the position of the fluorescence maxima. However the molecular absorption spectra still maintain the conventional maxima of the free  $\text{FAD}_{\text{ox}}$ . After the BA addition the 3D spectra was similar to that observed at pH = 6 (figure 15(C)). The same results were observed working at pH 8 and 10, which are more appropriate for the reaction than pH 6. When BA is added to the solution, the fluorescence intensity at 400 nm suffers a sharp decrease such as expected from the simulation given in figure 12.





Since no photoreduction could be observed in the spectra, we accounted for these results as being a consequence of a modification in the polarity of the active centre linked to the capability of the enzyme for the reaction. However, we have no definitive evidences.

We have tried several hypotheses in order to explain these spectra, but we do not yet have any specific evidence about any of them.

### 3.3. Model generalization and further applications

It would be expected that all the pOx reactions involving substrates (S) fulfilling that the re-oxidative half-reaction is faster than the reductive half-reaction will have a similar behaviour to that shown for GOx. Accordingly, all the pOx reactions fulfilling that the reoxidative half-reaction is faster than the reductive half-reaction will have a similar behaviour to that shown for ChOx. The kinetic mechanism or the rate constants of different pOx enzymes as MAO [68], DAAO [69] or LOx [70] with specific substrates have been reported, so it could be possible to approximately predict the fluorescence profile and the analytical possibilities of the methods based on this fluorescence.

## 4. Analytical applications based on FAD properties of FvEs

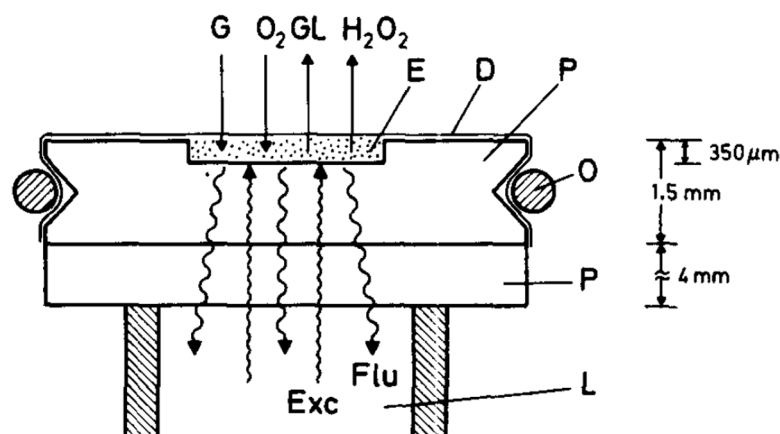
### 4.1. Autofluorescence imaging

Previously to discuss the FAD fluorescence application in optical biosensors, we will briefly refer to another interesting application of fluorescence of flavoproteins.

It is well known that Autofluorescence, i.e. the detection of the autogenous fluorescence of biological tissues, is gaining position as an imaging technique [71]. This fluorescence is emitted by molecules such as collagen, porphyrins, retinol, riboflavin or melanin but it is especially important that due to NADPH and flavin coenzymes. Most cell autofluorescence originates from mitochondria and lysosomes.

Autofluorescence may serve as a useful non-invasive diagnostic indicator [72] because it can be used as an intrinsic marker of biological processes in which the above mentioned molecules are involved (avoiding the possible toxicity of exogenous markers).

In this respect, it is possible to use the fluorescence of intracellular coenzymes, such as NADH or FAD, as intrinsic biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies [73]. For example, the redox pair FAD/FADH<sub>2</sub> is associated with respiration in eukary-



**Figure 14.** Cross-section through the sensing platelet of the fibre-optic glucose sensor. P, plexiglas; D, dialysing membrane; E, enzyme solution; O, O-ring; L, light guide. Arrows indicate the diffusion process involved (G, glucose; L, gluconolactone). The directions of the exciting light (Exc) and fluorescence (Flu) are also shown. The platelet has a o.d. 20 mm; diameter of cavity, 4 mm. (Reproduced from figure 1 [78], copyright 1989 with permission from Elsevier.)

otic cells [74] and the real-time monitoring of mitochondrial NADH and FAD provides a ratiometric measure of energy respiration as well as the redox state of a cell under certain physiological conditions [75]. The applications are diverse. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress have been associated with the majority of neurodegenerative diseases. The concentrations of intracellular NADH and flavin are good biomarkers of mitochondrial dysfunction. As a result, these coenzymes have a great potential as diagnostics of neurodegenerative diseases [76]. Skala *et al* [77] monitored the cellular NADH and FAD autofluorescence lifetime to identify metabolic fingerprints of living cells at the earliest stages of cancer development.

Flavoprotein fluorescence imaging (FFI) is becoming a valuable imaging tool in neuroscience research (flavoprotein autofluorescence is enhanced during neuronal activity) representing an improvement over conventional hemodynamic signals [78].

## 4.2. Substrates determination: batch methods and biosensors

### 4.2.1. Direct FAD fluorescence

There are several commercial FAD-enzymes responsible for enzymatic reactions which are interesting from the analytical point of view; however, very few analytical methodologies have been developed based on the intrinsic spectroscopic properties (mainly fluorescence) of the FAD.

#### Determination of glucose

The FAD-GOx-fluorescence has been widely reported as a tool to characterise the enzyme [79–82] or even its specificity depending on the redox mediator used [82]. Nevertheless, the first use of the FAD-fluorescence for analytical purposes can be found in the seminal paper by Trettnak and Wolfbeis [83]. The authors developed an optical sensor for Glu based on the changes in the fluorescence of the GOx ( $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) during the reaction. Until that time it had been thought

[18] that GOx was a non-fluorescent enzyme in the visible region both in the oxidized and in the reduced state. This idea could probably be justified because lower concentrations of GOx had been used than in the studies of Trettnak–Wolfbeis. The device (figure 14) consisted of a Plexiglas disk with a cavity in its centre in which a solution of the enzyme was placed. The hole was covered with a dialysing membrane, which was not permeable for the enzyme but allowed the substrates (Glu and oxygen) to diffuse into the reaction cavity. Although there was a linear response to Glu, the range was very short (1.5–2 mM) and the response time was relatively high (2–30 min). They managed to extend the analytical range (i.e. 2.5–10 mM in the case of Glu) by working in kinetic mode and no loss of fluorescence activity was shown over a period of 8 h.

Later, Chudobová *et al* [84] developed a fibre optic biosensor based on the absorption changes of immobilized GOx on a nylon net (with no change in activity being observed after 215 analyses). The decrease in the GOx absorbance at 490 nm gave rise to a dynamic range from 2 to 10 mM of Glu. They have also used the variation of the FAD-GOx-fluorescence during the reaction.

More recently, Esposito *et al* [85–88] improved the stability and increased the linearity of the methodology by entrapping GOx in a gelatine membrane or by covalent bonding to an agarose membrane [85]. They observed reported a dynamic range up to 8 mM of Glu in the case of the gelatine and up to 5 mM of Glu for the agarose membrane. By entrapping the GOx in a sol-gel matrix the authors were able to couple the enzyme to the end of a fibre optic and follow the changes in the visible region, both for the steady-state [86] and for the time course [87, 88] of the GOx fluorescence. In this case the method showed a linear range, respectively, from 0.2 to 10 mM [86] and from 0.4 to 5 mM [87] of Glu and a high catalytic stability with a decrease of about 2% after 60 d. None of the above methods has been applied to real samples. Sol-gel immobilization of GOx for glucose reagentless biosensing has also been carried out by

other authors but much shorter lifetimes of the sensor (especially due to leaching) have been reported [89, 90].

As can be seen the linear response obtained began at high Glu concentrations, actually higher than the oxygen initially present in solution. This result can be accounted for in the light of the theoretical model described in section 3.1.

Accordingly, because the analytical figures of merit of the GOx fluorescence or absorption methodology based on FAD did not represent an improvement over other auto indicating systems [64] and the mechanics through the changes on the fluorescence are not clear, it have not been found more analytical-determinations of Glu based on these properties.

At this point could be interesting to evaluate these results with those described in the previous section. The decrease in the absorbance of the FAD-GOx with the concentration of Glu reported by Chudobová [79] is in accordance with the expected changes due to the oxidised and the reduced form of FAD. The decrease in the GOx fluorescence is justified by the prevalence of the less fluorescent GOx<sub>red</sub> (working with low concentrations of GOx). The results obtained by other researchers (fluorescence increases during the reaction) can be justified by the combination of fotooxidation/inner filter effect there commented. Moreover, it can be also understood why the linear response obtained began at Glu concentrations higher than the oxygen initially presents in solution.

Accordingly, because the analytical figures of merit of the GOx fluorescence or absorption methodology based on FAD did not represent an improvement over other auto indicating systems [59] and the mechanics through the changes on the fluorescence are not clear, it have not been found more analytical-determinations of Glu based on these properties.

#### *Other substrates*

Using a similar device to that described for Glu, Trettnak and Wolfbeis also developed [91] a lactate biosensor using lactate monooxygenase; in this case, the changes in the fluorescence of the flavin-cofactor FMN were followed. The analytical evaluation of the biosensor gave similar characteristics to that of Glu.

As has been indicated above, we have use the FAD fluorescence of ChOx for the determination of Ch and BA, obtaining longer linear response range than for Glu [36]. In this case, the fluorescence of the FAD, as expected, decreased during the enzymatic reaction and the evolution of the fluorescence spectrum during the enzymatic reaction indicated that the reaction takes place in two consecutive, but partially overlapping, steps and each of them follows a different mechanism. The chemical system can be used to determine the Ch in the presence of BA as interference in the range from  $5 \times 10^{-6}$  to  $5 \times 10^{-5}$  M (univariate and multivariate calibration) and the total Ch and BA concentration in the range from  $5 \times 10^{-6}$  to  $5 \times 10^{-4}$  M (multivariate calibration) with mean errors under 10%. A

semiquantitative determination of the BA concentration can be obtained by difference. Ch has been successfully determined in an infant milk sample.

By coupling two enzymatic reactions, this methodology has also been used to determine other substrates containing Ch such as the phospholipid phosphorylcholine (ChoP) [92]. ChoP was first hydrolysed by the enzyme alkaline phosphatase (AP) and the Ch formed was then submitted to a reaction with ChOx. Measuring this intrinsic fluorescence, a linear response from  $5.2 \times 10^{-7}$  to  $1.0 \times 10^{-5}$  M was obtained for ChP. This methodology has also made possible the sequential determination of Ch and ChoP in milk powder samples using only one aliquot of the mixture, with good results.

#### *4.2.2. Intrinsic and extrinsic fluorophores FAD-subrogated*

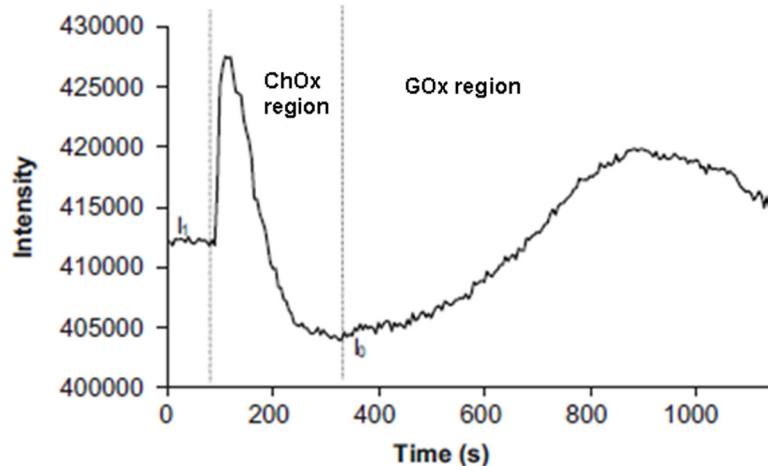
The analytical use of FAD spectroscopic properties also has limitations, the most important being the low fluorescence quantum yield of FAD and the photophysical effects, especially when the fluorescence of GOx (and pOx behave similarly) are measured. These facts either limit the sensitivity of the methods or, more importantly, greatly hinder the interpretation of the results and the reliable design of analytical methods.

These problems can be softened by measuring other fluorescence signals coming from the enzyme and also related to the concentration of the oxidized and reduced forms of FAD. Two alternative procedures have been proposed based on intrinsic or chemically linked (extrinsic) fluorophores of the enzymes.

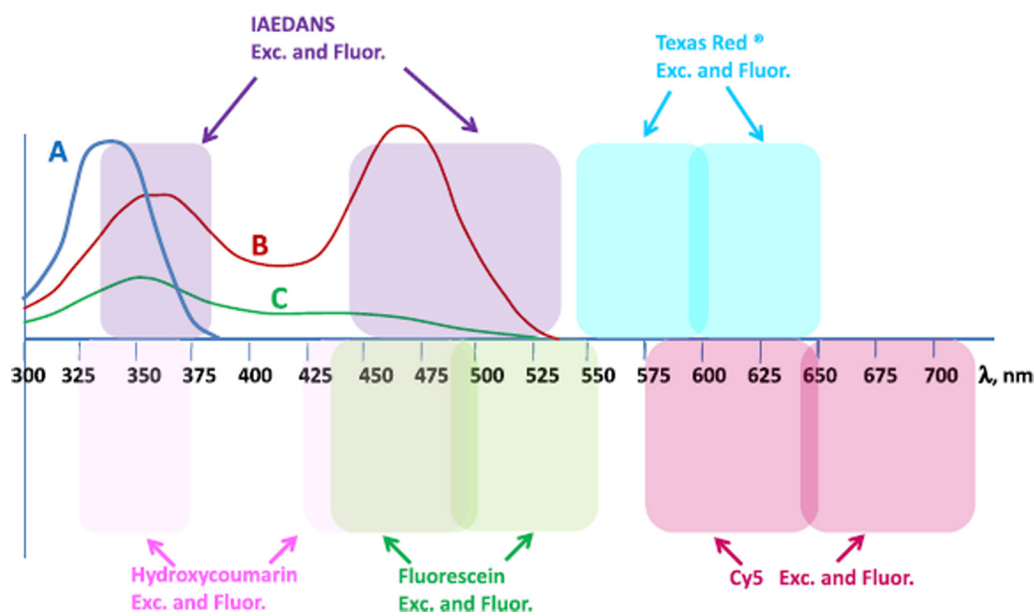
#### *Intrinsic fluorescence*

It is well-known that all enzymes have fluorescence in the UV region due to aminoacids, especially tryptophan. Both, the excitation and the fluorescence spectra of this aminoacid overlap with the absorption spectra of the FAD. The flavins can thus produce an inner filter effect on the tryptophan fluorescence, which is higher when the enzyme is in the oxidized form (GOx<sub>ox</sub>) than in the reduced form (GOx<sub>rd</sub>). The fluorescence intensity of tryptophan changes during the reaction, emulating the concentration of the reduced form, which are exactly the opposite to those shown in figures 10 or 12. Consequently, the analytical model given in equations (2) and (3) are fulfilled. Thus, our group proposed the Glu [64] determination based on the changes of the UV-Fl of GOx during the enzymatic reaction. The method allows the determination of Glu over the range  $5 \times 10^{-4}$  to  $2 \times 10^{-2}$  M with a RDS of 2.1%, and has been used to determine Glu in blood. The same methodology has been studied by other authors [86, 93].

Following a similar idea, we determined Ch in serum [94] using the fluorescence of ChOx. From the figures 10 and 12 is clear that GOx and ChOx fluorescence change according to a different scheme during the reaction; at the beginning of the reaction, the concentration of the oxidized form of ChOx is minimum



**Figure 15.** Fluorescence intensity variation at 340 nm (excitation at 286 nm) of a solution containing ChOx ( $1 \text{ U ml}^{-1}$ ), GOx ( $2 \text{ U ml}^{-1}$ ), Glu ( $0.55 \text{ mM}$ ) and Ch ( $5.5 \mu\text{M}$ ). (Reproduced from figure 3 [86], copyright 2009 with permission of Springer.)



**Figure 16.** Wavelength range of excitation and fluorescence of different attached fluorophores compared with: (A) (blue line) the tryptophan fluorescence spectrum in proteins; (B) (red line) oxidized FAD absorption spectrum in protein; (C) (green line) reduced FAD absorption spectrum in protein. (Reproduced from figure 5 [3], copyright 2012 with permission of Springer.)

but the concentration of the oxidized GOx concentration is maximum; by properly combining these effects (figure 15) it has also been possible to perform the simultaneous determination of Glu and Ch [95].

The inner filter effect on tryptophan fluorescence has also been used in enzymatic reactions not involving FvEs [3, 4, 96].

#### Extrinsic fluorescence

In this approach, the pOx is chemically modified with a fluorophore whose spectroscopic properties overlap with those of the flavin which produces again an inner filter effect. Depending on the properties of the fluorophore, the filter effect can be produced during the fluorophore absorption, the fluorophore fluorescence or even both. We first demonstrated the viability of this

approach using GOx linked to different fluorophores [3, 4] (figure 16) whose spectra overlap (hydroxycoumarin, IAEDANS or fluorescein (FS)), or not (Texas Red<sup>TM</sup> or Cy5) with those of the pOx; only in the first cases were changes in the fluorescence intensity of the linked fluorophore observed during the enzymatic reaction. Using this methodology, biosensors for Glu determination have been tested after immobilizing GOx chemically modified with fluorescein (GOx-FS) or pyrene [97, 98] in several supports as polyacrylamide [99, 100], sol-gel [90], or many others [101]. Other substrates as total cholesterol [102] and Ch [94] have been determined in blood or serum samples using COx-FS and ChOx-FS respectively ( $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ). In the case of total cholesterol determination, the use of derivatized COx-FS makes

it possible to simplify the methodology normally used in this type of determination (the indicator reaction is avoided and the number of reagents reduced), with the added advantage that the analytical signal is independent of the concentrations of oxygen and CO<sub>2</sub>.

This methodology gives a better analytical performance than that of tryptophan-based, especially because it avoids the spectral interferences of the sample which more frequently appear in the UV region.

#### 4.2.3. Combination of FAD spectroscopic properties and nanomaterials

Nanobiosensors based on FAD spectroscopic properties can also be designed. The nanomaterial may either be used as a support for the nanobiosensor (which could be based on the FAD fluorescence) or act as an extrinsic fluorophore. There are very few bibliographic references describing this possibility [103]. Del Barrio *et al* [104] have described the combination of upconversion materials (UCM) with GOx for the design of a fluorometric nanobiosensor for the continuous monitoring of Glu. The sensor combines the fluorescence of the GOx-FS and the luminescent properties of the upconverting luminescent nanoparticles (UCLNPs). Both the chemically modified enzyme and the UCLNPs are immobilized in a polyacrylamide film as a physical support. The system is excited with NIR radiation, which is absorbed by the nanoparticles, and their upconverted luminescence is used to excite GOx-FS, which undergoes a change in the fluorescence intensity during the enzymatic reaction with Glu. The sensor has sufficient stability and covers the physiological range of Glu levels in blood. The system responds linearly to Glu concentrations in the range from 3.3 to 16.6 mM in flow injection analysis mode. The excitation of the UCLNPs with NIR light is a major advantage, since fluorescence background from the matrix is minimized.

### 5. Future trends

The intrinsic fluorescence of FAD in FvEs is a powerful tool for analytical purposes, both in batch methods and optical biosensors, especially because: (1) a second substrate is not necessary (O<sub>2</sub> is provided by the medium) and, (2) the enzyme is able to repeat the oxidative cycles many times (continuous monitoring). Taking this into account, future research could involve the following topics:

1. New analytes. Up to date, FAD fluorescence applications have been reduced to very few analytes, especially Glu. In our opinion, it may be worth to explore the applicability of this fluorescence to other analytes as biogenic amines (MAO-A, MAO-B), aminoacids (DAAO), free and esterified cholesterol (ChOx) or phospholipids (ChOx). The methodology outlined in section 3 could be applied to know how the fluorescence will change along the reaction and to evaluate the concentration range of the analyte in which the method could be applied.
2. To taking advantage of this fluorescence, in depth studies to systematize the effect of the protein skeleton in FAD fluorescence would be of great interest.
3. Non-invasive monitoring and nanomaterials. Fluorescence has demonstrated its capability as a non-invasive technique. FvE can be used as recognition elements in implantable biosensors, using the FAD intrinsic fluorescence properties or subrogating them to extrinsic fluorophores. In this sense nanomaterials (quantum dots, Au nanoclusters), should be thoroughly tested as potential extrinsic fluorophores. Promising results have already been reported; for example, it has been demonstrated that FAD is able to interact with the plasmon of the Ag nanoparticles [105]. In addition, the interaction of enzymes with nanomaterials could improve their quantum yield; for example, when GOx is linked to graphene oxide the enzyme structure is slightly modified leaving the FAD more accessible and increasing its fluorescence [106].

### Acknowledgments

The authors thank the MINECO of Spain (project CTQ2012-34774) and the Gobierno de Aragón (DGA-FEDER) (Research Group E-74).

### References

- [1] Wang X and Wolfbeis O S 2016 Fiber-optic chemical sensors and biosensors (2013–2015) *Anal. Chem.* **88** 203–27
- [2] Borisov S M and Wolfbeis O S 2008 Optical biosensors *Chem. Rev.* **108** 423–61
- [3] Galbán J, Sanz-Vicente I, Ortega E, del Barrio M and de Marcos S 2012 Reagentless fluorescent biosensors based on proteins for continuous monitoring systems *Anal. Bioanal. Chem.* **402** 3039–54
- [4] Galbán J, Andreu Y, Sierra J F, de Marcos S and Castillo J R 2001 Intrinsic fluorescence of enzymes and fluorescence of chemically modified enzymes for analytical purposes: a review *Luminescence* **16** 199–210
- [5] Brennan J D 1999 Preparation and entrapment of fluorescently labelled proteins for the development of reagentless optical biosensors *J. Fluoresc.* **9** 295–312
- [6] Ghisla S and Edmondson D E 2014 Flavin coenzymes *Encyclopedia of Life Sciences* (Chichester: Wiley) pp 1–8
- [7] Land E J and Swallow A J 1969 One-electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis. II. Riboflavin *Biochemistry* **8** 2117–25
- [8] Sengupta A, Khade R V and Hazra P 2011 pH dependent dynamic behavior of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) in femtosecond to nanosecond time scale *J. Photochem. Photobiol. A* **221** 105–12
- [9] Drössler P, Holzer W, Penzkofer A and Hegemann P 2002 pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution *Chem. Phys.* **282** 429–39
- [10] Tyagi A and Penzkofer A 2010 pH dependence of the absorption and emission behaviour of lumiflavin in aqueous solution *J. Photochem. Photobiol. A* **215** 108–17

- [11] Sun M, Moore T A and Song P S 1972 Molecular luminescence studies of flavins. I. Excited-states of flavins *J. Am. Chem. Soc.* **94** 1730–40
- [12] Islam S D M, Susdorf T, Penzkofer A and Hegemann P 2003 Fluorescence quenching of flavin adenine dinucleotide in aqueous solution by pH dependent isomerisation and photo-induced electron transfer *Chem. Phys.* **295** 137–49
- [13] Kao Y, Saxena C, He T, Guo L, Wang L, Sancar A and Zhong D 2008 Ultrafast dynamics of flavins in five redox states *J. Am. Chem. Soc.* **130** 13132–39
- [14] Stanley R Y and MacPharlane IV A W 2000 Ultrafast excited state dynamics of oxidized flavins: direct observations of quenching by purines *J. Phys. Chem. A* **104** 6899–906
- [15] Chosrowjan H, Taniguchi S, Mataga N, Tanaka F and Visser A J G W 2003 The stacked flavin adenine dinucleotide conformation in water is fluorescent on picosecond timescale *Chem. Phys. Lett.* **378** 354–8
- [16] Brazard J, Usman A, Lacomat F, Ley C, Martin M M and Plaza P 2011 New insights into the ultrafast photophysics of oxidized and reduced FAD in solution *J. Phys. Chem. A* **115** 3251–62
- [17] Muller F, Massey V, Heizmann C, Hemmerich P, Lhoste J M and Gould D C 1969 The reduction of flavins by borohydride—3,4-dihydroflavin—structure, absorption and luminescence *Eur. J. Biochem.* **9** 392–401
- [18] Ghisla S, Massey V, Lhoste J M and Mayhew S G 1974 Fluorescence and optical characteristics of reduced flavins and flavoproteins *Biochemistry* **13** 589–97
- [19] Hille R, Miller S M and Palfey B 2013 *Oxidases, Dehydrogenases and Related Systems (Handbook of Flavoproteins vol 1)* (Berlin: de Gruyter)
- [20] Hille R, Miller S M and Palfey B 2013 *Complex Flavoproteins, Dehydrogenases and Physical Method (Handbook of Flavoproteins vol 2)* (Berlin: de Gruyter)
- [21] Macheroux P, Kappes B and Ealick S E 2011 Flavogenomics—a genomic and structural view of flavin-dependent proteins *FEBS J.* **278** 2625–34
- [22] BRENDA [www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org) (Accessed: July 2016)
- [23] Protein Data Bank (PDB) [www.pdb.org/pdb/home/home.do](http://www.pdb.org/pdb/home/home.do)
- [24] Enzyme Structures Database [www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes](http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes) (Accessed: November 2016)
- [25] Joosten V and van Berkel W J H 2007 Flavoenzymes *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11** 195–202
- [26] Mewies M, McIntire W and Scrutton N 1998 Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: the current state of affairs *Protein Sci.* **7** 7–20
- [27] Dijkman W P, de Gonzalo G, Mattevi A and Fraaije M W 2013 Flavoprotein oxidases: classification and applications *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** 5177–88
- [28] Mattevi A 2006 To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes *Trends Biochem. Sci.* **31** 276–83
- [29] Walsh C T and Wenczewicz T A 2013 Flavoenzymes: versatile catalysts in biosynthetic pathways *Nat. Prod. Rep.* **30** 175–200
- [30] Kiess M, Hecht H J and Kalisz H M 1998 Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases *Eur. J. Biochem.* **252** 90–8
- [31] Fraaije M and Mattevi A 2000 Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features *Trends Biochem. Sci.* **25** 126–32
- [32] Pollegioni L, Porrini D, Molla G and Pilone M S 2000 Redox potentials and their pH dependence of D-amino-acid oxidase of *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis* *Eur. J. Biochem.* **267** 6624–32
- [33] Vogt S, Schneider M, Schäfer-Eberwein H and Nöll G 2014 Determination of the pH dependent redox potential of glucose oxidase by spectroelectrochemistry *Anal. Chem.* **86** 7530–5
- [34] Massey V 2000 The chemical and biological versatility of riboflavin *Biochem. Soc. Trans.* **28** 283–96
- [35] Silva E and Edwards A M 2006 *Flavins Photochemistry and Photobiology (Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology vol 6)* (Cambridge: RSC) (doi: 10.1039/9781847555397)
- [36] Mataga N, Chosrowjan H, Shibata Y, Tanaka F, Nishina Y and Shiga K 2000 Dynamics and mechanisms of ultrafast fluorescence quenching reactions of flavin chromophores in protein nanospace *J. Phys. Chem. B* **104** 10667
- [37] Zhong D and Zewail A 2001 Femtosecond dynamics of flavoproteins: charge separation and recombination in riboflavin (vitamin B-2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98** 11867–72
- [38] Ortega E, de Marcos S, Sanz-Vicente I, Ubide C, Ostra M, Vidal M and Galbán J 2016 Fluorescence of the flavin group in choline oxidase. Insights and analytical applications for the determination of choline and betaine aldehyde *Talanta* **147** 253–60
- [39] Mataga N, Chosrowjan H, Shibata Y and Tanaka F 1998 Ultrafast fluorescence quenching dynamics of flavin chromophores in protein nanospace *J. Phys. Chem. B* **102** 7081–4
- [40] Massey V and Palmer G 1966 On existence of spectrally distinct classes of flavoprotein semiquinones. A new method for quantitative production of flavoprotein semiquinones *Biochemistry* **5** 3181–9
- [41] Pedotti M, Ghisla S, Motteran L, Molla G and Pallegioni L 2009 Catalytic and redox properties of glycine oxidase from *Bacillus subtilis* *Biochimie* **91** 604–12
- [42] Okafuji A, Schnegg A, Schleicher E, Möbius K and Weber S 2008 G-tensors of the flavin adenine dinucleotide radicals in glucose oxidase. A comparative multifrequency electron paramagnetic resonance and electron-nuclear double resonance study *J. Phys. Chem. B* **112** 3568–74
- [43] Massey V, Stankovich M and Hemmerich P 1978 Light-mediated reduction of flavoproteins with flavins as catalysts *Biochemistry* **17** 1–8
- [44] Macheroux P 1999 UV–visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins *Flavoprotein Protocols (Methods in Molecular Biology vol 131)* ed K Chapman and G A Reid (Totowa: Humana Press) pp 1–9
- [45] Massey V and Hemmerich P 1980 Active-site probes of flavoproteins *Biochem. Soc. Trans.* **8** 246–57
- [46] Song S H, Dick B, Penzkofer A, Pokorny R, Batschauser A and Essen L O 2006 Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* *J. Photochem. Photobiol. B* **85** 1–16
- [47] Muller F, Brüstlein M, Hemmerich P, Massey V and Walker W H 1972 Light-absorption studies on neutral flavin radicals *Eur. J. Biochem.* **25** 573–80
- [48] Chang C, He T F, Guo L, Stevens J A, Li T, Wang L and Zhong D 2010 Mapping solvation dynamics at the function site of flavodoxin in three redox states *J. Am. Chem. Soc.* **132** 12741–7
- [49] Ghanem M, Fan F, Francis K and Gadda G 2003 Spectroscopic and kinetic properties of recombinant choline oxidase from *Arthrobacter globiformis* *Biochemistry* **42** 15179–88
- [50] Visser A J W G, Ghisla S, Massey V, Muller F and Veeger C 1979 Fluorescence properties of reduced flavins and flavoproteins *Eur. J. Biochem.* **101** 13–21
- [51] Ghisla S 1980 Fluorescence and optical characteristics of reduced flavins and flavoproteins *Methods Enzymol.* **66** 360–73
- [52] Karasulu B and Thiel W 2015 Photoinduced intramolecular charge transfer in an electronically modified flavin derivative: roseoflavin *J. Chem. Phys.* **143** 19928–43
- [53] Miura R 2001 Versatility and specificity in flavoenzymes: control mechanism of flavin reactivity *Chem. Rec.* **1** 183–94
- [54] Massey V and Ghisla S 1974 Role of charge-transfer interactions in flavoprotein catalysis *Ann. New York Acad. Sci.* **227** 446–65
- [55] van Berkel W J H, Kamerbeek N M and Fraaije M W 2006 Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysis *J. Biotechnol.* **124** 670–89
- [56] Muh U, Williams C H and Massey V 1994 Lactate monooxygenase. III. Additive contributions of active site residues to catalytic efficiency and stabilization of an anionic transition state *J. Biol. Chem.* **269** 7994–8000
- [57] Yorita K, Janko K, Aki K, Ghisla S, Palfey B A and Massey V 1997 On the reaction mechanism of L-lactate oxidase: quantitative structure-activity analysis of the reaction with para-substituted L-mandelates *Proc. Natl Acad. Sci.* **94** 9590–5

- [56] Raba J and Mottola H 1995 Glucose-oxidase as an analytical reagent *Crit. Rev. Anal. Chem.* **25** 1–42
- [57] Bankar S B, Bule M V, Singhal R S and Ananthanarayan L 2009 Glucose oxidase—an overview *Biotechnol. Adv.* **27** 489–501
- [58] Wilson R and Turner A P F 1992 Glucose-oxidase—an ideal enzyme *Biosens. Bioelectron.* **7** 165–85
- [59] Gibson Q H, Swoboda B E P and Massey V 1964 Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase *J. Biol. Chem.* **239** 3927–34
- [60] Tao Z, Raffel R A, Souid A and Goodisman J 2009 Kinetic studies on enzyme-catalyzed reactions: oxidation of glucose, decomposition of hydrogen peroxide and their combination *Biophys. J.* **96** 2977–88
- [61] Duke F R, Weibel M, Page D S, Bulgrin V G and Luthy J 1969 The Glucose oxidase mechanism. Enzyme activation by substrate *J. Am. Chem. Soc.* **91** 3904–9
- [62] Johnson K A, Simpson Z B and Bloom T 2009 Global kinetic explorer: a new computer program for dynamic simulation and fitting of kinetic data *Anal. Biochem.* **387** 30–41
- [63] Kuzmic P 1996 Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase *Anal. Biochem.* **237** 260–73
- [64] Sierra J F, Galbán G and Castillo J R 1997 Determination of glucose in blood based on the intrinsic fluorescence of glucose oxidase *Anal. Chem.* **69** 1471–6
- [65] Sanz-Vicente I, Castillo J R and Galbán J 2005 Fluorescence anisotropy: application in quantitative enzymatic determinations *Talanta* **65** 946–53
- [66] Gadda G 2003 Kinetic mechanism of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis* *Biochim. Biophys. Acta* **1646** 112–8
- [67] Fan F and Gadda G 2005 On the catalytic mechanism of choline oxidase *J. Am. Chem. Soc.* **127** 2067–74
- [68] Ramsay R R 1991 Kinetic mechanism of monoamine oxidase A *Biochemistry* **30** 4624–9
- [69] Pollegioni L, Blodig W and Ghisla S 1997 On the mechanism of D-amino acid oxidase *J. Biol. Chem.* **272** 4924–34
- [70] Maeda-Yorita K, Aki K, Sagai H, Misaki H and Massey V 1995 L-lactate oxidase and L-lactate monooxygenase: mechanistic variations on a common structural theme *Biochimie* **77** 631–42
- [71] Berezin M Y and Achilefu S 2010 Fluorescence lifetime measurements and biological imaging *Chem. Rev.* **110** 2641–84
- [72] Monici M 2005 Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications *Biotechnol. Annu. Rev.* **11** 227–56
- [73] Heikal A A 2010 Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies *Biomark. Med.* **4** 241–63
- [74] Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F and Nakase Y 1979 Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals *J. Biol. Chem.* **254** 4764–71
- [75] Huang S, Heikal A A and Webb W W 2002 Two photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein *Biophys. J.* **82** 2811–25
- [76] Kwan A C, Duff K, Gouras G K and Webb W W 2009 Optical visualization of Alzheimer's pathology via multiphoton excited intrinsic fluorescence and second harmonic generation *Opt. Express* **17** 3679–89
- [77] Skala M C, Ricking K M K, Bird D K, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri K W, Keely P J and Ramanujam M 2007 *In vivo* multiphoton fluorescence lifetime imaging of proteinbound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia *J. Biomed. Opt.* **12** 024014
- [78] Sirotin Y B and Das A 2010 Spatial relationship between flavoprotein fluorescence and the hemodynamic response in the primary visual cortex of alert macaque monkeys *Front. Neuroenergetics* **2** 1–10
- [79] Hartnett M A, Ingersoll C M, Baker G A and Bright F V 1999 Kinetics and thermodynamics of free flavins and the flavin-based redox active site within glucose oxidase dissolved in solution or sequestered within a sol-gel-derived glass *Anal. Chem.* **71** 1215–24
- [80] Przybyl M, Miller E, Szreder T 2011 Thermostability of glucose oxidase in silica gel obtained by sol-gel method and in solution studied by fluorimetric method *J. Photochem. Photobiol. B* **103** 22–8
- [81] Yoshimoto M, Sato M, Wang S, Fukunaga K and Nakao K 2006 Structural stability of glucose oxidase encapsulated in liposomes to inhibition by hydrogen peroxide produced during glucose oxidation *Biochem. Eng. J.* **30** 158–63
- [82] Semashko T, Mikhailova R, Ramanaviciene A and Ramanavicius A 2013 Specificity of glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* 46.1 towards some redox mediators *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171** 1739–49
- [83] Trettnak W and Wolfbeis O S 1989 Fully reversible fibre-optic glucose biosensor based on the intrinsic fluorescence of glucose-oxidase *Anal. Chim. Acta* **221** 195–203
- [84] Chudobova I, Vrbova E, Kodicek M, Janovcova J and Kas J 1996 Fibre optic biosensor for the determination of D-glucose based on absorption changes of immobilized glucose oxidase *Anal. Chim. Acta* **319** 103–10
- [85] Lepore M, Portaccio M, De Tommasi E, De Luca P, Bencivenga U, Maiuri P and Mita D G 2004 Glucose concentration determination by means of fluorescence emission spectra of soluble and insoluble glucose oxidase: some useful indications for optical fibre-based sensors *J. Mol. Catal. B* **31** 151–8
- [86] Portaccio M, Lepore M, Della Vnetyra B, Stoilova O, Manolova N, Rashkov I and Mita D G 2009 Fiber-optic glucose biosensor based on glucose oxidase immobilised in a silica gel matrix *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **50** 437–48
- [87] Esposito P, Della Ventura B, De Nicola S, Altucci C, Velotta R, Mita D G and Lepore M 2011 Glucose sensing by time-resolved fluorescence of sol-gel immobilized glucose oxidase *Sensors* **11** 3483–97
- [88] Esposito R, Delfino I and Lepore M 2013 Time-resolved flavin adenine dinucleotide fluorescence study of the interaction between immobilized glucose oxidase and glucose *J. Fluoresc.* **23** 947–55
- [89] Przybyl M 2003 Behaviour of glucose oxidase during formation and ageing of silica gel studied by fluorescence spectroscopy *Mater. Sci.* **21** 397–416
- [90] de Marcos S, Galindo J, Sierra J F, Galbán J and Castillo J R 1999 An optical glucose biosensor based on derived glucose oxidase immobilised onto a sol-gel matrix *Sensors Actuators B* **57** 227–32
- [91] Trettnak W and Wolfbeis O S 1989 A fully reversible fiber optic lactate biosensor based on the intrinsic fluorescence of lactate monooxygenase *Fresenius Z. Anal. Chem.* **334** 427–30
- [92] Sanz-Vicente I, Lapieza M P, Cebolla V L and Galbán J 2015 Rapid enzymatic method for the determination of phosphorylcholine using the fluorescence of the enzyme choline oxidase. Sequential determination of choline and phosphorylcholine in milk powder for children *Microchem. J.* **123** 259–66
- [93] De Luca P, Lepore M, Portaccio M, Esposito R, Rossi S, Bencivenga U and Mita D G 2007 Glucose determination by means of steady-state and time-course UV fluorescence in free or immobilized glucose oxidase *Sensors* **7** 2612–25
- [94] Galbán J, Sanchez-Monreal O, Andreu Y, de Marcos S and Castillo J R 2004 Choline determination based on the intrinsic and the extrinsic (chemically modified) fluorescence of choline oxidase *Anal. Biochem.* **334** 207–15
- [95] Sanz-Vicente I, Romero J J, de Marcos S, Ubide C, Ostra M and Galban J 2009 Simultaneous determination of glucose and choline based on the intrinsic fluorescence of the enzymes *J. Fluoresc.* **19** 583–91
- [96] de Marcos S, Galbán J, Albajez R and Castillo J R 1997 Enzymatic determination of ethanol based on the intrinsic fluorescence of alcohol dehydrogenase *Anal. Chim. Acta* **343** 117–23
- [97] Tatsu Y and Yamamura S 2002 Fluorescence measurement of glucose by pyrene-modified oxidase *J. Mol. Catal. B* **17** 203–6
- [98] Odaci D, Gacal B N, Gacal B, Timur S and Yagci Y 2009 Fluorescence sensing of glucose using glucose oxidase modified by PVA-pyrene prepared via 'click' chemistry *Biomacromolecules* **10** 2928–34
- [99] Sanz V, Galbán J, de Marcos S and Castillo J R 2003 Fluorometric sensors based on chemically modified enzymes—glucose determination in drinks *Talanta* **60** 415–23

- [100] Sierra J F, Galbán J, de Marcos S and Castillo J R 2000 Direct determination of glucose in serum by fluorimetry using a labeled enzyme *Anal. Chim. Acta.* **414** 33–41
- [101] de Marcos S, Sanz V, Andreu Y and Galbán J 2006 Comparative study of polymeric supports as the base of immobilisation of chemically modified enzymes *Microchim. Acta* **153** 163–70
- [102] Galbán J, Sierra J F, López-Sebastian J M, de Marcos S and Castillo J R 2000 Direct fluorometric determination of total cholesterol in serum using derivatized cholesterol oxidase *Appl. Spectrosc.* **54** 1157–62
- [103] Wilhelm S, del Barrio M, Heiland J, Himmelstoß S F, Galban J, Wolfbeis O S and Hirsch T 2014 Spectrally matched upconverting luminescent nanoparticles for monitoring enzymatic reactions *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6** 15427–33
- [104] del Barrio M, de Marcos S, Cebolla V, Heiland J, Wilhelm S, Hirsch T and Galban J 2014 Enzyme-induced modulation of the emission of upconverting nanoparticles: towards a new sensing scheme for glucose *Biosens. Bioelectron.* **59** 14–20
- [105] Zhang J, Fu Y, Li G and Zhao R Y 2012 Metal plasmon-coupled fluorescence imaging and label free coenzyme detection in cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425** 696–700
- [106] Shao Q, Wu P, Xu X, Zhang H and Cai C 2012 Insight into the effects of graphene oxide sheets on the conformation and activity of glucose oxidase: towards developing a nanomaterial-based protein conformation assay *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14** 9076–85





# Analytical possibilities of Putrescine and Cadaverine enzymatic colorimetric determination in tuna based on diamine oxidase: A critical study of the use of ABTS

Jesús Navarro, Isabel Sanz-Vicente\*, Rebeca Lozano, Susana de Marcos, Javier Galbán

*Nanosensors and Bioanalytical Systems (N&SB), Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, Aragon Institute of Nanoscience, University of Zaragoza, 50009, Zaragoza, Spain*

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Putrescine  
Cadaverine  
Diamine oxidase  
ABTS  
HRP  
Tuna

## ABSTRACT

The joint determination of putrescine (Put) and cadaverine (Cad) in the presence of other biogenic amines is studied using their enzymatic reaction with diamine oxidase (DAO). Three alternative methods are studied based on the intrinsic colorimetric properties of DAO or horseradish peroxidase (HRP), and the use of 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) colorimetric reagent, respectively. In this last case an in-depth study is carried out in order to explain and solve some drawbacks usually associated with the use of this reagent (especially interferences, interaction with enzymes and instability), and to propose new analytical methodologies which this reagent allows to achieve (transient signal and the use of the violet species). Finally, the method has been applied to Put + Cad determination in a tuna sample without interference of other biogenic amines. The result has been compared with that obtained using a method based on HPLC-MS, which has allowed the new methodology to be validated.

## 1. Introduction

Putrescine (Put) and Cadaverine (Cad) are biogenic polyamines (BPA), specifically alpha omega-diamines, a sub-group of the biogenic amines (BA). BPA have great importance at the physiological level [1]. Low BPA levels reduce the biogenic synthesis of nucleic acids and proteins (leading to cellular growth inhibition). Normal levels are linked to correct cellular growth, but high BPA levels may lead to apoptosis or to malignant transformation [2]. Consequently, BPA biological synthesis and degradation should be balanced in order to keep BPA concentrations within appropriate narrow margins.

Foodstuffs are an additional (and non-controlled) source of BA [3]. The BAs are incorporated during manufacturing, as occurs with fermented foods (cheeses, wines, sauerkraut, etc.), but they also appear in non-fermented foods (e.g. scombroid fish, fruit juices, pork meat) when they are beginning to lose their freshness, due to microorganism proliferation.

The most frequent BA in foods [4–7] are Histamine, Tyramine, Phenylethylamine, Tryptamine and, from the BPA sub-group, Put and Cad. The concentration differs greatly from one food to another [5].

When foods containing BA are ingested, the biological BA levels are unbalanced and consequently physiological problems could be triggered.

From the health point of view, the most extensively studied are Histamine and Tyramine because they are related to “Scombroid poisoning” and “Cheese reaction,” respectively. Currently, Histamine is the only BA for which maximum limits have been set in the EU (Commission Regulation (EC) 2073/2005). Several studies suggest that the absorption, metabolism and/or potency of one BA might be modified by the presence of another. Put and Cad have not been classified as toxic, but they are able to enhance the toxicity of low concentrations of Histamine [8] (Put and Cad inhibit the action of monoamine oxidase and other enzymes which metabolize Histamine). Furthermore, during cooking Put and Cad can give rise to nitrosamines, which are carcinogenic substances [9]. To prevent all these problems, Put and Cad need to be controlled or monitored in foods. Therefore, having rapid and easy methods for their determination is of considerable interest.

BPA or BA mixtures are currently analyzed in foodstuffs using classical methodologies based on the combination of a sample treatment with the appropriate solvent and the application of an instrumental separation technique to the extract [10]. For example, for solid samples a conventional procedure consists of acid treatment (using trichloroacetic, perchloric or hydrochloric acids) followed by reversed-phase (U)HPLC with molecular absorption or fluorescence detection [11–13] after derivatization, although TLC, GC (after derivatization) or

\* Corresponding author.

E-mail address: [isasanz@unizar.es](mailto:isasanz@unizar.es) (I. Sanz-Vicente).

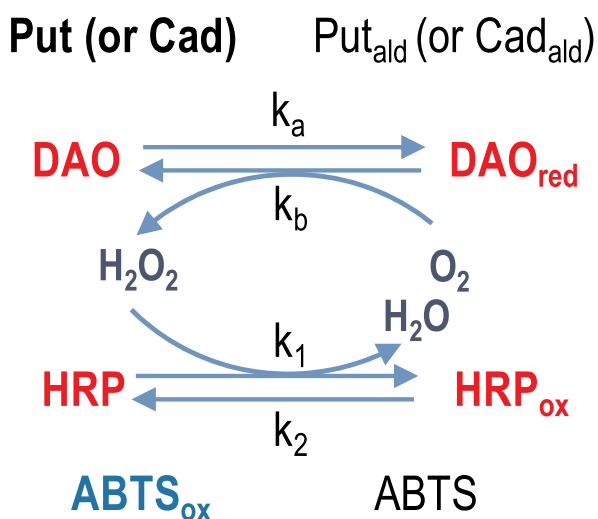


Fig. 1. Sequence of the enzymatic reactions used for BPA determination.

capillary electrophoresis have also been proposed.

For one BA or BPA (or the total concentration of them) monitoring, the most frequently used methods found in bibliography are electroanalytical (bio)sensors, based on enzymatic reactions, and amperometric detection. For BPA, a classical sequence of two enzymatic reactions is used (Fig. 1). In the first one, the enzyme diamine oxidase (DAO) catalyzes the BPA oxidation (to the corresponding aldehyde) by O<sub>2</sub> (giving H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). In the second one, the enzyme peroxidase (HRP) catalyzes the oxidation of a charge transfer mediator by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, giving a product active in amperometry [14–16]. In this reaction only one of the NH<sub>2</sub> groups of the BPA reacts and the product is later cycled.

Although the same scheme is frequently used for the colorimetric determination of biochemical metabolites, replacing the charge transfer mediator by a chromogen (such as 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) [17,18] or 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)), for BPA determination colorimetric methods based on this scheme [18], or on enzymatic reactions [19], are scarce. These methods are usually based on using synthetic chemical receptors. In this context, interesting methods based on the volatility of the low molecular weight BA coupled with the use of an acid-based indicator, a more specific chromogen [20–22] or a chromophores array [24] have been described. These also allow this methodology to be implemented in smart packages [22,23] for the naked-eye instant control of these compounds. For methods in solution, more selective chemical and biological receptors have been proposed [25], either with intrinsic chromogenic properties which are combined with those of gold nanoparticles (AuNP) [23,24] or, more recently, only using the chromophore properties of AuNP [26]. Some nanomaterials can also act both as receptors and as chromophores, but their selectivity against BPA (or BA) need to be carefully tested [26,27] in real samples.

Many enzymes present intrinsic spectroscopic (UV–vis absorption and fluorescence) properties due to the corresponding coenzymes. In some of them, if the reaction conditions are properly chosen it is possible to observe changes in these intrinsic properties during the corresponding enzymatic reactions, so they can be used as the analytical signals in batch methods or biosensors [28]. For example, the HRP presents several absorption bands due to the heme-group, whose exact  $\lambda$  and  $\epsilon$  depend on the heme-group oxidation state and on the ligands linked to this atom [29]. Going back to the scheme in Fig. 1, if the indicating reaction is carried out in the absence of ABTS, the HRP–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction gives an oxidized form of the (HRPII), having an absorption spectra different from that of HRP. This difference can be used as the basis of a spectrophotometric biosensor for either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> monitoring [30] or an analyte [31,32] which produces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a previous enzymatic reaction, Put or Cad in this case. DAO from *Lathirus cicera*

contains a cofactor composed of a tri-copper group linked to a topa-quinone group, which absorbs in the visible spectral region [33]. As far as we know, these properties have not yet been tested for analytical purposes.

Taking Fig. 1 as a basis, the aim of this paper is to study the analytical possibilities of DAO, HRP and ABTS for Put and Cad determination. In the latter case, secondary reactions which can occur with this reagent (which are not usually taken into account) are discussed. The possible interferences caused by the rest of the BA usually present in these types of sample have also been studied. The optimized methods are used for BPA determination in a tuna extract sample (scombroid fish) with good results.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents and solutions

Phosphate buffer solution (0.1 M, pH 6.0) was prepared from Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solids (Sigma S9638 and S9763).

Hydrogen peroxide stock solution (33% w/v) was supplied by Panreac (131077.1211). Peroxidase from *Horseradish* (HRP EC 1.11.1.7) was obtained from Sigma (P8125 88.6 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>). Diamine oxidase (DAO EC 1.4.3.22) was taken from three different organisms: *Lathirus cicera* (Molirom P021, 280U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>), *Porcine kidney* (Sigma D7876, 0.05U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>) and Plant (Bio-Research 903X, 5000U).

Cadaverine (C8561), Putrescine (P7505), Histamine (53300), Phenylethylamine (P6513), Tyramine (T287998), Tryptamine (246557) and 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (A1888) were supplied by Sigma. All solutions were daily weighed and dissolved in the buffer solution; ABTS solutions were stored in darkness.

The ruthenium solution (Ru) was prepared by dissolving 1 mg of tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate) (Sigma 544981) in 0.50 mL of dimethyl sulfoxide (Panreac131954.1611).

### 2.2. Equipment

The molecular absorption measurements were performed using a Hewlett-Packard model HP 8452A diode-array spectrophotometer equipped with a HP 89090A Peltier temperature and stirrer control accessory. Depending on the measurement wavelength, quartz (Hellma QS 101) or glass (Hellma Q 101) cuvettes were used of 1 cm of path length.

The fluorescence measurements were carried out with a Photon Technology International (PTI) Time Master fluorescence spectrometer working in a L-configuration (model TM-2/2003-PTI) and a quartz (Hellma QS 101) cuvette.

### 2.3. Procedure

The variation of the absorbance during the enzymatic reaction was measured at different wavelengths depending on whether the DAO intrinsic signal (465 nm), the HRP intrinsic signal (405 and 420 nm) or the ABTS signal (420 and 730 nm) was used.

After choosing the wavelength, the appropriate reagent concentrations were added into the cuvette with the buffer solution: a) 76 U/mL of DAO in the DAO method; b) 2 U/mL DAO and 25 U/mL HRP in the HRP method; and c) 2 U/mL of DAO, 2 U/mL of HRP and 4\*10<sup>-4</sup> M of ABTS in the ABTS method (total volume in the cell, 2 mL). The cuvette was then introduced in the spectrometer, the stirrer was connected and the measurement was started in the kinetic mode. After 50 s (to obtain the baseline), 20  $\mu$ L of the analyte (or sample) solution was injected and the variation of absorbance during the reaction was recorded over time. When ABTS was used, a filter must be placed between the lamp (D<sub>2</sub>) and the cell to avoid the photooxidation of the dye. During the optimization studies, the concentration of the reagents and other conditions

were modified depending on the parameter to be studied.

The measurements of the O<sub>2</sub> consumption during the enzymatic reaction of DAO and BA were made by fluorescence (457 nm excitation and 618 nm fluorescence wavelengths). For this, phosphate buffer (0.1 M, pH = 7), DAO (2U/mL) and Ru (1.40\*10<sup>-5</sup> M) solutions were placed in the cuvette (total volume 2 mL) and the initial fluorescence value was obtained. After 90 s, 20 µL of the analyte (Cad, Put, ...) solution was injected and the variation of fluorescence during the reaction was measured.

All measurements have been carried out a minimum of three times (n = 3).

#### 2.4. Tuna sample treatment

The sample was prepared and treated by the *Laboratorio de Salud Pública de Aragón* (LSPA).

The tuna sample was submitted to acid treatment by using a previously validated method [34]. In short, 2.5 g of tuna was treated with 20 mL 5% trichloroacetic acid; the samples were shaken in a vortex for 30 s. Then, the mixture was submitted to ultracentrifugation for 10 min at 4000 rpm (4 °C). This operation was repeated twice. The filtrate was taken to 50 mL with 5% trichloroacetic acid.

One fraction of it was analyzed by HPLC-MS and another was analyzed by the colorimetric procedure previously described.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. DAO and HRP intrinsic properties

##### 3.1.1. DAO intrinsic properties

DAO coming from three different organisms were tested (see Material and methods section), but that from *Lathirus cicera* was finally chosen because of its higher activity. This enzyme contains a 6-hydroxydopa quinone (HPQ) moiety linked to Cu(II) as the active center. The detailed mechanism through which DAO catalyzes BA oxidation by O<sub>2</sub> corresponds to a ping-pong type, and has been previously studied [35]. However, considering the aim of this paper, it can be simplified to a two step process, as indicated in Fig. 1.

First, a kinetic study was conducted in order to characterize the reactivity of DAO with Put, Cad and the most representative BA present in the samples (Histamine, Tyramine, Phenylethylamine and Tryptamine). To do so, the O<sub>2</sub> consumption during the enzymatic reaction was measured (Fig. S1) using a fluorescence oxygen sensor. The order of the reaction rate obtained was as follows

$$\text{Put} \approx \text{Cad} \gg \text{Histamine} \approx \text{Phenylethylamine} \gg \text{Tryptamine} \approx \text{Tyramine} \quad (1)$$

which agrees with the kinetic constants previously reported [36]. The DAO molecular absorption spectra variation during the reaction using Put as the substrate is given in Fig. S2. The original (DAO, oxidized) form does not show recognizable maxima. When the substrate concentration was lower than the O<sub>2</sub>, no spectral changes were observed during the reaction (indicating that the DAO reoxidation step is very fast). Only when the substrate concentration was higher than the O<sub>2</sub> did a new small maximum appear at about 465 nm. According to the

bibliography, this spectrum corresponds to an alternative reduced (semiquinonic) form which only appears when the whole O<sub>2</sub> present in the solution has been consumed (about 2.2\*10<sup>-4</sup> M at 20 °C). The absorbance changes at this wavelength can be used as the analytical signal, but this methodology has two drawbacks: 1) The amount of the enzyme necessary to observe these spectral changes is very high; 2) Even in these conditions the maximum absorbance change is low, so the expected method sensitivity is very low. The quantification limit obtained was about 0.35 mM (which corresponds to the concentration given in Fig. S2).

##### 3.1.2. HRP intrinsic properties

As has been indicated, the HRP and HRPII forms present different absorption spectra (Fig. S3). Then, during the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP reaction, transient signals at 420 nm are observed whose height and area are related to the peroxide concentration. When this reaction is coupled to the DAO/Put system, similar absorbance changes (due to Put) are observed. It is possible to use these absorbance changes as the analytical signal avoiding the use of a chromophore (ABTS, TMB, ...) and to re-use the HRP for different measurements (Fig. S4). About 15 measurements can be formed using the same HRP aliquot, although more than 5 are not recommendable if reproducible measurements are to be obtained. After the DAO concentration optimization, Fig. S5 shows the absorbance versus time representations obtained after submitting individual BA to the enzymatic reaction with DAO/HRP. In general, BA behave similarly to that indicated in (1). Again, Histamine and Phenylethylamine give a signal which can interfere in BPA determination, but their effect will only be important when Histamine or Phenylethylamine concentrations are about 10 times higher than those of BPAs. Particularly remarkable was Tyramine and Tryptamine behavior. As can be expected, no signal was observed with both BA; however, the signal of Cad and Put decreases in the presence of Tyramine and Tryptamine. They are able to suppress the signal given by BPA because they are able to react with HRPII and to regenerate HRP (Fig. S6A). The interference caused by Tyramine is strong (Fig. S6B). Even for concentrations lower than that of the BPAs, its interference is important. This problem could be solved if the DAO and HRP reactions are phased out and HRP is added after Tyramine has completed its reaction with DAO, but a very long reaction time would be necessary. Tryptamine causes a similar effect on HRPII but its regeneration rate is lower than that of Tyramine so its interference is quantitatively less important. Moreover, the Tryptamine concentration in most of the samples is usually very small.

The analytical figures of merit for Put and Cad determination have been obtained using the absorbance change at 420 nm as the analytical parameter. The linear response range, the sensitivity and the RSD for both BPAs are shown in Table 1. As can be seen, the sensitivity of Put is higher than that of Cad. A calibration study was carried out with mixtures of Put and Cad in proportions of 50%, and an intermediate slope was obtained, closer to that of Cad. The signals obtained for mixed solutions of Cad and Put in different proportions were interpolated in this calibration line. The errors obtained were between 3 and 10%, which would allow an estimation of the total concentrations of cadaverine and putrescine in real samples using the intrinsic signal of HRP.

**Table 1**

Figures of merit for Cadaverine and Putrescine determination using HRP intrinsic properties or HRP-ABTS system.

	Calibration line ([Cad] or [Put] in M)	range (M)	RSD (%)
HRP (420 nm)	$\Delta A_{\max} = -0.0004 + 28931 [\text{Put}]; f_{0.997}$	1.2*10 <sup>-6</sup> to 5.0*10 <sup>-6</sup>	3.7% (n = 4)
	$\Delta A_{\max} = -0.0016 + 21366 [\text{Cad}]; r = 0.999$	1.2*10 <sup>-6</sup> to 7.0*10 <sup>-6</sup>	4.8% (n = 4)
	$\Delta A_{\max} = 0.0019 + 22960 [\text{Cad} + \text{Put}]; r = 0.999$	1.6*10 <sup>-6</sup> to 6.0*10 <sup>-6</sup>	4.6% (n = 4)
HRP/ABTS (730 nm)	$\Delta A_{\max} = 0.0005 + 26036 [\text{Put}]; r = 0.999$	5.0*10 <sup>-7</sup> to 3.0*10 <sup>-6</sup> (*)	4.2% (n = 4)
	$\Delta A_{\max} = -0.0007 + 24467 [\text{Cad}]; r = 0.998$	5.0*10 <sup>-7</sup> to 3.0*10 <sup>-6</sup> (*)	5.0% (n = 4)

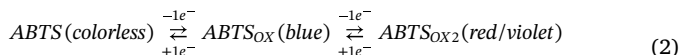
(\*) Maximum concentrations tested.

### 3.2. Method based on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP/ABTS reaction: previous considerations

Several chromophores have been proposed as colorimetric indicators in methods involving H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP, TMB and ABTS being the most important. Both present similar properties, but for measurements in solution ABTS is preferred because of its solubility in water. Although the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP/ABTS system is frequently used in analytical methodologies, there are several aspects which are not appropriately described in the bibliography and could help to avoid some problems.

#### 3.2.1. Instability of the ABTS compound

ABTS can exist in three oxidation states [37,38]:



Since in ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP reactions the ABTS concentration is always in excess of that of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the ABTS<sub>OX2</sub> is not formed. The oxidation to the blue ABTS<sub>OX</sub> is the process of choice. This compound presents several absorption maxima. The strongest appears at 420 nm, but its blue color is due to that presents in the visible region (about 730 nm). Both spectral regions are used for quantification but the maximum at 730 presents less interference problems and this will be used throughout the rest of this paper.

It is known that ABTS forms suffer from slight instability, due to a photooxidation to form the ABTS<sub>OX</sub> species. This can be avoided using an appropriate optical filter (Fig. S7). Moreover, it has been reported that ABTS<sub>OX</sub> suffers disproportionation according to Refs. [37,38]:



This last process is slow ( $k_1$  or  $k_{-1}$  constants have not been previously reported) and is one of the factors responsible for the loss of the blue color with time. From (3) it is clear that the higher the ABTS concentration used, the smaller the disproportionation, so it is recommendable to use high ABTS concentrations (see Fig. 2). Moreover, the higher the ABTS concentration, the larger the linear response range. However, this effect does not explain why the ABTS<sub>OX</sub> absorbance continuously decreases even in very high excess concentrations of ABTS. A very interesting aspect is the HRP concentration. The kinetic of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS/HRP reaction is very fast, so low HRP concentrations are sufficient. However, when high HRP concentrations are used, the blue color is lost more quickly (Fig. 3). This can be explained considering the reducing properties of the protein. We have stated [30] that HRPII can be reduced to the HRP initial compound by the action of tyrosine and tryptophan moieties present in the aminoacidic envelope

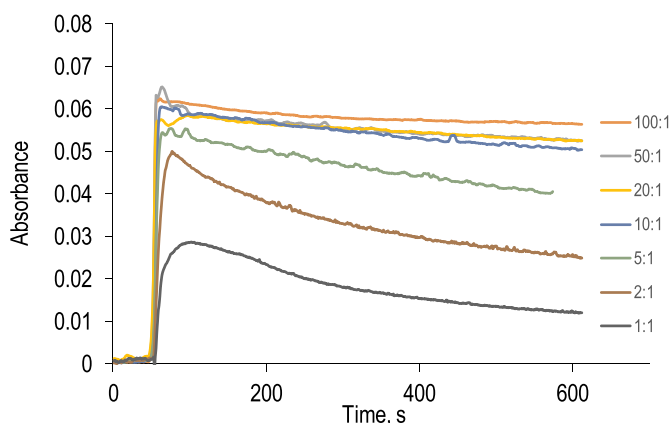


Fig. 2. ABTS concentration effect on the stabilization of the ABTS<sub>OX</sub> signal. Experimental conditions:  $\lambda = 730 \text{ nm}$ ,  $[HRP] = 2 \text{ U/mL}$ ,  $[H_2O_2] = 2.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 6$ .

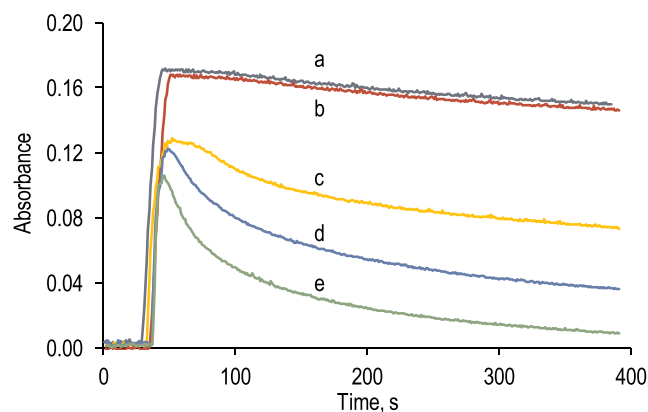


Fig. 3. HRP concentration effect on the ABTS<sub>OX</sub> signal. Experimental conditions:  $\lambda = 730 \text{ nm}$ ,  $[ABTS] = 4.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[H_2O_2] = 2.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 6$ .  $[HRP]$  concentrations used (in U/mL) were as follows: a) 0.8; b) 1.5; c) 5.0; d) 15; e) 30.

surrounding the protein. These amino acids may also be able to reduce ABTS<sub>OX</sub>, according to the process:



where HRP' represents the "oxidized" resulting HRP. In the supplementary material (Appendix S1) a detailed theoretical/experimental study is presented in order to demonstrate the process (4) and to calculate the  $k_1$  and  $k_2$  values, these being:

$$k_1 = 39(\pm 2) \text{ s}^{-1} \quad k_2 = 480(\pm 480) \text{ s}^{-1} \quad (5)$$

We have obtained similar results after changing the HRP excess for albumin, which also presents several tyrosine and tryptophan moieties close to the protein surface, so any protein can potentially act as an ABTS<sub>OX</sub> reducer. It is important to take this effect into account when combining the ABTS/HRP with another enzymatic reaction or when the method is to be applied to a protein-containing sample. In conclusion, the HRP concentration affects the colorimetric method. First, HRP is necessary to catalyze the ABTS oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and, second, HRP is able to reduce the ABTS<sub>OX</sub>.

#### 3.2.2. Conditions for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determination in batch and continuous mode

We can conclude that the best experimental conditions for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determination by the blue color measurement (ABTS<sub>OX</sub>) are obtained using low HRP and high ABTS concentrations. Fig. S8 shows the calibration line obtained in these conditions. Considering the stoichiometry of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS reaction, the maximum theoretical sensitivity for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determination using this method will be given by (averaged value):

$$\text{maximum sensitivity} = 2 \epsilon_{ABTS_{OX}}^{730} = 3.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (6)$$

The sensitivity we obtained in the optimized conditions was statistically similar (*t*-test) to this value, indicating that the experimental conditions are optimized. Accordingly, the detection limit (DL) will be given by:

$$DL = \frac{3 s_{Bl}^{730}}{2 \epsilon_{ABTS_{OX}}^{730}} \quad (7)$$

being  $s_{Bl}^{730}$  the standard deviation of the blank values, which normally depends on the dominant noise in the spectrophotometer used. It is important to take this into account because in recent years several families of materials (nanomaterials in many cases) have appeared in the bibliography presenting so-called "peroxidase-like" activity and the quality of many of them has been tested using the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS reaction. From equations (5) and (6) it can be deduced that these new materials are not able to improve the sensitivity and/or the DL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

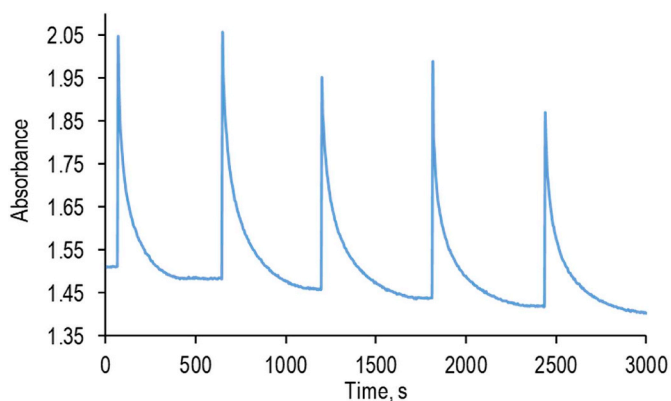


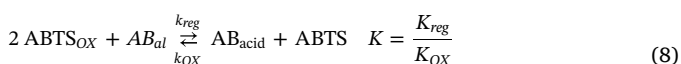
Fig. 4. Transient signal obtained using very high HRP concentration. Experimental conditions:  $\lambda = 730$  nm, injection volume =  $90 \mu\text{L}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9.8 \times 10^{-5}$  M,  $[\text{HRP}] = 290 \text{U/mL}$ ,  $[\text{ABTS}] = 4.4 \times 10^{-5}$  M,  $\text{pH} = 6$ .

determination using HRP.

Moreover, the effect of HRP previously shown (4) provides a different way to perform the  $\text{H}_2\text{O}_2$  determination. If a very high HRP concentration is used, then the whole  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  formed during the enzymatic reaction can be completely regenerated back to ABTS and a transient signal is obtained. This permits the same ABTS/HRP aliquot to be used for several  $\text{H}_2\text{O}_2$  measurements. As an example, Fig. 4 shows the results obtained after the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  aliquots ( $90 \mu\text{L}$ ) of the same concentration ( $9.8 \times 10^{-5}$  M). With the ABTS/HRP concentrations used in this proof of concept, up to 5 measurements can be carried out (after normalizing considering the different concentrations a  $\text{RSD} = 6.5\%$  was obtained), but this can be modified. These results also allow this reaction to be used as the basis for a reversible sensor.

### 3.3. Method based on the $\text{H}_2\text{O}_2$ /HRP/ABTS reaction: Put and Cad determination

The very first experiments were carried out using the HRP and ABTS concentrations considered optimum in the previous section. In these conditions the Put and Cad  $\text{Abs} = f(t)$  obtained are shown in Fig. 5 A. As can be seen, both compounds give similar signals. The only difference was due to the final decrease of the absorbance. This decrease is higher than that expected just considering the comproportionation (2) and/or the reduction back by HRP (3). This has been studied in detail and we found that it was due to the later reaction of  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  with the corresponding product (aldehyde) of the enzymatic reaction, which regenerates back the ABTS according to:



where  $\text{BA}_{\text{al}}$  and  $\text{BA}_{\text{acid}}$  represent the aldehyde and acid species of the substrate. Fig. 5A also indicates that the corresponding  $K$  is higher for Cad. This produces a different slope (sensitivity) of the calibration lines obtained for both analytes (Fig. S9), which is a drawback for the joint determination of both analytes. Moreover, the slopes of the calibration are lower than those maxima expected given by (6). According to (8) this problem could also be reduced by increasing the ABTS concentration (see Fig. 5B and also Fig. S10).

Fig. 6 also shows the ABTS absorbance profiles obtained after applying the reaction to the most common BA present in the samples. Again, the signals produced by Histamine and Tyramine are marked. In the HRP method, Tyramine interferes because it is able to regenerate HRP, but in this method this interference is not observed. This is because the kinetic of the HRP regeneration by ABTS is faster than that by Tyramine, so the  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  formation predominates over the interference.

At the beginning of the reaction the Histamine absorbance increases up to a maximum, which then decreases down to the initial absorbance (zero). Considering the previous results, we hypothesized that the product of the reaction with DAO/ $\text{O}_2$  (imidazole acetaldehyde,  $\text{His}_{\text{al}}$ ) behaves according to (7), the regeneration process being faster than the oxidation. Again, the addition of more ABTS provides a partial solution to this problem (Fig. 7), so Put and Cad can be determined in the presence of a 5/1 Histamine excess (Fig. 8).

The optimization studies for Put and Cad determination by this method were limited to the pH and the DAO concentration. Before the optimization, we examined whether DAO was able to regenerate  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  in a similar way to HRP. The experimental results (Fig. S11) indicated that up to at least  $6 \text{U/mL}$ , DAO does not affect the  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  stability. After DAO optimization (Fig. S12), the analytical figures of merit for Put and Cad were obtained (Table 1, and Fig. S10). As can be seen, both analytes can be determined with the same sensitivity (test- $t$ ) which is also of the same order as that obtained for  $\text{H}_2\text{O}_2$  (the maximum allowed (5)) indicating that in the experimental conditions used the whole Put and Cad is finally transformed into  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$ .

In this case it is also possible to measure Put and Cad using high HRP concentrations in order to obtain  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  transient signals similar to those described in the previous section for  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 4). The results are given in Fig. 8. These results indicate that the use of this methodology can be established as the basis for a partially reversible sensor for Put and Cad determination.

### 3.4. Put + Cad determination in a real sample

Both methods, that based on DAO/HRP (section 3.1) and that based on DAO/HRP/ABTS (section 3.2), have advantages and drawbacks. The final selection will depend on the type of sample to be determined, i.e. the concentrations of the BA present in the type of sample. Much previous information about the relative content of different BAs and BPAs can be found in the bibliography, so it is possible to choose the most appropriate for each type of sample. In this study, we have collaborated with the LSPA (see the Material and methods section) who provided an extract of a tuna sample which they had analyzed using a previously validated HPLC-MS method [34], allowing the 6 BAs to be determined (Table S1). Considering the relative concentration of BAs, the DAO/HRP/ABTS method was applied, and the results were compared ( $n = 3$ ) with those obtained by the present method.

[Cad+Put], this method ( $n=3$ )	[Cad+Put], HPLC-MS method ( $n=3$ )
520 mg/Kg ( $\pm 70$ mg/Kg)	480 mg/Kg ( $\pm 20$ mg/Kg)

(9)

As can be seen, both results were statistically similar, according to a  $t$ -test (95% confidence  $t_{\text{cal}} = 2.09 < t_{\text{crit}} = 2.78$ ) which validates this method.

Only 2 min are required for the measurement and the instrumentation is conventional and economical. The methodology therefore represents a good alternative to chromatographic methods for its speed and simplicity.

## 4. Conclusions

First, in this paper it has been demonstrated that the use of the intrinsic properties of enzymes is an alternative methodology which can compete in selectivity and simplicity with the most classical colorimetric methods. Second, this paper shows that the methodology based on the classical HRP/ABTS system works well when combined with DAO. However, several problems affecting the instability of the  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  and  $\text{BA}_{\text{al}}$  species need to be previously solved, just by optimizing the ABTS concentration. Such problems could also appear when HRP/ABTS is combined with any other oxidase enzymes for the determination of other metabolites, so it is important to taken them into account. Finally, by increasing the HRP concentration,  $\text{ABTS}_{\text{ox}}$  transient signals are

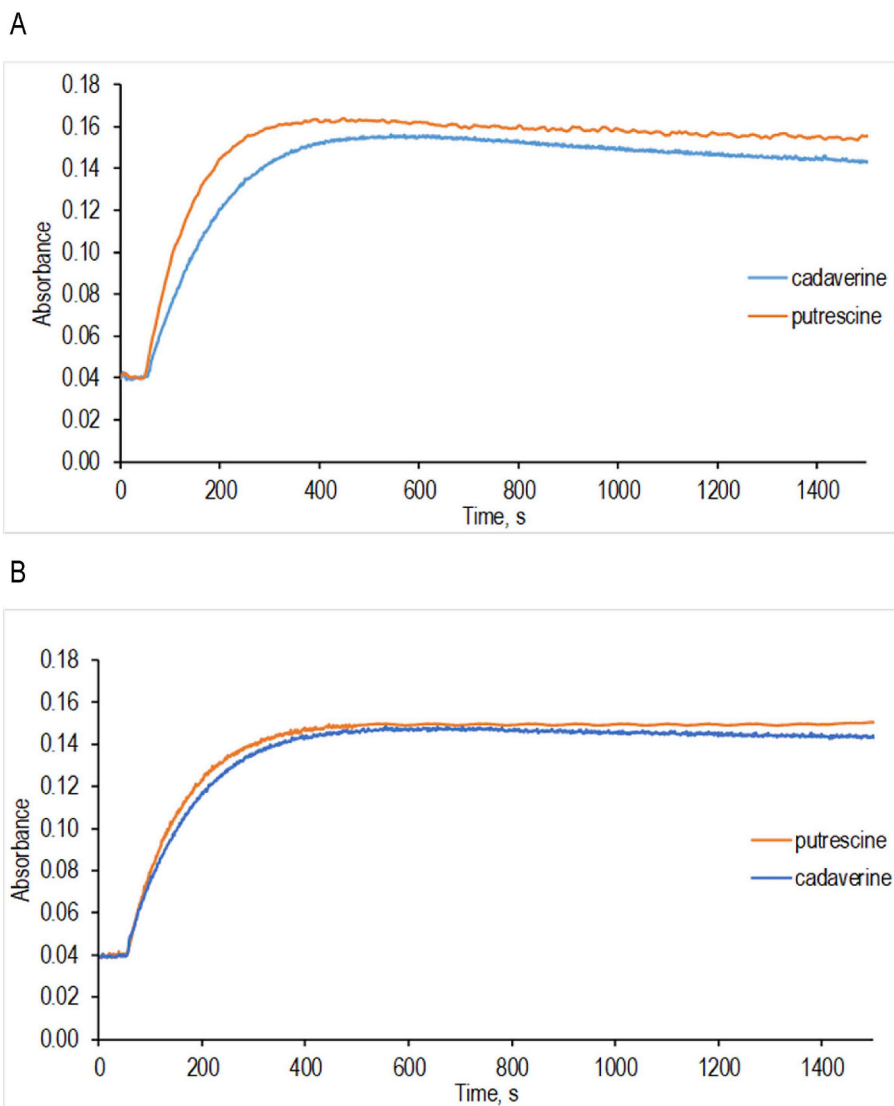


Fig. 5. Influence of ABTS concentration on the signal of Cad and Put. A) ABTS =  $4.4 \cdot 10^{-5}$  M B) ABTS =  $4.4 \cdot 10^{-4}$  M. Experimental conditions:  $\lambda = 420$  nm, [Cad] = [Put] =  $2.2 \cdot 10^{-6}$  M, [HRP] = 2U/mL, [DAO] = 1.5 U/mL, pH = 6.

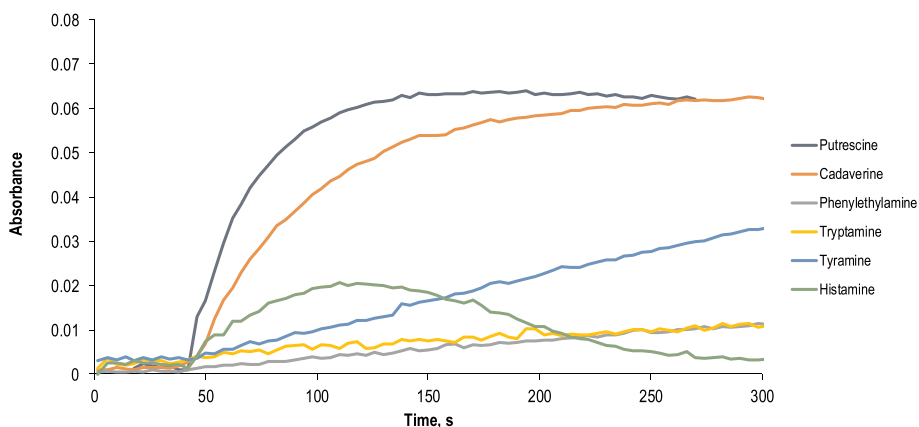
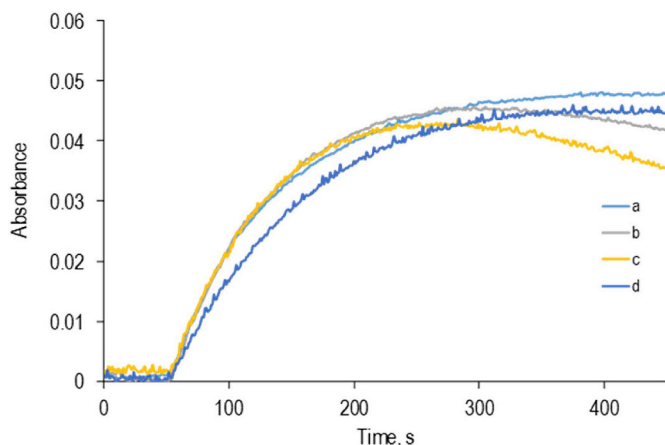
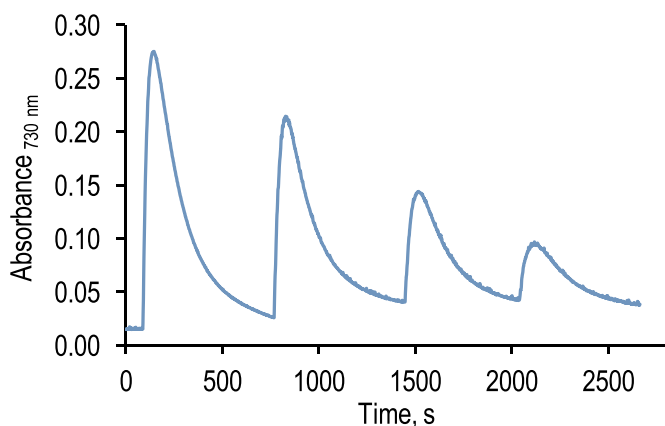


Fig. 6. Abs versus time recorders obtained with different BA. Experimental conditions:  $\lambda = 730$  nm, [ABTS] =  $4.4 \cdot 10^{-5}$  M, [Cad] = [Put] =  $2.4 \cdot 10^{-6}$  M, [Histamine] =  $2.4 \cdot 10^{-5}$  M, [Phenylethylamine] = [Tyramine] = [Tryptamine] =  $4.0 \cdot 10^{-6}$  M [HRP] = 2 U/mL, [DAO] = 1.8 U/mL, pH = 6.



**Fig. 7.** ABTS effect on the Histamine effect on Put determination. Experimental conditions: [HRP] = 2 U/mL, [DAO] = 1.8 U/mL, [Put] =  $2.0 \times 10^{-6}$  M, pH = 6,  $\lambda$  = 730 nm [ABTS] =  $4.5 \times 10^{-5}$  M (except d). a) no Histamine b) [Histamine] =  $4.0 \times 10^{-6}$  M c) [Histamine] =  $4.0 \times 10^{-5}$  M d) [Histamine] =  $4.0 \times 10^{-5}$  M and [ABTS] =  $4.5 \times 10^{-4}$  M.



**Fig. 8.** Abs versus time transient signals ( $\lambda$  = 730 nm) obtained with different Put concentrations. Experimental conditions: 2 mL in the cell containing [ABTS] =  $4.8 \times 10^{-5}$  M, [HRP] = 190 U/mL and [DAO] = 2.0 U/mL, 20  $\mu$ L aliquots of Put solutions are sequentially added giving the following concentrations: a)  $3.0 \times 10^{-5}$  M; b)  $1.5 \times 10^{-5}$  M; c)  $7.4 \times 10^{-6}$  M; d)  $3.7 \times 10^{-6}$  M.

obtained, which allows this method to be used as the basis for reversible sensors for Put and Cad. The same idea can also be applied to other colorimetric methods based on the ABTS/HRP colorimetric reaction.

#### Acknowledgments

This work was supported by the MINECO of Spain (project CTQ2016-76846R) and by Research groups funded by DGA-FEDER (group E25\_17R). J Navarro thanks the Government of Aragon (DGA) for a grant. The authors are also very grateful to Dr. Francisco Palacios and MSc Cristina Asensio from the Laboratorio de Salud Pública de Aragón (LSPA, DGA) for their invaluable help.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120392>.

#### References

[1] L. Persson, Polyamine homeostasis, *Essays Biochem.* 46 (2009) 11–24 <https://doi.org/10.1042/bse0460002>.

[2] N. Seiler, R. Francis, Polyamines and apoptosis, *J. Cell Mol. Med.* 9 (2005) 623–642 <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00493.x>.

[3] M.H. Silla Santos, Biogenic amines: their importance in foods, *Int. J. Food Microbiol.* 29 (1996) 213–231 [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1).

[4] N. Benkerroum, Biogenic amines in dairy products: origin, incidence and control means, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15 (2016) 801–826 <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>.

[5] V. Ladero, M. Calles-Enríquez, M. Fernández, M.A. Álvarez, Toxicological effects of dietary biogenic amines, *Curr. Nutr. Food Sci.* 6 (2010) 145–156 <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>.

[6] S.L. Taylor, R.R. Eitenmiller, Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 17 (2) (1986) 91–128 <https://doi.org/10.3109/10408448609023767>.

[7] P. Visciano, M. Schirone, R. Tofalo, G. Suzzi, Biogenic amines in raw and processed seafood, *Front. Microbiol.* 3 (2012) 188 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00188>.

[8] G. Jairath, P.K. Singh, R.S. Dabur, M. Rani, M. Chaudhari, Biogenic amines in meat and meat products and its public health significance: a review, *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 6835–6846 <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1860-x>.

[9] A.R. Shalaby, Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Res. Int.* 29 (7) (1996) 675–690 [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X).

[10] G.I. Mohammed, A.S. Bashammakh, A.A. Alsibaai, H. Alwael, M.S. El-Shahawi, A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 78 (2016) 84–94 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.007>.

[11] F.B. Erim, Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 52 (2013) 239–247 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.018>.

[12] J.L. Ordóñez, A.M. Troncoso, M.C. García-Parrilla, R.M. Callejón, Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages—A review, *Anal. Chim. Acta* 939 (2016) 10–25 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.045>.

[13] S. Sentellas, O. Núñez, J. Saurina, Recent advances in the determination of biogenic amines in food samples by (U) HPLC, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 7667–7678 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02789>.

[14] S. Tombelli, M. Mascini, Electrochemical biosensors for biogenic amines: a comparison between different approaches, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 277–284 [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00606-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00606-5).

[15] S. Leonardo, M. Campàs, Electrochemical enzyme sensor arrays for the detection of the biogenic amines histamine, putrescine and cadaverine using magnetic beads as immobilisation supports, *Microchim. Acta (Online)* 183 (6) (2016) 1881–1890, <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1821-8>.

[16] X. Yang, B. Feng, X. He, F. Li, Y. Ding, J. Fei, Carbon nanomaterial based electrochemical sensors for biogenic amines, *Microchim. Acta* 180 (2013) 935–956 <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1015-6>.

[17] M.B. Arnao, A. Cano, M. Acosta, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.* 73 (2001) 239–244 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1).

[18] J.I. Lee, J.H. Jang, M.J. Yu, Y.W. Kim, Construction of a bifunctional enzyme fusion for the combined determination of biogenic amines in foods, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 9118–9124 <https://doi.org/10.1021/jf403044m>.

[19] H. Usman, M.H. Abu Bakar, A.S. Hamzah, A.B. Salleh, A tapered fibre optics biosensor for histamine detection, *Sens. Rev.* 36 (2016) 40–47 <https://doi.org/10.1108/SR-06-2015-0101>.

[20] P.Q. Leng, F.L. Zhao, B.C. Yin, B.C. Ye, A novel, colorimetric method for biogenic amine detection based on arylalkylamine N-acetyltransferase, *Chem. Commun.* 51 (2015) 8712–8714 <https://doi.org/10.1039/C5CC02370J>.

[21] N. Kaur, S. Chopra, G. Singh, P. Raj, A. Bhasin, S.K. Sahoo, A. Kuwar, N. Singh, Chemosensors for biogenic amines and biothiols, *J. Mater. Chem. B* 6 (2018) 4872–4902 <https://doi.org/10.1039/C8TB00732B>.

[22] C. Schaude, C. Meindl, E. Fröhlich, J. Attard, G.J. Mohr, Developing a sensor layer for the optical detection of amines during food spoilage, *Talanta* 170 (2017) 481–487 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.029>.

[23] J.L. Pablos, S. Vallejos, A. Muñoz, M.J. Rojo, F. Serna, F.C. García, J.M. García, Solid polymer substrates and coated fibers containing 2,4,6-trinitrobenzene motifs as smart labels for the visual detection of biogenic amine vapors, *Chem. Eur J.* 21 (2015) 8733–8736 <https://doi.org/10.1002/chem.201501365>.

[24] N. Jornet-Martínez, M. González-Béjar, Y. Moliner-Martínez, P. Campins-Falcó, J. Pérez-Prieto, Sensitive and selective plasmonic assay for spermine as biomarker in human urine, *Anal. Chem.* 86 (2014) 1347–1351 <https://doi.org/10.1021/ac404165j>.

[25] Y. Chen, Y. Zhang, Y. Gao, J. Lee, H. Chen, Y. Yin, Visual determination of aliphatic diamines based on host-guest recognition of calix[4]arene derivatives capped gold nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* 72 (2015) 306–312 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.036>.

[26] K.M.A. El-Nour, E.T.A. Salam, H.M. Soliman, A.S. Orabi, Gold nanoparticles as a direct and rapid sensor for sensitive analytical detection of biogenic amines, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (1–11) (2017) 231 <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2014-z>.

[27] K.A. Rawat, J.R. Bhamore, R.K. Sinhal, S.K. Kailasa, Microwave assisted synthesis of tyrosine protected gold nanoparticles for dual (colorimetric and fluorimetric) detection of spermine and spermidine in biological samples, *Biosens. Bioelectron.* 88 (2017) 71–77 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.069>.

[28] J. Galbán, I. Sanz-Vicente, E. Ortega, M. del Barrio, S. de Marcos, Reagentless fluorescent biosensors based on proteins for continuous monitoring systems, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (10) (2012) 3039–3054 <https://doi.org/10.1007/s00216-012->

- 5715-2.
- [29] D.G. Pina, A.V. Shnyrova, F. Gavilanes, A. Rodríguez, F. Leal, M.G. Roig, I.Y. Sakharov, G.G. Zhadan, E. Villar, V.I. Shnyrov, Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 120–126 <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.01855.x>.
- [30] V. Sanz, S. de Marcos, J. Galbán, Hydrogen peroxide and peracetic acid determination in waste water using a reversible reagentless biosensor, *Anal. Chim. Acta* 583 (2) (2007) 332–339 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.10.054>.
- [31] V. Sanz, S. de Marcos, J. Galbán, Uric acid determination using uricase and the autotransducer molecular absorption properties of peroxidase, *Anal. Chim. Acta* 607 (2008) 211–218 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.051>.
- [32] V. Sanz, S. de Marcos, J. Galbán, Direct glucose determination in blood using a reagentless optical biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2876–2883 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.12.015>.
- [33] P. Pietrangeli, S. Nocera, R. Federico, B. Mondoví, L. Morpungo, Inactivation of copper-containing amine oxidases by turnover products, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 146–152 <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03913.x>.
- [34] ITE-FQ080-02: determination of biogenic amines by HPLC-MS/MS. Public health laboratory, Government of Aragón (Spain). HYPERLINK [https://gobierno.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13\\_SaludPublica/Cartera\\_Servicios\\_Laboratorio\\_20190507](https://gobierno.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13_SaludPublica/Cartera_Servicios_Laboratorio_20190507).
- [pdf https://gobierno.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13\\_SaludPublica/Cartera\\_Servicios\\_Laboratorio\\_20190507.pdf](https://gobierno.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13_SaludPublica/Cartera_Servicios_Laboratorio_20190507.pdf) [https://gobierno.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13\\_SaludPublica/Cartera\\_Servicios\\_Laboratorio\\_20190507.pdf](https://gobierno.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13_SaludPublica/Cartera_Servicios_Laboratorio_20190507.pdf).
- [35] S. Hirota, T. Iwamoto, S. Kishishita, T. Okajima, O. Yamauchi, K. Tanizawa, Spectroscopic observation of intermediates formed during the oxidative half-reaction of copper/topa quinone-containing phenylethylamine oxidase, *Biochemistry* 40 (2001) 15789–15796 <https://doi.org/10.1021/bi011631o>.
- [36] P. Pietrangeli, R. Federico, B. Mondoví, L. Morpungo, Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 997–1004 <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.03.014>.
- [37] S.L. Scott, W. Chen, A. Bakac, J.H. Espenson, Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 6710–6714 <https://doi.org/10.1021/j100127a022>.
- [38] G. Gramss, Formation of the azodication (ABTS<sup>2+</sup>) from ABTS [2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)] in sterile plant cultures: root-exuded oxidoreductases contribute to rhizosphere priming, *Soil Syst.* 2 (1–16) (2018) 26 <https://doi.org/10.3390/soilsystems2020026>.





# Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in food

Isabel Sanz-Vicente<sup>1</sup> · Ángel López-Molinero<sup>2</sup> · Susana de Marcos<sup>1</sup> · Jesús Navarro<sup>2</sup> · Pablo Cebrián<sup>3</sup> · Chantal Arruego<sup>3</sup> · Victor Visiedo<sup>3</sup> · Javier Galbán<sup>1</sup>

Received: 21 February 2020 / Revised: 8 April 2020 / Accepted: 21 April 2020  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

## Abstract

Diamino-oxidase (DAO), horseradish peroxidase (HRP), and tetramethylbenzidine (TMB) have been immobilized into cellulose to obtain circular cellulose test supports (CCTSs) for the determination of cadaverine (Cad) and putrescine (Put). During the enzymatic reaction, TMB is oxidized and a blue spot is obtained. This color (RGB coordinates) is measured with a smartphone and a commercial application. The highest sensitivity is provided by the component *R* and a linear response is observed for low biogenic amine (BA) concentrations, but a second-order polynomial response better fits the experimental results for a wider concentration range. This has been successfully explained with a model developed to explain the RGB values obtained in this type of analytical system. Optimization studies enable CCTSs to be obtained for Put and Cad determination, which could be used (kept at 4 °C) for at least 45 days if a stabilizer (StabilCoat™ or StabilGuard™) is added during its synthesis. In these conditions, the *R* coordinate follows the model up to at least  $4 \times 10^{-4}$  M Put and/or Cad (both analytes give the same response). The method permits the Put and Cad determination from  $5 \times 10^{-5}$  M up to  $4 \times 10^{-4}$  M (RSD = 3%,  $n = 3$ ). The CCTSs have been applied to Put + Cad determination in a tuna sample without any interference by other biogenic amines. The concentration found statistically agrees with that obtained using a HPLC-MS-validated method.

**Keywords** Putrescine · Cadaverine · Diamine oxidase · TMB · Test supports · Cellulose

Parts of this work were presented at the X Iberian Spectroscopy Conference (X CIE) and the XXVI National Spectroscopy Meeting (RNE) (Spain) in July 2018 and have been awarded with an ABC Best Poster Award.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02677-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Isabel Sanz-Vicente  
isasanz@unizar.es

<sup>1</sup> Nanosensors and Bioanalytical Systems (N&SB), Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, Aragon Institute of Nanoscience, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

<sup>2</sup> Nanosensors and Bioanalytical Systems (N&SB), Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

<sup>3</sup> Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

## Introduction

Biogenic amines (BAs) are organic molecules having important biological activity, especially as neurotransmitters or hormones. The human body can enzymatically synthesize them, usually through decarboxylation of the corresponding amino acids (amino acid decarboxylases, AADCs). They are also present in many types of foodstuffs, where they appear by bacterial AADC activity; their concentrations are especially high in foods with a high protein content (e.g., meat, fish, or dairy products) or in those whose storage (temperature, pH, salinity, packaging) or processing (fermentation) conditions allow the bacteria involved to proliferate. Consequently, the concentration of BAs is an indication of freshness and quality of both food and raw materials. The human body has a mechanism for elimination of BAs by means of enzymatic reactions catalyzed by diamino-oxidase (DAO), monoamino-oxidase (MAO), and histamine *N*-methyltransferase (HNMT). Nevertheless, in certain individuals, these reactions may be insufficient due to low enzymatic activity or the use of drugs

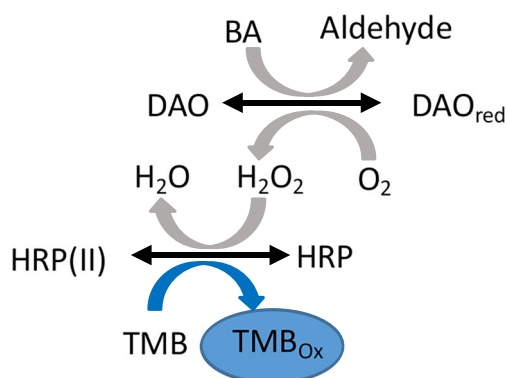
that inhibit those enzymes. This can cause several health disorders ranging from intolerance to intoxication [1].

From a toxicological point of view, the most studied BAs are histamine (His) (the only one for which there is legislation) and tyramine (Tyr). However, there is a growing interest in the study of some polyamines, especially cadaverine (Cad) and putrescine (Put). First, they are also natural substrates of DAO and consequently reduce the ability of this enzyme to degrade His and Tyr; second, they are responsible for the formation of nitrosamides (recognized carcinogens) when combined with nitrites, for instance during cooking [2]; and third, they are indicators of tumoral processes [3–5].

The usual methods to determine these compounds are based on separation techniques such as gas chromatography, thin-layer chromatography, or high-performance liquid chromatography [6–8]. They give good results, although they need time-consuming sample preparation and derivatization stages. Food sector industries and public health agencies are interested in having, at their disposal, faster and versatile quality control systems, so they need easy, cheap, and fast analytical methods directed towards specific BAs.

An alternative method consists of using enzymatic methods in solution. This is based on the scheme developed by Lerke et al. [9] for histamine determination (Scheme 1). In the first step, an amino-oxidase enzyme (in our case, DAO) catalyzes the loss of an amino group of the BAs (in this study, Cad or Put) forming the corresponding aldehyde and  $H_2O_2$ . In the second step, the horseradish peroxidase (HRP) enzyme catalyzes the oxidation of a chemical transducer by  $H_2O_2$ . This scheme has been successfully used for developing electrochemical sensors using different types of charge transfer mediators [10–13].

The same scheme has been used for the development of a solution colorimetric method for BAs, replacing the charge transfer mediator by a chromogen, such as 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) [14, 15]. However, more interesting is the development of test strips after the immobilization of enzymes on paper or cellulose [16]. Following this idea, Hall et al. [17]



**Scheme 1** Sequence on the enzymatic reactions used for BPA determination

dipped commercial peroxide test strips in a mixture of DAO and HRP, making them sensitive to histamine, and later to Cad and Put [18]. These strips have not been commercialized, perhaps because the measurement time is between 7 and 10 min. In addition, the increase in absorbance that occurs at 560 nm was measured by reflectance with a spectrophotometer, which hindered the possibility of quantitative measurement in situ.

The growing and rapid improvement of smartphone technology (with better cameras and lighting sources) has made these devices increasingly useful in analytical chemistry [19].

In this work, we present the development of reactive supports made of powdered cellulose to determine Cad and Put whose response time is less than 2 min. The signal is measured with a commercial smartphone (using the camera's RGB read-out facility), making the methodology fully portable and accessible to any user without specific training.

## Material and methods

### Reagents and solutions

Phosphate buffer solutions (0.1 M, pH levels 6.0, 7.0, and 8.0) were prepared from  $Na_2HPO_4$  and  $NaH_2PO_4$  solids (Sigma S9638 and S9763). Carbonate buffer solution (0.1 M, pH 9.0) was prepared from  $Na_2CO_3$  (Sigma 222321) and  $NaHCO_3$  (Sigma S5761).

Hydrogen peroxide stock solution (33% w/v) was supplied by Panreac (131077.1211). HRP (EC 1.11.1.7) was obtained from Sigma (P8125, 88.6 U  $mg^{-1}$ ). DAO (EC 1.4.3.22) from *Lathyrus cicera* (280 U  $mL^{-1}$ ) was purchased from Molirom P021.

Cadaverine (C8561), putrescine (P7505), histamine (53300), phenylethylamine (P6513), tyramine (T287998), tryptamine (246557), and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (860336) were supplied by Sigma. All solutions were daily weighed and dissolved in the buffer solution (minus TMB, which was dissolved in dimethyl sulfoxide (Panreac 131954.1611)). TMB solutions were stored in darkness.

The following chemicals were tested as stabilizers: StabilCoat (SC01-0050), StabilGuard (SG01-0050), StabilZyme Select (SZ03-CF02-00508), and StabilZyme Protein-Free (SZPF-CF01-0050) from SurModics, and saccharose 99% (102019112) and gelatin 98% (48723) from Sigma-Aldrich. All of them were solved or diluted in buffer.

Several cellulose types (named as A, B, C, D, and E) were tested. A (Aldrich 310697) and B (Aldrich 11365 Avicel PH101) were microcrystalline cellulose of the size of 20  $\mu m$  and 50  $\mu m$ , respectively, and average degree of polymerization of less than 350. C (815050.1, Macherey Nagel & Co) and D (815060, Macherey Nagel & Co) were native cellulose of fiber length between 20 and 75  $\mu m$  and between 20 and

100  $\mu\text{m}$ , respectively, and average degree of polymerization of 620–680. E (Sigma 22,184) was cellulose of fiber length between 20 and 250  $\mu\text{m}$ .

## Equipment and instruments

Molecular absorption measurements were performed using a Hewlett-Packard model HP 8452A diode array spectrophotometer equipped with a HP 89090A Peltier temperature and stirrer control accessory. Depending on the measurement wavelength, quartz (Hellma QS 101) or glass (Hellma Q 101) cuvettes were used.

Cellulose supports were dried into an OVAN incubator (model OM10E).

Two smartphones were used to measure the color development in the cellulose supports: a Nexus 5X (camera of 12.3 megapixels) and an iPhone 6S (camera of 12 megapixels); with the first smartphone (which work under Android operating system), the application used to capture the RGB coordinates was Color Grab<sup>®</sup> (from Loomatix), and with the other one (iOS8), the application used was Color Value Pro (V 1.0). Finally, a Nikon D3400 reflex camera was also used. The image file (raw data) was processed with Matlab R2011b (MathWorks, Natick, MA, USA) and ImageJ (version by FIJI, using Java 6) programs for reading RGB. Factorial analysis and data treatments were calculated by both Matlab R2011b and Excel (Microsoft Excel 2010, Redmond, WA, USA).

In this case, an illumination box was used. Indirect constant artificial lighting was produced by a warm white dimmable LED by EGLO (Austria) (7.5 W), which could be selected to red, green, and blue illuminations. Their spectral power densities were characterized in the range 400–700 nm and measured with an arrangement composed by an optical fiber (QP600-1-sR) and a compact monochromator (Ocean Optics QE-65000).

## Procedure

### Measurements in solution

The variation of the absorbance during the enzymatic reaction was initially monitored at 450 nm and 650 nm (the diode array spectrophotometer obtains the absorbance in the whole wavelength range from 190 to 1100 nm).

To do that, the appropriate concentrations of reagents were added into the cuvette with the buffer solution, giving 2 U mL<sup>-1</sup> of DAO, 0.6 U mL<sup>-1</sup> of HRP, and  $4 \times 10^{-4}$  M of TMB (total volume in the cell, 2 mL). The cuvette was then introduced in the spectrophotometer, the stirrer was connected, and the measurement was started in the kinetic mode. After 50 s (to obtain the baseline, this period of time can be reduced), 20  $\mu\text{L}$  of the analyte (or sample) solution was

injected and the variation of the absorbance during the reaction was recorded over the time. As diode array spectrophotometer has reserve optic configuration, a yellow filter must be placed between the lamp ( $D_2$ ) and the cell to avoid the photo-oxidation of the dye. During the optimization studies, the concentration of the reagents and other conditions were modified depending on the parameter to be studied. The maximum absorbance at the chosen wavelength ( $Ab_{s_{\text{max},\lambda}}$ ) was used as the analytical parameter.

### Cellulose platform preparation

The mold used was the lid of a conventional 96-well plate.

Two protocols have been used for preparation of the circular cellulose test supports (CCTSs).

**Normal CCTSs** On a dispersion of 3% of cellulose, TMB and HRP were added. Seventy-five microliters of this dispersion ( $4 \times 10^{-4}$  M in TMB and 0.6 U mL<sup>-1</sup> in HRP) was added into the wells of the mold. The plate was placed into the incubator and dried at 35 °C for 1 h. Then, 10  $\mu\text{L}$  of DAO solution was added and, after 30 s, 5  $\mu\text{L}$  of the analyte solution (Cad or Put).

**Long-life CCTSs** On a dispersion of 3% of cellulose, TMB was added. Seventy-five microliters of this dispersion ( $4 \times 10^{-4}$  M in TMB) was put into the wells of the mold plate. The plate is placed into the incubator and dried at 35 °C for 1 h. Then, 10  $\mu\text{L}$  of DAO and HRP was added and, after 30 s, 10  $\mu\text{L}$  of the stabilizer (usually StabilCoat<sup>™</sup>). The so-prepared CCTSs are allowed to dry and stored in a closed bag with desiccant in the refrigerator. The analyte determination is carried out by injection of 5  $\mu\text{L}$  of the analyte solution (Cad or Put).

Measurements (photographs) were obtained after drying (about 1 min after sample addition).

For the construction of the test, the supports should be stuck to a polystyrene strip.

### Measurements using the smartphone

To measure the color, the camera of a smartphone and a commercial application, which decomposes the color in RGB value, were used. In order to maintain constant lighting conditions, the position of the smartphone was fixed and the strips (or supports) were moved under it (see Electronic Supplementary Material (ESM) Fig. S1).

Firstly, the RGB zero values were taken before the addition of the analyte (named as  $R_0$ ,  $G_0$ , and  $B_0$ , respectively). Later, the analyte was added and, after 60 s (time enough to obtain a stable color), the  $R$ ,  $G$ , and  $B$  values were obtained. The analytical signal was the change in the value of each coordinate ( $\Delta R(R_0 - R)$ ,  $\Delta G(G_0 - G)$ , and  $\Delta B(B_0 - B)$ ) or the relative change

observed in the value of each coordinate (sub-index  $r$  refers to relative)

$$\Delta B, r = \frac{B_0 - B}{B_0} \quad \Delta G, r = \frac{G_0 - G}{G_0} \quad \Delta R, r = \frac{R_0 - R}{R_0} \quad (1)$$

### Measurements using the digital camera

The camera was set to automatic focus mode. The size of the picture was adapted according to the size of the CCTSs. The pictures were transferred to a computer using Microsoft Photo Editor™. RGB values were measured in each image from regions of interest of 1500 pixels in size. The analytical parameters used were as previously indicated in Eq. (1).

### AB determination in a tuna sample

A tuna sample was analyzed by the *Laboratorio de Salud Pública of Aragón* (LSPA) using a validated method [20]. In brief, 2.50 ( $\pm 0.01$ ) g tuna was weighted in a flask together with 100  $\mu\text{L}$  histamine dihydrochloride-d4 (internal standard, 100  $\text{mg L}^{-1}$ ) and 20 mL of 5% trichloroacetic acid. The mixture was first manually shaken during 30 s, then submitted to ultrasounds (10 min) and finally centrifuged (4 °C) at 4000 rpm during 10 min. The solution was filtered (filter paper) and taken to 50 mL with 5% trichloroacetic acid. Ten microliters of this solution were injected in a HPLC-MS instrument. The following concentrations were obtained (in  $\text{mg kg}^{-1}$ ): 100  $\pm 11$  Put, 380  $\pm 19$  Cad, 900  $\pm 40$  His, 300  $\pm 22$  Tyr, 20.0  $\pm 2.2$  tryptamine, and 50.0  $\pm 5.6$  phenylethylamine. This sample was also analyzed by the method presented in this paper; the sample treatment used was similar to that described except the addition of the internal standard.

## Results and discussion

### Studies in solution

#### Development of the method: analytical figures of merit for Put and Cad

As mentioned in the “Introduction,” the analytical system developed in this study is based on a sequence of enzymatic reactions (Scheme 1) which results in the appearance of a blue color. Although the TMB/HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicating reaction has been extensively studied, there are two important aspects which have not yet been fully clarified regarding TMB and HRP concentrations: (1) A concentration ratio of TMB to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed of 10:1 or higher should be used to obtain the maximum stable signal (see ESM Fig. S2), and (2) many authors have indicated that the blue color of the TMB<sub>ox</sub>

species disappears over time. In this study, we have demonstrated that HRP is able to regenerate (in part) TMB from TMB<sub>ox</sub> (see ESM Fig. S3). The HRP concentration is critical, with a maximum obtained using 0.60 U mL<sup>-1</sup>.

There are additional interesting aspects of the optimization of Put and Cad determination: (1) It was observed that the DAO concentration (ESM Fig. S4) affects the kinetic of the reaction but does not affect the maximum signal obtained or its stability. With 2 U mL<sup>-1</sup>, the maximum signal was obtained in less than 2 min. (2) Both the formation of the blue TMB compound and the activity of both enzymes depend on the pH. Therefore, the effect of this parameter on the global yield was studied. ESM Fig. S5 shows the results obtained. As can be seen, with pH 6, the signal is at a maximum and stable, although the reaction time is longer.

The analytical figures of merit for Put and Cad determination have been obtained using the absorbance change at 650 nm as the analytical parameter. The linear response range (ESM Fig. S6), the sensitivity, and the RSD for both BAs are shown in Table 1. As can be seen, both analytes can be determined with the same sensitivity ( $t$  test) and the linear response range obtained allows the application of the method to real samples. This table also shows the calibration line obtained using only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The slope of the calibration line is slightly higher than that obtained for Put and Cad; this can be explained considering that, like HRP, DAO is also able to partially reduce TMB<sub>ox</sub> to TMB, which is demonstrated when the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB/HRP reaction is carried out in the presence of DAO (see ESM Fig. S7).

#### Study of interferences: His determination

Many food samples containing Put and Cad also contain other biogenic amines, especially His and Tyr. The DAO used in this work presents a specificity ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) [21] for Put and Cad which is about 100 times higher than that for Tyr or His. Nevertheless, an interference study was carried out. The results show that His and Tyr do not interfere until, at least, a His (Tyr):Put (Cad) ratio of 10:1 is obtained. Tyr did not modify either the Abs<sub>max</sub> or the Abs =  $f(t)$  profiles obtained with Put/Cad. However, the effect of His was different (Fig. 1). This compound did not affect the Abs<sub>max</sub>, but it produced a later gradual decrease in the absorbance value obtained. Different tests (compiled in ESM Fig. S8) were performed in order to elucidate the mechanism of this negative slope. The conclusion was that the aldehyde derived from the His (imidazole acetaldehyde) is able to regenerate TMB<sub>ox</sub>, reducing its absorbance. As can be seen, the kinetic of this reaction is not very fast so the decrease in the absorbance follows a straight line. Interestingly, the slopes of these decreases proportionally change with the His concentration (see Fig. 1, inset), but the His concentrations need to be high in order to detect this effect. This effect could be used for the simultaneous

**Table 1** Calibration line in the solution of cadaverine, putrescine, and hydrogen peroxide

	Calibration line ([Cad] or [Put] in M)	Range (M)	RSD, % ( <i>n</i> )
Cadaverine	Abs = 29,502 [Cad] + 0.001; $r = 0.999$	$1.0 \times 10^{-6}$ to $1 \times 10^{-5}$ *	1.8 (5)
Putrescine	Abs = 29,740 [Put] + 0.001; $r = 0.999$	$1.0 \times 10^{-6}$ to $1 \times 10^{-5}$ *	0.8 (5)
Peroxide	Abs = 38,788 [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] + 0.0001; $r = 0.999$	$5.0 \times 10^{-7}$ to $6 \times 10^{-6}$	2.3 (5)

Conditions: HRP = 0.6 U mL<sup>-1</sup>, TMB =  $1 \times 10^{-4}$  M, pH = 6, DAO = 1.8 U mL<sup>-1</sup>, pH = 6,  $\lambda = 650$  nm

\*Maximum concentration tested

determination of Put/Cad and His in samples containing very high His concentrations compared with those of Put/Cad.

### Put and Cad determination in a tuna sample

The method was applied to Put + Cad determination in the previously described (section “**AB determination in a tuna sample**”) tuna sample. Note that the His and Tyr concentrations present in the sample are below the interference limit. The result obtained was 490 ( $\pm 40$ ) mg kg<sup>-1</sup> ( $n = 3$ ), which is statistically similar to that obtained by the HPLC-MS reference method (95% confidence  $t_{\text{cal}} = 0.4 < t_{\text{crit}} = 2.78$ ). This validates the described procedure.

### Measurement system optimization

#### Mathematical description

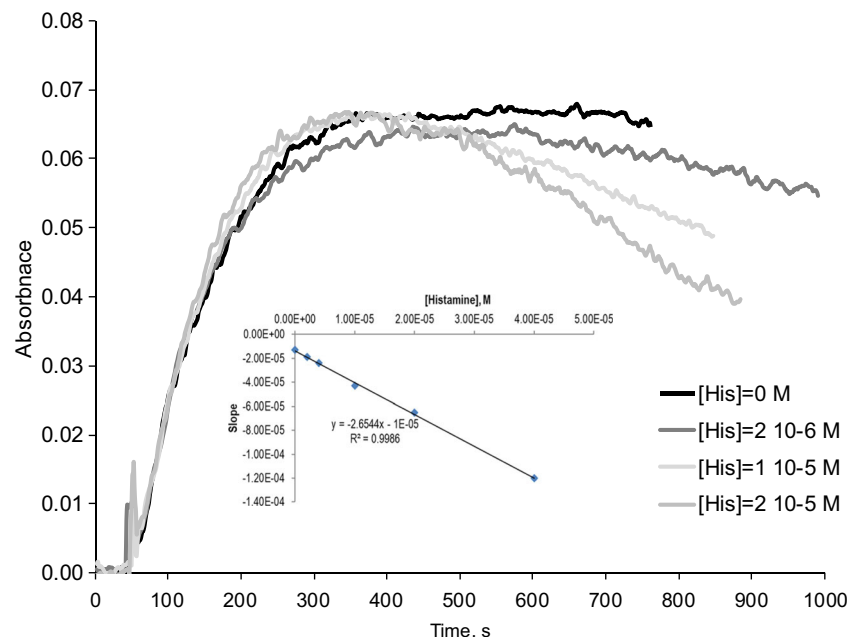
The aim of this study is to prepare test supports for the rapid determination of Put/Cad. This involves the use of a smartphone or a digital camera as the instrument and RGB coordinates as the analytical signals. In this section, we are

interested in obtaining a mathematical relationship between the  $R$ ,  $G$ , and  $B$  responses given by the instrument to the three color coordinates ( $E_{(R,G,B)}$ ) and the absorbing species concentration ( $C$ , mg L<sup>-1</sup>), in this case TMB<sub>ox</sub>. These responses are given by [22]

$$E_{(R,G,B)} = A \sum_{\lambda} I_{\lambda} P_{\lambda} R_{\lambda} \quad (2)$$

where  $A$  is a constant including constant factors related with the camera design, the solid angle, the light-to-voltage transformation, and the analog-to-digital conversion;  $I_{\lambda}$  is the spectral power of the illumination source which is usually known and independent of the characteristics of the solid to be measured;  $P_{\lambda}$  is the spectral sensitivity of the camera (this parameter is characteristic of each smartphone or camera); and  $R_{\lambda}$  is the reflectance of the solid (test strips, in this case). This parameter depends on the absorbing species present in the solid ( $C$ , in M, and  $\varepsilon_{\lambda}$  in M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) and the scattering coefficient of the solid ( $s_{\lambda}$ , in cm). Several models have been proposed to relate the  $R_{\lambda}$  with  $a_{\lambda}$ ,  $s_{\lambda}$ , and  $C$ . The most commonly used is that derives from the Kubelka-Munk theory adapted to TLC plate measurements [23]

**Fig. 1** Effect of histamine in the putrescine signal. Experimental conditions: [TMB] =  $6 \times 10^{-5}$  M, [HRP] = 0.5 U mL<sup>-1</sup>, [DAO] = 1 U mL<sup>-1</sup>, [Put] =  $2 \times 10^{-6}$  M,  $\lambda = 650$  nm



$$R_\lambda = \frac{1}{\alpha_\lambda + \beta_\lambda \text{Coth}(\beta_\lambda s_\lambda L)} \alpha_\lambda = \frac{2, 3\varepsilon_\lambda C + s_\lambda}{s_\lambda} \beta_\lambda = \sqrt{\alpha^2 - 1} \quad (3)$$

where  $\text{Coth}$  is the hyperbolic cotangent and  $L$  is the optical pathlength. A combination of Eqs. (2) and (3) gives

$$E_{(R,G,B)} = A \sum_\lambda I_\lambda P_\lambda K_\theta \frac{1}{\alpha_\lambda + \beta_\lambda \text{Coth}(\beta_\lambda s_\lambda L)} \quad (4)$$

Equation (4) suggests a complex relationship between  $E_{(R,G,B)}$  and the analyte concentration. However, this can be simplified by applying a polynomial Taylor series approximation, yielding (see ESM Appendix 1)

$$E_{(R,G,B)} = AE_{0,(R,G,B)} + A \sum_i \frac{1}{i} E_{i,(R,G,B)} c^i \quad (5)$$

where  $E_{0,(R,G,B)}$  is the response obtained when the concentration of the absorbing species is zero

$$E_{0,(R,G,B)} = A \sum_\lambda I_\lambda P_\lambda \left( \frac{s_\lambda L}{1 + s_\lambda L} \right) \quad (6)$$

As it is well known, the minimum order of the polynomial depends on the width of the concentration range to be covered and the complexity of the original function. In this case,  $i = 2$  gives a suitable balance between the concentration range and the robustness of the calibration line. As indicated in the ESM

$$E_{1,(R,G,B)} = - \sum_\lambda I_\lambda P_\lambda \left[ \left( \frac{s_\lambda L}{1 + s_\lambda L} \right)^2 \left[ \frac{3 + 2s_\lambda L}{3s_\lambda} \right] \right] 2, 3\varepsilon_\lambda c \quad (7)$$

$$E_{2,(R,G,B)} = \sum_\lambda I_\lambda P_\lambda \left[ \left( \frac{s_\lambda L}{1 + s_\lambda L} \right)^3 \left[ \frac{30 + 45s_\lambda L + 24(s_\lambda L)^2 + 4(s_\lambda L)^3}{45s_\lambda^2} \right] \right] (2, 3\varepsilon_\lambda c)^2 \quad (8)$$

To avoid the effect of the stray light and  $A$  in the analytical signal,  $\Delta E$  and  $\Delta E_r$  were used

$$\Delta E_{(R,G,B)} = E_{0,(R,G,B)} - E_{(R,G,B)} \quad (9a)$$

$$\Delta E_{(R,G,B),r} = \frac{E_{0,(R,G,B)} - E_{(R,G,B)}}{E_{0,(R,G,B)}} \quad (9b)$$

### Adaptation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> commercial test strips for BA sensing

Commercial strips for peroxides are commercially available (Quantofix Peroxide 25<sup>®</sup>). As far as we know, these strips contain HRP and a colorant similar to TMB (the concentrations are unknown). The possibility of using these strips to detect Put and Cad was studied. In order to do so, 5  $\mu\text{L}$  of a 50  $\text{U mL}^{-1}$  DAO solution was added to each strip and allowed to dry for 1 min. Then, 5  $\mu\text{L}$  of Put of concentrations between 1.0 and 65  $\text{mg L}^{-1}$  (equivalent to the 0.5 to 25  $\text{mg L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

range for which the strips were designed) was added and the reaction was allowed to develop for 30 s. The  $\Delta E_{R,r}$ ,  $\Delta E_{G,r}$ , and  $\Delta E_{B,r}$  values were obtained; the results are compiled in ESM Fig. S9. Some interesting conclusions can be obtained from these results: (1) The highest sensitivity provided by the component  $R$  ( $\Delta E_{R,r}$ ) could be expected when the molecular absorption spectra of the TMB<sub>ox</sub> are compared with the spectral responsivity of the smartphone (ESM Fig. S10). As can be seen, TMB<sub>ox</sub> (which is blue in color) shows very little absorbance at the  $B$ -component wavelength range, a little more at the  $G$ -component, and high absorbance at the  $R$ -component wavelength ranges. Interestingly, these three filters also transmit some light in the NIR region (between 800 and 1000 nm). Since the TMB<sub>ox</sub> presents an additional absorption band in this spectral zone (centered at 890 nm), the signal is finally observed working with  $E_B$ . (2) Focusing on the  $E_R$  values, a linear response is observed for low Put concentrations (ESM Fig. S9B), but a second-order polynomial response better fits the experimental results for a wider concentration range (ESM Fig. S9A). (3) The results indicate that it is possible to use this type of commercial test strip for semi-quantitative Put and Cad determination after adding DAO.

### Instrument optimization

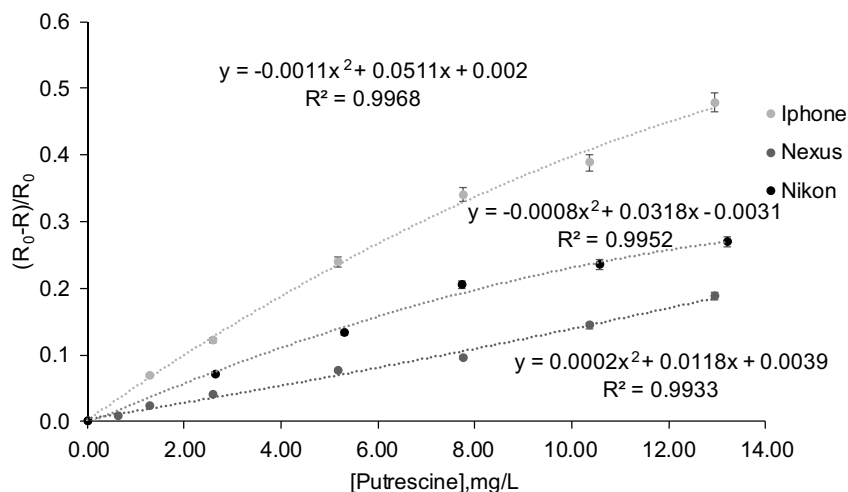
As has been indicated,  $P_\lambda$  depends on the smartphone or camera used. Since this parameter appears in the coefficients of the calibration line ( $E_{1,(R,G,B)}$  and  $E_{2,(R,G,B)}$ ), different sensitivity levels are expected to be obtained with different smartphones or cameras. In this study, we used two different smartphones (iPhone 6S and Nexus QQ) and a digital camera. The  $\Delta E_{R,r}$  results obtained using the commercial test strips modified with DAO for Put determination are shown in Fig. 2.

### Optimization of circular test supports

#### Support design

Although the toxicity of biogenic amines is not questioned, the level of toxicity is difficult to establish because it depends on the characteristics of each person and the level of other amines. There is no legislation, but a maximum level of total BA of 750–900  $\text{mg kg}^{-1}$  has been suggested [1]. The European Union has established regulations only for His. Its level should be below 100  $\text{mg kg}^{-1}$  in raw fish and below 200  $\text{mg kg}^{-1}$  in salted fish for species belonging to the *Scombridae* and *Clupeidae* families (Commission Regulation (EC) 2073/2005). Since there is no legislation for the other BAs, in this work, a concentration of 100  $\text{mg kg}^{-1}$  was chosen as a reference to prepare the test supports sensitive to Put and Cad. The CCTSs were initially synthesized following the procedure “Normal CCTSs” described in section “Cellulose platform preparation.”

**Fig. 2** Sensitivity comparison between two smartphones and a digital camera. Experimental conditions: commercial strip test of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quantofix Peroxide 25<sup>®</sup>) plus 5 μL of 50 U mL<sup>-1</sup> DAO solution



Different supports were used for obtaining the sensing platforms; two were finally chosen. Most of the optimizations were carried out using the lid of a plastic 96-well plate whose diameter (around 0.5 cm) was suitable for obtaining CCTSs to be measured with the smartphone.

Larger CCTSs (ESM Fig. S11), which allow the calibration and determination to be performed in the same support, were also tested with good results.

To design a quick, sensitive, and reproducible method, the kinetic of the reaction should be fast, and the color produced during the reaction should be as intense and homogenous as possible. To obtain these properties, two aspects need to be controlled: (a) The analyte should diffuse in a controlled way through the CCTSs, avoiding undesirable phenomena such as the “coffee ring effect” (the product of the reaction is accumulated in the outside area), and (b) the enzyme should not lose activity after immobilization. Both depend on the material used (type of cellulose and the concentration and the volume of the cellulose solution used for obtaining CCTSs) and the way in which the enzyme is immobilized. Several types of cellulose were tested, but only the 5 cited in section “Reagents and solutions” were able to give robust CCTSs. Figure S12 (see the ESM) shows the signal obtained using different concentrations ranging from 1 to 5% of the different types of cellulose chosen (less than 1% gives a soft CCTS, and higher than 5% did not provide enough reproducibility). Three percent was finally chosen balancing sensitivity, reaction time, and easy handling. All the celluloses gave good results

(Table 2), but cellulose A gave a better-defined spot; the signal was significantly higher (1-factor ANOVA, 95%).

Regarding the sample volume to be injected, 50 μL, 75 μL, and 100 μL were tested. As can be seen in ESM Table S1, there was no influence on the signal. However, in terms of ease of use, the best results were found using 75 μL.

Enzyme immobilization by entrapment is desirable to obtain a homogeneous color, but adsorption avoids loss of activity. The results obtained in the previous study indicated that HRP can be entrapped. However, DAO entrapment gives very small signals and a slower reaction rate (see ESM Fig. S12), so it was decided to immobilize DAO by adsorption (see section “Reagents and solutions”).

### Optimization of experimental conditions

The quantity of immobilized reagents affects the sensitivity and the kinetic of the enzymatic reactions. It also affects the selectivity, if the amines compete for the DAO. The results obtained for the optimization of DAO (Fig. 3) show that above 0.25 unit of DAO/CCTS, the  $\Delta E_R$  does not depend on the DAO amount. The response time decreases as the amount of DAO increases; 0.25 unit CCTS<sup>-1</sup> was chosen as the appropriate quantity since the signal is at a maximum, the response time is suitable for a fast method (30 s until a stable signal is achieved), and the amount of the reagent consumed is reasonable.

**Table 2** Signal obtained ( $\Delta R$ ) with different types of cellulose

	Cellulose				
	A	B	C	D	E
$\Delta R \pm \sigma$	56.67 ± 2.0	51.67 ± 1.9	46.00 ± 1.5	49.00 ± 1.6	48.67 ± 1.6

Conditions: 3% cellulose, [HRP]=1.0 U mL<sup>-1</sup>, [TMB]=6 × 10<sup>-4</sup> M and pH=7 in the cocktail of reagents, DAO=0.25 U CCTS<sup>-1</sup> before drying, [Cad]=1 × 10<sup>-4</sup> M, n=3

**Fig. 3** Optimization of DAO quantity. Experimental conditions: manufacturing procedure described in “Normal CCTSs” under section “Cellulose platform preparation” (3% cellulose, [HRP] = 0.5 U mL<sup>-1</sup>, [TMB] = 6 × 10<sup>-4</sup> M, [Cad] = 1 × 10<sup>-4</sup> M, pH = 7.0)

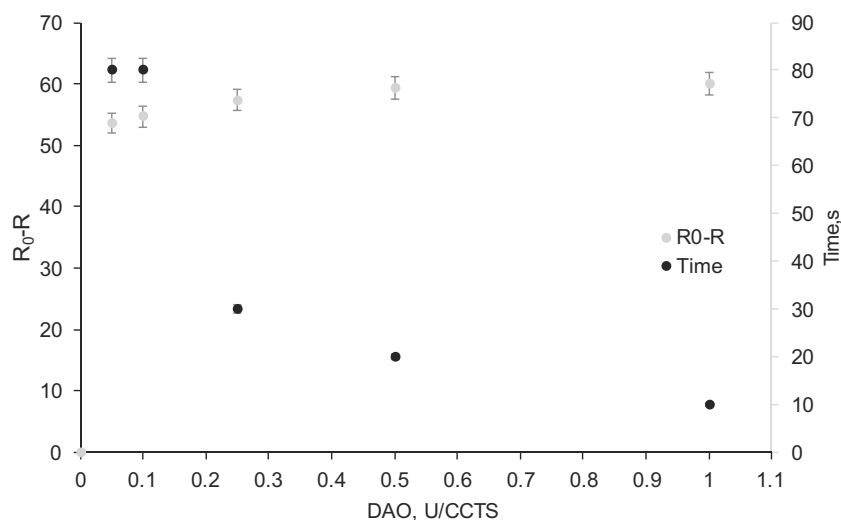


Table S2 (see the ESM) shows that the best results were obtained working with a TMB:Put molar ratio of 10:1 or higher in the CCTSs. The 1-factor ANOVA showed that there are no significant differences for molar ratios higher than 10. This agrees with the results obtained in solution. Finally, the HRP (ESM Fig. S13) and pH (ESM Table S3) were also optimized.

A very important parameter to be considered is the CCTSs' life time. Under the optimal conditions chosen, the lifetime was only 4 days. Therefore, the following chemicals were tested in order to improve the stability of the enzymes: StabilCoat, StabilGuard, StabilZyme/HRP, StabilZyme Select, trehalose, saccharose, and gelatin. A very exhaustive study was carried out including the cellulose concentration and the optimum moment of the CCTS synthesis at which the stabilizer and enzymes should be added (ESM Appendix 2).

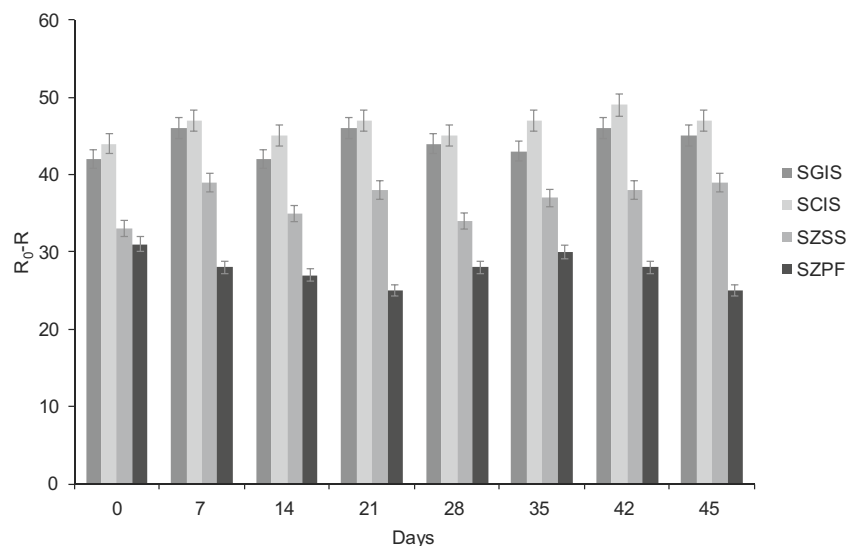
The best results were found using StabilCoat and StabilGuard, but the manufacturing procedure used was changed to the “Long-life CCTSs” procedure described in section “Cellulose platform preparation.” In these conditions, the lifetime of the platform is extended to at least 45 days (Fig. 4). The maximum signal is not obtained immediately (ESM Fig. S12). As can be seen, at 30 s, the maximum signal is obtained working with 3% cellulose. The signal is stable for at least 5 min.

#### Analytical characteristics. cadaverine and putrescine determination in tuna

The analytical figures of merit were obtained in the optimized conditions. The response range (ESM Fig. S14), the sensitivity, and the RSD for both BAs are shown in Table 3.

**Fig. 4** Effect of stabilizers on the lifetime of the CCTSs.

Experimental conditions: manufacturing procedure described in “Long-life CCTSs” under section “Cellulose platform preparation” (3% cellulose, [TMB] = 6 × 10<sup>-4</sup> M, [HRP] = 0.045 U CCTS<sup>-1</sup>, [DAO] = 0.2 U CCTS<sup>-1</sup>, [putrescine] = 2 × 10<sup>-4</sup> M, pH = 7, n = 3). SGIS, StabilGuard; SCIS, StabilCoat; SZSS, StabilZyme Select; SZPF, StabilZyme Protein-Free





**Table 3** Calibration line in CCTSs of cadaverine, putrescine, and hydrogen peroxide

	Calibration line ([Cad] or [Put] in M)	Range (M)	RSD, % ( <i>n</i> )
Cadaverine	$(R_0 - R)/R_0 = 1785 [\text{Cad}] - 0.0004; r = 0.999$	$5.0 \times 10^{-5}$ to $2 \times 10^{-4}$	3.2 (4)
	$(R_0 - R)/R_0 = -576,792 [\text{Cad}]^2 + 1906 [\text{Cad}] - 0.004; r = 0.999$	$5.0 \times 10^{-5}$ to $4 \times 10^{-4}$ *	3.2 (4)
Putrescine	$(R_0 - R)/R_0 = 1844 [\text{Put}] + 0.0042; r = 0.999$	$5.0 \times 10^{-5}$ to $2 \times 10^{-4}$	3.1 (4)
	$(R_0 - R)/R_0 = -965,171 [\text{Put}]^2 + 2039 [\text{Put}] - 0.001; r = 0.999$	$5.0 \times 10^{-5}$ to $4 \times 10^{-4}$ *	3.1 (4)
Peroxide	$(R_0 - R)/R_0 = 2211 [\text{H}_2\text{O}_2] + 0.004; r = 0.997$	$1.5 \times 10^{-5}$ to $3 \times 10^{-4}$	3.8 (4)

Conditions: 3% cellulose, [HRP] = 0.5 U mL<sup>-1</sup>, [TMB] =  $6 \times 10^{-4}$  M and pH = 7 in the cocktail of reagents, DAO = 0.5 U CCTS<sup>-1</sup>

\*Maximum concentration tested

For both BAs, a linear range was obtained up to  $2 \times 10^{-4}$  M, with the lowest concentration tested being  $2 \times 10^{-5}$  M, which would allow the determination in real samples. A second-degree polynomial response allows to extend the response range up to concentration values of at least  $5 \times 10^{-4}$  M. Both analytes present the same sensitivity in CCTSs. To demonstrate the capability of the method for the Put + Cad joint determination, an additional study was carried out with mixtures of Put and Cad between 1:1 and 1:4 (or vice versa). The signals obtained for these solutions were interpolated in both the calibration lines (Put and Cad). The errors obtained were between 3 and 6% (ESM Table S4), which would allow the determination of the total concentrations of cadaverine and putrescine in real samples.

As it occurs in solution, the slope of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> calibration line (measured using CCTSs) is higher than the Put and Cad slopes (Table 3).

The effect produced by Tyr and His was also studied. His does not produce any interference in the Put/Cad signal at least up to a 5:1 M ratio (ESM Fig. S15a). However, if the spots are observed after a 5-min reaction (ESM Fig. S15b), the TMB<sub>ox</sub> signal has disappeared due to a similar effect to that produced in the solution. This shows that His is present in the sample, even in the case of 2:1 ratio, for which histamine does not interfere. Tyr does not produce any interference in the Put/Cad signal at least up to 10:1 M ratio.

Put and Cad present in the extract of the tuna sample (see section “Put and Cad determination in a tuna sample”) were analyzed using the CCTSs designed here. The result obtained was  $460 \pm 65$  mg kg<sup>-1</sup> (*n* = 3). This result is statistically similar, according to a *t* test (95% confidence  $t_{\text{cal}} = 0.51 < t_{\text{crit}} = 2.78$ ), to that obtained for the sample using the HPLC-MS method. This enables us to validate this method for the determination of Cad + Put in the presence of other biogenic amines such as histamine and tyramine in high concentrations in this type of sample.

## Conclusions

It has been demonstrated that long-life CCTSs based on the combined enzymatic reactions given in Scheme 1 can be

easily synthesized for Put + Cad joint determination in tuna, both semi-quantitative with the naked eye and quantitative by measuring the *R* color coordinate with a smartphone and a commercial application. Since the *R* coordinate has been related to the concentration of BAs, a quantitative method can be considered. The minimum detectable concentration is  $2 \times 10^{-5}$  M which, following the sample treatment proposed, enables biogenic amine levels to be quantitatively measured below 100 mg kg<sup>-1</sup>, which can be considered the critical safety level. In this case, the method would serve as a quality and freshness evaluation technique. This, together with the short response time, the ease of handling, and the possibility of measuring with a smartphone device, makes these supports a good option for the in situ determination of biogenic amines in food.

**Acknowledgments** J Navarro thanks to the Government of Aragon (DGA) for a grant. The authors are also very grateful to Dr. Francisco Palacios and MSc Cristina Asensio from Laboratorio de Salud Pública de Aragón (LSPA, DGA) for their invaluable help. This work was the winner of a Poster Prize awarded for excellent presentation of particularly significant innovative analytical research at X CIE/XXVI RNE. This award was sponsored by Analytical and Bioanalytical Chemistry.

**Funding information** This work was supported by the MINECO of Spain (project CTQ2016-76846R) and by research groups funding DGA-FEDER (group E25\_17R).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Human and animal interest** The research does not involve human participants and/or animals.

## References

- Ladero V, Calles-Enríquez M, Fernández M, Álvarez MA. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr Nutr Food Sci.* 2010;6:145–56. <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>.
- Bulushi IA, Poole S, Deeth HC, Dykes GA. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation—a

- review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2009;49:369–77. <https://doi.org/10.1080/10408390802067514>.
3. Choi MH, Kim KR, Kim YT, Chung BC. Increased polyamine concentrations in the hair of cancer patients. *Clin Chem.* 2001;47:143–4. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.1.143>.
  4. Ernestus RI, Röhn G, Schröder R, Els T, Klekner Á, Paschen E, et al. Polyamine metabolism in brain tumours: diagnostic relevance of quantitative biochemistry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;71:88–92. <https://doi.org/10.1136/jnnp.71.1.88>.
  5. Levêque J, Foucher F, Bansard JY, Havouis R, Grall JY, Moluinox JP. Polyamine profiles in tumor, normal tissue of the homologous breast, blood, and urine of breast cancer sufferers. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;60:99–105. <https://doi.org/10.1023/A:1006319818530>.
  6. Önal A, Tekkeli SEK, Önal C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* 2013;138:509–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.056>.
  7. Erim FB. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends Anal Chem.* 2013;52:239–47. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.018>.
  8. Ordóñez JL, Troncoso AM, García-Parrilla MDC, Callejón RM. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages - a review. *Anal Chim Acta.* 2016;939:10–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.045>.
  9. Lerke PA, Porcuna MH, Hin HB. Screening test for histamine in fish. *J Food Sci.* 1983;48:155–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb14812.x>.
  10. Tombelli S, Mascini M. Electrochemical biosensors for biogenic amines: a comparison between different approaches. *Anal Chim Acta.* 1998;358:277–84. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00606-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00606-5).
  11. Leonardo S, Campàs M. Electrochemical enzyme sensor arrays for the detection of the biogenic amines histamine, putrescine and cadaverine using magnetic beads as immobilisation supports. *Microchim Acta.* 2016;183:1881–90. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1821-8>.
  12. Yang X, Feng B, He X, Li F, Ding Y, Fei J. Carbon nanomaterial based electrochemical sensors for biogenic amines. *Microchim Acta.* 2013;180:935–56. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1015-6>.
  13. Kivirand K, Rincken T. Biosensors for biogenic amines: the present state of art mini-review. *Anal Lett.* 2011;44:2821–33. <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.565445>.
  14. Lee JI, Jang JH, Yu MJ, Kim YW. Construction of a bifunctional enzyme fusion for the combined determination of biogenic amines in foods. *J Agric Food Chem.* 2013;61:9118–24. <https://doi.org/10.1021/jf403044m>.
  15. Navarro J, Sanz-Vicente I, Lozano R, de Marcos S, Galbán J. Analytical possibilities of putrescine and cadaverine enzymatic colorimetric determination in tuna based on diamine oxidase: a critical study of the use of ABTS. *Talanta.* 2020;208:120392. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120392>.
  16. Chen YL, Jonathan Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *J Bioact Compat Polym.* 2016:1–15. <https://doi.org/10.1177/0883911516637377>.
  17. Hall M, Eldridge DB, Saunders RD, Fairclough DL, Bateman RC. A rapid dipstick test for histamine in tuna. *Food Biotechnol.* 1995;9:39–57. <https://doi.org/10.1080/08905439509549884>.
  18. Hall M, Sykes PA, Fairclough DL, Lucchese J, Rogers P, Staruszkiewicz W, et al. A test strip for diamines in tuna. *JAOAC Int.* 1999;82:1102–8.
  19. Calabria D, Caliceti C, Zangheri M, Mirasoli M, Simoni P, Roda A. Smartphone-based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry. *Biosens Bioelectron.* 2017;94:124–30. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.053>.
  20. ITE-FQ080-02: determination of biogenic amines by HPLC-MS/MS. Public Health Laboratory. Government of Aragón (Spain). [https://gobierno.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13\\_SaludPublica/Cartera\\_Servicios\\_Laboratorio\\_20190507.pdf](https://gobierno.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13_SaludPublica/Cartera_Servicios_Laboratorio_20190507.pdf)
  21. Pietrangeli P, Federico R, Mondovi B, Morpurgo L. Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *J Inorg Biochem.* 2007;101:997–1004. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.03.014>.
  22. Connah D, Westland S, Thomson MGA. Recovering spectral information using digital camera systems. *Color Technol.* 2001;117:309–12. <https://doi.org/10.1111/j.1478-4408.2001.tb00080.x>.
  23. Goldman J. Quantitative analysis on thin-layer chromatograms. Theory of absorption and fluorescent densitometry. *J Chromatogr. A* 1973. 78:7–19. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)99031-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)99031-4).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Isabel Sanz-Vicente** is a member of the Nanosensors and Bioanalytical Systems Group and of the Aragon Institute of Nanoscience (INA). From 2000, she is an Assistant Professor in Analytical Chemistry at the University of Zaragoza. Her work has been focused on the use of the optic properties, intrinsic and extrinsic, of enzymes for the development of self-indicating analytical methodology, sensitive and selective, as the basis of optical biosensors.



**Ángel López Molinero** is a Full Professor of Analytical Chemistry in the University of Zaragoza since 1987. He was a visitor in CNRS Lyon, France, in developing ICP-AES for analytical spectroscopy. Lately, he has moved his interest to digital image-based methods. Principles and feasibility of colorimetric detections by digital image sensors are studied by advanced chemometric methods.



**Susana de Marcos** received her PhD in Chemistry from the University of Zaragoza (Spain) in 1993. She was a postdoctoral fellow at the University of Graz (Austria) under the supervision of Prof. O.S. Wolfbeis, working in the field of optical sensors. From 1998, she is an Assistant Professor in Analytical Chemistry at the University of Zaragoza. She is a member of the Nanosensors and Bioanalytical Systems Group and the Aragon Institute of

Nanoscience (INA). Her research interest is focused on the development of optical (nano)biosensors for continuous monitoring analytes for biomedical, food, and environmental applications.

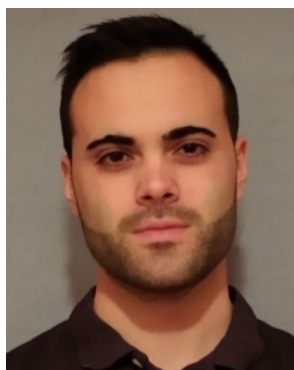


**Chantal Arruego** is graduated in chemistry from the University of Zaragoza.



**Jesús Navarro** is graduated in chemistry and biochemistry from the University of Zaragoza and master in chemical science and technology with specialty in analytical chemistry. Currently, he is a PhD student focused on the study of optical analysis methods based on enzymatic reactions. These enzyme systems have been implemented on solid supports to perform rapid analysis methods. It is worth noting the study of chromophores and gold nanoparticles as the basis of enzyme platforms,

receiving two awards at conferences.



**Víctor Visiedo** is graduated in food science and technology from the University of Zaragoza. He is studying a European Master in Food Safety and Quality.



**Pablo Cebrián** is graduated in chemistry and master in industrial chemistry from the University of Zaragoza.



**Javier Galbán** is a Full Professor in Analytical Chemistry in the University of Zaragoza from 2003, where he is the coordinator of the Nanosensors and Bioanalytical Systems Group. He also belongs to the Aragon Institute of Nanoscience. His interest fields are optical (mainly fluorescence and molecular absorption) (nano)biosensors as a part of monitorization devices and point-of-care systems for clinical and food analysis.



# Colorimetric-enzymatic determination of tyramine by generation of gold nanoparticles

Jesús Navarro<sup>1</sup> · Susana de Marcos<sup>1</sup> · Javier Galbán<sup>1</sup>

Received: 23 September 2019 / Accepted: 24 January 2020  
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2020

## Abstract

In this paper, it has been demonstrated that Au(III) is able to act instead of O<sub>2</sub> in the oxidase enzymatic reaction, so that it becomes reduced to purple gold nanoparticles (AuNPs). The plasmon band (at 540 nm) can be used as the analytical signal. Tyramine has been determined using its enzymatic reaction with tyramine oxidase (TAO). The kinetic of the AuNP formation has been studied in the light of both the Avrami equation for crystallization and the Finke-Watsy mechanism for AuNP nucleation and growth. The effects of the Au(III), TAO and tyramine concentrations on the corresponding kinetic constants have been investigated. Working at room temperature, under optimal conditions (phosphate buffer pH 7.0, TAO 0.5 U.mL<sup>-1</sup> Au(III) 1 mM), the linear response ranges from 2.5 × 10<sup>-5</sup> M to 3.3 × 10<sup>-4</sup> M Tyramine (5.6% RSD) and the LOD is 2.9 × 10<sup>-6</sup> M. Under these conditions, the signal is measured after 30 min reaction (to obtain the highest sensitivity), but this time can be significantly reduced by increasing the temperature (the reaction is finished after 4 min when working at 50 °C). The method has been applied to tyramine determination in a cheese sample with good results. The new scheme proposed in this paper can be extended, in principle, to other enzymatic methods based on oxidase enzymes.

**Keywords** Tyramine · Tyramine oxidase · HRP · ABTS · TMB · Foodstuff

## Introduction

Tyramine is a biogenic amine produced by the decarboxylation of the aminoacid tyrosine due to biological activity (microorganisms). It is usually present in foodstuffs in moderate concentrations. High concentrations in foodstuffs of this compound, which can appear due to inadequate manipulation or decomposition, are not suitable for human consumption (its toxic effects include nausea, vomiting, migraines or respiratory disorders) [1]. The tyramine contents in foods is not specifically

regulated by law although it is strongly suspected that it helps the histamine concentrations in the human body to increase (the concentration limits of histamine in some foods have been established by the European Union). Moreover, tyramine is the majority biogenic amine in some types of foods and its maximum content in some products is regulated in the corresponding Codex Alimentarius of some countries [2].

The determination of tyramine in foods presents similar difficulties to the analysis of other biological substances: the complexity of the sample matrix and its low concentration. This is why it is almost unavoidable to perform a previous extraction to eliminate the interferences, to concentrate the samples and to apply an instrumental separation technique such as layer chromatography, gas chromatography, capillary electrophoresis or high-resolution liquid chromatography. These methodologies have been described in previous papers [3, 4]. All these methods work very well, but they need long analysis time and qualified personnel, so they are normally used when several biogenic amines need to be determined. Rapid response methods are necessary for the rapid detection of high levels of tyramine in foods in order to adequately protect consumers, workers and producers. Enzymatic methods of analysis are suitable alternatives in these cases.

---

*This work was presented at the IX NyNA 2019, International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology at Zaragoza (Spain) from 2 - 4 July, 2019. Chairman: Dr. Juan R. Castillo.*

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00604-020-4141-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

✉ Javier Galbán  
jgalban@unizar.es

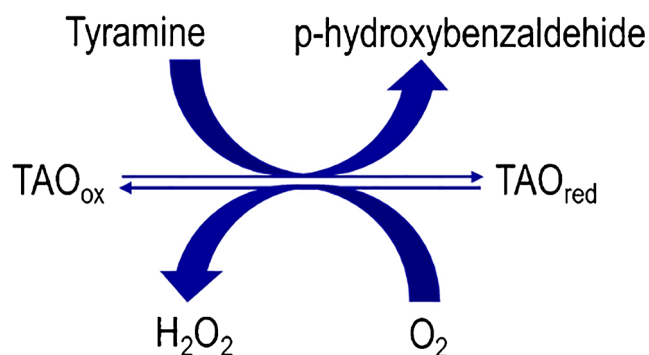
<sup>1</sup> Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, Aragón Institute of Nanoscience (INA-ICMA), University of Zaragoza, E-50009 Zaragoza, Spain

Very few enzymatic reactions work analytically well for tyramine, in particular, those based on Polyamine Oxidase (PAO) and especially Tyramine Oxidase (TAO) [5]. TAO is an oxidase enzyme which catalyzes the oxidation/decarboxylation of tyramine according to the reaction given in Scheme 1. TAO has been used for the development of electrochemical sensors [6, 7], but as far as we know, no optical colorimetric or fluorometric methods or sensors have been developed for the determination of this compound.

The current strategies used for colorimetric determinations based on oxidase reactions, such as that shown in Scheme 1, consist of coupling an indicating reaction based on horseradish peroxidase (HRP) and a chromogen (TMB, ABTS, or some others) which is oxidized to a colored form (the reduced form is colorless). These reactions generally work well but present some problems [8, 9]: a) most dyes are not very stable and can be partially oxidized by the  $O_2$  present in the air; b) the colored species formed can react with the product of the analyte; c) several reducer species present in the sample can interfere in the dye product formation. New strategies to avoid these problems are required.

The use of AuNPs as a basis for the development of colorimetric methods has been growing exponentially. Most of these methods are based on using the AuNPs as a substitute for the chromogenic reagent and exploit three fundamental ideas [10, 11]: 1) The addition of the analyte causes the aggregation of these nanoparticles so that they change their spectroscopic properties in a way related to the analyte concentration in the sample, 2) as a consequence of the enzymatic reaction the AuNPs size increases due to the  $H_2O_2$  presence [12]; and 3) The product of the enzymatic is able to form AuNPs [13].

In this paper we propose a different approach which complements these AuNPs methods and solves some of the previously indicated problems caused by chromogens. It consists of synthesizing AuNPs from Au(III) as a consequence of the enzymatic reaction and measuring the absorbance of the appearing plasmon band (540 nm).



**Scheme 1** Enzymatic oxidation of tyramine catalyzed by Tyramine Oxidase (subscript “ox” and “red” refer to oxidized and reduced forms of TAO, respectively)

Our hypothesis is that Au(III) can replace  $O_2$  in the reaction of Scheme 1, so it is reduced and AuNPs appear during the enzymatic reaction. Taking advantage of the good selectivity of TAO to tyramine, interference problems are minimized. This has allowed this method to be applied for tyramine determination in a cheese sample. Experimental conditions have been obtained in which the formation of nanoparticles occurs in a few minutes. This method complements one of the three ways in Analytical Nanoscience proposed by Valcarcel [14].

## Experimental section

### Reagents and solutions

Tyramine oxidase (TAO) (EC 1.4.3.6) was obtained from Sekisui Diagnosis (<https://www.sekisuichemical.com>) ( $4.6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) and dissolved in phosphate buffer pH 7.0, 0.1 M. The biogenic amines tyramine, cadaverine, putrescine and histamine were obtained from Sigma (<https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>); these amines were weighed and dissolved in the corresponding buffer. Phosphate buffer (0.1 M) was prepared from  $Na_2HPO_4$  and  $NaH_2PO_4$  solids (Sigma S9763, S9638). Gold(III) chloride hydrate solid (Sigma 254,169) was dissolved in miliQ water to obtain a 50 mM solution.

### Apparatus

A Foxy-RTM fluorescence  $O_2$  sensor from Ocean Optics (EW Duive, The Netherlands, <https://oceanoptics.com/>) consisting of a QE65000 CCD-array spectrometer coupled to an oxygen FOXY-R (by A QBIF600-UV/Vis optical fiber), and a LS-450 pulsed blue LED light as radiation source, was used to measure dissolved oxygen. A Tecnai F30H–7650 microscope (scanning and transmission mode, STEM) (FEI, The Netherlands, <https://www.fei.com>) was used for characterization of the gold nanoparticles. UV-vis molecular absorption measurements were performed on a Specord 210 Plus spectrophotometer and an Agilent 8453 diode array spectrophotometer (One cm cuvettes were used in all cases). A Thermo Scientific Multifuge X1R centrifuge was used for separation by centrifugation. The Millipore MiliQ  $H_2O$  system was used for water purification.

### Sample treatment

Ten grams of Emmental cheese were weighed and mechanically ground with 20 mL of trichloroacetic acid (TCA) 5% (*w/V*). The mixture was stirred for 30 min and subsequently

centrifuged for 20 min at 5000 rpm at 4 °C. The supernatant was collected and 2 mL of 2 M NaOH was added and centrifuged again for 20 min at 5000 rpm at 4 °C. The supernatant was collected and the pH was adjusted to pH 7.0 with HCl 1 M. The extract was filtered with a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filter and the solution was made up to 25 mL with miliQ H<sub>2</sub>O. This sample solution was used for the determination of tyramine in cheese.

## Measurement procedure

1940  $\mu\text{L}$  of the corresponding standard solution (in phosphate buffer pH = 7.0 0.1 M) and 20  $\mu\text{L}$  TAO 0.5  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  were added in a cuvette. After waiting 5 min, 40  $\mu\text{L}$  of 50 mM HAuCl<sub>4</sub> were added to the cuvette. The formation of AuNPs was followed by measuring the variation of Abs (540 nm) with time at room temperature and at 40 °C. To perform the kinetic study, spectra were collected every 5 s after adding the HAuCl<sub>4</sub> solution.

For the determination of tyramine in Emmental cheese, 250  $\mu\text{L}$  of the sample solution, 1690  $\mu\text{L}$  phosphate buffer pH = 7.0 0.1 M and 20  $\mu\text{L}$  TAO 0.5  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  were added in a cuvette. After waiting 5 min, 40  $\mu\text{L}$  of 50 mM HAuCl<sub>4</sub> were added to the cuvette and the formation of AuNPs was followed.

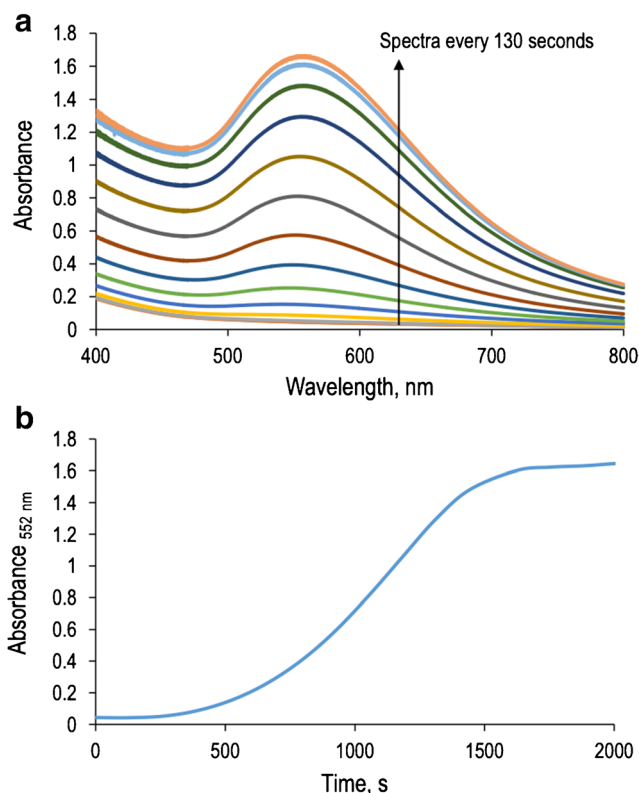
## Results and discussion

### Mechanism of the enzymatic reaction in the presence of au(III)

The molecular absorption spectra of a solution containing tyramine, TAO and Au(III) change during the enzymatic reaction, as shown in Fig. 1a. As can be seen, after an activation time, a band due to the plasmon resonance appears and increases until a plateau is obtained (Fig. 1b). Depending on the experimental conditions used, a later slower increase is observed. Figure S1 (Supporting Information) shows TEM images indicating that the spectra are due to the AuNP formation.

Several hypotheses were considered in order to explain the AuNP formation, before establishing the final mechanism:

- i) Intrinsic reducing capabilities of proteins: Some proteins are able to generate Au nanostructures due to the reducing capability of some aminoacids [15]; however, in this case, no AuNP formation was observed by direct reaction between Au(III) and TAO (Figure S2A).
- ii) Intrinsic reducing capabilities of tyramine: Previous papers have shown that AuNP can be formed by direct reaction between nitrogenated compounds and Au(III) [16]. The direct reaction between tyramine and Au(III) was thoroughly studied but no AuNP formation was



**Fig. 1** Molecular absorption spectra of gold nanoparticles (AuNP) formation during the enzymatic reaction. Experimental conditions: [TAO] = 0.5  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , [Au(III)] = 1 mM, [tyramine] =  $2.6 \times 10^{-4}$  M, incubation time 5 min and pH 7.0 phosphate buffer 0.1 M, at room temperature (Fig. b shows the absorbance at the maximum wavelength)

- observed. It is only when using a large amount of tyramine that a black Au<sup>0</sup> precipitate appears after several hours of reaction, giving a small signal (Figure S2B). This study was also carried out in the presence of albumin but no changes were observed (Figure S2C).
- iii) AuNP growth induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Several authors have indicated that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is able to increase the growth of previously formed AuNP [12, 17]. Thus, the Au<sup>0</sup> nucleus can be formed by direct reduction of Au(III) with tyramine, where H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assists the AuNP growth. To test this, the enzymatic reaction was carried out in the presence of catalase (Figure S3) to remove the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed during the enzymatic reaction. The catalase produced rather the opposite effect, increasing the kinetic of AuNP formation and reducing the width of the spectra. Moreover, catalase increases the rate of the AuNP formation, which indicates that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actually hinders the process.
- iv) Au(III) versus O<sub>2</sub>: Finally, as shown below, the kinetic of the AuNP formation increases when the tyramine concentration is higher than that of the O<sub>2</sub> (i.e. the whole O<sub>2</sub> of the solution is consumed), indicating that the Au(III) participates in the enzymatic reaction. The possibility that metallic ions can act as substrates of enzymes has recently been reported [18].

All these studies reinforce the idea that the active center of the enzyme is responsible for the AuNP. According to this, Au(III) is reduced to gold nanoparticles and the catalytic center of the enzyme is oxidized to its initial state. TAO is an enzyme belonging to the copper-containing amine oxidases group. The kinetic mechanism of this type of enzyme has been studied [19] (not specifically with TAO) and is summarized in figure S4. As can be seen, during the reaction Cu(II) can be reduced to Cu(I) and it is reoxidized back by O<sub>2</sub>. Since Cu(I) is also able to reduce Au(III) to Au<sup>0</sup>, this can demonstrate the proposed mechanism.

### Kinetics of the AuNP formation: theoretical background

In this paper we are interested in providing theoretical support and understanding of the experimental results obtained. Most of the classical mechanisms [20, 21] consider that the formation of nanoparticles is based on the Johnson, Mehl, Avrami and Kolmogorov (JMAK) crystallization model which is given by the general equation:

$$\frac{Abs_t}{Abs_\infty} = 1 - e^{-(kt)^n} \implies \text{Ln} \left( \text{Ln} \left( \frac{Abs_\infty}{Abs_\infty - Abs_t} \right) \right) = n \text{Ln}(K_{Av}) + n \text{Ln}(t) \quad (1)$$

$Abs_t$  and  $Abs_\infty$  being the absorbance of the plasmon band at any moment and at the end of the reaction respectively,  $K_{Av}$  being the overall kinetic constant (Avrami constant) of the AuNP formation reaction and  $n$  being a parameter related to the dimensionality and shape of the AuNPs. During the optimization study, the  $Abs = f(t)$  representations were fitted to this equation and the corresponding  $K$  values were obtained.

Starting with these principles, Finke-Watzky proposed a kinetic mechanism consisting of two simultaneous steps [22], the first being a slow continuous pseudo-first order reaction describing the formation of nuclei involving the precursor (Au(III) in this case) (Eq. 2), and a second fast step (Eq. 3) comprising an autocatalytic growth of the nuclei with the precursor,



They derived an equation relating the  $[A]_t$  concentration with  $k_1$ ,  $k_2$  and  $C_{A,0}$  (initial A concentration):

$$[A]_t = \frac{k_1 + k_2 C_{A,0}}{k_2 C_{A,0} + k_1 e^{(k_1 + k_2 C_{A,0})t}} \quad (4)$$

From this equation, both  $[B]_t$  and  $[AuNP]_t$  can be derived. Although other models have been subsequently proposed, the Finke-Watzky mechanism has been extensively used for

modeling gold or other nanoparticle formation (and other types of structures, such as protein agglomeration) [23]. In most cases, the reducer concentration (necessary for Au<sup>0</sup> formation) is in excess of A, so  $k_1$  and  $k_2$  are pseudo-first and second order constants, respectively. In our case the reducer is not always in excess relative to Au(III), but in most cases it is in defect so we have derived two equations to describe the absorbance variation due to AuNP during the reaction ( $Abs_t$ ), both when the concentration of Au(III) is higher (Eq. 5), or lower (Eq. 6) than the tyramine concentration (see supplementary material Appendix S1).

$$Abs_t = \varepsilon_{AuNP} [AuNP]_t = \varepsilon_{AuNP,n} \frac{k_1}{k_{2,n}} \left( \frac{1 - e^{-C_{Au,0} (k_1 + \frac{2}{3} k_{2,n} C_{Tyramine,0})t}}{e^{-C_{Au,0} (k_1 + \frac{2}{3} k_{2,n} C_{Tyramine,0})t}} + \frac{3k_1}{2k_{2,n} C_{Ty,0}} \right) \quad (5)$$

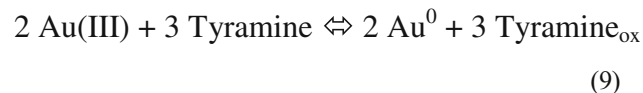
$$Abs_t = \varepsilon_{AuNP} [AuNP]_t = \varepsilon_{AuNP,n} \frac{k_1}{k_{2,n}} \left( \frac{1 - e^{-C_{Tyramine,0} (k_1 + k_{2,n} C_{Au,0})t}}{e^{-C_{Tyramine,0} (k_1 + k_{2,n} C_{Au,0})t}} + \frac{k_1}{k_{2,n} C_{Au,0}} \right) \quad (6)$$

where

$$k_{2,n} = \frac{k_2}{n} \quad (7)$$

$$\varepsilon_{AuNP,n} = \frac{\varepsilon_{AuNP}}{n} \quad (8)$$

In these equations,  $C_{Au,0}$  and  $C_{Ty,0}$  are the total Au(III) and tyramine concentrations used,  $n$  the number of Au atoms per AuNP and  $\varepsilon_{AuNP}$  the molar absorptivity of the AuNPs. Moreover, the stoichiometry of the overall reaction has also been taken into account.



During the optimization study, the  $Abs = f(t)$  records obtained were fitted to the corresponding equation (Eq. 6 or Eq. 7) using Solver® and the  $k_{2,n}$ ,  $k_1$  y  $\varepsilon_{AuNP,n}$  were obtained.

As has been indicated above (Fig. 1b), a later increase in the absorbance at the end of the process was observed, especially when the Au(III) concentration was in excess. This is usually explained by a further evolution of the formed nanoparticles, which is normally due to one of the following processes [24, 25]: a) Ostwald ripening, according to which smaller nanoparticles formed at the end of the process become dissolved to increase the size of the larger nanoparticles; or b)

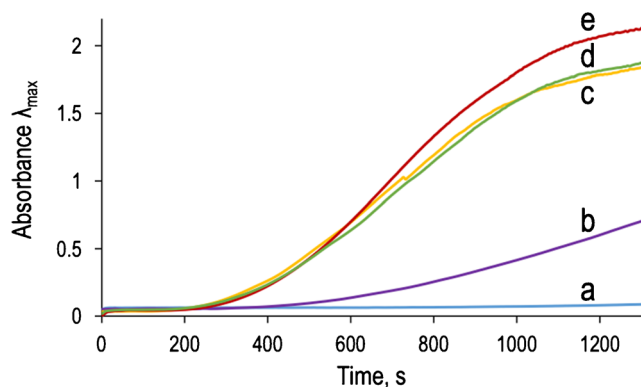
Oriented attachment, referring to the coalescence of smaller nanoparticles to give larger ones. While we have no direct experimental evidence of either of these processes, it seems clear that a further reorganization of the AuNP is also produced during the enzymatic reaction. We have applied both models but neither of them properly fitted our results, so no further discussion on this part of the curve is given in this paper (see Figure S5).

### Optimization of the analytical method

Although Au(III) is able to replace O<sub>2</sub> in the reaction, the enzyme is more prone to react with O<sub>2</sub> than with Au(III). This is observed when Au(III) is added at different times (incubation time) from the beginning of the reaction (see Fig. 2). As can be seen, the longer the delayed time (up to 5 min), the faster the reaction, which indicates that, when Au(III) is added, the lower the O<sub>2</sub> concentration in the solution, the faster the reaction. However, for 8 min incubation time the reaction becomes slower, which can be explained considering that the O<sub>2</sub> has diffused back from the environment surrounding the cuvette. The calculated kinetic constants  $k_1$  and  $k_{2,n}$  (table S1) show that the O<sub>2</sub> mainly affect the AuNP growth. Five minutes was chosen as the optimum incubation time.

Since this type of method has not been previously reported, it was considered necessary to study the effect of experimental variables on the AuNP formation. In the framework of the AuNP formation during the reaction, the following results were considered of interest: A) maximum wavelength ( $\lambda_{\max}$ ) and bandwidth ( $\Delta\lambda$ , taken as the width at half of the maximum) of the plasmon band, as a measurement of the AuNP size [26, 27]; B) maximum absorbance (Abs<sub>max</sub>) (also the  $\epsilon_{\text{AuNP},n}$  at  $\lambda_{\max}$ ) before ripening, as a measurement of the analytical method sensitivity; and C) kinetic of the reaction (represented by the  $K_{\text{Av}}$ ,  $k_1$  and  $k_{2,n}$  values).

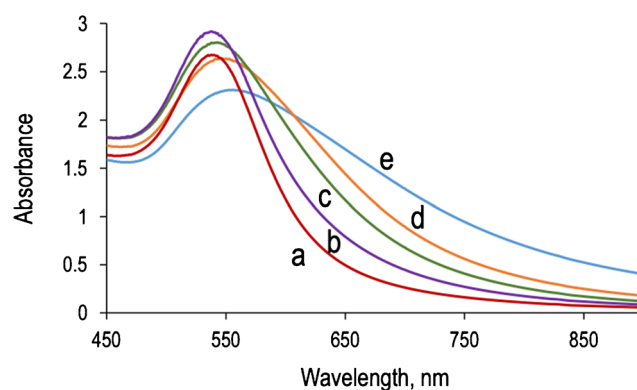
The most critical parameter affecting the AuNP formation during the enzymatic reaction are the Au(III), TAO and



**Fig. 2** Effect of the incubation time on the kinetic of the AuNP formation a) 0 min; b) 1 min; c) 3 min; d) 5 min; e) 8 min. Experimental conditions: [TAO] = 0.5 U.mL<sup>-1</sup>, [Au(III)] = 1 mM, [tyramine] =  $2.6 \times 10^{-4}$  M and pH 7.0 phosphate buffer 0.1 M, at room temperature

tyramine (the analyte) concentrations. Tables S2–S4 compile the Abs<sub>max</sub>,  $\lambda_{\max}$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $k_1$ ,  $k_{2,n}$ ,  $\epsilon_{\text{AuNP},n}$  and  $K_{\text{Av}}$  values obtained during the optimization studies of these parameters. The following conclusions can be derived from these studies:

- 1) By increasing the concentration of TAO (Fig. 3), the polydispersity of the AuNPs increase and as a consequence, the  $\Delta\lambda$ .
- 2)  $\lambda_{\max}$  depends on the TAO (Fig. 3) and tyramine concentrations, but in opposite senses. Although new assays are necessary to properly explain these results, a first hypothesis can be made. It is accepted that the longer the wavelength the higher the AuNP diameter [28, 29]. However, the TEM images (Fig. S1) indicated that the AuNP diameter does not appreciably change with the enzyme concentration. Thus, the  $\lambda_{\max}$  displacement can be attributed to the interaction between the AuNP and the protein, which according to the bibliography produces a red shift of the plasmon band [30]. Regarding the tyramine effect, probably the tyramine product of the reaction can take part of the outer sphere of the AuNP, so the spectra wavelength will be affected.
- 3) The overall kinetic of the reaction (see  $K_{\text{Av}}$  value) is favored, as expected, by medium-high TAO and tyramine concentrations, but the effect of both parameters on  $k_1$  and  $k_{2,n}$  is different. While TAO stimulates the growth step, tyramine increases the nucleation step. The effect of the Au(III) is of interest:  $K_{\text{Av}}$  is nearly constant up to an Au(III) concentration close to the O<sub>2</sub> saturation concentration (O<sub>2,sat</sub>) in water, but higher Au(III) values produce a decrease in the overall kinetic reaction. Similarly,  $k_1$  gives a maximum at O<sub>2,sat</sub> then decreases, but  $k_{2,n}$  decreases monotonically with the Au(III) concentration. These results seems to indicate that Au(III) is of course necessary for AuNP formation, but it can act as an inhibitor of the enzymatic reaction.



**Fig. 3** Effect of the TAO concentration on the absorption spectra of the formed AuNP a) 0.2 U.mL<sup>-1</sup>; b) 0.5 U.mL<sup>-1</sup>; c) 1.0 U.mL<sup>-1</sup>; d) 2 U.mL<sup>-1</sup>; e) 4 U.mL<sup>-1</sup>. Experimental conditions: [Au(III)] = 1 mM, [tyramine] =  $2.6 \times 10^{-4}$  M, incubation time 5 min and pH 7.0 phosphate buffer 0.1 M, at room temperature



- 4) The effect of Au(III) and TAO on the  $Abs_{S_{max}}$  is also indicated in Tables S2 and S3, and can be explained considering the variations observed in the corresponding  $\epsilon_{AuNP,n}$ . The Mie theory predicts a relationship between this parameter and the cubed AuNP diameter raised to the cube ( $d^3$ ) [31]. This relationship has been experimentally observed [31, 32]; an average relation is given by (see Appendix S2):

$$\epsilon_{AuNP} = 9.2(\pm 4.1) \times 10^4 d^3 \quad (d, \text{ in nm}) \quad (10)$$

If it is considered that AuNPs are spherical in shape, it is possible to relate  $d$  with the number of Au atoms present in each AuNP according to the following equation [33]:

$$n = 30.9 d^3 \quad (d, \text{ in nm}) \quad (11)$$

By combining Eqs. (10) and (11) the expected  $\epsilon_{AuNP,n}$  value can be obtained:

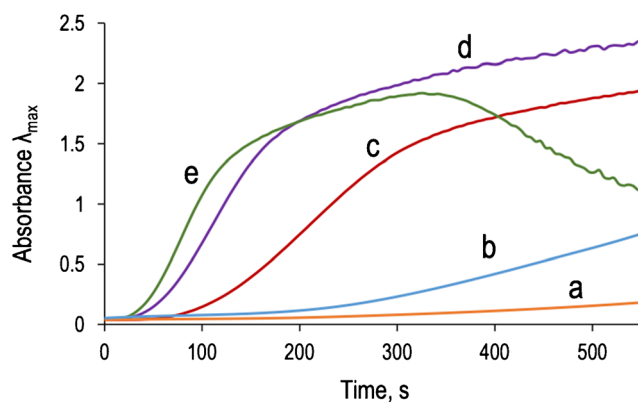
$$\epsilon_{AuNP,n} = \frac{\epsilon_{AuNP}}{n} = 3.0(\pm 1.3) \times 10^3 \quad (12)$$

The values given in tables S2–S4 qualitatively (i.e., order of magnitude) agree with (Eq. 12), which validates the model given by Eqs. (5) and (6); the differences observed between the theoretical value given in Eq. 12 and those obtained experimentally can be explained considering that the AuNP are not fully spherical (Fig. S1). Moreover, Eq. (10) states that changes in the observed  $\epsilon_{AuNP,n}$  may be due to small variations in the  $d$  of the formed AuNP.

In order to obtain a suitable balance between kinetics, sensitivity and linear range, the Au(III) and TAO concentrations chosen were  $10^{-3}$  M and  $0.5 \text{ U.mL}^{-1}$  respectively.

The pH effect on the TAO enzymatic reaction was studied (figure S6A) and the results were compared with those obtained by measurement of the  $O_2$  consumption in the absence of Au(III) (figure S6B). As can be seen, the enzymatic reaction can be carried out quantitatively in a pH range from 6 to 10 in the absence of Au(III), with optimum reaction rates at pH 7.0 and 8.0. When Au(III) is used, the effect of the pH is more critical. First, the AuNP formation is observed in a narrower pH range, from 7.0–9.0; second, the  $Abs_{max}$  and the kinetic constants of the reaction depend on the pH, with an optimum at pH 7.0; third, the  $\lambda_{max}$  and  $\Delta\lambda$  show same dependence on the pH, but 7.0 and 8.0 give similar results.

The AuNP formation is slower than the classical indicating colorimetric reactions based on HRP and a dye. To improve the kinetic of the reaction, the effect of temperature was also studied (Fig. 4). As expected, the time necessary to reach the plateau is reduced by increasing the temperature. At a



**Fig. 4** Effect of the temperature on the kinetic of the reaction a) 20 °C; b) 30 °C; c) 40 °C; d) 50 °C; e) 60 °C. Experimental conditions: [TAO] =  $0.5 \text{ U.mL}^{-1}$ , [Au(III)] = 1 mM, [tyramine] =  $7.9 \times 10^{-4}$  M, incubation time 5 min and pH 7.0 phosphate buffer 0.1 M

temperature of 60 °C, after the fast increase in the absorbance a later decrease is observed due to the enzyme denaturation which destabilizes the AuNP formed. The three kinetic constants ( $k_1$ ,  $k_{2,n}$  and  $K_{Av}$ ) increase with the temperature following the Arrhenius equation (Table S5), but its effect on the  $Abs_{max}$ ,  $\lambda_{max}$  and  $\Delta\lambda$  is negligible.

Finally, to try to improve the synthesis process of the nanoparticles during the enzymatic reaction,  $SiO_2$  nanoparticles were added. This was intended to generate nuclei from which the gold nanoparticles grow. However, no modifications of the kinetic were observed (Figure S7).

## Analytical figures of merit

The optimum experimental conditions for tyramine determination derived from the studies described above are compiled in Table 1. The experimental linear response range (Figure S8), the detection (LOD) and quantification limit (LOQ) and the RSD obtained are also compiled, working at room temperature (rt) and at 40 °C degrees. It is important to indicate that the detection limit of this method is consistent with that obtained using the classical HRP/colorant reaction.

**Table 1** Analytical figures of merit obtained working at room temperature (20 °C) and 40 °C

	20 °C (rt)	40 °C
Linear range, $\mu\text{M}$	25–330	25–330
LOQ, $\mu\text{M}$	9.5	11.5
LOD, $\mu\text{M}$	2.9	3.4
RSD, % (250 $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	5.6 ( $n = 5$ )	6.0 ( $n = 5$ )

<sup>a</sup> The RSD obtained for all points of the calibration line linearly decrease from 11.3% (rt) or 11.8% (40 °C) obtained for 25  $\mu\text{M}$  to 3.2% (rt) or 4.0% (40 °C) obtained using 330  $\mu\text{M}$

## Interferences

Other amines have been studied as possible interferences in the method. To this end, putrescine, cadaverine and histamine, the main biogenic amines appearing with tyramine in real samples, were studied. Our experimental studies have shown that these three biogenic amines were not able to generate AuNP during the enzymatic reaction (at least up to  $10^{-4}$  M). However, they affect the AuNP formation during the tyramine/TAO reaction.

First, figure S9A show the  $Abs_{540nm} = f(t)$  representations obtained for tyramine in the presence of putrescine and cadaverine. As can be seen, both amines decrease the rate of the AuNP formation during the reaction but the final absorbance is not affected. Figure S9B shows that the kinetic of the  $O_2$  consumption by the tyramine/TAO reaction is not affected by any of the amines, so the most plausible interference mechanism comes from the ability of Au(III) to form coordination complexes with diamines,  $(Au(Put)_2)^{3+}$  and  $(Au(Cad)_2)^{3+}$  being the expected stoichiometries [34]). These complexes decrease the kinetic of the Au(III) reduction. In order to correct this problem, several alternatives were examined. The easiest to use was increasing the kinetic of the reaction by heating at temperature of about 40 °C (figure S9C).

A more important problem was caused by the histamine:tyramine ratio. If this ratio is 1:1, the formation of nanoparticles is not observed. The general hypothesis is that histamine forms a complex, stronger than those of the putrescine or cadaverine with Au(III) that does not allow it to react following the mechanism described above [35]. This interference was not avoided by heating the solution or by adding a metallic species (Cu(II) or Zn(II)) able to react with histamine. To evaluate the magnitude of this interference, tests were performed with a constant concentration of tyramine and varying the amounts of histamine present in the reaction. Figure S10A shows the absorption spectra obtained. It can be observed that the decrease in the signal is proportional to the histamine presents in the sample (Figure S10B). This type of interference can be estimated by performing a doping of the sample with a known concentration of tyramine and observing how the signal decreases depending on the amount of histamine present.

## Real sample

Many types of samples contain tyramine as the majority biogenic amine. An example is Emmental cheese, so we applied this method to tyramine determination in a sample of this cheese.

Using the optimized experimental conditions (and working at 40 °C), we applied the method explained in the experimental section and the standard addition method to avoid interferences of the matrix. In Figure S11 it can be seen that the slope

of the line does not differ significantly from the slope of the line for which no sample is added, so no proportional interferences were observed. The concentration of tyramine in the sample obtained was  $93 \pm 14 \text{ mg Kg}^{-1}$  ( $n = 5$ ). The sample was also analyzed by the Public Health Laboratory of Aragón using their HPLC validated method ( $86 \pm 13 \text{ mg Kg}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) and a colorimeter method based on TAO but using HRP/TMB as the indicating reaction (see Appendix S3). No significant differences were observed between the methods.

## Conclusions

This paper has demonstrated the possibility of generating AuNP during an enzymatic reaction and using the corresponding plasmon resonance band as the analytical signal, thus avoiding, in this way, the chromogen/HRP indicating reaction. Although several theoretical aspects need more in-depth studies, the results suggest that this is a general mechanism which can work with many other enzymatic reactions. Moreover, other types of analytical signals deserve to be studied, such as: the fluorescence of gold nanoclusters, which is expected to appear during the nucleation process, and/or the surface-enhanced Raman signal of the enzyme or the reaction product, as a consequence of the AuNP formation. Finally, this method may also be carried out using other types of metallic species able to generate nanoparticles (especially, Ag(I)).

**Acknowledgments** The authors thank the Ministry of Economy and Finance (MINECO) of Spain (CTQ2016-76846R) and the Research Groups funding of the Government of Aragón (group E25\_17R), for financial support. J Navarro thanks the Government of Aragón (DGA) for a grant. The authors are also very grateful to Dr. Francisco Palacios and Cristina Asensio, MsC, of the Public Health Laboratory of Aragón, for their invaluable help.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The author(s) declare that they have no competing interests.

## References

1. Benkerroum N (2016) Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 15: 801–826. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>
2. Karovičová J, Kohajdová Z (2005) Biogenic amines in food. *Chem Pap* 59:70–79
3. Papageorgiou M, Lambropoulou D, Morrison C, Kłodzińska E, Namieśnik J, Plotka-Wasyłka J (2018) Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *Trac-Trend Anal Chem* 98:128–142. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.001>

4. Ordóñez JL, Troncoso AM, García-Parrilla MDC, Callejón RM (2016) Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages—a review. *Anal Chim Acta* 939:10–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.045>
5. Wouters J, Perpete P, Hayen P, Anceau N, Durant F (1994) Kinetic characterization of tyramine oxidase of *Arthrobacter* species. *Biochem Mol Biol Int* 32:737–743
6. Lata S, Yadav S, Bhardwaj R, Pundir CS (2011) Amperometric determination of tyramine in sauce and beer by epoxy resin biocomposite membrane bound tyramine oxidase. *Sens Instrum Food Qual Saf* 5:104–110. <https://doi.org/10.1007/s11694-011-9117-5>
7. Lange J, Wittmann C (2002) Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Anal Bioanal Chem* 372:276–283. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1130-9>
8. Osman AM, Wong KKY, Femyhough A (2006) ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem Biophys Res Commun* 346:321–329. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.118>
9. Scott SL, Chen WJ, Bakac A, Espenson JH (1993) Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. *J Phys Chem* 97:6710–6714. <https://doi.org/10.1021/j100127a022>
10. Zamborini FP, Bao L, Dasari R (2011) Nanoparticles in measurement science. *Anal Chem* 84:541–576. <https://doi.org/10.1021/ac203233q>
11. Sabela M, Balme S, Bechelany M, Janot JM, Bisetty K (2017) A review of gold and silver nanoparticle-based colorimetric sensing assays. *Adv Eng Mater* 9:1700270. <https://doi.org/10.1002/adem.201700270>
12. Liu BW, Wu YY, Huang PC, Wu FY (2019) Colorimetric determination of cytosine-rich ssDNA by silver (I)-modulated glucose oxidase-catalyzed growth of gold nanoparticles. *Microchim Acta* 186:467–468. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3591-6>
13. Li G, Yang M, Chen LC, Gao B, Xiong XL (2015) Colorimetric and visual detection of tyrosine based on its copper-catalyzed enzymatic oxidation to dopamine and subsequent reductive formation of colored gold nanoparticles using copper ions. *Microchim Acta* 182:13–117. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1278-6>
14. López-Lorente AI, Valcárcel M (2016) The third way in analytical nanoscience and nanotechnology: involvement of nanotools and nanoanalytes in the same analytical process. *Trac-Trend Anal Chem* 75:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.011>
15. Xie J, Zheng Y, Ying JY (2009) Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *J Am Chem Soc* 131:888–889. <https://doi.org/10.1021/ja806804u>
16. Newman JDS, Blanchard GJ (2006) Formation of gold nanoparticles using amine reducing agents. *Langmuir* 22:5882–5887. <https://doi.org/10.1021/la060045z>
17. Bai J, Flowers K, Benegal S, Calizo M, Patel V, Bishnoi SW (2009) Using the enzymatic growth of nanoparticles to create a biosensor. An undergraduate quantitative analysis experiment. *J Chem Educ* 86:712. <https://doi.org/10.1021/ed086p712>
18. Alonso-de Castro S, Cortajarena AL, López-Gallego F, Salassa L (2018) Bioorthogonal catalytic activation of platinum and ruthenium anticancer complexes by FAD and flavoproteins. *Angew Chem Int Ed* 130:3197–3201. <https://doi.org/10.1002/ange.201800288>
19. Quist DA, Diaz DE, Liu JJ, Karlin KD (2017) Activation of dioxygen by copper metalloproteins and insights from model complexes. *J Biol Inorg Chem* 22:253–288. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1415-2>
20. Thanh NT, Maclean N, Mahiddine S (2014) Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chem Rev* 114:7610–7630. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>
21. You H, Fang J (2016) Particle-mediated nucleation and growth of solution-synthesized metal nanocrystals: a new story beyond the LaMer curve. *Nano Today* 11:145–167. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.04.003>
22. Watzky MA, Finke RG (1997) Transition metal nanocluster formation kinetic and mechanistic studies. A new mechanism when hydrogen is the reductant: slow, continuous nucleation and fast autocatalytic surface growth. *J Am Chem Soc* 119:10382–10400. <https://doi.org/10.1021/ja9705102>
23. Finney EE, Finke RG (2008) Nanocluster nucleation and growth kinetic and mechanistic studies: a review emphasizing transition-metal nanoclusters. *J Colloid Interface Sci* 317:351–374. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.05.092>
24. Brazeau AL, Jones ND (2009) Growth mechanisms in nanocrystalline lead sulfide by stopped-flow kinetic analysis. *J Phys Chem C* 113:20246–20251. <https://doi.org/10.1021/jp907270x>
25. Shields SP, Richards VN, Buhro WE (2010) Nucleation control of size and dispersity in aggregative nanoparticle growth. A study of the coarsening kinetics of thiolate-capped gold nanocrystals. *Chem Mater* 22:3212–3225. <https://doi.org/10.1021/cm100458b>
26. Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA (2005) Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Rev* 105:1025–1102. <https://doi.org/10.1021/cr030063a>
27. Enoch S, Quidant R, Badenes G (2004) Optical sensing based on plasmon coupling in nanoparticle arrays. *Opt Express* 12:3422–3427. <https://doi.org/10.1364/OPEX.12.003422>
28. Haiss W, Thanh NT, Aveyard J, Fernig DG (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–Vis spectra. *Anal Chem* 79:4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>
29. Khlebtsov NG (2008) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. *Anal Chem* 80:6620–6625. <https://doi.org/10.1021/ac800834n>
30. Shi X, Li D, Xie J, Wang S, Wu Z, Chen H (2012) Spectroscopic investigation of the interactions between gold nanoparticles and bovine serum albumin. *Chin Sci Bull* 57:1109–1115. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4741-3>
31. Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q (2007) Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloid Surface B* 58:3–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>
32. Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2006) Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B* 110:7238–7248. <https://doi.org/10.1021/jp057170o>
33. Leff DV, Ohara PC, Heath JR, Gelbart WM (1995) Thermodynamic control of gold nanocrystal size: experiment and theory. *J Phys Chem* 99:7036–7041. <https://doi.org/10.1021/j100018a041>
34. Mironov IV, Afanas'eva VA (2010) Gold (III) amine complexes in aqueous alkali solutions. *Russ J Inorg Chem* 55:1156–1161. <https://doi.org/10.1134/S0036023610070302>
35. Sjöberg S (1997) Critical evaluation of stability constants of metal-imidazole and metal-histamine systems (technical report). *Pure Appl Chem* 69:1549–1570. <https://doi.org/10.1351/pac199769071549>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.