



**Universidad**  
Zaragoza

# Trabajo Fin de Grado

Métodos rápidos en el control de la calidad  
alimentaria: caso determinación de Xantina

Rapid methods in the quality control of foods: case  
determination of Xantine

Autor

Marcos Oyarzabal Escola

Director

Ángel López Molinero

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica

Curso 2023/2024

## Resumen

Se estudia el análisis de xantina, principalmente, como compuesto derivado del metabolismo de los nucleótidos. Así se forma durante la degradación del ATP en tejidos post-mortem y por tanto pueden ser indicadores de frescura y calidad de alimentos. Especialmente en la industria pesquera y cárnica.

El trabajo desarrolla métodos para detectar la xantina utilizando procedimientos con ensayos enzimáticos en cascada. Así, inicialmente hay una oxidación enzimática de Xantina. Seguida de oxidación del indicador Amplex Red a Resorufina. La absorbancia de este compuesto final es proporcional a la Xantina inicial.

Se han caracterizado y optimizado las condiciones del proceso analítico y sus prestaciones mediante espectrofotometría de absorbancia molecular. La cinética de la reacción ha sido evaluada y su comportamiento se ajusta al modelo Michaelis-Menten. En las condiciones óptimas el método ha sido aplicado a una muestra real de suero fisiológico.

Manteniendo el procedimiento enzimático se ha estudiado una nueva implementación del procedimiento sobre un soporte con dispositivos de microfluidica en papel. Así la coloración final puede ser medida por colorimetría de imagen digital RGB mediante cámara de teléfono móvil. El método es una nueva propuesta de procedimiento rápido y eficiente.

Además, se estudia una nueva alternativa basada en el uso de solo la primera reacción enzimática actuando sobre Au(III), para producir AU-NPs de características cromogénicas. Con este modo se propone una metodología más simplificada de imagen digital, siempre sobre soporte de papel microfluídico de alta eficiencia.

## Abstract

The analysis of xanthine is primarily studied as a compound derived from the metabolism of nucleotides. It is formed during the degradation of ATP in post-mortem tissues and can therefore be indicators of food freshness and quality, especially in the fishing and meat industries.

The work develops methods to detect xanthine using procedures with cascade enzymatic assays. Initially, there is an enzymatic oxidation of xanthine, followed by the oxidation of the indicator Amplex Red to resorufin. The absorbance of this final compound is proportional to the initial xanthine concentration.

The conditions of the analytical process and its performance have been characterized and optimized using molecular absorbance spectrophotometry. The reaction kinetics have been evaluated, and its behavior fits the Michaelis-Menten model. Under optimal conditions, the method has been applied to a real sample of physiological serum.

Maintaining the enzymatic procedure, a new implementation of the procedure on a support with paper-based microfluidic devices has been studied. The final coloration can thus be measured by digital RGB image colorimetry using a mobile phone camera. The method is a new proposal for a fast and efficient procedure.

Additionally, a new alternative based on using only the first enzymatic reaction acting on Au(III) to produce chromogenic Au-NPs has been studied. This approach proposes a more simplified methodology of digital imaging, still on a high-efficiency paper microfluidic support.

## Contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Nuevos analitos para el control de la calidad: .....	1
2. Xantina e Hipoxantina Mediante Espectrofotometría .....	1
3. Xantina e Hipoxantina Mediante Microfluídica y Colorimetría Digital.....	2
<b>OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO</b> .....	3
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	3
1. Materiales y equipos .....	3
2. Reactivos y disoluciones .....	4
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	4
1. Estudio experimental de xantina por espectrofotometría .....	4
• Contexto del método .....	4
• Optimización de variables.....	8
• Prestaciones del método .....	11
• Robustez .....	13
• Caracterización de la cinética .....	15
• Aplicaciones en suero fisiológico .....	18
2. Estudio experimental de xantina e hipoxantina por microfluídica y colorimetría digital	19
• Contexto del método .....	19
• Optimización del procedimiento microfluídico. ....	20
• Efecto salino: .....	22
3. Estudio de microfluídica y colorimetría digital con nanopartículas de Au .....	22
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	24
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	25
<b>ANEXOS</b> .....	26

## INTRODUCCIÓN

### 1. Nuevos analitos para el control de la calidad:

La Xantina y la Hipoxantina, derivados del metabolismo de nucleótidos, son cruciales para evaluar la frescura y calidad de productos alimenticios, especialmente en la industria pesquera y cárnica<sup>1</sup>. Se forman durante la degradación del ATP en tejidos post-mortem, actuando como indicadores de frescura. Su medición es fundamental para el control de calidad, garantizando la seguridad y aceptabilidad de los productos.

### Papel en la Evaluación de la Frescura

Tras la muerte de un animal, el ATP en sus músculos se degrada, produciendo inosina monofosfato, inosina, Hipoxantina y Xantina. Estos compuestos se acumulan a diferentes ritmos según la temperatura de almacenamiento y la especie del animal. La medición de hipoxantina y xantina proporciona una evaluación precisa de la frescura de la carne.

- Hipoxantina: Su concentración aumenta gradualmente durante el almacenamiento, reflejando cambios autolíticos iniciales. Es útil como índice temprano de frescura.
- Xantina: Se produce en etapas posteriores del almacenamiento, marcando estados más avanzados de deterioro.

### Importancia en el Control de Calidad

La detección de Xantina e Hipoxantina es esencial para asegurar la seguridad y calidad de los productos alimenticios. Niveles elevados indican un deterioro significativo, afectando el sabor, textura y valor nutritivo de la carne. La industria alimentaria necesita utilizar procedimientos para control rápido. Habitualmente métodos enzimáticos, basados en xantina oxidasa<sup>2</sup> (XOD) son de gran interés.

### Aplicaciones Prácticas

- Control de Frescura del Pescado: La hipoxantina se acumula rápidamente en pescado mal almacenado, ideal para evaluar frescura en tiempo real.
- Control de Calidad en Carnes: La concentración de xantina e hipoxantina evalúa la frescura de carnes como pollo, cerdo y ternera, manteniendo altos estándares de calidad.
- Industria de Conservas: La estabilidad de la hipoxantina durante el enlatado asegura la calidad de la materia prima y del producto final.

### 2. Xantina e Hipoxantina Mediante Espectrofotometría

La detección de Xantina e Hipoxantina mediante espectrofotometría utiliza las propiedades de absorción de luz de estas moléculas o de los productos generados en sus reacciones enzimáticas<sup>3</sup>.

### Principio del Método

El método consta de dos etapas. Primero, la Xantina y la Hipoxantina se oxidan en presencia de la enzima xantina oxidasa (XOD), produciendo ácido úrico y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como subproductos. La Hipoxantina se convierte en Xantina y luego en ácido úrico. En la segunda etapa, la detección espectrofotométrica mide la absorbancia de los productos de la reacción enzimática, principalmente el ácido úrico, a una longitud de onda específica.

## Procedimiento

Las muestras que contienen Xantina e Hipoxantina (sueros, líquidos biológicos o alimentos) se preparan y se les agrega XOD para iniciar la oxidación. A veces se utilizan mediadores químicos para mejorar la precisión y sensibilidad. La mezcla de reacción se incuba a temperatura controlada para permitir la reacción enzimática completa. Luego, la absorbancia se mide con un espectrofotómetro a la longitud de onda específica del ácido úrico. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de Xantina e Hipoxantina en la muestra<sup>4</sup>.

## Ventajas del Método

El método es sensible y específico, permitiendo la detección de Xantina e Hipoxantina a niveles bajos. Es rápido y relativamente simple, sin necesidad de equipos complejos, lo que lo hace accesible para muchos laboratorios. Puede aplicarse a una variedad de muestras biológicas y alimentarias.

## Limitaciones

El método tiene algunas limitaciones. Otras sustancias en la muestra que absorben en la misma longitud de onda pueden interferir con la medición. Además, la dependencia de la enzima XOD significa que la actividad enzimática debe ser alta y constante para obtener resultados precisos.

## Aplicaciones

En el diagnóstico médico, se utiliza para monitorear enfermedades relacionadas con el metabolismo de purinas, como la gota y ciertas enfermedades renales. En el control de calidad de alimentos, se emplea para evaluar la frescura de carne y pescado, donde la acumulación de Xantina e Hipoxantina indica deterioro. También se utiliza en investigación bioquímica para estudiar el metabolismo de purinas y la función enzimática en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas.

### 3. Xantina e Hipoxantina Mediante Microfluídica y Colorimetría Digital

La combinación de microfluídica y colorimetría digital para la detección de Xantina e Hipoxantina aprovecha la miniaturización, precisión y análisis visual. Los dispositivos microfluídicos usan canales y cámaras a microescala para manipular pequeñas cantidades de fluidos, controlando con precisión las reacciones químicas y enzimáticas en volúmenes muy pequeños. La muestra con xantina e hipoxantina se introduce en el dispositivo junto con la enzima xantina oxidasa (XOD), que convierte xantina e hipoxantina en ácido úrico y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )<sup>5</sup>.

Para la detección colorimétrica, se añade un reactivo que reacciona con los productos de la reacción enzimática, como el  $H_2O_2$ , produciendo un cambio de color. Este cambio de color se captura digitalmente usando una cámara o un escáner, y la intensidad y tonalidad del color son proporcionales a la concentración de xantina e hipoxantina en la muestra. Las imágenes capturadas se analizan mediante software para cuantificar el cambio de color, correlacionando los valores RGB (Red, Green, Blue) con las concentraciones de las moléculas objetivo.

#### El método presenta varias ventajas:

- Miniaturización y eficiencia: Permite usar volúmenes muy pequeños de reactivos y muestras, reduciendo costos y tiempo de análisis.
- Precisión y control: Los dispositivos microfluídicos proporcionan un control preciso sobre las condiciones de la reacción, mejorando la reproducibilidad y exactitud.

- **Análisis rápido:** La combinación de detección colorimétrica y captura digital de imágenes permite un análisis en tiempo real.

Además, los dispositivos microfluídicos son compactos y portátiles, facilitando su uso en campo y en entornos con recursos limitados. Sin embargo, el método también tiene limitaciones, como las interferencias de color de otras sustancias presentes en la muestra y la necesidad de equipamiento digital, como una cámara o un escáner y software para el análisis de imágenes.

### **Aplicaciones**

- **Diagnóstico clínico:** Monitoreo de niveles de xantina e hipoxantina en suero para el diagnóstico y gestión de enfermedades metabólicas como la insuficiencia renal.
- **Industria alimentaria:** Evaluación de la frescura de carne y pescado, donde la acumulación de xantina e hipoxantina indica deterioro.
- **Investigación bioquímica:** Estudios sobre el metabolismo de purinas y la actividad enzimática en diversas condiciones fisiológicas y patológicas.

### **OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO**

El objetivo principal de este trabajo es estudiar nuevos métodos analíticos para la detección de xantina e hipoxantina, compuestos que son indicadores de la frescura en productos cárnicos y pesqueros. Se busca implementar técnicas espectrofotométricas y microfluídicas con colorimetría digital para lograr una cuantificación rápida y precisa de estos compuestos. Además, se pretende evaluar la eficacia de estos métodos en diferentes condiciones experimentales y optimizar variables clave para mejorar la sensibilidad, precisión y robustez de las mediciones. Para alcanzar estos objetivos, se plantea un enfoque experimental que incluye:

1. **Estudio de Contexto:** Realizar un barrido de variables significativas para entender su influencia en el resultado del procedimiento analítico.
2. **Optimización de Parámetros:** Ajustar las condiciones experimentales (pH, concentración de enzima, etc.) mediante diseños factoriales completos para determinar los niveles óptimos que maximicen la respuesta analítica.
3. **Evaluación de la Robustez:** Probar la consistencia del método bajo variaciones controladas de las condiciones experimentales para asegurar su fiabilidad.
4. **Aplicaciones Prácticas:** Validar los métodos desarrollados en escenarios reales, con muestras reales.

Este enfoque sistemático permitirá la evaluación de los métodos propuestos y su potencial aplicación en la industria alimentaria para determinar la frescura y calidad de los alimentos.

### **PARTE EXPERIMENTAL**

1. **Materiales y equipos**
  - Para la realización de este estudio se emplearon los siguientes materiales y equipos:
  - **Espectrofotómetro:** utilizado para medir la absorbancia de las soluciones.
  - **Cubetas de 3 mL:** usadas para la realización de los ensayos enzimáticos.

- Micropipetas: con puntas desechables y recipientes eppendorf para la medida de pequeños volúmenes (1-3 mL).
- Cámara digital: Utilizada para la captura de imágenes de las reacciones colorimétricas, en este caso Samsung Galaxy A12.
- Software de análisis de imágenes: ImageJ.
- Balanzas analíticas: De precisión para la preparación de soluciones y reactivos.
- Material general y volumétrico de laboratorio estandarizado: vasos, pipetas, matraces aforados, etc.
- Reflectómetro 'konica-Minolta'
- Caja de iluminación para tomar fotos iluminando en condiciones reguladas.
- Iluminantes LEDs de color blanco, azul, rojo y verde.

## 2. Reactivos y disoluciones

- Xantina con 99% de pureza.
- HP comercial: probus 30% p/p.
- Hipoxantina con 99% de pureza.
- Xantina oxidasa sigma X2252, fracciones de 25 U/mL fraccionada en eppendorf de 100 uL.
- HRP (peroxidasa de rábano) sigma aldrich. 47,61 U/mL.
- Disoluciones tampon, fosfatos disueltas en HCl 6M: pH 6, pH 8 y pH 10.
- Agua miliQ merck.
- Amplex Red (AR) 98% de pureza, disuelto en DMSO para obtener una concentración de 0,0098 mol/L.
- Disolución fosfatos, tanto  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  como  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , disueltas en HCl 6M.
- Etanol del 99% de pureza.
- Oro: en forma de  $\text{HAu(III)Cl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en HCL, 50mM, también como  $\text{HAu(III)Cl}_4$  dil en PBS para dar 15mM.
- Suero fisiológico marca Eroski, con 0,9% NaCl.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

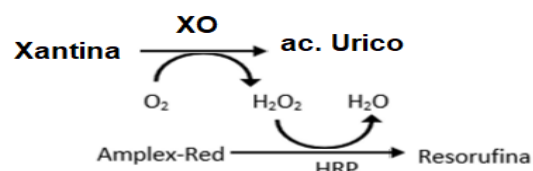
### 1. Estudio experimental de xantina por espectrofotometría

- Contexto del método

Se pretende obtener una información inicial y general acerca del comportamiento e influencia de las variables, así como de los límites del resultado del procedimiento analítico.

Para ello se ha procedido a un barrido de las variables más destacadas y evaluar el cambio de la respuesta del método.

Figura 1



En los experimentos se ha medido la absorbancia de las disoluciones y también la velocidad: cambio de la absorbancia con el tiempo.

La tabla 1 es ejemplo tipo de preparación de experimentos. Con la toma y adición de los volúmenes utilizados.

En la tabla 2, se dan las concentraciones resultantes en la cubeta de lectura espectrofotométrica.

Los diseños y cálculos siempre se efectúan sobre hoja Excel. La adición de reactivos se atiende al orden dado: desde 1-a 5.

TABLA 1

EXP	1 pH 8	2 HRP	3 AR	4 XO		5 X	tot
disol	ul	ul	ul	ul		ul	ul
BLANCO	600	20,0	20,0	20,0		0	660
BLANCO	600	20,0	20,0	20,0		0	660
1	570	20,0	20,0	20,0		30	660
2	530	20,0	20,0	20,0		70	660
<b>cambio pH</b>							
EXP	pH 6	2 HRP	3 AR	4 XO		5 X	tot
3	570	20,0	20,0	20,0		30	660
<b>cambio [XO]</b>							
EXP	pH 6	2 HRP	3 AR	4 XO		5 X	tot
4	550	20,0	20,0	40,0		30	660
<b>cambio modo lectura</b>		inyectar todas en la cubeta y medir a 1:30 min					
EXP	pH 8	2 HRP	3 AR	4 XO		5 X	tot
5	570	20,0	20,0	20,0		30	660

Es importante señalar que después de la adición de los 4 reactivos iniciales, se mide absorbancia. Que conduce a una señal de fondo: Af.

Cuando se estabiliza, aproximadamente 30 s, se inyecta la disolución 5. Con el analito. Y se produce el cambio de absorbancia. En la Figura 2 aparece el perfil de la absorbancia y en la Figura 3, la velocidad.

#### 1-Estudio inicial: influencia de pH, XO sobre el analito X

Se efectúa un barrido de las variables indicadas: pH, [XO] y [X]. De acuerdo a los valores y concentraciones de las tablas 1 y 2.

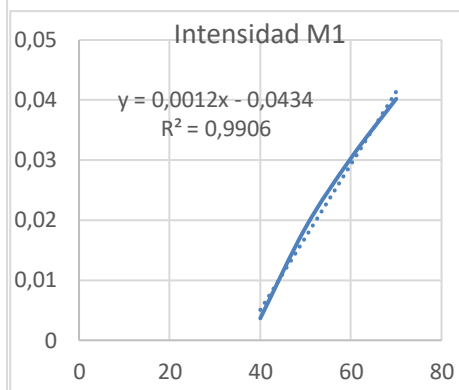
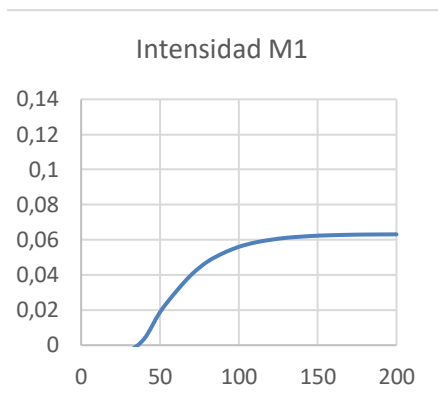
Valores de concentración en la cubeta espectrofotométrica.

Tabla 2

Exp	HRP	AR	XO	[X]= [HP]
	U/ml	mol/l	U/ml	mol/l
bl	0,128	$3,04 \cdot 10^{-5}$	0,130	0
bl	0,128	$3,04 \cdot 10^{-5}$	0,130	0
1	0,128	$3,04 \cdot 10^{-5}$	0,130	$2,18 \cdot 10^{-6}$
2	0,128	$3,04 \cdot 10^{-5}$	0,130	$5,09 \cdot 10^{-6}$
<b>pH 6</b>				
3	0,128	$3,04 \cdot 10^{-5}$	0,130	$2,18 \cdot 10^{-6}$
<b>pH 6</b>				
4	0,128	$3,04 \cdot 10^{-5}$	0,259	$2,18 \cdot 10^{-6}$
<b>pH 8 inyección y medir Abs a 1,30 min</b>				
5	0,128	$3,04 \cdot 10^{-5}$	0,130	$2,18 \cdot 10^{-5}$

Los perfiles tipo de las señales obtenidas, con sus características se recogen en las figuras 2 y 3.

Abs a 572 nm, durante 200 segundos. Crecimiento de la señal a partir de los 30 s tras inyectar el reactivo 5 a la cubeta. Figura 3, pendiente (velocidad=  $d(\text{Abs})/d(t)$ ) correspondiente al tramo de incremento lineal de la Abs.



Como más característico de los resultados se observa que se produce cambio en la absorbancia y la pendiente en los rangos estudiados. Se observa que a pH 6 se obtiene menor absorbancia, pero de modo muy rápido, con gran pendiente. Por otro lado, a pH 10 se produce mayor absorbancia, pero requiere mayor tiempo de estabilización.

## 2-Estudio de la fuerza iónica: efecto NaCl y Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

La actividad enzimática puede verse modificada por la fuerza iónica. Y dado que los ensayos de tipo 'bio' suelen producirse con modificaciones en la fuerza iónica-efecto salino, se opta por su estudio.

Así se evalúa la influencia de fuerza iónica preparada con NaCl y como fosfato sódico. El NaCl es frecuente en la preparación de alimentos y los fosfatos en la preparación de los tampones de pH.

Efecto NaCl: se lleva a cabo según las condiciones resumidas en el siguiente 'plan'

Tabla 3

Exp	HRP U/ml	AR mol/l	XO U/ml	[X]= [HP] mol/l	NaCl Mol/l
bl	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	0	<b>0</b>
bl	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	0	<b>0</b>
Sin fuerza iónica					
1	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	$4,73 \cdot 10^{-6}$	<b>0</b>
<b>pH 8</b> Fuerza iónica alta					
3	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	$4,73 \cdot 10^{-6}$	<b>0,525</b>
<b>pH 8</b> Fuerza iónica media					
4	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	$4,73 \cdot 10^{-6}$	<b>0,233</b>

Se estudia la influencia de [NaCl] a valores de: alta, media y sin NaCl. (Manteniendo constantes el resto de condiciones).

Lo más característico de los resultados es que sin adición de NaCl la velocidad es 0,0028 Abs/s, pero con adición de NaCl a 0,23 M la velocidad se reduce a 0,0021. Y para concentración alta 0,52 M la velocidad se reduce aún más: a 0,0018 Abs/s. Es decir, el efecto salino del NaCl, en el rango estudiado, reduce la velocidad de reacción. Además, de la velocidad, la absorbancia disminuye conforme aumenta el NaCl.

El estudio de la influencia de fosfatos es de gran interés, puesto que una gran cantidad de disoluciones tampón a pH próximos a neutralidad suelen prepararse con sales fosfatadas.

Condiciones experimentales.

tabla 4

Exp	HRP	AR	XO	[X]=[HP]	fosfatos
	U/ml	mol/l	U/ml	mol/l	Mol/lit
bl	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	0	<b>0,097</b>
bl	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	0	<b>0,097</b>
Fuerza iónica referencia					
1	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	$4,73 \cdot 10^{-6}$	<b>0,086</b>
<b>pH 8</b> Fuerza iónica baja					
2	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	$4,73 \cdot 10^{-6}$	<b>0,132</b>
<b>pH 8</b> fuerza iónica alta					
3	0,119	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0,121	$4,73 \cdot 10^{-6}$	<b>0,202</b>

Se utilizó concentración  $[\text{PO}_4^{3-}]$ : alta, media y otra sin concentración adicional de fosfatos. (Se mantuvieron fijas el resto de condiciones)

Lo más característico de los resultados es que se observa comportamiento similar al observado con NaCl. Es decir, conforme aumenta la concentración de fosfatos disminuye la velocidad. Así: la velocidad de referencia, sin adición extra, es 0,0016 Abs/s. Se reduce a 0,001 Abs/s con adición media y todavía es menor 0,0008 Abs/s con alta adición. Disminuir la velocidad supone más tiempo para alcanzar la máxima señal y su estabilización.

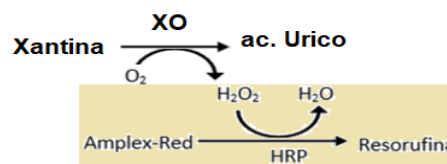
### 3-Estudio de la reacción indicadora: influencia del pH.

El procedimiento para la determinación de Xantina pasa por dos reacciones enzimáticas consecutivas que se describen en la Figura 4. En la primera se oxida X, para producir ácido úrico y peróxido (HP). Y en la segunda se oxida el colorante-indicador AR (Amplex Red) en una reacción del HP catalizada por la enzima HRP, para producir Resorufina. Ese último compuesto exhibe una coloración roja, que puede ser medida por espectrofotometría o colorimetría en el procedimiento de detección.

Es de interés evaluar cómo se afecta la oxidación del indicador Ar, en las condiciones de acidez del proceso global.

Se diseña el experimento de oxidación de AR en el que se modifica el pH a tres valores: 6, 8 y 10. Manteniendo constantes el resto de las condiciones de la reacción: [HP], [HRP] y [AR].

Figura 4



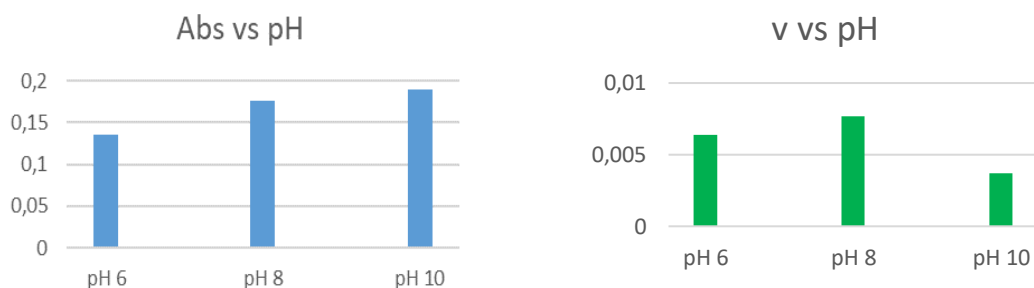
En la tabla se dan las condiciones del 'plan':

Tabla 5

Exp	HRP	AR	HP
	U/ml	mol/l	mol/l
bl	0,12	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0
bl	0,12	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0
<b>pH 6</b>			
1	0,12	$2,83 \cdot 10^{-5}$	$3,45 \cdot 10^{-6}$
<b>pH 8</b>			
2	0,12	$2,83 \cdot 10^{-5}$	$3,45 \cdot 10^{-6}$
<b>pH 10</b>			
3	0,12	$2,83 \cdot 10^{-5}$	$3,45 \cdot 10^{-6}$

Los resultados se evalúan sobre cambios producidos en la absorbancia máxima, y también en la influencia sobre la velocidad de la reacción. En la absorbancia se muestra que aumenta de pH 6 a 8 pero a partir de pH 8 tiende a estabilizarse. Y en términos de la velocidad, se aumenta de pH 6 a 8 y luego disminuye. El procedimiento indicador se ve influido según el pH del medio.

Figura 5: resultados sobre la reacción indicadora



- Optimización de variables

A partir del estudio de contexto inicial, se lleva a cabo un estudio más detallado de la influencia y optimización de los factores sobre las respuestas del método analítico de determinación de X.

Se aplica estrategia de diseños de experimentos factoriales de tipo completo. En este caso se evalúan 2 variables (más significativas: pH, [XO] conc. Enzima U/ml), modificadas a 3 niveles. Así, se prepara un plan de  $3^2 = 9$  experimentos. Modificando cada variable a tres niveles: bajo (-1), medio (0), alto (+1). En las tablas se dan las características de las variables y la matriz de experimentos.

Tabla 6: Variables y sus niveles

Condiciones	X1	X2
<b>Variabes</b>	<b>P pH</b>	<b>XO [XO], U /ml</b>
<b>nivel +1</b>	<b>10</b>	<b>0,25</b>
<b>nivel 0</b>	<b>8</b>	<b>0,18</b>
<b>nivel -1</b>	<b>6</b>	<b>0,12</b>

La descripción de la matriz de experimentos se presenta en la tabla 7:

Tabla 7: matriz de 9 experimentos con valores codificados y reales

Exptos	p-pH	XO	Exptos	pH	[XO], u /ml
1	-1	-1	1	6	0,12
2	-1	0	2	6	0,18
3	-1	1	3	6	0,25
4	0	-1	4	8	0,12
5	0	0	5	8	0,18
6	0	1	6	8	0,25
7	1	-1	7	10	0,12
8	1	0	8	10	0,18
9	1	1	9	10	0,25

Se fija una concentración constante de Xantina de  $4,73 \cdot 10^{-6}$  mol/ L. Así mismo son constantes las concentraciones de HRP a 0,119 U/mL, colorante AR a  $4,24 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Los cálculos previos se diseñan sobre hoja de Excel.

Tabla 8

Variables significativas		términos deducidos			experimental
pH	XO	pH * XO	pH <sup>2</sup>	XO <sup>2</sup>	Abs max_neta
6	0,12	0,72	36	0,0144	0,1471
6	0,18	1,08	36	0,0324	0,1882
6	0,25	1,5	36	0,0625	0,1346
8	0,12	0,96	64	0,0144	0,2061
8	0,18	1,44	64	0,0324	0,1946
8	0,25	2	64	0,0625	0,1824
10	0,12	1,2	100	0,0144	0,1820
10	0,18	1,8	100	0,0324	0,2055
10	0,25	2,5	100	0,0625	0,1915

Matriz con la inclusión de los resultados experimentales de Abs (neta a 572 nm) y términos de interacción de las variables y términos cuadrático.

Los diseños de experimentos aplicados permiten deducir una ecuación de ajuste polinómica para predecir la respuesta. Los resultados de 9 experimentos permiten aplicar un modelo polinómico de grado 2 y predecir 5+1 coeficientes entre variables y la absorbancia.

Los coeficientes del ajuste se determinan minimizando las diferencias (suma de las diferencias al cuadrado) entre los resultados experimentales y los valores predichos por el modelo. Este proceso se realiza en dos pasos: primero, una aproximación inicial mediante regresión múltiple para seleccionar posibles coeficientes, y luego un ajuste final usando mínimos cuadrados con la opción 'Solver' para mayor precisión.

La tabla 9 resalta los mejores coeficientes y los errores de predicción, considerando estos coeficientes como óptimos y expresando la respuesta con mínimo error. Los resultados muestran coherencia y convergen hacia la respuesta óptima desde diferentes cálculos.

Tabla 9

cálculos		x solver					
pH	XO	pH * XO	pH <sup>2</sup>	XO <sup>2</sup>	b0		Suma dif, Mínimo
0,016077	0,000028	0,000217	0,000674	0,000005	0,000018	dif 0	0,011241
0,013564	0,000000	0,044789	0,000000	0,079059	0,000000	dif min	0,012150
0,001692	0,000000	0,044789	0,001167	0,078984	0,000000	dif 0	0,021783
0,012838	0,000000	0,044789	0,000043	0,078986	0,000004	dif min	0,012442

#### modelo solver

$$\text{Abs} = 1,8 \cdot 10^{-5} + 5 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{XO}]^2 + 6,7 \cdot 10^{-4} \cdot \text{pH}^2 + 2,2 \cdot 10^{-4} \cdot \text{pH} \cdot \text{XO} + 2,8 \cdot 10^{-5} \cdot [\text{XO}] + 0,017 \cdot \text{pH}$$

Los resultados son siempre obtenidos mediante la aplicación Solver (mínimos cuadrados). La correlación, entre los valores de Abs experimental (de la tabla de experimentos) con los predichos por el modelo (la misma tabla de experimentos), presenta un coeficiente  $r^2 = 0,791$

Las principales características demuestran como variable más influyente el término pH. Con baja influencia de [XO], en una proporción que se aproxima a 1/600. Así mismo son poco influyentes los términos de interacción y cuadráticos.

Del estudio se deducen condiciones óptimas de pH y [XO] para una respuesta de máxima absorbancia. Sin embargo, en valores de pH 8 y/o 10, así como [XO] valores 0,12/0,18 U/ml, conducen a valores de señal grandes.

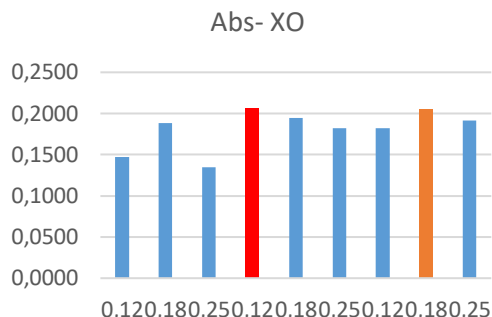
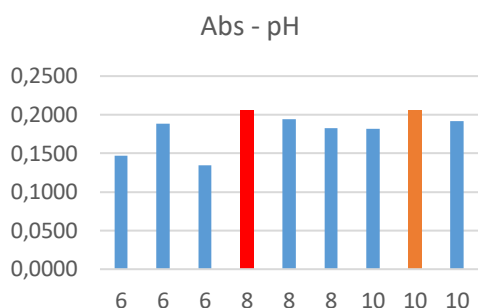
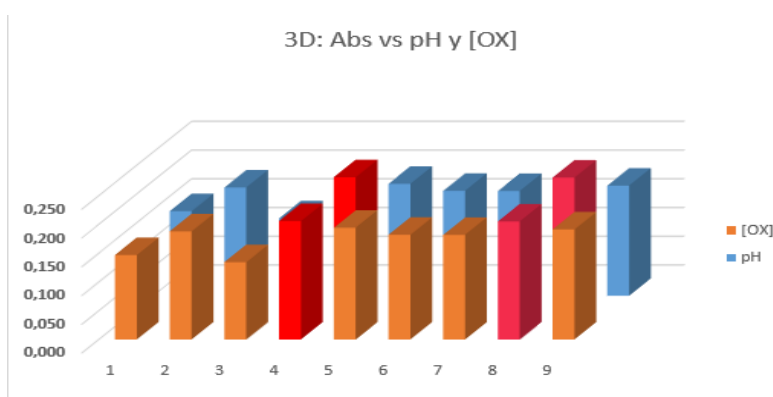


Figura 6: Diagrama Abs vs pH 6-8-10      Figura 7: Diagrama Abs vs [XO] 0,12-0,18-0,22 U/mL  
 La representación 3D del diagrama de barras visualiza y re-confirma el argumento anterior: PHs óptimos para el rango 8-10. Y concentración [OX] en rango 0,12-0,18 U/ml.

Figura 8



Se debe de aclarar que la optimización es al proceso global, es decir, al resultado aparente del proceso que consta de dos reacciones: la oxidación de la Xantina y la oxidación del colorante AR. Por tanto, si bien se producen dos reacciones, la sensibilidad en la medida del color es muy influyente. Así el pH se ve favorecido a valores altos. Mientras que hay baja influencia ‘aparente’ de la [OX].

El estudio de optimización del ‘sistema químico’ ha sido modelizado mediante un polinomio de orden dos, con un coeficiente de correlación  $r^2 = 0,79$  entre valores experimentales y teóricos.

Se demuestra una influencia principal por parte del pH que se optimiza a 8. Y también [XO] que puede ser optimizada a valores 0,12-0,18 U/mL. En estudios posteriores se trabajará entre estos valores según convenga a la ‘eficiencia’ de los procedimientos.

Por otra parte, también se han realizado y calculado los estudios de optimización sobre la velocidad de la reacción.

En este caso, los resultados muestran claramente que la [XO] es la variable más influyente. Mientras que no lo es el pH, ni sus términos de interacción (con el pH). El modelo de más aproximación, con mínimos cuadrados, Solver, se muestra confluyente cuando los valores tienden a la expresión:

$$V = 1,33 \cdot 10^{-3} + 1,28 \cdot 10^{-2} \cdot [XO] + 1,9 \cdot 10^{-3} \cdot [XO]^2$$

Estos resultados son coherentes con un mecanismo donde la velocidad de la reacción está muy influida por la enzima.

- Prestaciones del método

Se evalúan las prestaciones analíticas del método de determinación espectrofotométrica de X aplicado en sus condiciones óptimas. En el estudio se han diferenciado dos metodologías según el modo de adición de analito, X. Así se distingue entre método con:

- i- Adición de volúmenes cambiantes de una disol referente de X.
- ii- Adición de un volumen constante de diferentes disoluciones-concentraciones de analito.

Se ha optado por remarcar estas diferencias metodológicas en tanto en cuanto influyen en la rapidez de su desarrollo. Se presentan solo los resultados mediante el procedimiento de volúmenes cambiantes puesto que la otra posibilidad con volumen constante no mejora los resultados.

i- El método de adición de volúmenes diferentes se justifica con los datos de la tabla 10.

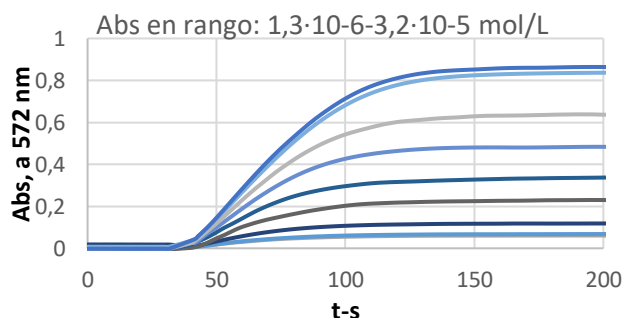
Inicialmente se inyecta a la cubeta disolución tampon. Seguido de los reactivos señalados (2-HRP;3-AR; 4-XO). Siendo el analito inyectado en último término. Se llega a volumen final en el ensayo: 745 ul. Las concentraciones de HRP, indicador AR y XO, son constantes.

El rango de [X], se modifica con adición de volúmenes entre 10-20-50-60 ul de disolución de referencia.

Tabla 10

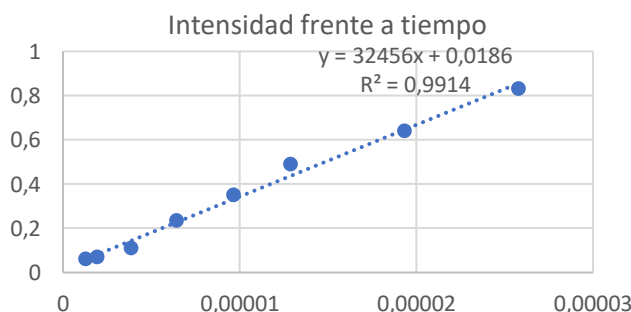
Exp	2 HRP U/ml	3 AR mol/l	4 XO U/ml	[X]= [HP] mol/l
MQ	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	0
bl	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	0
1	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	$1,29 \cdot 10^{-6}$
2	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	$1,93 \cdot 10^{-6}$
3	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	$3,87 \cdot 10^{-6}$
4	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	$6,44 \cdot 10^{-6}$
5	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	$9,66 \cdot 10^{-6}$
6	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	$1,29 \cdot 10^{-5}$
7	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	$1,93 \cdot 10^{-5}$
8	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	$2,58 \cdot 10^{-5}$
9	0,114	$3,37 \cdot 10^{-5}$	<b>0,171</b>	$3,22 \cdot 10^{-5}$

Los perfiles de las señales de absorbanza (a 572 nm) de los diferentes experimentos preparados según los valores de la tabla pppIII, en función del tiempo, se ofrecen en la figura 9.



Después de la adición de analito, a 35 s, la absorbanza aumenta, hasta estabilizarse.

Figura 10



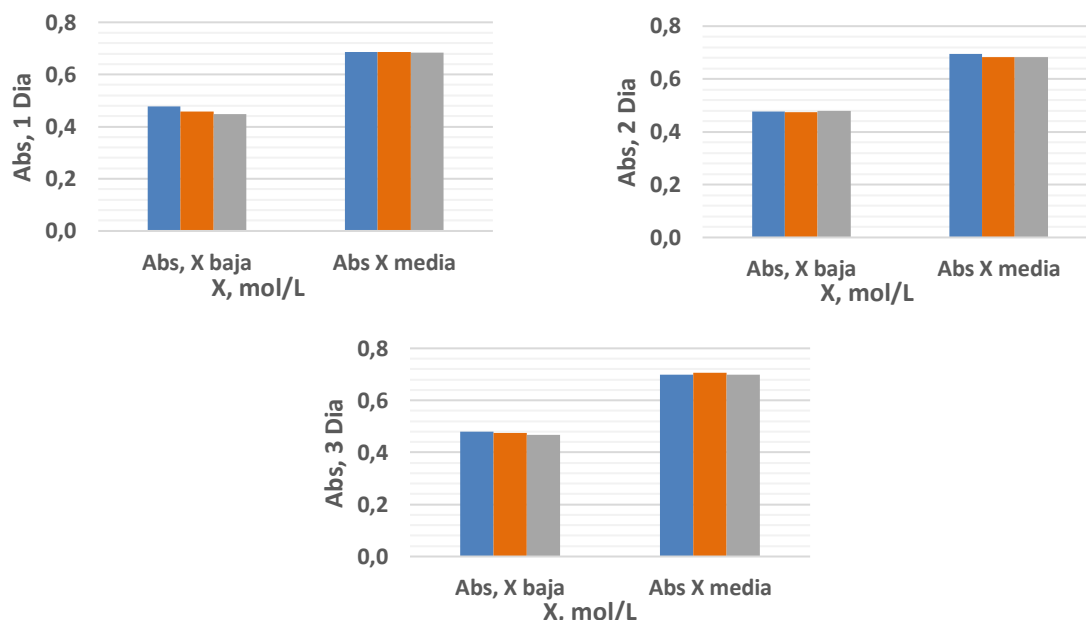
La representación lineal Abs (neta) vs [X], mol/L, muestra una alta correlación lineal, eliminando el punto alto  $3,22 \cdot 10^{-5}$  mol/L.

El estudio estadístico de la regresión lineal, para el rango  $1,29 \cdot 10^{-6}$ - $2,58 \cdot 10^{-5}$  mol/L de X, ofrece unos resultados óptimos. Se destacan los parámetros de la regresión, el análisis de la varianza y la distribución de residuales.

Así el coeficiente de correlación lineal es 0,9957. La pendiente y sensibilidad de la regresión presenta un alto valor:  $32455,79$  ur Abs/mol·L<sup>-1</sup>. Siendo la ordenada en el origen:  $0,0186$  ur Abs. La distribución de los residuales es de tipo homocedástico y muestra un error tipo  $0,0285$  ur Abs.

La reproducibilidad y precisión de este método se obtiene evaluando la respuesta a dos valores de concentración de X: bajo-medio:  $1,29 \cdot 10^{-6}$ - $1,93 \cdot 10^{-5}$ . Efectuando la medida de cada disolución con tres réplicas distintas. Y realizadas en tres días distintos. Resultados en la figura 11.

Figura 11: resultados de la precisión en 3 días diferentes.



Mediante ANOVA se calculan los parámetros de repetibilidad, que caracterizan la reproducibilidad a corto plazo, y la precisión, que caracteriza la reproducibilidad a largo plazo del método. La tabla con los cálculos en Excel se encuentra en los anexos en la tabla 20.

La precisión del método se deduce como precisión intermedia, según los cálculos de la tabla. Los resultados muestran valores de repetibilidad de medida dentro de grupos del 0,63 %dsr y una precisión intermedia del método del 1,69 %dsr. La precisión intermedia del método es baja y coincide con lo obtenido a bajas concentraciones, alrededor del 2 %dsr.

Sensibilidad = $32455,79$ L/mol	LD = $3 \times 4,36 \cdot 10^{-3} / 32455,79 =$ $4,03 \cdot 10^{-7}$ mol/L	Repetibilidad medida: 2,04 y 0,63 dsr%, para baja-media conc. de X respectivamente.
Rango lineal: $1,3 \cdot 10^{-6}$ - $2,6 \cdot 10^{-5}$ mol/L	LQ = $10 \times 4,36 \cdot 10^{-3} / 32455,79 =$ $1,34 \cdot 10^{-6}$ mol/L	Precisión del método: 1,46 y 1,69 dsr%, de igual modo para alta, media y baja concentración.

LD: 3x repetibilidad medida/ sensibilidad calibración. LQ: 10 x repetibilidad medida/ sensibilidad calibración

- Robustez

Se evalúa la robustez del nuevo método analítico. Esto es, el grado de mantenimiento de la respuesta analítica cuando se alteran las variables del procedimiento. Se aplica de modo que las variables son modificadas en un rango de baja magnitud respecto a sus niveles óptimos.

Este estudio es recomendado en el sector de control alimentario. Y se desarrolla mediante diseños de experimentos de tipo barrido (de factores). Entre ellos el más recomendado es el denominado de 'Youden-Steiner'.

Es un diseño cerrado de 7 factores, a dos niveles: +, alto, y -, nivel inferior. Que necesitaría  $2^7 = 128$  experimentos totales. Pero del que solo se seleccionan 8 experimentos. Es, por tanto, un diseño fraccionado con resolución que permite calcular el efecto de las variables principales, pero no sus interacciones.

El diseño teórico se adapta al presente experimento para evaluar solo 4 factores reales. Las variables consideradas son:

- pH: como valor de disolución tampon. Volumen de tampon: por su influencia en el poder de amortiguamiento.
- [XO] u/ml, conc. de enzima Xantina oxidasa. Y su volumen también se considera como factor experimental.

Y así, el resto hasta 7, son considerados como 'factores falsos o dummies'. De modo que con este 'molde' se facilita aplicar el modelo teórico para aportar consistencia en los argumentos y gran eficiencia.

En la siguiente tabla se ofrecen: Tabla 11: condiciones de las variables en diseño de barrido

-las variables: 4 reales, 3 falsas;  
-sus niveles: + alto (óptimo de máximo); - inferior: nivel reducido en el 5% de su valor máximo (como valor entero y aprox).

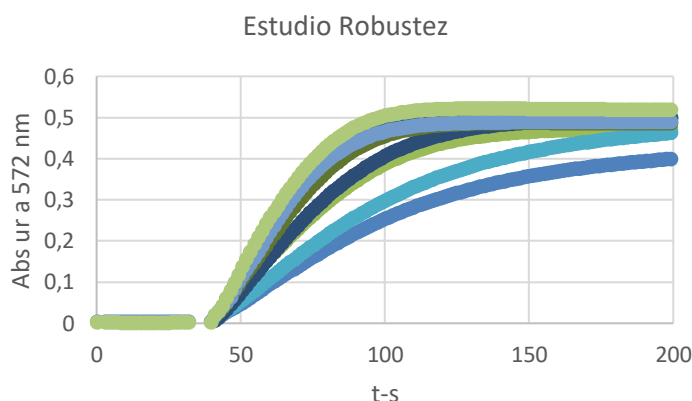
factor	Val Optimo	Variacion-5%	
A-pH tampon	8,0	7,6	7,6
B- volumen tampon, ul	670	636,5	640,0
C- [XO]	0,17	0,16	0,16
D- volumen XO	30	28,5	28,0
E- orden	2	1	'Dummy'
F- Iluminación	2	1	'Dummy'
G- horario	2	1	'Dummy'

Con las variables elegidas se diseña la matriz de experimentos en variables codificadas y reales.

	A-pH tampon	B- vol tampon	C- [XO]	D-vol XO	E- Orden	F- Iluminación	G- Horario
experimentos	pH	ul	U/ml	ul	r	r	r
1	8	670	0,17	25	2	2	2
2	8	670	0,16	25	1	1	1
3	8	640	0,17	23	2	1	1
4	8	640	0,16	23	1	2	2
5	7,6	670	0,17	23	1	2	1
6	7,6	670	0,16	23	2	1	2
7	7,6	640	0,17	25	1	1	2
8	7,6	640	0,16	25	2	2	1

Los resultados experimentales de la Figura 12 ofrecen los perfiles de absorbancia media a 572 nm de las disoluciones preparadas según el esquema de la tabla anterior.

Figura 12: Perfil de Absorbancia de las disoluciones del diseño Youden Steiner.  
Perfiles de absorbancia para los experimentos



De las señales anteriores se obtienen los valores de Abs neta, según criterios aplicados anteriormente, para los diversos experimentos.

Con los valores de Abs, a 572 nm se puede deducir la influencia o efecto de cada variable y posteriormente la influencia de todas como proceso global.

El cálculo del 'efecto' en cada variable se obtiene de las diferencias de las señales entre niveles óptimos y menores.

Y la desviación estándar del proceso es obtenida del sumatorio de las diferencias cuadráticas en cada variable. En la tabla 13 se ofrecen los cálculos.

Se compara la desviación estándar del estudio 0,02786 u Abs, frente a la desviación estándar del procedimiento 0,02850 u Abs. Este ha sido calculado en el experimento de prestaciones como reproducibilidad del método. Multiplicado por el factor de cobertura, en este caso al nivel de confianza del 99%.

De la comparación se demostraría que el método no es afectado por los pequeños cambios introducidos en las variables. Y, por tanto, se trata de un método robusto con un factor de cobertura y confianza del 99%.

Tabla 13: Resultados

efecto Diferencias		efecto Diferencias	Dif^2
$\Sigma A/4 - \Sigma a/4$		-0,02278	0,00052
$\Sigma B/4 - \Sigma b/4$		-0,02508	0,00063
$\Sigma C/4 - \Sigma c/4$		-0,02932	0,00086
$\Sigma D/4 - \Sigma d/4$		-0,02133	0,00045
$\Sigma E/4 - \Sigma e/4$		-0,00398	0,00002
$\Sigma F/4 - \Sigma f/4$		-0,00468	0,00002
$\Sigma G/4 - \Sigma g/4$		-0,01473	0,00022
S intralab: 0,0095			S <sub>Dif</sub> <sup>2</sup>
S intralab= Repetibilidad*F cobertura 3,0			0,028

Los resultados de Youden-Steiner pueden ser dirigidos hacia el estudio de las variables. Y poner de manifiesto si alguna de las variables individualmente puede manifestar influencia sobre la robustez, en vez de considerar el método en su conjunto.

En este criterio se comparan las diferencias asociadas a cada variable con las del criterio general. El resultado se ofrece en la tabla 14.

Tabla 14: Resultados

efecto Diferencias		efecto Diferencias	$S_{Dif^2}$	
$\Sigma A/4 - \Sigma a/4$	$S_{D1} = \sqrt{2 * \Sigma (D_1^2 / 7)}$	-0,02278	0,0279	< (0,0279)
$\Sigma B/4 - \Sigma b/4$		-0,02508		< (0,0279)
$\Sigma C/4 - \Sigma c/4$		-0,02932		> (0,0279) Posible efecto
$\Sigma D/4 - \Sigma d/4$		-0,02133		< (0,0279)
$\Sigma E/4 - \Sigma e/4$		-0,00398		< (0,0279)
$\Sigma F/4 - \Sigma f/4$		-0,00468		< (0,0279)
$\Sigma G/4 - \Sigma g/4$		-0,01473		< (0,0279)

La comparación evidencia que la variable [XO] se manifiesta no robusta, en las condiciones experimentadas. Mientras que el resto sí que serían robustas.

El resultado es congruente con el experimento, ya que modificar la [XO] y su volumen muestra que ambas variables están correlacionadas. El estudio demuestra que el método es robusto en su conjunto y que las variables también muestran comportamiento robusto, aunque no se puede mantener constante la [XO] y su volumen según el diseño.

Paralelamente, se evaluó la robustez en la pendiente de la reacción, mostrando mejoras en la robustez. El método se vuelve robusto con menores factores de cobertura (<95%, 2).

- Caracterización de la cinética

Se realizó un estudio de la cinética de oxidación de la Xantina, catalizada por la enzima XO, en las condiciones óptimas deducidas anteriormente.

Se aplica el modelo de Michaelis-Menten<sup>6</sup> para caracterizar las reacciones enzimáticas. Según este modelo la velocidad desaparición-oxidación de un sustrato, tal que Xantina, a través de la enzima XO, se puede explicar a través de un mecanismo en el que se formaría el compuesto intermedio X:XO, que pasa a ser oxidado por el O<sub>2</sub>. Y producir ácido úrico y agua oxigenada, peróxido de hidrógeno, con regeneración de la enzima XO.

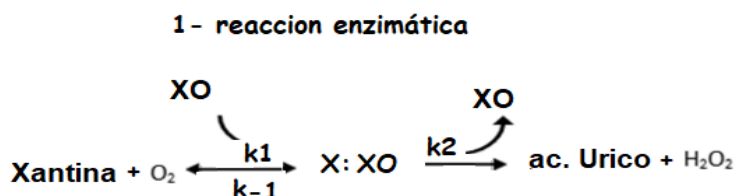


Figura 13: reacción enzimática de oxidación de la xantina, (3,7-Dihydropurine-2,6-dione) catalizada por la xantina oxidasa, XO, para producir ácido úrico (2,6,8-Trihidroxipurina) y agua oxigenada, HP. El progreso de la reacción (oxidación del sustrato) anterior se sigue mediante una reacción acoplada de aparición de color. Que es consecuencia de la reacción entre el HP producido y la enzima HRP, que

oxida rápidamente al colorante Amplex Red y lo transforma a Resorufina. Así la absorción a 572 nm (aumenta) proporciona el seguimiento de la reacción enzimática.

## 2- reacción indicadora ciclo peroxidasas (no reversible)

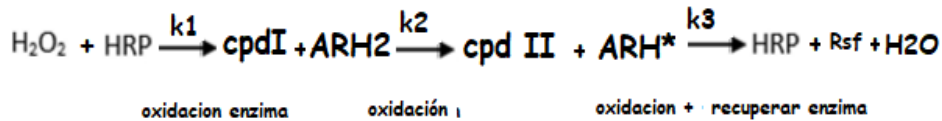


Figura 14: proceso a tres etapas:

oxidación de HRP para producir el intermedio-radical cpd I; (radical de la Enzima Peroxidasa de Rábano-Horseradish Peroxidasa).

oxidación del radical al sustrato o colorante Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina) AR, también oxidación del radical cpd II al compuesto-sustrato ARH\*

Y finalmente producción de Rsf resorufina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-ona), producto colorante rojo y fluorescente con máx de absorción a 571 nm, de absortividad molar 58000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

El modelo de Michaelis-Menten puede ser aplicado y modelar el aparente proceso global anterior. Es decir, la oxidación del sustrato mediante la aparición de la absorción de la resorufina.

El modelo se describe mediante la ecuación siguiente (1), que explica la oxidación de la Xantina y muestra la dependencia de la velocidad inicial, V<sub>0</sub> (de oxidación), con su concentración.

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Figura 15: Siendo:

V<sub>0</sub>= velocidad inicial de la reacción,

V<sub>max</sub>=velocidad máxima,

[S] concentración de Sustrato, X,

K<sub>m</sub>: constante de Michaelis –Menten: K<sub>m</sub>= (k<sub>-1</sub>+ k<sub>2</sub>)/k<sub>1</sub>

(k<sub>m</sub> = concentración de sustrato a la que velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima. Y que expresa afinidad entre la enzima y el sustrato. Así, a menor K<sub>m</sub>, mayor afinidad enzima sustrato).

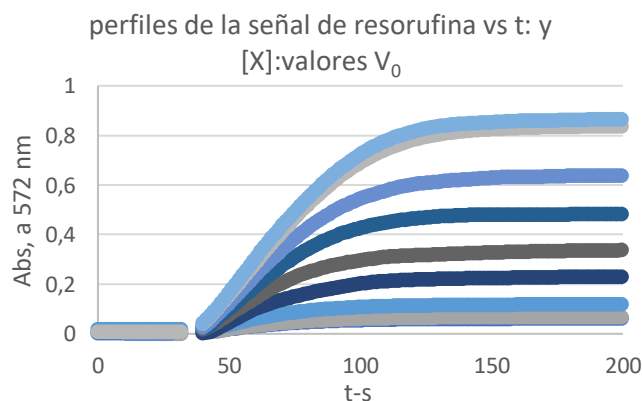
El estudio cinético se realiza en un experimento en el que se modifica sistemáticamente la concentración de sustrato, según la tabla 15. Y se mide la velocidad (inicial) de la reacción. Como la pendiente de la absorbancia, tras la adición del sustrato: rango 40-60 s. A una disolución de reacción preparada en sus condiciones óptimas. Ver figura 15.

La tabla recoge también los valores de concentración de Xantina y velocidad enzimática

Tabla 15

Conc, mol/L	Pendiente
[S]	V <sub>0</sub> exp=d(A)/d(t)
1,29·10 <sup>-6</sup>	0,0013
1,93·10 <sup>-6</sup>	0,0015
3,87·10 <sup>-6</sup>	0,0026
6,44·10 <sup>-6</sup>	0,0055
9,66·10 <sup>-6</sup>	0,0064
1,29·10 <sup>-5</sup>	0,0086
1,93·10 <sup>-5</sup>	0,0105
2,58·10 <sup>-5</sup>	0,0122
3,22·10 <sup>-5</sup>	0,0131

Figura 16



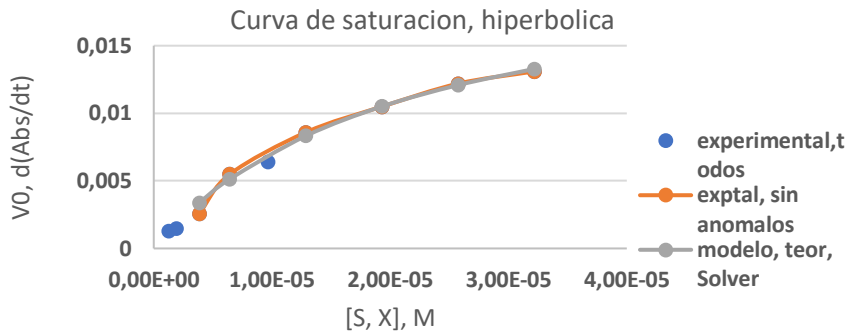


Figura 17

En la figura 16, se representa la velocidad inicial de reacción,  $V_0$ , como función de  $[S]$ .

La representación tiene perfil típico de curva hiperbólica rectangular del comportamiento de los procesos enzimáticos. En la figura se han incluido tres series de valores: todos los valores experimentales (azul), los valores corregidos sin anomalos (naranja) y los valores teóricos ( $V_0$  predichos) que le corresponderían según la ecuación de Michaelis (gris).

Los parámetros aparentes  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$ , del modelo Michaelis, se calculan mediante ajuste por mínimos cuadrados, entre los valores experimentales y los predichos del modelo. En este caso se realizan con la aplicación de Excel: Solver. Los mejores ajustes se consiguen con:  $V_{m\acute{a}x}=0,0201$  Abs/s y  $K_m$  (aparente)  $1,72 \cdot 10^{-5}$  M.

El cálculo también puede realizarse transformando la ecuación a modo lineal. Así se ha usado el modelo Eadie- Hofstee<sup>7</sup> que ajusta a la ecuación:

$$V = V_{\max} - \frac{K_m V}{[S]} \quad (2)$$

Figura 18.

Con los mismos significados de las variables que antes.

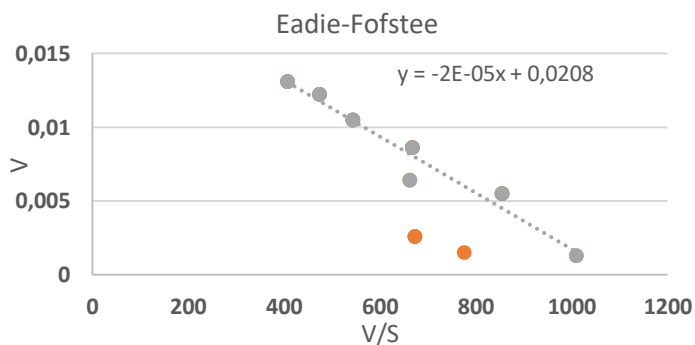
La aplicación de los resultados experimentales puede verse en la Figura 18.

De la que se deducen valores de:

$$K_m = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$V_{m\acute{a}x} = 0,0208 \text{ uAbs/s}$$

Figura 19



La representación de:  $V$  vs  $V/[S]$  es una línea recta, de pendiente:  $-K_m$  y ordenada origen:  $V_{m\acute{a}x}$ .

Los resultados entre los dos métodos de cálculos presentan una alta coincidencia con valores de  $K_m$ :  $2 \cdot 10^{-5} \rightarrow 1,72 \cdot 10^{-5}$  M, y  $V_{m\acute{a}x}$ :  $0,0209 \rightarrow 0,0201$ . En ambos métodos los resultados son ligeramente superiores mediante Eadie-Fofstee.

El uso de las reacciones acopladas es habitual en la caracterización de procesos enzimáticos. De modo que el comportamiento global del sistema lleva a la deducción de características aparentes del proceso global de reacción. Son habituales en el caso de usar 'oxidasas', como el procedimiento que se aplica

en este estudio. En el que inicialmente se oxida a través de 'XO'. Y es seguido mediante 'peroxidasa' HP/HRP que reaccionan frente a compuestos cromogénicos o sustratos. Como el Amplex Red. En la bibliografía se describen estos procesos con sustratos como la Antipirina/Resorcinol<sup>8</sup>. Se aporta como información de comparación la cinética de oxidación de AR por la enzima laccase, con  $K_m$  76,88  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $V_{\text{max}}$  15,63  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ .<sup>9</sup>

- Aplicaciones en suero fisiológico

Se aplicó un nuevo procedimiento de determinación espectrofotométrica de X a una muestra real de suero fisiológico marca Eroski, con 0,9% NaCl. La muestra, sin Xantina, fue aditivada con patrón de referencia.

Se prepararon disoluciones de suero aditivadas con Xantina a diferentes concentraciones:

- 1- Disolución aditivada a un contenido de  $[X]=4,80\cdot 10^{-4}$  mol/L, y de  $[\text{NaCl}] = 0,160$  ml/L.
- 2- Disolución de  $[X] = 4,80\cdot 10^{-5}$  mol/L, y mismo contenido de  $[\text{NaCl}] = 0,160$  ml/L.

A partir de las disoluciones y patrones de reactivos de referencia, se preparó un experimento con condiciones óptimas de reacción para la determinación de Xantina a tres niveles de concentración: alto, medio y bajo. Junto con las disoluciones de las muestras, se prepararon tres patrones de xantina con los mismos valores de concentración que las muestras aditivadas.

Tabla 16  
Concentraciones en las disoluciones del experimento de aplicación del método

Exp	2 HRP U/ml	3 AR mol/l	4 XO U/ml	[X]= [HP] mol/L		EFECTO SAL mol/lit
				ADDED	PAT	
bl	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171	0	0	0
bl	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171	0	0	0
	<b>MTRA BAJA</b>					
1	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171	$6,44\cdot 10^{-6}$		0,0022
	<b>MTRA BAJA</b>					
2	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171	$6,44\cdot 10^{-6}$		0,0022
3	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171		$6,44\cdot 10^{-6}$	0
	<b>MTRA MEDIA</b>					
4	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171	$1,29\cdot 10^{-5}$		0,0043
	<b>MTRA MEDIA</b>					
5	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171	$1,29\cdot 10^{-5}$		0,0043
6	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171		$1,29\cdot 10^{-5}$	0
	<b>MTRA ALTA</b>					
7	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171	$2,58\cdot 10^{-5}$		0,0087
	<b>MTRA ALTA</b>					
8	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171	$2,58\cdot 10^{-5}$		0,0087
9	0,114	$3,37\cdot 10^{-5}$	0,171		$2,58\cdot 10^{-5}$	0

Y las señales correspondientes a las disoluciones anteriores se presentan en la figura 20.

Figura 20: resultados de las muestras aditivadas  
Señales de absorbancia a 572 nm para las disoluciones de la experiencia de aplicación

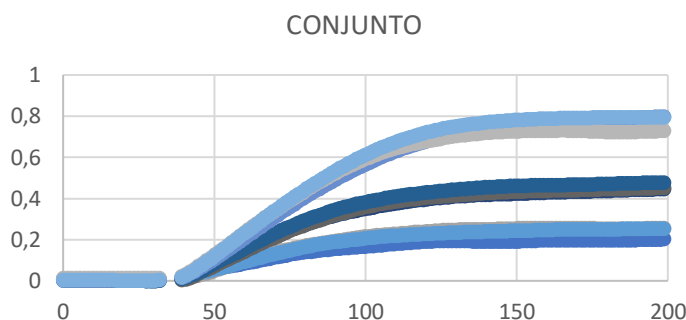
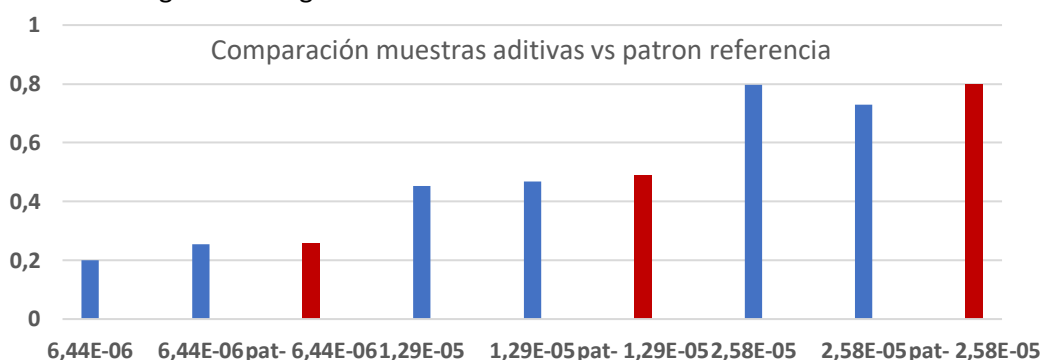


Figura 21: diagrama de los resultados de las muestras aditivadas



Los resultados de las muestras aditivadas muestran un sesgo negativo del -7% en comparación con los valores de referencia. Esto se debe a una influencia sistemática del efecto salino, que es mayor con menor concentración de analito. Sin embargo, a [X] medio-altas, la influencia salina es inferior al 5%, sugiriendo una menor influencia sistemática a concentraciones superiores a  $1,2 \cdot 10^{-5}$  mol/L.

La recuperación del analito adicionado es del 90-95% y 97% para bajas, medias y altas adiciones, respectivamente, siendo mayor con más analito adicionado, lo que concuerda con el sesgo observado. El análisis de varianza de los resultados (muestras y patrones) muestra una varianza de medida del 5,828%, inferior al 10%, lo cual es favorable para el método.

## 2. Estudio experimental de xantina e hipoxantina por microfluídica y colorimetría digital

- Contexto del método

Se realiza un estudio para determinar Xantina e Hipoxantina usando reacciones enzimáticas, modificando el soporte de reacción y la detección. La nueva metodología emplea papel microfluídico y colorimetría de imagen digital para mediar el color de la reacción a través de valores RGB.

El procedimiento consiste en preparar los reactivos de oxidación (enzimas XO, HRP) y el colorante Ar en una solución a pH controlado, que se deposita en papel cromatográfico. Tras secarse, se inyecta la solución del analito, y la reacción colorimétrica se desarrolla en unos instantes. Después de la reacción y estabilización, se toma una fotografía con un 'smartphone' y se leen los colores RGB.

El soporte de papel (Whatman tipo 4) se prepara como un disco circular de 1cm de diámetro, cortado con molde y presión manual, y se adhiere con cinta adhesiva de doble cara a soportes adecuados.

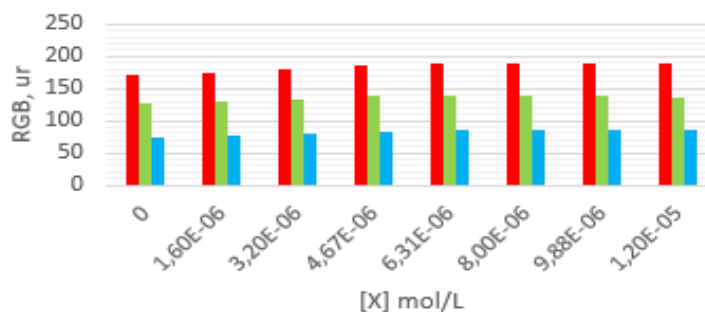
Se prepara un eppendorf que contiene tampon pH 8, HRP, AR y XO. Por otra parte, se preparan disoluciones de X (y de HX) de diferentes concentraciones para evaluar la calibración.

Se inyectan sobre los chips de papel 10 ul de la disolución del eppendorf. Y, tras su secado, otros 10 ul de disolución de calibrado (X o bien de HX).

Tabla 17: concentraciones resultantes en cada chip

Exp	[X]= [HP]	X	HRP	AR	XO
	mol/l	mg/L	U/ml	mol/l	U/ml
MQ	0		0,094	$3,35 \cdot 10^{-5}$	0,141
1	$1,60 \cdot 10^{-6}$	0,24	0,094	$3,35 \cdot 10^{-5}$	0,141
2	$3,20 \cdot 10^{-6}$	0,49	0,094	$3,35 \cdot 10^{-5}$	0,141
3	$4,67 \cdot 10^{-6}$	0,71	0,094	$3,35 \cdot 10^{-5}$	0,141
4	$6,3 \cdot 10^{-6}$	0,96	0,094	$3,35 \cdot 10^{-5}$	0,141
5	$8,0 \cdot 10^{-6}$	1,22	0,094	$3,35 \cdot 10^{-5}$	0,141
6	$9,9 \cdot 10^{-6}$	1,50	0,094	$3,35 \cdot 10^{-5}$	0,141
7	$1,2 \cdot 10^{-5}$	1,83	0,094	$3,35 \cdot 10^{-5}$	0,141

Figura 22: intensidad de los colores para cada dispositivo. Valores RGB y [X] en los dispositivos



El resultado muestra correlación entre el color básico RGB con la [analito]. Siendo la mayor varianza obtenida con el color R.

- Optimización del procedimiento microfluídico.

Se han estudiado las condiciones para conseguir máxima intensidad de color reflejado- RGB. Se mantuvieron las condiciones de pH y [XO] a valores de la experiencia espectrofotométrica y se evaluaron las influencias del tipo de papel, siempre Whatman: tipo 4 (W4): poro 20-25  $\mu\text{m}$ , grande, filtrado rápido y tipo 5 (W5): poro 2,5  $\mu\text{m}$ , pequeño, filtrado lento. Y se tuvo en cuenta los tiempos de reacción y retraso para la captura de la imagen tras la inyección: 120, 180 y 240 s. Se tomaban imágenes siempre colocadas en caja de iluminación cerrada. Con iluminación LED blanca.

Figura 23: Resultados de Xantina e Hipoxantina en chips W4 y W5 a 240 segundos.

Xantina, en whatman tipo 4, imagen a 240 s



Xantina, en whatman tipo 5, imagen a 240 s



Hipoxantina, en whatman tipo 4, imagen a 240 s



Hipoxantina, en whatman tipo 5 imagen a 240 s



En la tabla se resumen los mejores resultados de las experiencias de calibración.

Analito	Condiciones		Resultados: recta de calibrado			
	Dispositivo	t(s)	Rango: LQ-LM	pdte	o.o	r <sup>2</sup>
Xantina	W4-poro grande	240	$1,06 \cdot 10^{-6} - 1,3 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^6$	186,7	>0,90
Xantina	W5-poro pequeño (R)	240	$1,06 \cdot 10^{-6} - 1,3 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^6$	188	>0,95
Hipoxantina	W4-poro grande (G)	240	$1,6 \cdot 10^{-6} - 1,2 \cdot 10^{-5}$	$-2 \cdot 10^6$	190	>0,99
Hipoxantina	W5-poro pequeño	240	$1,6 \cdot 10^{-6} - 1,2 \cdot 10^{-5}$	$-2 \cdot 10^6$	187	>0,90

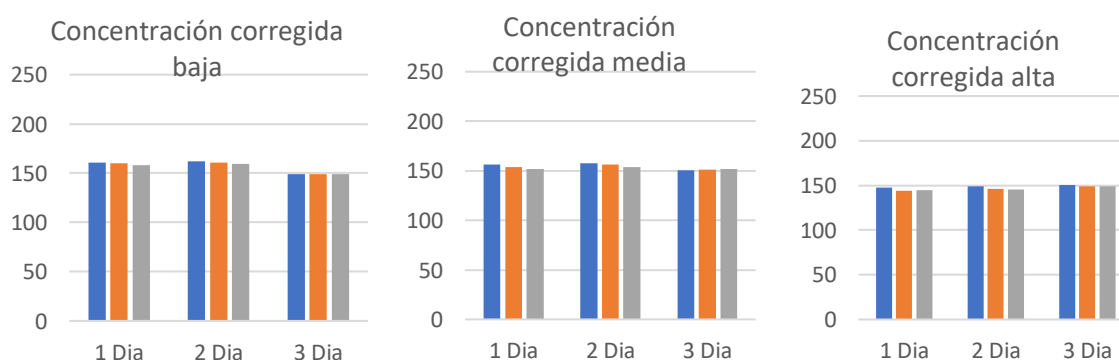
Se destaca como resultado que la Xantina es más favorable analíticamente cuando se mide el color reflejado R, con un poro pequeño W5 y tomando imágenes a 240 s. La calibración muestra una pendiente positiva. En cambio, la Hipoxantina produce un color rojo muy intenso y constante, siendo más sensible al medir el color verde con un poro grande W4 y más tiempo

Estos resultados son coherentes con la estequiometría de la reacción: la Hipoxantina, que produce 2 mol de HP/mol sustrato, muestra un color R intenso y constante en todo el rango estudiado, mientras que la Xantina, que produce 1 mol de HP/mol sustrato, no satura el color R, lo que resulta una varianza y sensibilidad analíticamente interesantes. Los tiempos de reacción afectan a la lectura, y conforme aumenta el tiempo, se obtienen mayores rangos de linealidad. Se recomienda medir a partir de 240 segundos como referencia.

- **Prestaciones: reproducibilidad y repetibilidad como medidas de la precisión.**

Se llevó a cabo un experimento de precisión para medir la reproducibilidad y repetibilidad evaluando la respuesta a diferentes valores de concentración de X y de HX: bajo-medio-alto:  $1,6 \cdot 10^{-6}$ ,  $6,31 \cdot 10^{-6}$  y  $1,2 \cdot 10^{-5}$  para la xantina e hipoxantina y midiendo en tres días distintos. Se destaca que las medidas de color necesitan ser corregidas frente a un patrón. En este caso se utilizó como referencia color blanco de un testigo patrón introducido en todas las imágenes.

Figura 24: resultados precisión para el caso de HX\_XO



Los resultados muestran la variación de las intensidades cromáticas 'G' para el analito HX, cuando se miden tres concentraciones, en tres días distintos. Y siendo obtenida cada lectura con tres réplicas. Las señales han sido corregidas mediante el factor de compensación del patrón de blanco.

Se calcula la repetibilidad de la medida como varianza dentro de grupos/día. Obteniéndose valores en el entorno del 1%. La precisión del método a partir de la varianza (media) entre días/grupos. Esta se deduce como precisión intermedia entre la varianza entre grupos restando la varianza dentro de grupos. Para cada uno de los tres niveles de concentración. Y presenta valores superiores a la repetibilidad y al 1%. En la tabla se dan los resultados para la hipoxantina:

Hipoxantina concentración baja				
	Repetibilidad medidas	Reproducibilidad método	LD, mol/L	LQ, mol/L
%dsr	0,72	4,09	$1,13 \cdot 10^{-6}$	$3,75 \cdot 10^{-6}$
Concentración media				
%dsr	1,23	1,36	$1,89 \cdot 10^{-6}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$
Concentración alta				
%dsr	1,12	1,14	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^{-6}$

- Efecto salino:

Se llevó a cabo también un experimento sobre la influencia de una disolución salina en las reacciones de X y HX. Se preparan unos experimentos en los que a una concentración de analito constante (X, HX, de  $6,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L, y en condiciones óptimas de reacción) se adicionan concentraciones de NaCl en tres niveles: sin fuerza iónica NaCl 0,0 mol/L, adición de NaCl 0,11 mol/L y finalmente disolución concentrada con 0,22 mol/L NaCl. Los resultados se ofrecen en la siguiente figura:

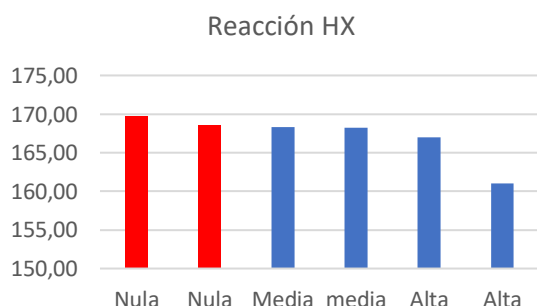


Figura 25: efecto salino en HX.

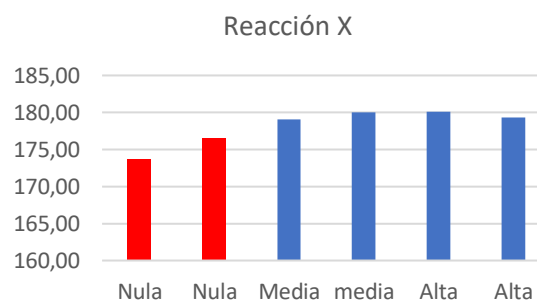


Figura 26: efecto salino en X.

Se observa que la disolución salina tiene efecto en ambas reacciones, para el caso de la HX la absorbancia va disminuyendo conforme se aumenta la concentración salina, mientras que para la reacción de X la absorbancia va aumentando conforme se aumenta la concentración salina.

### 3. Estudio de microfluídica y colorimetría digital con nanopartículas de Au

La detección analítica de la degradación de nucleótidos, en productos como Xantina, Hipoxantina ha sido realizada a través de procesos con dos reacciones acopladas: la oxidación y el desarrollo espectrofotométrico-colorimétrico. Tal y como se ha descrito en la Figura 27. La simplificación y la mejora de la eficiencia de la detección ha sido estudiada en el método de microfluidica con lectura de imagen digital.

Se estudian nuevas opciones para mejorar la eficiencia. Se evalúa un desarrollo colorimétrico con Au(III), donde tras la reacción 1, el Au(III) se reduce y precipitar como Au-NP's que tiene un carácter cromogénico intrínseco.

La reducción podría ocurrir mediante la enzima XO y algunos de sus grupos activos.

La enzima XO es complejo, con grupos-centros con potencialmente reductores. La estructura cristalográfica<sup>10</sup> muestra la presencia de: FAD en rojo, Fe-S en naranja, cofactor de Mo en amarillo, salicilato en azul.

Otra opción es reducir Au-NP's mediante un proceso de reacciones acopladas según se describe en la figura 29. Esto implica usar peróxido (reacción 1), para oxidar un alcohol a aldehído (reacción 2), que luego reduce a Au-NPs (reacción 3).

Figura 27: Esquema de reacciones posibles en la generación de Au-NPs

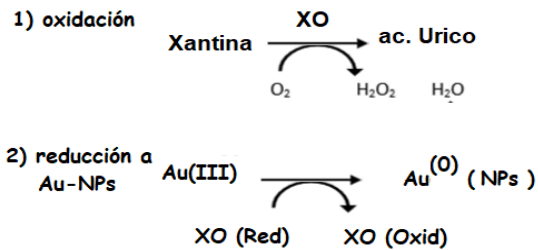


Figura 28

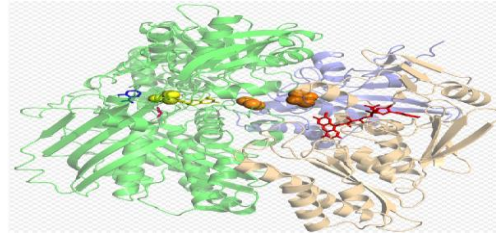
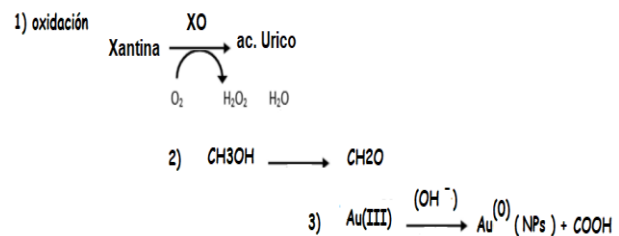


Figura 29



Estos planteamientos se han implementado en experimentos, realizando primero la reacción 1, de oxidación, en condiciones. Luego, se sigue con la precipitación de Au-NPs usando dos alternativas: reducción en presencia de XO y reducción mediante aldehído. El procedimiento se implementa en un dispositivo de microfluídica en papel, con lectura colorimétrica por DIC-RGB.

Exp	[X]= [HP] mol/l	X mg/L	NaOH 0,5M ul
bl	0	0	8,00
bl	0	0	8,00
1	$2 \cdot 10^{-6}$	0,30	8,00
2	$2 \cdot 10^{-6}$	0,30	8,00
3	$7,89 \cdot 10^{-6}$	1,20	8,00
4	$7,89 \cdot 10^{-6}$	1,20	8,00
5	$1,50 \cdot 10^{-5}$	2,28	8,00
6	$1,50 \cdot 10^{-5}$	2,28	8,00

Tabla 18: Composición de las reacciones en papel SIN alcohol.

Exp	[X]= [HP] mol/l	X mg/L	NaOH 0,5M ul
bl	0	0	8,00
bl	0	0	8,00
1	$1,78 \cdot 10^{-6}$	0,27	8,00
2	$1,78 \cdot 10^{-6}$	0,27	8,00
3	$7,02 \cdot 10^{-6}$	1,07	8,00
4	$7,02 \cdot 10^{-6}$	1,07	8,00
5	$1,33 \cdot 10^{-5}$	2,03	8,00
6	$1,33 \cdot 10^{-5}$	2,03	8,00

Tabla 19: Composición de las reacciones en papel CON alcohol.

Se tomaron las imágenes que se muestran a continuación:



Figura 30: Imagen digital de la reacción de X/XO, y detección colorimétrica con formación de AuNP's en experiencia SIN metanol. Imagen tomada a 6 min

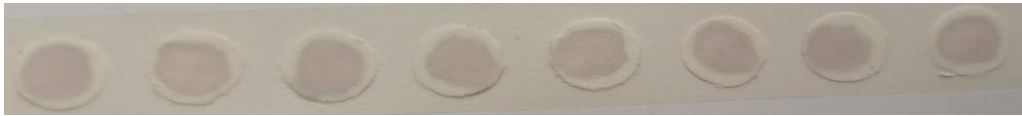
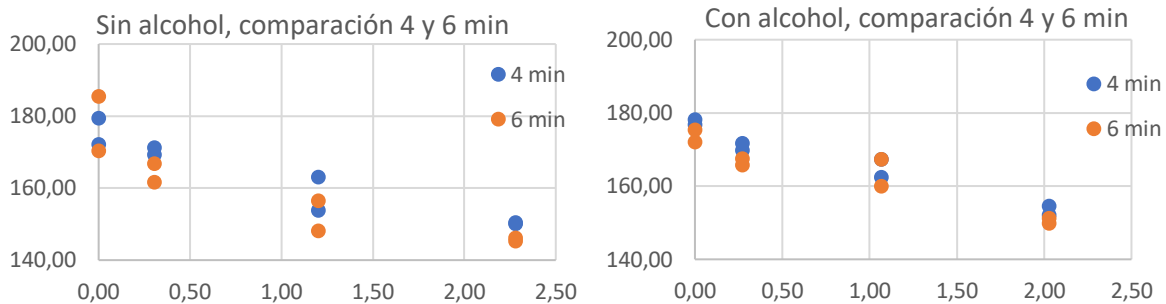


Figura 31: Imagen digital de la reacción de X/XO, y detección colorimétrica con formación de AuNP's en experiencia CON adición de METANOL. Imagen tomada a 6 min.

En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos a partir de imageJ, midiendo en el R tanto los resultados sin alcohol como con alcohol.

Figura 32



Las imágenes digitales de las reacciones sin metanol, tomadas a los 6 minutos, muestran la formación de AuNPs, lo que permite una detección colorimétrica precisa de la reacción X/XO. Los resultados medidos en la coordenada R de las imágenes demuestran una tendencia correlacionada con [X]. Sin embargo, se observó una mayor dispersión de las señales en ausencia de metanol. En presencia de metanol, las imágenes digitales tomadas a los 6 minutos también indican la formación de AuNPs. Los resultados obtenidos muestran una menor dispersión de las señales, lo que sugiere que el metanol mejora la precisión de la detección colorimétrica.

Los resultados sugieren que la adición de metanol reduce la dispersión de las señales, mejorando así la precisión de la detección colorimétrica de AuNPs. Sin embargo, la adición de NaOH al papel puede inducir una señal de fondo debido a la reacción de los grupos =O del papel. Para mitigar este efecto, se recomienda: adicionar la disolución de metanol y NaOH de manera conjunta y reducir la concentración de NaOH para minimizar la señal de fondo.

## CONCLUSIÓN

La xantina se puede determinar espectrofotométricamente mediante oxidación enzimática con xantina oxidasa, seguida de una segunda oxidación del colorante Amplex Red. La absorbancia a 572 nm es lineal en el rango de  $1,3 \cdot 10^{-6}$  a  $2,6 \cdot 10^{-5}$  mol/L de xantina, con una sensibilidad de 32455,79 L/mol. El ensayo Youden Steiner muestra que este es un método robusto. La repetibilidad y reproducibilidad están en el rango de 0,63-1,7% RSD. El método se aplicó a suero fisiológico dopado, con un factor de recuperación de 90, 95 y 97% para concentraciones bajas, medias y altas de xantina, respectivamente.

Se desarrolló un procedimiento más eficiente usando las mismas reacciones enzimáticas en un soporte microfluídico de papel con lectura digital RGB. La xantina se correlaciona linealmente con el color R en el rango de  $1,06 \cdot 10^{-6}$  a  $1,3 \cdot 10^{-5}$  mol/L, con una sensibilidad de  $2 \cdot 10^6$  L/mol. El mismo método puede aplicarse a la determinación de hipoxantina, con el color R saturándose y el G exhibiendo una respuesta lineal en el mismo rango, con una sensibilidad negativa de  $-2 \cdot 10^6$  L/mol. La repetibilidad de las medidas es cercana al 1% RSD, y la reproducibilidad está en el rango de 1,1-4,1% RSD.

La xantina también puede determinarse mediante un procedimiento basado en la primera reacción enzimática de oxidación, seguida de una reducción a Au-NPs de carácter cromático, logrando una respuesta lineal mejor en el rango de  $1,8 \cdot 10^{-6}$  a  $1,3 \cdot 10^{-5}$  mol/L.

Se utilizaron técnicas de calibración, estudios de precisión, análisis del efecto salino y la implementación de microfluídica y colorimetría digital para nanopartículas de oro (AuNPs). Los resultados muestran que la metodología desarrollada es altamente sensible y precisa, con excelente repetibilidad y precisión tanto para xantina como para hipoxantina. Los experimentos confirmaron que las técnicas permiten detectar efectivamente estas concentraciones en diferentes condiciones, y que la adición de metanol mejora la precisión, reduciendo la dispersión de las señales.

En conclusión, este trabajo proporciona una base sólida para la detección y análisis de xantina e hipoxantina, utilizando métodos avanzados y precisos, sugiriendo su eficacia para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. F. D. Jahns, J. L. Howe, R. J. Coduri JR., and A. G. Rand JR. A Rapid Visual Enzyme Test To Assess Fish Freshness. *Food Technology*. 1976; pp 27–30.
2. Pundir, C.S., Devi, R. Biosensing methods for xanthine determination: A review. *Enzyme Microb Technol*. 2014; 57:55–62. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2013.12.006](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.12.006)
3. Wu S, Jia S, Dong X. Study on detection methods for xanthine in food and biological samples. *Ijcrps.com*. SOI: [1.15/ijcrps-2016-3-8-1](https://doi.org/10.15/ijcrps-2016-3-8-1)
4. Sainz MS. Detección y diferenciación de aminas biógenas con técnicas espectroscópicas y de imagen digital. [TFG, Departamento de Química Analítica]: Universidad de Zaragoza; 2019.
5. Román CM. Activación y sensibilización de ensayos enzimáticos en el control de aminas biógenas. [TFG, Departamento de Química Analítica]: Universidad de Zaragoza; 2022.
6. Michaelis V. L., Menten M. M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Uwec.edu*. [https://www.chem.uwec.edu/Chem352\\_Resources/pages/readings/media/Michaelis\\_&\\_Menton\\_1913.pdf](https://www.chem.uwec.edu/Chem352_Resources/pages/readings/media/Michaelis_&_Menton_1913.pdf)
7. Leite MVM, Bobuřská L, Espíndola SP, Campos MRC, Azevedo LCB, Ferreira AS. Modeling of soil phosphatase activity in land use ecosystems and topsoil layers in the Brazilian Cerrado. *Ecol Modell*. 2018; 385:182–8. DOI: [10.1016/j.ecolmodel.2018.07.022](https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.07.022)
8. Ivanec-Goranina R, Kulys J. Kinetic study of peroxidase-catalyzed oxidation of 1-hydroxypyrene. Development of a nanomolar hydrogen peroxide detection system. *Open Life Sci*. 2008;3(3):224–32. DOI: [10.2478/s11535-008-0021-x](https://doi.org/10.2478/s11535-008-0021-x)
9. Wang T., Xiang Y., Liu X., Chen W., Hu Y. A novel fluorimetric method for laccase activities measurement using Amplex Red as substrate. *Talanta*. 2017; 162:143–50. DOI: [10.1016/j.talanta.2016.10.006](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.006)
10. Wikipedia, la enciclopedia libre. [https://es.wikipedia.org/wiki/Xantina\\_oxidasa](https://es.wikipedia.org/wiki/Xantina_oxidasa)

ANEXOS

En la siguiente tabla ANOVA se ofrecen los resultados:

Tabla 20. Precisión Espectrofotometría

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	2,0576	0,68586667	6,53E-07
Columna 2	3	2,0601	0,6867	4,11E-05
Columna 3	3	2,1022	0,70073333	1,52E-05

Análisis de varianza

Origen var	SS	gdl	MS	F	P	Vcritico F
Entre grupos	0,0004186	2	0,00020932	11,0293	0,0098	5,1433
Dentro grupos	0,0001139	6	1,8979E-05			
Total	0,0005325	8				

repetibilidad de la medida		= $\sqrt{MS \text{ dentro}}$	4,36E-03	0,63	%dsr	Abs X, mean
precisión método	repetibilidad intermedia	= $\sqrt{(MS \text{ entre} - MS \text{ dentro}) / n \cdot r \cdot \text{replicas}(3)}$	0,0080	1,69	%dsr	0,6911

LD

LQ

4,03E-07      1,34E-06