

Mario Domínguez García

Desarrollo de métodos
enzimáticos para la determinación
de alcaloides del tropano:
biosensores colorimétricos
monouso y basados en la
generación enzimática de
nanomateriales

Director/es

Galbán Bernal, Francisco Javier
De Marcos Ruiz, Susana

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



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

**DESARROLLO DE MÉTODOS ENZIMÁTICOS PARA
LA DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES DEL
TROPANO: BIOSENSORES COLORIMÉTRICOS
MONOUSO Y BASADOS EN LA GENERACIÓN
ENZIMÁTICA DE NANOMATERIALES**

Autor

Mario Domínguez García

Director/es

Galbán Bernal, Francisco Javier
De Marcos Ruiz, Susana

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2025



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Desarrollo de métodos enzimáticos para la
determinación de alcaloides del tropano:
biosensores colorimétricos monouso y basados
en la generación enzimática de nanomateriales

Autor

Mario Domínguez García

Director/es

Javier Galbán Bernal
Susana de Marcos Ruiz

Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias
2025

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

CERTIFICAN,

que la presente Memoria:

Desarrollo de métodos enzimáticos para la determinación de alcaloides del tropano: biosensores colorimétricos monouso y basados en la generación enzimática de nanomateriales

ha sido realizada por **D. Mario Domínguez García** 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 13 de marzo de 2025,

Fdo. Javier Galbán Bernal

Fdo. Susana de Marcos Ruiz

Pedro Cerbuna, 12. Facultad de Ciencias (Edif. D) / 50009 Zaragoza (Spain) Tel. 976761290 / Fax. 976761292 / quiman@unizar.es **unizar.es**

Este trabajo forma parte del proyecto de I+D+i **PID2019-105408GB-I00 y PID2022-139235OB-I00** financiado por MICIN/AEI/10.13039/501100011033 y las ayudas del Gobierno de Aragón a los grupos de investigación **E_25_20R y E_25_23R**

Resumen

Los principales objetivos de la tesis son, por un lado, desarrollar métodos ópticos enzimáticos para la detección de alcaloides del tropano (AT) en disolución y en sensores colorimétricos clásicos; y por el otro, ampliar el campo de aplicación de los métodos analíticos basados en la generación in-situ de nanomateriales a reacciones enzimáticas que utilizan NAD como cofactor.

Estos objetivos se desarrollan ampliamente entre el Capítulo 4 y el 10 de esta tesis de la siguiente forma:

- Capítulo 4: Se realizó un estudio de caracterización de la enzima Tropinona Reductasa (TRasa), clave en la ruta de degradación de los AT. Se estudió su cinética en presencia de los sustratos tropina y escopina, estableciendo modelos matemáticos para entender su comportamiento. Además, se optimizaron las condiciones experimentales para desarrollar un método en disolución que permita la determinación de atropina, escopolamina y ambos analitos de forma conjunta, mediante la medida de la señal del NADH generado.
- Capítulo 5: Se diseñó un sensor colorimétrico basado en la reacción enzimática del capítulo anterior acoplada a una reacción con un colorante. Se estudiaron tanto la viabilidad de emplear soportes sólidos de celulosa para inmovilizar los reactivos como la optimización de las condiciones experimentales para mejorar la sensibilidad y especificidad del sensor. Su aplicación en muestras reales demostró su potencial como herramienta de detección de AT.
- Capítulo 6: Se llevó a cabo una revisión bibliográfica acerca de los nanomateriales de oro empleado como indicadores en reacciones enzimáticas, centrándose en el mecanismo de interacción entre la enzima y el nanomaterial.
- Capítulo 7: Se investigó la generación de nanopartículas puras (Au) y mixtas (Au-Pt) mediada por NAD(P)H, analizando su formación y caracterización. Se desarrolló un modelo matemático que explica la cinética de formación de estas nanopartículas y se llevaron a cabo unos primeros estudios de sustitución del NAD(P)H por cofactores sintéticos.
- Capítulo 8: A partir de los resultados anteriores, se desarrolló un método para la determinación de atropina basado en la generación enzimática de nanopartículas de Au y Pt. Se evaluó la aplicación del método en muestras de alimentos y se trató de inmovilizar el sistema de reacciones sobre soportes de celulosa.
- Capítulo 9: Se estudiaron las posibilidades que ofrecen los tectómeros para el desarrollo de nanosensores mediante la optimización de un sensor que permita la determinación de tiramina por generación in-situ de nanopartículas de oro y su posterior aplicación al sistema de reacciones optimizado para el análisis de AT.
- Capítulo 10: Se realizaron unos primeros estudios en el desarrollo de metodologías que permitan la detección de los precursores de los AT: la putrescina y su aldehído; mediante la optimización de sensores colorimétricos y basados en la generación de nanopartículas de oro. Además, se estudió su aplicación en envases inteligentes de cara a futuros estudios.

La tesis demuestra que los biosensores enzimáticos y los sistemas basados en nanomateriales son herramientas prometedoras para la detección rápida de AT. Estos

desarrollos sientan las bases para futuras investigaciones en sensores enzimáticos aplicados a otros contaminantes alimentarios y compuestos de interés biomédico.

Índice

SECCIÓN I

Capítulo 1: Introducción

1.1 Importancia de los alcaloides del tropano	5
1.1.1 Estructura química	5
1.1.2 Biosíntesis.....	6
1.1.3 Funciones y toxicidad	7
1.1.4 Presencia de alcaloides del tropano en alimentos.....	8
1.2 Métodos analíticos para la determinación de alcaloides del tropano basados en técnicas de separación instrumentales.....	10
1.3 Métodos analíticos rápidos para la determinación de alcaloides del tropano. Biosensores	12
1.3.1 Sensores ópticos	12
1.3.2 Biosensores ópticos enzimáticos	13
1.3.3 Aplicación de los sensores a la determinación de alcaloides del tropano.....	16
1.4 Bibliografía	17

Capítulo 2: Presentación de la Tesis y objetivos

2.1 Presentación y objetivos.....	29
2.2 Estructura de la Tesis	32

Capítulo 3: Experimental

3.1 Reactivos y materiales.....	37
3.1.1 Reactivos.....	37
3.1.1.1 Precursores metálicos.....	37
3.1.1.2 Enzimas y proteínas.....	37
3.1.1.3 Sustratos	37
3.1.1.4 Disoluciones amortiguadoras.....	38
3.1.1.5 Colorantes.....	39

3.1.1.6 Otros	39
3.1.2 Materiales	39
3.2 Instrumentación.....	40
3.2.1 Espectrofotómetros de Absorción Molecular UV-vis	40
3.2.2 Fluorímetro.....	42
3.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (STEM – HR-TEM).....	43
3.2.4 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).....	43
3.3 Procedimientos de síntesis.....	44
3.3.1 Preparación de los soportes de celulosa con INT y diaforasa.....	44
3.3.2 Preparación de los soportes de celulosa con Au(III).....	44
3.3.3 Preparación de los soportes de celulosa con TMB y PuO.....	44
3.3.4 Inmovilización del Au(III) en láminas de PLA.....	44
3.4 Procedimientos de medida general	45
3.4.1 Medida de absorción molecular	45
3.4.2 Medida de fluorescencia.....	45
3.4.3 Medida de coordenadas RGB.....	46
3.5 Procedimientos específicos.....	47
3.5.1 Hidrólisis de atropina o escopolamina	47
3.5.2 Medida de tropina por formación de AuPtNPs	47
3.5.3 Obtención de espectros de absorbancia por medidas de barrido sincrónico	48
3.5.4 Determinación del Au(III) desprendido de las Au-Tect@PLA con bromuros.....	48
3.6 Tratamiento de muestra.....	49
3.6.1 Tratamiento de la muestra de chía.....	49
3.6.2 Tratamiento de la muestra de trigo sarraceno (I).....	49
3.6.3 Tratamiento de la muestra de trigo sarraceno (II).....	49

3.7 Bibliografía	50
------------------------	----

SECCIÓN II

Capítulo 4: Estudio analítico y fundamental de la Tropinona Reductasa

4.1 Primeros estudios: Búsqueda de una reacción enzimática adecuada	55
4.1.1 Posibilidades analíticas del cofactor NAD(P)/NAD(P)H	55
4.1.2 Estudios previos: Empleo de la enzima LKKRed	57
4.1.3 Tropinona Reductasa.....	59
4.1.4 Tropina Esterasa.....	61
4.1.5 Empleo de la ruta de degradación para el análisis de escopolamina.....	62
4.2 Estudio de la cinética de la Tropinona Reductasa.....	64
4.2.1 Revisión de los modelos matemáticos descritos	64
4.2.1.1 Complejos binarios por sustitución (mecanismo Ping-Pong)	66
4.2.1.2 Formación de complejos ternarios (orden obligatorio)	68
4.2.2 Comprobación del modelo cinético para la reacción con tropina y cálculo de sus parámetros cinéticos	69
4.2.2.1 Modelo cinético y cálculo aproximado de los parámetros cinéticos	69
4.2.2.2 Cálculo fino de los parámetros cinéticos para la tropina.....	75
4.2.3 Comprobación del modelo cinético para la reacción con escopina y cálculo de sus parámetros cinéticos	77
4.2.3.1 Modelo cinético y cálculo aproximado de los parámetros cinéticos	77
4.2.3.2 Cálculo fino de las constantes enzimáticas para la escopina	81
4.3 Estudio analítico de la reacción en disolución para tropina y atropina: Desarrollo del método analítico	84
4.3.1 Optimización y caracterización analítica para la tropina	84
4.3.1.1 Naturaleza y pH de la disolución amortiguadora	84
4.3.1.2 Temperatura de la reacción	85
4.3.1.3 Concentración de Tropinona Reductasa.....	88

4.3.1.4 Características analíticas.....	89
4.3.2 Optimización y caracterización analítica para la atropina. Absorción molecular	90
4.3.2.1 Hidrólisis de la atropina	90
4.3.2.2 Características analíticas para la atropina. Rendimiento de hidrólisis	91
4.3.3 Optimización y caracterización analítica para la atropina. Fluorescencia molecular	93
4.3.4 Aplicación del método sobre una muestra real	95
4.4 Estudio de la determinación simultánea de escopolamina y atropina	96
4.4.1 Estudio de la determinación de escopolamina.....	96
4.4.2 Determinación simultánea de atropina y escopolamina	100
4.4.2.1 Determinación simultánea a partir de las diferencias cinéticas	100
4.4.2.2 Determinación simultánea a partir de los cambios en la sensibilidad según la temperatura de la reacción	105
4.4.2.3 Aplicación de la determinación simultánea a partir de diferencias cinéticas sobre una muestra de chía.....	107
4.5 Conclusiones	107
4.6 Bibliografía	108
Capítulo 5: Desarrollo de un sensor enzimático colorimétrico para alcaloides del tropano	
5.1 Introducción.....	113
5.2 Colorimetría digital.....	114
5.3 Estudio de la reacción en disolución	118
5.3.1 Optimización de la reacción con el colorante.....	118
5.3.2 Características analíticas de la reacción colorimétrica	122
5.3.3 Acoplamiento de las dos reacciones.....	123
5.4 Estudio de la reacción en soporte sólido	125

5.4.1 Diseño de los soportes de celulosa.....	126
5.4.2 Optimización de las condiciones experimentales.....	128
5.4.3 Características analíticas.....	132
5.5 Aplicación del método sobre muestras reales.....	135
5.6 Estudio del método con escopolamina	136
5.7 Conclusiones.....	139
5.8 Bibliografía.....	139

SECCIÓN III

Capítulo 6: Nanomateriales de oro como indicadores en reacciones enzimáticas

6.1 Introducción: Tipos de nanomateriales de oro.....	147
6.2 Nanomateriales de oro como indicadores de reacciones enzimáticas: Metodologías generales	149
6.2.1 Mecanismo 2: Actividad catalítica	150
6.2.2 Mecanismo 3: Desactivación de la fluorescencia	151
6.2.3 Mecanismo 4: Mediador de las propiedades de las enzimas	152
6.2.4 Mecanismos 6 y 7: Cambios de tamaño del nanomaterial	152
6.2.5 Mecanismo 5: Recrecimiento de nanomateriales.....	153
6.3 Sensores basados en la formación de nanopartículas metálicas	153
6.3.1 Mecanismo 1: Generación in situ de nanomateriales durante las reacciones enzimáticas.....	153
6.3.2 Predicción de la sensibilidad	154
6.3.3 Mecanismo de reducción I: Propiedades reductoras del centro activo de la enzima	156
6.3.4 Mecanismo de reducción II: Propiedades reductoras del producto de la reacción.....	158

6.3.5 Mecanismo de reducción III: Propiedades reductoras de la coenzima/cofactor.....	159
6.4 Bibliografía	163

Capítulo 7: Estudio de la reacción entre iones metálicos y NAD(P)H

7.1 Introducción.....	175
7.2 Determinación de NAD(P)H por generación de nanomateriales	176
7.2.1 Formación de nanopartículas de oro	176
7.2.1.1 Caracterización físico-química.....	176
7.2.1.2 Optimización del método.....	177
7.2.1.3 Características del método analítico.....	181
7.2.2 Formación de nanopartículas de oro y platino.....	182
7.2.2.1 Caracterización físico-química.....	184
7.2.2.2 Características del método analítico.....	185
7.3 Desarrollo de un modelo para la formación de NP metálicas por acción del NAD(P)H	186
7.3.1 Revisión de los modelos matemáticos descritos en la bibliografía.....	187
7.3.1.1 Aspectos generales	187
7.3.1.2 Modelos clásicos: etapas de nucleación y crecimiento	189
7.3.1.3 Modelos clásicos: Etapa de maduración	190
7.3.2 Desarrollo de un modelo para la formación de nanopartículas de Au(III) y NADPH	192
7.3.3 Desarrollo de un modelo para la formación de nanopartículas mixtas de Au(III)/Pt(II) y NADPH.....	196
7.4 Diferencias entre NADH y NADPH	199
7.5 Empleo de cofactores de nicotinamida sintéticos para la formación de NPs metálicas.....	202
7.5.1 Problemática.....	202

7.5.2 Empleo de cofactores de nicotinamida sintéticos para la formación de NPs metálicas	203
7.5.2.1 Optimización	204
7.5.2.2 Caracterización físico-química.....	206
7.5.2.3 Características analíticas	206
7.6 Conclusiones	208
7.7 Bibliografía	208
Capítulo 8: Determinación enzimática de atropina por generación in-situ de nanomateriales	
8.1 Introducción	217
8.2 Acoplamiento de la reacción de formación de nanopartículas a la determinación de atropina	218
8.3 Aplicación de la metodología sobre muestras reales	224
8.4 Estudio de la reacción en soportes de celulosa.....	227
8.5 Conclusiones	229
8.6 Bibliografía	230
Capítulo 9: Tectómeros como base de sensores para la generación in-situ de nanomateriales	
9.1 Introducción	233
9.1.1 Empleo de tectómeros como soportes de sensores.....	233
9.1.2 Tiramina: Toxicología e importancia de su determinación.....	236
9.2 Inmovilización del Au(III) sobre láminas de PLA y reacción con tiramina ...	238
9.2.1 Forma de trabajo	238
9.2.2 Efecto de la disolución amortiguadora y del pH empleados en la preparación de las Au-Tect@PLA.....	239
9.2.3 Efecto del pH de la disolución amortiguadora utilizada para disolver la tiramina patrón	240

9.2.4 Efecto de la proporción molar entre el tectómero y el oro en las Au-Tect@PLA	241
9.3 Estabilidad de las láminas sensoras: necesidad de envejecimiento	242
9.3.1 Reacción entre Au(III) y bromuro.....	242
9.3.2. Cálculo del Au(III) desprendido de las láminas en función del tiempo.	245
9.4 Caracterización analítica para la cuantificación de tiramina.....	247
9.4.1 A partir de las coordenadas RGB.....	248
9.4.2 A partir de medidas de reflectancia	251
9.5 Estudio de interferencias	254
9.6 Reacción de las Au-Tect@PLA con NAD(P)H.....	255
9.7 Acoplamiento de la reacción de oxidación de la tropina	258
9.8 Conclusiones	260
9.9 Bibliografía	261

SECCIÓN IV

Capítulo 10: Metodologías para la determinación de precursores de alcaloides del tropano

10.1 Introducción	267
10.1.1 Alcaloides del tropano en alimentos: relación con putrescina y su aldehído.....	267
10.1.2 Desarrollo de sensores para putrescina y su aldehído: estudios previos	270
10.2 Estudio de la reacción en soporte sólido: Reacción con TMB y HRP.....	272
10.2.1 Inmovilización de los reactivos en soportes de celulosa.....	272
10.2.2 Optimización de la concentración de PuO.....	273
10.2.3 Características analíticas.....	274
10.3 Sensor basado en la formación de AuNPs I: Putrescina	275

10.3.1 Fundamento teórico.....	275
10.3.2 Ensayos previos.....	276
10.3.3 Optimización de las condiciones experimentales.....	278
10.3.3.1 Tiempo de reacción.....	278
10.3.3.2 Concentración de Au(III).....	279
10.3.3.3 pH y concentración de la disolución amortiguadora empleada para preparar los soportes.....	279
10.3.3.4 Concentración de PuO.....	280
10.3.4 Características analíticas.....	282
10.4 Sensor basado en la formación de AuNPs II: 4-aminobutanal y envases inteligentes.....	283
10.4.1 Consideraciones previas.....	283
10.4.2 Aplicación en envases alimenticios.....	283
10.4.3 Reducción de la humedad de los envases.....	285
10.5 Conclusiones.....	288
10.6 Bibliografía.....	289

SECCIÓN V

Conclusiones

Artículos publicados

SECCIÓN

I

Capítulo 1: Introducción

Capítulo 2: Presentación de la Tesis y objetivos

Capítulo 3: Experimental

Capítulo 1:

Introducción

1.1 Importancia de los alcaloides del tropano

Un gran número de plantas silvestres y cultivadas producen metabolitos en concentraciones que pueden dañar la salud humana cuando se ingieren. La mezcla accidental o intencionada de estas plantas (o partes de la planta) con alimentos expone al consumidor a estas toxinas. Si bien los riesgos que conlleva el abuso o el consumo en exceso de varias toxinas vegetales son conocidos desde la antigüedad, como el empleo de ricina o cicuta en intentos de asesinato, el conocimiento de la relevancia para la salud humana cotidiana de la mayoría de las toxinas vegetales continúa siendo más bien pobre [1.1]. Entre estas toxinas vegetales de interés para la salud de los seres humanos se encuentran los alcaloides del tropano.

Los alcaloides del tropano (AT) son metabolitos secundarios producidos por varias especies de plantas, por lo que es fácil encontrarlos en una amplia variedad de alimentos y cereales. Las plantas que producen esta clase de compuestos pertenecen principalmente a la familia de las solanáceas (mandrágora, beleño, solanácea mortal, belladona, estramonio, patata, tomate), pero también se pueden encontrar en plantas de otras familias (*Brassicaceae*, *Erythroxylaceae*, *Euphorbiaceae*, *Convulvulaceae*) [1.2–1.4]. En la actualidad, se han descubierto más de doscientos AT diferentes, y pueden encontrarse en cualquier parte de la planta, desde las semillas o los frutos, hasta las flores, hojas o tallos [1.3, 1.5]. La concentración de cada AT es diferente según la especie, la estación del año, la localización geográfica y la parte de la planta [1.6].

1.1.1 Estructura química

A nivel estructural, la característica común que comparten todos los AT es la presencia de un anillo de tropano en su estructura química. Este anillo está formado a su vez por dos, uno de pirrolidina y otro de piperidina, que se unen compartiendo el átomo de nitrógeno y dos átomos de carbono (Figura 1.1). La mayor parte de estos compuestos son ésteres derivados de la unión de un ácido orgánico e hidroxitropano [1.3]. De todos los AT, los más estudiados son la atropina, que es una mezcla racémica de (\pm)-hiosciamina, y la escopolamina (o hioscina) [1.7].

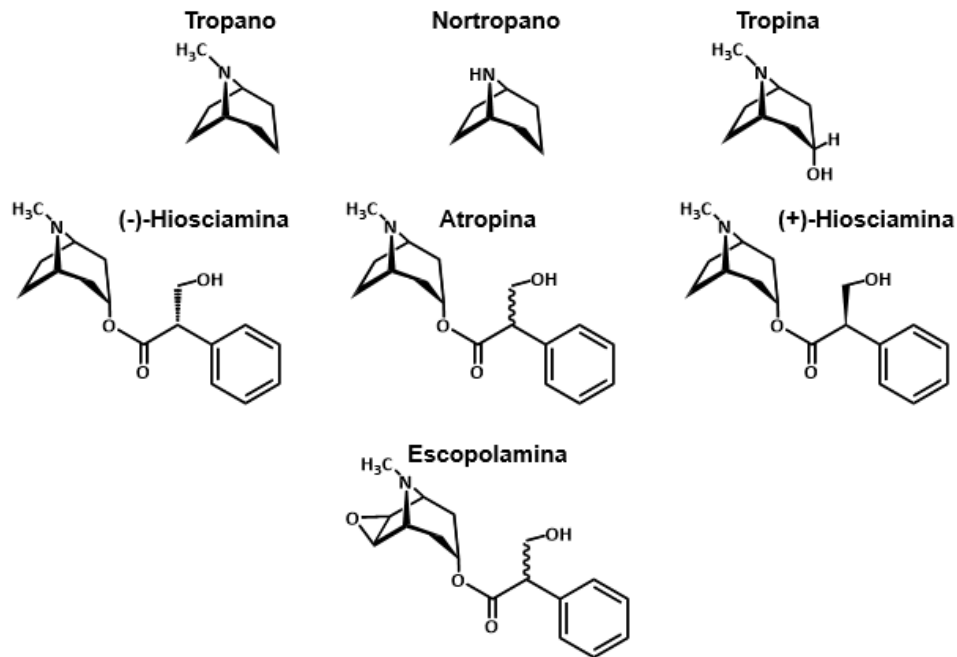


Figura 1.1: Molécula de tropano y sus derivados más estudiados.

1.1.2 Biosíntesis

Los AT son, en gran medida, sintetizados en células jóvenes de la raíz y transportados al resto de partes de la planta a través de los vasos del xilema [1.8]. La síntesis del anillo de tropano comienza con la degradación del aminoácido ornitina a putrescina, que a su vez se degrada a N-metilputrescina por acción de la enzima putrescina N-metiltransferasa. Ésta última se transforma en N-metilaminobutanal, en una reacción catalizada por la enzima Diamino Oxidasa (DAO) o por la enzima Putrescina Oxidasa (PuO). Este compuesto se cicla de forma espontánea dando lugar al catión 1-metil-pirrolinio, que se transforma en tropinona y finalmente en tropina [1.9].

En lo referente a la biosíntesis de la atropina y la escopolamina, ambas moléculas proceden de la molécula de tropina, que se esterifica con R-fenillactato (un derivado de la fenilalanina) dando lugar a R-litorina. A partir de esta etapa, se han descrito en la literatura al menos dos rutas diferentes que parten de R-litorina para dar lugar a atropina [1.10]. Por último, la escopolamina está formada a partir de atropina en una reacción de dos pasos en la que interviene la enzima

hiosciamina 6 β -hidroxilasa (H6H) [1.9, 1.11]. En la Figura 1.2 se muestra una descripción general de la biosíntesis.

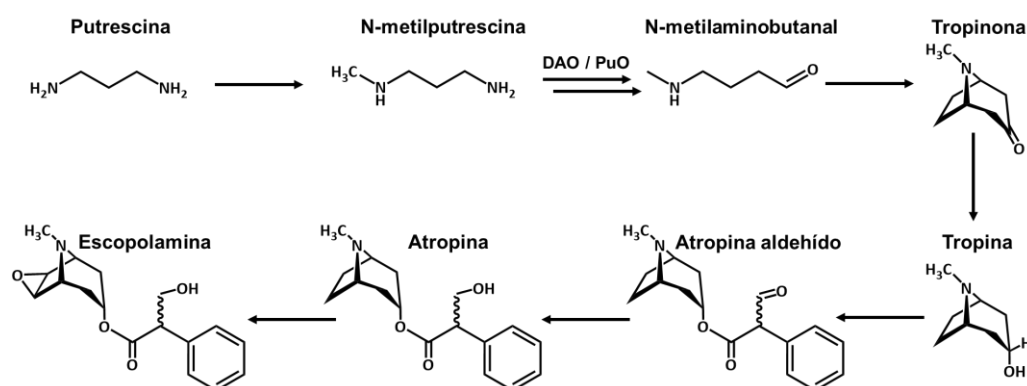


Figura 1.2: Esquema simplificado de las reacciones implicadas en la biosíntesis de tropina, atropina y escopolamina a partir de putrescina.

1.1.3 Funciones y toxicidad

El interés que suscitan la atropina y la escopolamina a nivel analítico es debido, por una parte, a sus propiedades biológicas y farmacológicas, al actuar como inhibidores no selectivos de los receptores muscarínicos de la acetilcolina [1.1, 1.12]. A lo largo de la historia, se han empleado en medicina, generalmente administrados en dosis bajas como fármacos en forma de sales, como el sulfato de atropina, o derivados semisintéticos como el bromuro de N-butilescolamina [1.2]. Su empleo en general ha servido para tratar múltiples síntomas y patologías como náuseas, vómitos, problemas cardíacos y respiratorios. Se han empleado también como antiespasmódico en problemas gastrointestinales, como fármacos antialérgicos, como tratamiento contra compuestos organofosforados e incluso como dilatador de la pupila para el tratamiento oftalmológico [1.1, 1.13–1.15]. Por ejemplo, el nombre de la planta belladona (*Atropa belladonna*) se refiere al uso de esta planta en el pasado en la medicina europea para dilatar las pupilas por razones puramente estéticas [1.1], las hojas de estramonio eran un componente de los llamados “cigarrillos para el asma” [1.16], y la atropina era recomendada en la medicina tradicional china como tratamiento para la artritis [1.17].

Por otra parte, al tratarse de compuestos anticolinérgicos, han sido causantes de numerosas intoxicaciones, debidas al consumo de alimentos contaminados con alto contenido en estos compuestos. Los efectos tóxicos causados por atropina y

escopolamina pueden derivar en taquicardias, espasmos musculares, midriasis, delirio y, en ocasiones, pueden provocar incluso la muerte del individuo [1.1, 1.3]. Estos efectos suelen aparecer unos 60 minutos tras su consumo y sus síntomas clínicos perduran entre 24 y 48 horas [1.18]. En cuanto a su toxicocinética, estos compuestos son absorbidos en el tracto gastrointestinal [1.19], rápidamente distribuidos entre los tejidos [1.20] y excretados principalmente a través del sistema renal [1.21]. En un contexto forense, estos compuestos son usados fraudulentamente por su efecto de sumisión química, en particular la escopolamina que es conocida como burundanga.

1.1.4 Presencia de alcaloides del tropano en alimentos

En concreto, las especies *Datura Stramonium* (estramonio o manzana espinosa), *Hyoscyamus Niger* y *Atropa Belladonna* son las más implicadas en la contaminación de alimentos y piensos con este tipo de alcaloides. Esto es debido a que estas plantas crecen fácilmente en forma de maleza en diversos cultivos vegetales. De este modo, al encontrarse presentes en todas las partes de las plantas que los producen, es frecuente la contaminación cruzada, debido a la recolección de forma rápida y mecanizada.

Las semillas de estas plantas se encuentran como impurezas en cultivos de linaza, soja, mijo, girasol y trigo sarraceno [1.22]. Un estudio empleando semillas de estramonio obtenidas de diferentes lugares de los Estados Unidos reveló que contenían unas concentraciones medias de atropina y escopolamina de 2.3 y 0.5 mg/g de semilla, respectivamente [1.23]. La EFSA [1.4] habla de niveles de atropina, escopolamina o alcaloides del tropano en general de entre 1 y 9 mg/g de semilla de estramonio. Una sola semilla de estramonio tiene un peso aproximado de unos 8 mg [1.4], lo que significa que un total de 100 de estas semillas podrían contener más de 7 mg de atropina.

En los últimos años, en Europa se han informado de varios casos de intoxicaciones producidos por la presencia de estos compuestos en alimentos y cereales. Un ejemplo se encontró en 2007 en Francia, donde se informó de dos casos de intoxicación humana debido a la presencia de atropina y escopolamina en harina de trigo sarraceno [1.24].

Por lo tanto, ante esta problemática, las posibles soluciones residen en dos puntos principales [1.25]:

- Medidas de acción temprana, donde los productores de alimentos y las empresas manufactureras concentren sus esfuerzos por reducir la presencia de plantas que producen AT en cultivos, materias primas y productos manufacturados, adoptando buenas prácticas agrícolas y manufactureras.
- Implementación adecuada de medidas de control de la inocuidad de los alimentos.

Debido a sus efectos adversos sobre la salud, tanto la atropina como la escopolamina son consideradas sustancias indeseables en alimentos (especialmente para niños) y piensos por lo que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establece una dosis de referencia aguda de 0.016 mg/kg-día expresada como la suma de atropina y escopolamina [1.26]. A raíz de los estudios realizados por la EFSA, la Unión Europea estableció una concentración máxima de cada uno de esos dos compuestos de 1.0 µg/kg en alimentos para lactantes y niños de corta edad (Tabla 1.1) [1.27].

Tabla 1.1: Concentración máxima permitida por la Unión Europea en diferentes productos alimenticios.

Alimentos	Máximos (µg/kg)
Alimentos transformados a base de cereales y alimentos para lactantes y niños de corta edad que contengan mijo, sorgo, alforfón, maíz o sus productos derivados	Atrop=1 Escp=1
Maíz no transformado, excepto: -el destinado a molienda por vía húmeda -el reventón	Atrop+Escp=15
Trigo sarraceno (alforfón) no transformado	Atrop+Escop=10
Trigo sarraceno comercializado para el consumidor final Producto de la molienda del alforfón	Atrop+Escop=10
Infusiones de hierbas (producto desecado), excepto las semillas de anís	Atrop+Escop=25

Los problemas derivados de la toxicidad de los alimentos en los que se encuentran los AT son de gran importancia a nivel social, económico y político. Esto queda reflejado en las acciones que se han ido lanzando desde organismos internacionales como las Naciones Unidas, con el objetivo de llamar la atención a los diferentes estamentos sociales sobre la importancia del problema y la necesidad de llevar a cabo controles de estos parámetros sobre alimentos (especialmente aquellos más propensos a ser contaminados por estos compuestos). Se hace necesario disponer de métodos que permitan hacer una primera evaluación de la toxicidad de un alimento de forma rápida y económica.

1.2 Métodos analíticos para la determinación de alcaloides del tropano basados en técnicas de separación instrumentales

Actualmente las metodologías existentes están principalmente basadas en técnicas de separación instrumentales, particularmente en cromatografía, pero también en electroforesis capilar, acopladas a diferentes tipos de detectores; aunque también se emplean técnicas de inmunoensayo [1.28–1.30]. En este apartado se comentará brevemente en qué consisten y qué prestaciones aportan estas técnicas.

Se han publicado numerosos artículos de revisión que abarcan el uso de este tipo de técnicas instrumentales para el análisis de AT [1.2, 1.13, 1.28]. Como punto en común todas estas técnicas requieren de un proceso de extracción previo, con objeto de eliminar las posibles interferencias contenidas en la matriz de la muestra y concentrar el analito.

Debido a su elevada polaridad, su extracción se suele llevar a cabo empleando mezclas de agua y metanol (en proporción 40/60 v/v), obteniendo unas recuperaciones de entre el 95 y el 101% [1.31]. Para incrementar la eficiencia de la extracción, se puede añadir a esta mezcla un porcentaje de entre el 0.2 y el 2% de ácido fórmico [1.32] o acetonitrilo [1.33]. En ocasiones, se aplica un paso previo de limpieza de la muestra que consiste en una extracción en fase sólida que permite eliminar interferencias y preconcentrar el analito [1.28].

Las técnicas de separación cromatográficas acopladas a un detector de MS (o MS/MS) constituyen las herramientas más potentes y empleadas para la

determinación de AT, alcanzando límites de detección inferiores a 5 ng/mL [1.34–1.36]. No obstante, aunque proporcionan una menor sensibilidad y selectividad, también existen estudios que emplean otros tipos de detectores más clásicos como detectores de ionización de llama (FID) [1.37], detectores de nitrógeno-fósforo (NPD) o detectores de matriz de diodos (DAD) [1.38]. En cuanto a la técnica cromatográfica, se han obtenido buenos resultados tanto con cromatografías de gases como de líquidos. Sin embargo, la HPLC en fase reversa empleando columnas C₁₈ es la más utilizada [1.31, 1.39, 1.40]. Esto se debe a que en muchos procedimientos en los que se emplea la cromatografía de gases es necesario un paso previo de derivatización tanto para la atropina como para la escopolamina. Esta derivatización se basa generalmente en una etapa de sililación, que hace que compuestos polares sean más fáciles de volatilizar por sustitución de un hidrógeno, que no se encuentre estéricamente obstaculizado, por un grupo trimetilsilano. La sililación se puede llevar a cabo por reacción con, entre otros compuestos, hexametildisilazano [1.36] o bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida [1.41].

La técnica de electroforesis capilar es menos empleada que las cromatografías acopladas a MS, ya que la sensibilidad disminuye considerablemente con respecto a estas últimas. No obstante, esta técnica presenta otras ventajas como su rapidez y su simpleza, pudiendo cribar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo [1.42, 1.43]. A pesar de ello, al contar con límites de detección aproximadamente 100 veces más elevados que las técnicas de HPLC-MS [1.44], hay que tener en consideración el nivel de AT que se va a encontrar en las muestras, limitando por tanto su utilidad a muestras con altas concentraciones.

Por último, se deben mencionar las técnicas de inmunoensayo. Estas técnicas requieren de anticuerpos estables y de alta calidad, lo cual supone un reto debido a que el almacenamiento a largo plazo de estos anticuerpos puede afectar a su rendimiento [1.45, 1.46]. No obstante, a diferencia de la electroforesis capilar, ofrecen valores de sensibilidad y límites de detección comparables a los obtenidos mediante técnicas de HPLC-MS. Además, son técnicas fáciles de operar, requieren menores tiempos de análisis, son más económicas y aportan una gran especificidad; características que las convierten en técnicas adecuadas para la determinación in-situ [1.47].

A pesar de que todas las técnicas enumeradas aportan buenos resultados, se tratan de procedimientos generalmente lentos para el control de calidad, que suelen ir acompañados de un tratamiento de muestra (derivatización, extracción...). Además, son por lo general procedimientos con un coste elevado.

Es por todas estas razones que el diseño y el desarrollo de metodologías rápidas y que requieran de un tratamiento de muestra más simple es objetivo de estudio. Una alternativa que puede cubrir esta necesidad son los sensores.

1.3 Métodos analíticos rápidos para la determinación de alcaloides del tropano. Biosensores

1.3.1 Sensores ópticos

Un sensor, según la IUPAC [1.48], consiste en un dispositivo que transforma información química en una señal de la que se puede extraer un valor analítico. Para cumplir con la definición anterior, un sensor debe estar compuesto por los componentes mostrados en la Figura 1.3 que se pueden agrupar en dos sistemas principales:

- Un sistema receptor, que proporciona selectividad al sensor. En este sistema el analito sufre una interacción que provoca la transformación de la información química en una señal primaria.
- Un sistema transductor, que se encarga de aportar sensibilidad al sensor. Aquí la señal primaria obtenida en el sistema receptor se transforma en la señal analítica.

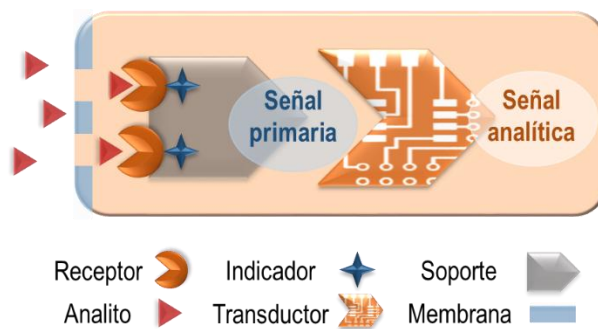


Figura 1.3: Representación de los componentes principales de un sensor.

Los sensores pueden clasificarse en dos tipos según sean de un solo uso (desechables) o estén pensados para tomar una gran cantidad de medidas, e incluso para tomarlas de forma continuada (sistemas de monitorización).

En lo que se refiere al sistema transductor, existen varios tipos de transducción posibles, según si la señal analítica que se obtiene de ellos es electroquímica, de masa, fotónica, térmica, magnética, etc. Si la señal primaria es transformada en una señal analítica basada en la absorción UV-vis o en propiedades de fluorescencia (transducción óptica), el sensor recibe el nombre de sensor óptico. Para conseguir esta señal de carácter óptico en este tipo de sensores se suele emplear una reacción adicional llamada reacción indicadora.

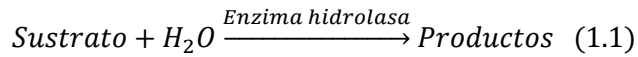
Por otra parte, atendiendo al sistema receptor, se pueden establecer tres categorías según se utilicen receptores sintéticos [1.49–1.51], bioreceptores naturales [1.52] o receptores mixtos, que estarían constituidos por bioreceptores naturales modificados sintéticamente para mejorar algunas de sus propiedades. En cuanto a los primeros, destacan los de origen orgánico como dendrímeros, calixarenos, éteres corona o criptando, ciclodextrinas y especialmente polímeros de impresión molecular. En lo que corresponde a los bioreceptores naturales, los de naturaleza proteica, especialmente las enzimas, proteínas de transporte y los anticuerpos, ofrecen los resultados más prometedores. Finalmente, en cuanto a los receptores mixtos, existen diferentes tipos de modificaciones que se han hecho sobre proteínas de transporte y anticuerpos, aunque los más ampliamente usados son los aptámeros.

1.3.2 Biosensores ópticos enzimáticos

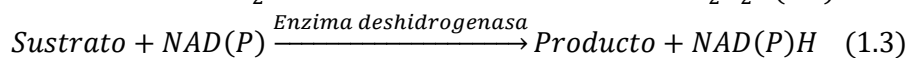
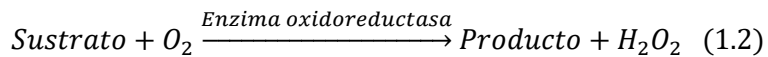
Como se ha expuesto en el apartado anterior, las propiedades analíticas y la aplicabilidad de los sensores están muy condicionadas por el tipo de receptor. En este sentido, los biosensores enzimáticos utilizan como sistema receptor una enzima. Su principal ventaja es la reducción del tiempo requerido para el análisis, lo que ofrece una posibilidad de cribado rápido en la industria alimenticia, muy necesaria para establecer un control de calidad rutinario. Este tipo de biosensores emplea generalmente uno de los siguientes tipos de reacciones enzimáticas:

- **Reacciones de hidrólisis:** llevadas a cabo por las enzimas incluidas dentro del grupo 3 de la clasificación establecida por la Unión

Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBMB), destacando las enzimas estererasas (como lipasas, fosfatasas o nucleasas), que catalizan diversas reacciones de (des)esterificación. Se utilizan habitualmente para analizar la actividad de las enzimas y como sistemas indicadores en metodologías de inmunoensayo.



- **Reacciones de oxidación-reducción:** realizadas por el grupo 1 de la UIBMB, donde el sustrato, generalmente el analito, que se quiere determinar sufre una reacción de oxidación-reducción. Son especialmente útiles en análisis cuantitativos en metabolómica. Su éxito se basa en diversos factores, tales como una adecuada selectividad (aunque depende de la reacción y del problema), su disponibilidad comercial (cada vez hay más enzimas disponibles), su reversibilidad (pueden ser reutilizadas), su aplicabilidad en soportes sólidos (biosensores) y la posibilidad de utilizar esquemas indicadores no muy complejos. Dentro de ellas destacan las que utilizan como cosustrato O_2 (1.2) y las que utilizan NAD(P) (1.3).



Para obtener la información analítica de estas reacciones se han desarrollado diferentes estrategias siendo las más desarrolladas aquellas basadas en la utilización de las propiedades ópticas intrínsecas de las enzimas, la utilización combinada con nanomateriales y la utilización de reacciones indicadoras.

En lo referente a la utilización de las propiedades intrínsecas de las enzimas, es ampliamente conocido que todas las enzimas exhiben propiedades de absorción molecular y de fluorescencia, especialmente debido a los aminoácidos que contienen (en particular tirosina y triptófano) [1.53]. Algunas de estas enzimas permiten la detección sin emplear reactivos químicos auxiliares. Estas propiedades de fluorescencia intrínsecas se han empleado para detectar cambios

conformacionales o en las interacciones proteína ligando [1.53], lo que puede conducir al desarrollo de biosensores en el futuro. En algunos casos, esta fluorescencia se ha empleado con fines analíticos cuando [1.54]:

- El sustrato de la reacción, el producto o ambos producen un efecto de filtro interno que puede relacionarse con la concentración del sustrato.
- Esquemas de detección FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Förster).

La principal limitación de los sensores que emplean las propiedades fluorescentes de las enzimas es que la medición se realiza en una región del espectro donde muchas sustancias absorben radiación, lo cual se puede solventar en algunos casos modificando químicamente la enzima con un fluoróforo adecuado. Estos sensores se han aplicado a muestras reales mediante la exploración de los cambios cinéticos.

En cuanto a la utilización combinada con nanomateriales, en los sensores bioquímicos modernos, el auge de la nanotecnología, especialmente los nanomateriales, ofrece un abanico de nuevas posibilidades basadas en sus propiedades electroquímicas, catalíticas, de adsorción y, especialmente, ópticas. Los nanomateriales se han utilizado con fines de detección. Sin embargo, aún se están explorando las posibilidades reales que ofrece la combinación de nanomateriales con biomoléculas y se están desarrollando nuevas alternativas metodológicas creativas. Esta aplicación de los nanomateriales en los biosensores se explicará más detalladamente en la Sección 3 de esta tesis.

Por último, y siendo la estrategia más empleada en el desarrollo de biosensores enzimáticos, se encuentra la utilización de reacciones indicadoras. Este tipo de estrategias se estudiarán a lo largo de la Sección 2 de esta Tesis, y se aplican generalmente a métodos basados en las reacciones del tipo (1.2) y (1.3). En las del tipo (1.2), se combina la aparición del H_2O_2 con una reacción indicadora adecuada. En las del tipo (1.3), el cofactor NAD o NADP se reduce a NADH o NADPH, respectivamente. Ambas moléculas cuentan con propiedades de absorción (máximo a 340 nm) y de fluorescencia (máximo a 450 nm). No obstante, para obtener una señal cuyo máximo de absorción se encuentre en el espectro visible, es posible acoplar una reacción indicadora que involucre a un colorante.

1.3.3 Aplicación de los sensores a la determinación de alcaloides del tropano

Aunque el desarrollo de sensores químicos está cobrando importancia, la mayoría de los que se han desarrollado hasta el momento para la determinación de AT están basados en reacciones electroquímicas [1.55] o en la fluorescencia de quantum dots [1.56] y carecen de especificidad suficiente para ser empleados con muestras reales.

Esta falta de especificidad se puede solucionar como bien se ha explicado antes con el uso de inmunoensayos. Sin embargo, para desarrollar métodos más accesibles y simples que proporcionen una evaluación inicial de toxicidad alimentaria en el ámbito de la atropina y la escopolamina, es necesario centrarse en metodologías enzimáticas (por su especificidad) y colorimétricas (por su accesibilidad). Hasta donde se sabe, no se ha propuesto ningún método enzimático para este tipo de compuestos, probablemente debido a la falta de disponibilidad de enzimas comerciales apropiadas.

Es por este motivo que se han revisado las posibles rutas de degradación existentes que involucren reacciones con AT. El primer paso de todas estas rutas consiste en una etapa de hidrólisis, la cual está catalizada por la enzima Tropina Esterasa [1.57] (Figura 1.4).

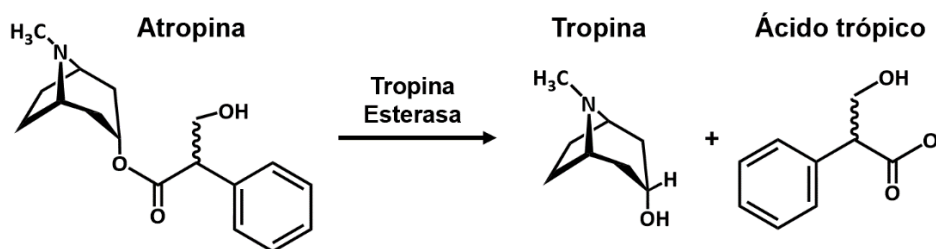


Figura 1.4: Reacción de hidrólisis de la atropina.

Tras esta etapa, se puede continuar con dos posibles rutas de degradación diferentes, ambas de elevada especificidad, siguiendo una, la vía del ácido trópico y la otra, la vía de la tropina.

Para el primer caso, únicamente se ha encontrado en la literatura una reacción compleja que involucra ATP y CoA (coenzima A), catalizada por medio de la enzima L-firefly luciferin-CoA Ligasa [1.58] (Figura 1.5). El problema de esta

reacción es que no permite el acoplamiento posterior con mecanismos indicadores asequibles.

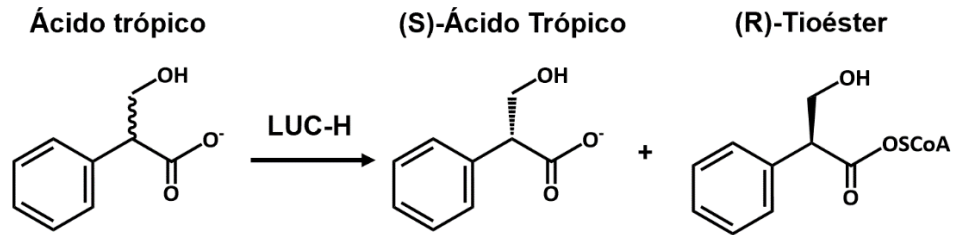


Figura 1.5: Ruta de degradación del ácido trópico.

Un esquema más simple se puede encontrar mediante la vía de degradación de la tropina. Este se basa en el uso de la enzima Tropinona Reductasa, la cual cataliza la oxidación del grupo -OH empleando NAD como cofactor (Figura 1.6). Esta reacción puede ser monitorizada mediante la medida de las propiedades de absorción/fluorescencia molecular del NADH (340 nm) [1.57, 1.59].

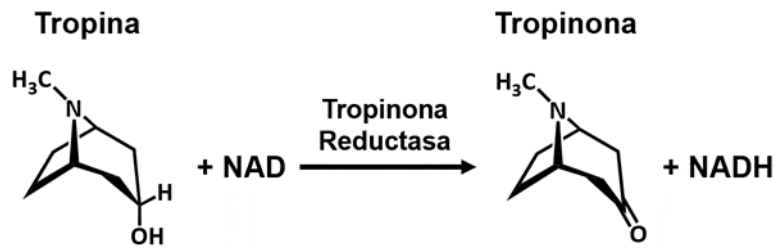


Figura 1.6: Ruta de degradación de la tropina.

A lo largo de esta Tesis, se estudiará esta ruta de degradación y su aplicación al desarrollo de biosensores para la determinación de tropina, atropina y escopolamina.

1.4 Bibliografía

- 1.1. Adamse P, van Egmond HP, Noordam MY, Mulder PPJ, De Nijs M (2014) Tropane alkaloids in food: Poisoning incidents. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 6:15–24

- 1.2. Aehle E, Dräger B (2010) Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: An update. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878:1391–1406. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.03.007>
- 1.3. (2013) Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 11:. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3386>
- 1.4. (2008) Tropane alkaloids (from *Datura* sp.) as undesirable substances in animal feed - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal* 6:. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.691>
- 1.5. Kohnen-Johannsen KL, Kayser O (2019) Tropane alkaloids: Chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules* 24:796. <https://doi.org/10.3390/molecules24040796>
- 1.6. Griffin WJ, Lin GD (2000) Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* 53:623–627. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00475-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00475-6)
- 1.7. Mateus ARS, Crisafulli C, Vilhena M, Barros SC, Pena A, Sanches Silva A (2023) The Bright and Dark Sides of Herbal Infusions: Assessment of Antioxidant Capacity and Determination of Tropane Alkaloids. *Toxins (Basel)* 15:245. <https://doi.org/10.3390/toxins15040245>
- 1.8. Hashimoto T, Hayashi A, Amano Y, Kohno J, Iwanari H, Usuda S, Yamada Y (1991) Hyoscyamine GB-Hydroxylase, an Enzyme Involved in Tropane Alkaloid Biosynthesis, Is Localized at the Pericycle of the Root. *Journal of Biological Chemistry* 266:4648–4653. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)64371-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)64371-X)
- 1.9. Zhang L, Yang B, Lu B, Kai G, Wang Z, Xia Y, Ding R, Zhang H, Sun X, Chen W (2007) Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing Putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Planta* 225:887–896. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0402-1>
- 1.10. Li R, Reed DW, Liu E, Nowak J, Pelcher LE, Page JE, Covello PS (2006) Functional Genomic Analysis of Alkaloid Biosynthesis in *Hyoscyamus*

- niger Reveals a Cytochrome P450 Involved in Littorine Rearrangement. *Chem Biol* 13:513–520. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.03.005>
- 1.11. Yun D-J, Hashimoto T, Yamada Y (1992) Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:11799–11803. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11799>
 - 1.12. Debnath B, Singh WS, Das M, Goswami S, Singh MK, Maiti D, Manna K (2018) Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Mater Today Chem* 9:56–72. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>
 - 1.13. Romera-Torres A, Romero-González R, Martínez Vidal JL, Garrido Frenich A (2018) Analytical methods, occurrence and trends of tropane alkaloids and calystegines: An update. *J Chromatogr A* 1564:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.004>
 - 1.14. Dey P, Kundu A, Kumar A, Gupta M, Lee BM, Bhakta T, Dash S, Kim HS (2020) Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In: *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier, pp 505–567. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9>
 - 1.15. Wink M (2015) *Alkaloids: Toxicology and Health Effects*, 1st ed. Elsevier. ISBN 9780123849553
 - 1.16. Beltman W, Van Riel AJHP, Wijnands-Kleukers APG, Vriesman MF, Van den Hengel-Koot IS, De Vries I, Meulenbelt J (1999) Smartshops – Smart shops: a survey of products, claimed effects and medical-toxicological relevance. RIVM report 348802 017. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands.
 - 1.17. Lin C-C, Chen J-C (2002) Medicinal Herb *Erycibe henri* Prain (“Ting Kung Teng”) Resulting in Acute Cholinergic Syndrome. *J Toxicol Clin Toxicol* 40:185–187. <https://doi.org/10.1081/CLT-120004409>

- 1.18. Spina SP, Taddei A (2007) Teenagers with Jimson weed (*Datura stramonium*) poisoning. *Canadian Journal of Emergency Medicine* 9:467–469. <https://doi.org/10.1017/S1481803500015530>
- 1.19. Beermann B, Hellström K, Rosén A (1971) The Gastrointestinal Absorption of Atropine in Man. *Clin Sci* 40:95–106. <https://doi.org/10.1042/cs0400095>
- 1.20. Kanto J, Klotz U (1988) Pharmacokinetic implications for the clinical use of atropine, scopolamine and glycopyrrolate. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 32:69–78. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1988.tb02691.x>
- 1.21. Kalser SC, McLain PL (1970) Atropine metabolism in man. *Clin Pharmacol Ther* 11:214–227. <https://doi.org/10.1002/cpt1970112214>
- 1.22. Martinello M, Borin A, Stella R, Bovo D, Biancotto G, Gallina A, Mutinelli F (2017) Development and validation of a QuEChERS method coupled to liquid chromatography and high resolution mass spectrometry to determine pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey. *Food Chem* 234:295–302. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.186>
- 1.23. Russel J, Edwards C, Jordan C, Luckman E, Chu A, Blythe D, Krick J (2010) Jimsonweed poisoning associated with a homemade stew – Maryland, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 59:102–104. <https://www.jstor.org/stable/23319543>
- 1.24. de Nijs M, Crews C, Dorgelo F, MacDonald S, Mulder PPJ (2023) Emerging Issues on Tropane Alkaloid Contamination of Food in Europe. *Toxins* 15:98. <https://doi.org/10.3390/toxins15020098>
- 1.25. Abia WA, Montgomery H, Nugent AP, Elliott CT (2021) Tropane alkaloid contamination of agricultural commodities and food products in relation to consumer health: Learnings from the 2019 Uganda food aid outbreak. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20:501–525. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12664>
- 1.26. Mulder PPJ, de Nijs M, Castellari M, Hortos M, MacDonald S, Crews C, Hajslova J, Stranska M (2016) Occurrence of tropane alkaloids in food.

- EFSA Supporting Publications 13:
<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.en-1140>
- 1.27. Reglamento (UE) 2016/239 L 45/3. Transcripción al BOE: <https://www.boe.es/doue/2016/045/L00003-00005.pdf> (último acceso Febrero 2025)
 - 1.28. Drager B (2002) Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A* 978:1–35. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01387-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01387-0)
 - 1.29. Chen HX, Chen Y, Du P, Han FM (2007) LC-MS for identification and elucidation of the structure of in-vivo and in-vitro metabolites of atropine. *Chromatographia* 65:413–418. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0187-9>
 - 1.30. Weston A, Brodmann P, Widmer M, Bartel J, Kübler E (2019) Development of a DNA-based assay to detect and quantify tropane alkaloids producing thornapple contaminations in processed food. *Chimia (Aarau)* 73:422–425. <https://doi.org/10.2533/chimia.2019.422>
 - 1.31. Jakabová S, Vincze L, Farkas Á, Kilár F, Boros B, Felinger A (2012) Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *J Chromatogr A* 1232:295–301. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.036>
 - 1.32. Boros B, Farkas Á, Jakabová S, Bacskay I, Kilár F, Felinger A (2010) LC-MS quantitative determination of atropine and scopolamine in the floral nectar of *Datura* species. *Chromatographia* 71:43–49. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1524-y>
 - 1.33. Cirlini M, Demuth TM, Biancardi A, Rychlik M, Dall’Asta C, Bruni R (2018) Are tropane alkaloids present in organic foods? Detection of scopolamine and atropine in organic buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) products by UHPLC–MS/MS. *Food Chem* 239:141–147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.028>

- 1.34. Jandrić Z, Rathor MN, Švarc-Gajić J, Maestroni BM, Sasanya JJ, Djurica R, Cannavan A (2011) Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of tropane alkaloids and glycoalkaloids in crops. *Food Additives and Contaminants - Part A* 28:1205–1219. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.584908>
- 1.35. Zhou J-L, Liu W, Guo Z-X, Chen B-L (2015) Fingerprint Analysis of *Datura* Flos Using Rapid Resolution Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Combined with Stoichiometry. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 38:137–142. <https://doi.org/10.1080/10826076.2014.896811>
- 1.36. Caligiani A, Palla G, Bonzanini F, Bianchi A, Bruni R (2011) A validated GC-MS method for the detection of tropane alkaloids in buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) fruits, flours and commercial foods. *Food Chem* 127:204–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.141>
- 1.37. Śramska P, Maciejka A, Topolewska A, Stepnowski P, Haliński ŁP (2017) Isolation of atropine and scopolamine from plant material using liquid-liquid extraction and EXTrelut® columns. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1043:202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.003>
- 1.38. Long Z, Zhang Y, Gamache P, Guo Z, Steiner F, Du N, Liu X, Jin Y, Liu X, Liu L (2018) Determination of tropane alkaloids by heart cutting reversed phase – Strong cation exchange two dimensional liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1072:70–77. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.064>
- 1.39. Shimshoni JA, Duebecke A, Mulder PPJ, Cuneah O, Barel S (2015) Pyrrolizidine and tropane alkaloids in teas and the herbal teas peppermint, rooibos and chamomile in the Israeli market. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32:2058–2067. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1087651>
- 1.40. Chen H, Marín-Sáez J, Romero-González R, Frenich AG (2017) Simultaneous determination of atropine and scopolamine in buckwheat

and related products using modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry Manuscript Draft

- 1.41. Temerdashev AZ, Kolychev IA, Kiseleva N V. (2012) Chromatographic determination of some tropane alkaloids in datura metel. *Journal of Analytical Chemistry* 67:960–966. <https://doi.org/10.1134/S1061934812120040>
- 1.42. Weinberger R (2000) *Practical Capillary Electrophoresis*, 2nd ed. Elsevier. ISBN 9780127423562
- 1.43. Ye N, Zhu R, Gu X, Zou H (2001) Determination of scopolamine, atropine and anisodamine in Flos daturae by capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography* 15:509–512. <https://doi.org/10.1002/bmc.112>
- 1.44. Holzgrabe U, Brinz D, Kopec S, Weber C, Bitar Y (2006) Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? *Electrophoresis* 27:2283–2292. <https://doi.org/10.1002/elps.200600016>
- 1.45. Bradbury ARM, Trinklein ND, Thie H, Wilkinson IC, Tandon AK, Anderson S, Bladen CL, Jones B, Aldred SF, Bestagno M, Burrone O, Maynard J, Ferrara F, Trimmer JS, Görnemann J, Glanville J, Wolf P, Frenzel A, Wong J, Koh XY, Eng HY, Lane D, Lefranc MP, Clark M, Dübel S (2018) When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *MAbs* 10:539–546. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1445456>
- 1.46. Xu J, Sun J, Lu X, Wang Y, Zhang Y, Sun X (2023) A highly sensitive fluorescence immunochromatography strip for thiacloprid in fruits and vegetables using recombinant antibodies. *Talanta* 256:. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124258>
- 1.47. Wang Z, Ma Q, Zheng P, Xie S, Yao K, Zhang J, Shao B, Jiang H (2023) Generation of broad-spectrum recombinant antibody and construction of colorimetric immunoassay for tropane alkaloids: Recognition mechanism and application. *J Hazard Mater* 459:. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132247>

- 1.48. Hulanicki A, Glab S, Ingman F (1991) Chemical sensors definitions and classification. *Pure Appl Chem* 63:1247–1250. <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>
- 1.49. Peltomaa R, Barderas R, Benito-Peña E, Moreno-Bondi MC (2022) Recombinant antibodies and their use for food immunoanalysis. *Anal Bioanal Chem* 414:193–217. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03619-7>
- 1.50. Benito-Peña E, Valdés MG, Glahn-Martínez B, Moreno-Bondi MC (2016) Fluorescence based fiber optic and planar waveguide biosensors. A review. *Anal Chim Acta* 943:17–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.049>
- 1.51. Peltomaa R, Benito-Peña E, Moreno-Bondi MC (2018) Bioinspired recognition elements for mycotoxin sensors. *Anal Bioanal Chem* 410:747–771. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0701-3>
- 1.52. Gonzalez-Flo E, Alaball ME, Macla J (2020) Two-Component Biosensors: Unveiling the Mechanisms of Predictable Tunability. *ACS Synth Biol* 9:1328–1335. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00010>
- 1.53. Kyrychenko A, Ladokhin AS (2024) Fluorescent Probes and Quenchers in Studies of Protein Folding and Protein-Lipid Interactions. *Chemical Record* 24. <https://doi.org/10.1002/tcr.202300232>
- 1.54. Galbán J, Sanz-Vicente I, Ortega E, Del Barrio M, De Marcos S (2012) Reagentless fluorescent biosensors based on proteins for continuous monitoring systems. *Anal Bioanal Chem* 402:3039–3054. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5715-2>
- 1.55. Crapnell RD, Banks CE (2021) Electroanalytical overview: The detection of the molecule of murder atropine. *Talanta Open* 4. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100073>
- 1.56. Khataee A, Hassanzadeh J, Kohan E (2018) Specific quantification of atropine using molecularly imprinted polymer on graphene quantum dots. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 205:614–621. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.07.088>

- 1.57. Nikel PI, Kim J, de Lorenzo V (2014) Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida*KT2440. *Environ Microbiol* 16:239–254. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12224>
- 1.58. Kato DI, Teruya K, Yoshida H, Takeo M, Negoro S, Ohta H (2007) New application of firefly luciferase - It can catalyze the enantioselective thioester formation of 2-arylpropanoic acid. *FEBS Journal* 274:3877–3885. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05921.x>
- 1.59. Domínguez M, Moraru D, Lasso S, Sanz-Vicente I, de Marcos S, Galbán J (2024) Colorimetric enzymatic rapid test for the determination of atropine in baby food using a smartphone. *Anal Bioanal Chem* 416:7317–7323. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05401-x>

Capítulo 2:

Presentación de la Tesis y objetivos.

2.1 Presentación y objetivos

Esta Tesis Doctoral se planteó en torno a dos objetivos generales.

Objetivo 1: *Resolver un problema analítico concreto: Desarrollo de métodos ópticos enzimáticos para la determinación de alcaloides del tropano (AT).*

En particular se desarrollarán métodos para el análisis de atropina y escopolamina, que pueden ser aplicados tanto en disolución como implementados en test rápidos o sensores de un solo uso. Como ya se verá, hay una cierta superposición en cuanto a los fundamentos y aplicaciones de los métodos desarrollados; sin embargo, cada uno de ellos tiene un origen y un propósito distinto.

Objetivo 2: *Ampliar el campo de aplicación de los métodos analíticos (implementados sobre sensores o no) basados en la generación in-situ de nanomateriales a reacciones enzimáticas que utilizan NAD como cofactor.*

Este segundo objetivo se superpone con el primero ya que todos los estudios irán al final dirigidos hacia la determinación de AT, pero durante su desarrollo irán apareciendo problemas que se pueden extrapolar de forma general a todas las reacciones enzimáticas de este tipo.

El presente capítulo tiene como propósito dar unas breves pinceladas acerca de cómo se fueron desarrollando estos objetivos, planteando para ello objetivos más específicos.

Es importante decir que esta Tesis se enmarca dentro de los proyectos de investigación “Generación enzimática de nanomateriales: Una estrategia innovadora en el desarrollo de biosensores ópticos para el control de calidad en alimentos” (PID2019-105408GB-I00) y “Estrategias analíticas singulares basadas en la formación in-situ de nanomateriales para la solución de problemas de salud alimentaria” (PID2022-139235OB-I00). Uno de los objetivos principales de estos proyectos es la puesta a punto de biosensores ópticos enzimáticos destinados al control de calidad en alimentos, específicamente de AT. La revisión bibliográfica mostró que las reacciones enzimáticas más importantes para AT consistían, como se ha desarrollado en el Capítulo 1, es una primera desesterificación con la enzima Tropolina Esterasa (TEasa) y una posterior reacción de oxidación por medio de la

Tropinona Reductasa (TRasa). No obstante, estas enzimas no se encontraban disponibles comercialmente, lo que planteó el primer objetivo específico de la Tesis.

Objetivo Específico 1: *Encontrar una ruta de degradación enzimática accesible que permita el desarrollo de una metodología para la determinación de alcaloides del tropano.*

El desarrollo de este objetivo dio lugar a unos resultados preliminares, realizados durante los inicios de esta Tesis, en los que se habían realizado experimentos con la enzima LKKRed (Lactobacillus Kefir Ketoreductasa), ampliamente empleada para el análisis de cetonas cíclicas, lo que la convertía en una posibilidad a tener en cuenta para el análisis de AT.

No obstante, tal y como se expone en el Capítulo 4, los resultados obtenidos con esta enzima no fueron adecuados como para justificar futuros estudios analíticos (desarrollo de una metodología en disolución y su implementación en test rápidos y biosensores) basados en ella. Tras diversas pruebas, finalmente se contactó con una empresa que sintetizó las enzimas TEasa y TRasa, con el objetivo de emplear la ruta encontrada en la bibliografía. Una vez conseguidas estas enzimas, surgió el siguiente objetivo específico de la Tesis:

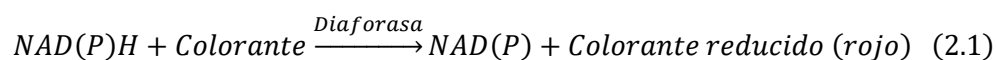
Objetivo Específico 2: *Caracterizar la enzima y desarrollar una metodología que permita la determinación enzimática de AT a partir de las propiedades intrínsecas de los compuestos involucrados en la reacción (NAD(P)H).*

Si bien existen enzimas que sufren cambios en su absorción o fluorescencia relacionados con la estructura de la propia enzima, las enzimas TEasa (Figura 1.4) y TRasa (Figura 1.5) no cuentan con estas propiedades intrínsecas. En este caso, la reacción que produce TRasa involucra al cofactor NAD(P)/NAD(P)H, por lo que, en primer lugar, se utilizaron las propiedades de absorción del NAD(P)H generado para el estudio de la reacción. Este objetivo fue desarrollado a lo largo del Capítulo 4 de esta Tesis.

Es importante indicar que las dos enzimas comentadas fueron desarrolladas específicamente para este trabajo. La TEasa no dio buenos resultados, pero la TRasa sí, por lo que se realizó también un estudio de caracterización cinética.

No obstante, la señal analítica de la metodología desarrollada tenía su máximo de absorción en 340 nm (espectro UV), lo que presentaba ciertos inconvenientes a la hora de aplicarlo en muestras reales, como una mayor exposición a efectos matriz y que la señal no pueda ser observada mediante detección visual. Con el fin de solucionar estos problemas, se abrieron dos alternativas diferentes que se fueron desarrollando y ampliando durante la Tesis.

La primera de ellas, tratada en el Capítulo 5, consistió en acoplar una reacción indicadora en la cual el NAD(P)H generado en la reacción de la TRasa redujera a un colorante, según:



Esta reacción dio pie al siguiente objetivo específico de esta Tesis:

Objetivo Específico 3: *Desarrollar un método enzimático colorimétrico para la determinación de AT, basado en el uso de la reacción enzimática con TRasa acoplada a una reacción indicadora.*

Se trataba de desarrollar métodos enzimáticos clásicos, empleado una reacción indicadora mediada por la enzima Diaforasa (NADH-deshidrogenasa), ya que al indagar acerca de este tipo de reacciones para AT, apenas se encontró información bibliográfica.

La metodología desarrollada en disolución se implementó posteriormente sobre soportes de celulosa, permitiendo una detección visual (método de criba) o una determinación cuantitativa de AT mediante la medida de las coordenadas RGB del test enzimático colorimétrico construido.

En cuanto a la segunda alternativa, desarrollada en los Capítulos 7 y 8 de esta Tesis, constituye la parte más innovadora de este trabajo desde el punto de vista metodológico y se enmarca dentro del Objetivo 2. Consistió en la sustitución de la reacción indicadora anterior por Au(III) (o por una mezcla Au(III)/Pt(II)) como reactivo indicador para que el NAD(P)H generado en la reacción enzimática redujera este metal dando lugar a la formación de AuNPs coloreadas. Esta reacción da lugar al siguiente objetivo específico de esta Tesis.

Objetivo Específico 4: *Estudiar la formación de AuNPs y AuPtNPs por mediada por NAD(P)H para su aplicación como reacción indicadora en la determinación de*

analitos que participen en una reacción mediada por una enzima NAD-dependiente.

Posteriormente, se implementó este método en soportes sólidos de celulosa similares a los ya comentados en el objetivo específico anterior, cuyos resultados se describen en el Capítulo 8. Por último, se estudió su implementación en polímeros de poliglicina (tectómeros), un nuevo tipo de soporte sólido para sensores que puede aportar aplicaciones interesantes en el campo de los sensores (Capítulo 9).

Los ciclos biológicos de formación de AT están altamente relacionados con diversos procesos fisiológicos de plantas y animales que involucran a otras sustancias, siendo las principales la putrescina y el 4-aminobutanal, que por otro lado tienen gran influencia en la calidad de alimentos. El desarrollo de sensores para el análisis simultáneo de estas permitirá obtener una visión más general de toda la problemática asociada a la toxicidad de los AT y de la calidad de los alimentos. Este tipo de estudios se lleva a cabo en el capítulo 10 y dan pie al último objetivo específico de la Tesis.

Objetivo Específico 5: *Desarrollar plataformas analíticas para la determinación de precursores de AT, a partir de una reacción enzimática colorimétrica, y por formación de nanomateriales.*

2.2 Estructura de la Tesis

Este apartado tiene como objetivo aportar una visión global acerca de la estructura de la presente Tesis, teniendo en cuenta los objetivos desarrollados en el apartado anterior. Como se puede observar en el índice, consta de 5 secciones principales; dentro de cada una de ellas se desarrollan diferentes capítulos según la temática de cada sección.

La **Sección I** desarrolla a lo largo de 3 capítulos los aspectos generales que definen el marco común de la Tesis, evitando así la repetición sucesiva de los mismos. De este modo, el Capítulo 1 incluye el contexto analítico de los alcaloides del tropano, el Capítulo 2 (actual) aborda los objetivos y la estructura de la Tesis, y el Capítulo 3 desarrolla los aspectos relacionados con los materiales y reactivos utilizados, así como la metodología experimental seguida.

La **Sección II** consta de dos capítulos. El primero de ellos (Capítulo 4), está formado por una primera parte en la que se describen los primeros estudios realizados en esta Tesis, una segunda en la que se lleva a cabo el estudio cinético de la enzima TRasa empleando diferentes sustratos, y una última que consiste en la puesta a punto de una metodología en disolución para la determinación de alcaloides del tropano por medio de la señal del NAD(P)H generado en la reacción enzimática. Por otra parte, en el Capítulo 5, este sistema de reacciones se acopla a una reacción colorimétrica con un colorante y se desarrolla un sensor para la determinación de alcaloides del tropano en muestras de alimentos.

En cuanto a la **Sección III**, se compone de cuatro capítulos. Incluye un capítulo inicial (Capítulo 6) en el que se realiza una descripción bibliográfica acerca de los principales usos de los nanomateriales en métodos ópticos enzimáticos desarrollados hasta la fecha. El Capítulo 7 desarrolla los resultados obtenidos al utilizar la síntesis de nanomateriales de oro por reacción con NAD(P)H para su implementación en reacciones enzimáticas y el Capítulo 8 incorpora los resultados del Capítulo 7 en la reacción de la enzima TRasa, con el fin último de desarrollar un sensor que permita la determinación de alcaloides del tropano. Por otra parte, el Capítulo 9 aborda el empleo de tectómeros como base para el desarrollo de nanosensores basados en las reacciones optimizadas en los dos capítulos anteriores, y suponiendo una alternativa a los soportes de celulosa.

En la **Sección IV**, se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de sensores ópticos para la determinación de putrescina y su aldehído, moléculas precursoras de los AT, recogidos en el Capítulo 10.

Por último, la **Sección V** muestra unas conclusiones generales de esta Tesis, así como los artículos publicados durante el desarrollo de la misma.

Capítulo 3:

Experimental

3.1 Reactivos y materiales

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

3.1.1 Reactivos

3.1.1.1 Precursores metálicos

- Ácido tetracloroáurico (CAS 27988-77-8) sólido de pureza 99.995% de Sigma-Aldrich.
- Acetato de paladio (CAS 3375-31-3) sólido de pureza 98% de Sigma-Aldrich.
- Nitrato de cobre trihidratado (CAS 10031-43-3) sólido de pureza 99-104% de Sigma-Aldrich.
- Nitrato de plata (CAS 7761-88-8) sólido de pureza $\geq 99\%$ de Sigma-Aldrich.
- Tetracloroplatinato (II) de potasio (CAS 10025-99-7) sólido de pureza 98% de Sigma-Aldrich.

3.1.1.2 Enzimas y proteínas

- Tropinona Reductasa (EC 1.1.1.206) de 8.8 mg/mL de Gecco.
- Tropina Esterasa (EC 3.1.1.10) de 4.9 mg/mL de Gecco.
- Diamino Oxidasa (EC 1.4.3.6) de extracto de planta (*Lathirus cicera*) disuelto en disolución amortiguadora 50 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6 de $\approx 169 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- Peroxidasa de rábano picante (HRP) (EC 1.11.1.7) de $\approx 150 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, sólido liofilizado de Sigma-Aldrich.
- Putrescina Oxidasa (EC 1.4.3.10) de 100 μM de Gecco.
- Seroalbúmina bovina (BSA) (EC 232.936.2) de Sigma-Aldrich.
- Tiramina Oxidasa (EC 1.4.3.6) de *Arthrobacter* sp. de $4.6 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, sólido liofilizado de Sekisui Diagnosis.

3.1.1.3 Sustratos

- Tropina (CAS-120-29-6) de pureza $\geq 97\%$ de Sigma-Aldrich.

- Sulfato de Atropina monohidrato (CAS-5908-99-6) de pureza $\geq 97\%$ de Sigma-Aldrich.
- Bromohidrato de Escopolamina (CAS-6533-68-2) de pureza $\geq 98\%$ de Sigma-Aldrich.
- β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido hidrato NAD (CAS-53-84-9) de pureza $\geq 99\%$ de Sigma-Aldrich.
- β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido hidrato reducida, como sal de disodio NADH (CAS-606-68-8) de pureza $\geq 97\%$ de Sigma-Aldrich.
- β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato hidrato NADP (CAS-53-59-8) de pureza $\geq 98\%$ de Sigma-Aldrich.
- β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato hidrato reducida, como sal de tetrasodio NADPH (CAS-2646-71-1) de pureza $\geq 98\%$ de Sigma-Aldrich.
- Clorhidrato de Tiramina (CAS-60-60-19) de pureza $\geq 98\%$ de Sigma-Aldrich.
- Diclorhidrato de Putrescina (CAS 333-93-7) de pureza $\geq 98\%$ de Sigma-Aldrich.
- Diclorhidrato de Cadaverina (CAS 1476-39-7) de pureza $\geq 98\%$ de Sigma-Aldrich.
- Diclorohidrato de Histamina (CAS 56-92-8) de pureza $\geq 98\%$ de Sigma-Aldrich.
- Tiramina (CAS 51-67-2) de pureza $\geq 98\%$ de Sigma-Aldrich.

3.1.1.4 Disoluciones amortiguadoras

- Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico hidratado (MES) de pureza $\geq 99.5\%$ de Sigma-Aldrich.
- Sales de NaHCO_3 y Na_2CO_3 grado ACS de Sigma-Aldrich.
- Sales de Na_2HPO_4 grado ACS de Sigma-Aldrich y NaH_2PO_4 de pureza 99% de Panreac.
- Sal de $\text{CH}_3\text{-COONa}$ grado ACS de pureza $\sim 100\%$ de VWR Chemicals.
- Amoniaco de pureza 30% (v/v) de Panreac (131130).
- Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) (CAS 201-064-4) de Panreac.

3.1.1.5 Colorantes

- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzolina-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.
- Cloruro de Iodonitrotetrazolio (INT)

3.1.1.6 Otros

- Ácido tricloroacético de Scharlab. Se prepara en disolución al 5%.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) de pureza 99.9% de Panreac.
- Peróxido de hidrógeno de pureza 33% (m/v) de Panreac.
- Etanol de pureza 99.5% (v/v) de Panreac.
- Metanol de pureza 99.9% (v/v) de Panreac.
- Ácido fórmico de pureza 98% (v/v) de Panreac.
- Ácido clorhídrico de pureza 37% (v/v) de Panreac.
- Hidróxido de sodio de pureza 99% (CAS 1310-73-2) de VWR Chemicals.
- Celulosa microcristalina en polvo de 20 μm (CAS 9004-34-6) de Sigma-Aldrich.
- Tectómero 2-tailed (2T) de pureza 95%, $(\text{C}_8\text{H}_{10}(-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{Gly}5)_2)_2\text{HCl}$, de PlasmaChem GmbH.
- Láminas de poli(ácido láctico), PLA.

3.1.2 Materiales

- Micropipetas Socorex y Eppendorf.
- Cubetas de vidrio, cuarzo y plástico de 1 cm de paso óptico.
- Cubetas de bajo volumen de plástico de 1 cm de paso óptico.
- Centrífuga MiniSpin, Eppendorf.
- pH-metro CRISON, Basic 20.
- Centrífuga LOCH, Bunsen.
- Balanza analítica AND modelo GR-202 (resolución 0.01 mg hasta 42 g).
- Filtros de centrífuga Amicon Ultra – 0.5/4 mL (UltraCell-10K Membrane), Millipore (UFC801024).
- Membrana de Nylon (ALBET-NY-045-25BL).

- 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 H₂O₂ (Quantofix 913-19).
- Baño ultrasonidos PSelecta, Precistern.
- Filtro óptico Kodak de corte (<400 nm).
- Placas de pocillos Nunc 96.

3.2 Instrumentación

3.2.1 Espectrofotómetros de Absorción Molecular UV-vis

Las medidas de absorción molecular se han realizado utilizando dos equipos diferentes: espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 465 y espectrofotómetro Specord 210 plus.

El Perkin Elmer Lambda 465 (Figura 3.1) permite medir entre 190 y 1100 nm utilizando dos lámparas, wolframio y deuterio, con una rendija de 1 nm. Contiene una red de fotodiodos (PDA) situado detrás del compartimento de muestra y una red de difracción. Al tratarse de un equipo de red de diodos, 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.

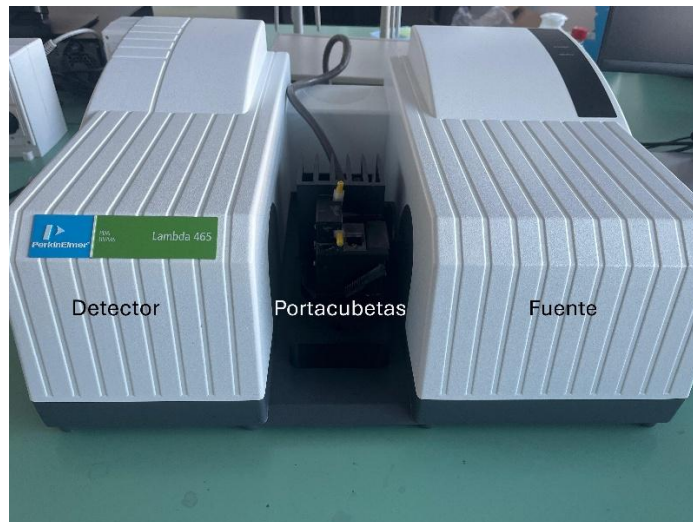


Figura 3.1: Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 465.

Este instrumento lleva acoplado un módulo Peltier de HP modelo 89090A (Figura 3.2) que permite realizar las medidas agitando y controlando la temperatura en la cubeta.



Figura 3.2: Peltier HP modelo 89090A.

Por otro lado, se ha utilizado el Specord 210 Plus (Figura 3.3) para poder realizar medidas cinéticas con varias cubetas a la vez, ya que contiene un portacubetas con capacidad para 8. 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 acoplar un baño de refrigerante para controlar la temperatura.



Figura 3.3: Espectrofotómetro Specord 210 Plus.

3.2.2 Fluorímetro

Las medidas de fluorescencia se han realizado utilizando un equipo Cary Eclipse de Agilent. El fluorímetro Cary Eclipse (Figura 3.4) 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 por el usuario.



Figura 3.4: Fluorímetro Cary Eclipse de Agilent.

Este equipo también ha sido empleado para realizar medidas de absorción en placas de pocillos empleando el lector de placas (Figura 3.5) y midiendo en el modo barrido sincrónico, siguiendo el procedimiento explicado más adelante en el apartado 3.5.3.



Figura 3.5: Fluorímetro Cary Eclipse con lector de placas.

3.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (STEM – HR-TEM)

Las imágenes de los nanomateriales han sido realizadas por el microscopio electrónico Tecnai F30-7650 (FEI), con voltajes de trabajo de 200 y 300 kV. Todas las medidas realizadas en este equipo fueron tomadas por el grupo de Microscopías Avanzadas, LMA, de la Universidad de Zaragoza.

3.2.4 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

La técnica XPS se fundamenta en la detección de los fotoelectrones emitidos por la superficie de la muestra al ser expuesta a un haz de rayos X. Permite obtener la concentración atómica de los elementos presentes en la superficie con una profundidad de análisis de aproximadamente 5 nm, además de obtener información relativa al estado químico de los elementos. Todas las medidas realizadas en este equipo fueron también tomadas por el grupo de Microscopías Avanzadas, LMA, de la Universidad de Zaragoza utilizando un espectrómetro XPS Kratos AXIS Supra, equipado con una fuente Mono Al K α 120W (8 mA / 15 kV).

3.3 Procedimientos de síntesis

3.3.1 Preparación de los soportes de celulosa con INT y diaforasa

Las suspensiones de celulosa del 5% (m/v) se preparan pesando 50 mg de celulosa de 20 μm en un vial, añadiendo los reactivos en las concentraciones optimizadas ($3.3 \cdot 10^{-3}$ M NAD, $3.9 \cdot 10^{-4}$ M INT y 0.67 U/mL de diaforasa) y finalmente agua milli-Q hasta un volumen final de 1 mL. De esta mezcla, se depositan 75 μL en la tapa de una placa de pocillos y se deja secar en la incubadora a 35°C durante aproximadamente 2 horas.

3.3.2 Preparación de los soportes de celulosa con Au(III)

En este caso las suspensiones de celulosa del 5% (m/v) se preparan pesando 50 mg de celulosa de 20 μm en un vial y añadiendo 980 μL de disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de pH 8 (0.1 M) y 20 μL de Au(III) $5 \cdot 10^{-2}$ M. 75 μL de esta mezcla se depositan en la tapa de una placa de pocillos y se deja secar en la incubadora a 30°C durante aproximadamente 2 horas.

3.3.3 Preparación de los soportes de celulosa con TMB y PuO

Las suspensiones de celulosa se preparan igual que en el apartado 3.5.1 pero sustituyendo los reactivos del apartado citado por TMB de concentración $6 \cdot 10^{-4}$ M y PuO 25 μM .

3.3.4 Inmovilización del Au(III) en láminas de PLA

Las láminas sensoras de Au(III)/tectómero se preparan depositando 20 μL de una premezcla de Au(III) y tectómero 2T de concentración $3.0 \cdot 10^{-3}$ M para ambas especies sobre láminas de poli(ácido láctico) (PLA), de un espesor de 250 μm y 10 mm de diámetro (Figura 3.6). Tras dejar secar las láminas en la incubadora durante una hora a 35°C, estas se sumergen en 600 μL de agua milli-Q durante 30 minutos para eliminar los reactivos depositados que no se hayan inmovilizado en la lámina.

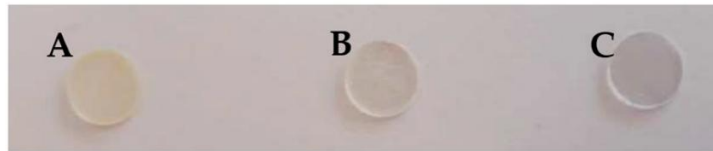


Figura 3.6: Au-Tect@PLA preparadas empleando una suspensión de concentración $3.0 \cdot 10^{-3}$ M de tectómero 2T y diferentes concentraciones de Au(III): **A)** $3.0 \cdot 10^{-3}$ M, **B)** $1.5 \cdot 10^{-3}$ M, **C)** 0 M; todas ellas a pH 6 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M).

3.4 Procedimientos de medida general

3.4.1 Medida de absorción molecular

Para las medidas de absorción molecular se utiliza una cubeta en el caso del Perkin Elmer 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 μL y así la dilución sea del 1%. En ocasiones se ha tenido que utilizar adiciones de mayor o menor volumen debido a que la forma en que están preparadas las muestras impide una mayor concentración o dilución.

La diferencia entre los dos equipos es que en el Agilent se realiza la referencia con una cubeta al comienzo de las medidas y en el Specord son necesarias dos cubetas, donde se deja de referencia durante las medidas.

3.4.2 Medida de 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 (normalmente 20 μL de cada uno de ellos). Posteriormente se seleccionan los parámetros instrumentales (W_{ex} , W_{em} , λ_{em} , λ_{ex} y V).

3.4.3 Medida de coordenadas RGB

Las medidas de las coordenadas RGB se toman por medio de un smartphone con la apk AppColorimetryV1, desarrollada en el grupo de investigación. Esta aplicación puede ser descargada de forma gratuita para sistemas operativos Android accediendo al siguiente link: https://drive.google.com/drive/folders/1Hub0fYkR0tabdXlaZeWeYzVL Dwll5KzC?usp=drive_link. Para ello, el smartphone se coloca sobre una caja de iluminación que cuenta con un soporte de apoyo y que ha sido desarrollada en el laboratorio (Figura 3.7). Este sistema permite que las condiciones de iluminación sean constantes en todas las medidas. En cuanto a la apk AppColorimetryV1, presenta un método de corrección que estandariza cada medida respecto a un sistema RGB común que reduce significativamente los errores inherentes a la medida y la varianza entre diferentes teléfonos móviles, logrando que las medidas sean comparables [3.1].

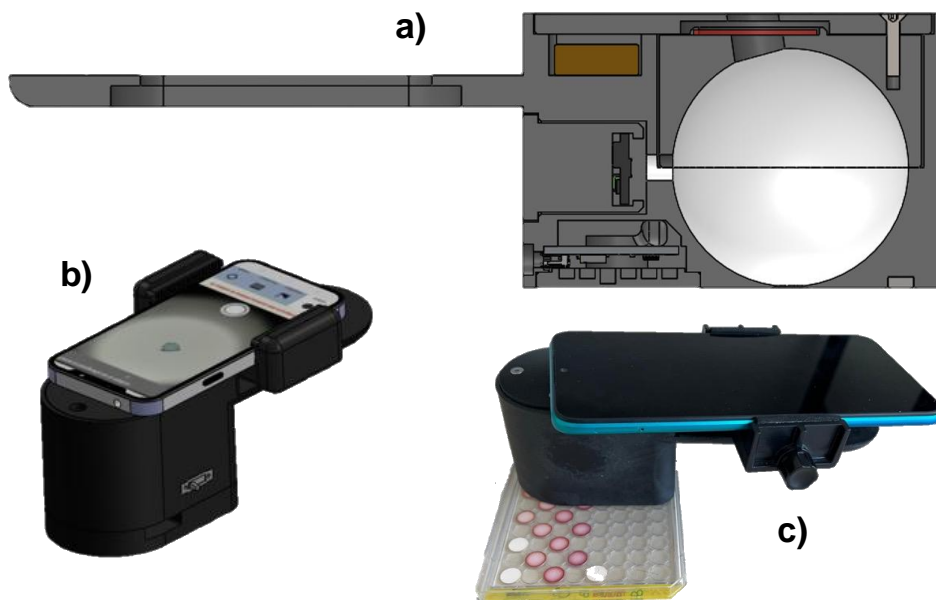


Figura 3.7: a) Esquema de la caja de iluminación. b) Caja de iluminación acoplada a un smartphone. c) Medidas tomadas sobre un soporte sólido con el dispositivo conjunto caja de iluminación-smartphone.

En cuanto a la coordenada elegida, en cada caso se escoge aquella que mejores resultados proporciona dependiendo del máximo de absorción del colorante o de las AuNPs formadas responsables de la señal analítica. En todos los casos, en lugar de emplear la coordenada como señal analítica, se emplea un parámetro como $C_0 - C$, ó $(C_0 - C)/C_0$, siendo C la coordenada R, G o B; y C_0 la coordenada R, G o B obtenida para el blanco. El empleo de estos busca normalizar las medidas con respecto al blanco de la reacción correspondiente.

3.5 Procedimientos específicos

3.5.1 Hidrólisis de atropina o escopolamina

Para llevar a cabo la hidrólisis de estos compuestos, 20 μL de la disolución estándar (o de la muestra) se mezclan con 20 μL de NaOH 2M. Tras reaccionar durante cinco minutos se añade la disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ de pH 10 (0.1 M) y la cantidad de NAD y enzima Tropinona Reductasa correspondiente hasta un volumen final de 2 mL.

3.5.2 Medida de tropina por formación de AuPtNPs

Para llevar a cabo estas medidas, es necesario pH 10 para la primera reacción (oxidación de la tropina), mientras que para la formación de AuPtNPs se requiere pH 7. Por ello, 20 μL de disolución estándar de tropina se mezclan con 200 μL de disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ de pH 10 (0.1 M), 40 μL de NAD(P) de concentración $5 \cdot 10^{-3}$ y 5 μL de Tropinona Reductasa 8.8 mg/mL. Esta mezcla, se deja reaccionar durante 5 minutos (tiempo suficiente para oxidar toda la tropina) y posteriormente se añaden 1675 μL de disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de pH 7 (0.1 M), 48 μL de Pt(II) $5 \cdot 10^{-2}$ M y 12 μL de Au(III) $5 \cdot 10^{-2}$ M (en ese orden). Destacar que, para realizar estas mismas medidas con atropina o escopolamina, es necesaria la etapa de hidrólisis previa explicada en el apartado 3.5.1.

3.5.3 Obtención de espectros de absorbancia por medidas de barrido sincrónico

Cuando se requieren muchas medidas de forma simultánea (principalmente para una optimización sistemática), y que a su vez conlleve un gasto mínimo de reactivos, es más conveniente el uso de placas de pocillos.

Como no se tuvo acceso a un instrumento específico que permitiera medir la absorción en este tipo de soportes durante la realización de esta Tesis, las medidas se realizaron con el fluorímetro utilizando la función de “barrido sincrónico”. Esta forma de medir permite irradiar la muestra a la misma longitud de onda a la que se recoge la luz emitida.

De este modo, el espectro de intensidad obtenido para la disolución de referencia se corresponde con $I_{0,\lambda}$ a cada longitud de onda mientras que $I_{t,\lambda}$ son las intensidades de la disolución de medida. De este modo, el espectro de absorción completo se calcula aplicando:

$$Abs_{\lambda} = -\log \frac{I_{t,\lambda}}{I_{0,\lambda}} \quad (3.1)$$

Para la determinación de NAD(P)H, se mezclan 240 μL de disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de pH 7 (0.1 M) con 30 μL de NAD(P)H de la concentración requerida y 30 μL de Au(III) y Pt(II) en la concentración correspondiente.

En cuanto a las medidas por “barrido sincrónico” de las Au-Tect@PLA, se procede del mismo modo, pero introduciendo la lámina en el correspondiente pocillo y añadiendo la disolución de analito sobre esta. En este caso, la señal de $I_{0,\lambda}$ se obtiene midiendo una lámina sobre la cual se ha añadido una disolución de agua milli-Q.

3.5.4 Determinación del Au(III) desprendido de las Au-Tect@PLA con bromuros

Para comprobar si el oro realmente queda adherido a la lámina de PLA, las Au-Tect@PLA se sumergen en 600 μL de agua milli-Q durante media hora. Después, se toman 500 μL del agua milli-Q en contacto con la Au-Tect@PLA y se pipetea a una cubeta junto con 200 μL de disolución amortiguadora de H_3PO_4 pH 2,

provocando este pH la desfuncionalización del tectómero [3.2]. Se añaden también sobre la cubeta 50 μ L de disolución de KBr de forma que la concentración de anión bromuro en la disolución de medida sea de 0.1 M. Por último, se llevan a cabo las medidas de las disoluciones preparadas en un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis en cubetas de bajo volumen, con las cuales se pueden realizar medidas empleando un volumen mínimo de 750 μ L.

3.6 Tratamiento de muestra

3.6.1 Tratamiento de la muestra de chía

Se aplica el método desarrollado por Adamse [3.3]. Se pesan 4 g de chía, se trituran y se lixivian con 40 mL de una mezcla de metanol/agua/ácido fórmico en proporciones 60/40/0.4 (V/V/V) durante media hora. Después, una alícuota de 4 mL del sobrenadante se ultrafiltra a través de un filtro de centrifuga de 10 kDa. Por último, el volumen de esta alícuota necesario para preparar la disolución de medida, se somete al procedimiento de hidrólisis explicado en el apartado 3.4.1.

3.6.2 Tratamiento de la muestra de trigo sarraceno (I)

1.5 g de semillas de trigo sarraceno trituradas se lixivian con 30 mL de agua milli-Q en un vaso de precipitados durante media hora. Después, el lixiviado de la muestra se centrifuga a 6000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras decantar el sobrenadante obtenido tras la centrifugación, se añade disolución de NaOH hasta alcanzar un pH básico (en torno a 13, para que se produzca la hidrólisis de la atropina), y se vuelve a centrifugar durante otros 20 minutos en las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante se neutraliza mediante la adición de HCl y se filtra por gravedad. La disolución resultante se lleva a un volumen final de 50 mL mediante la adición de agua milli-Q.

3.6.3 Tratamiento de la muestra de trigo sarraceno (II)

En este caso se aplica de nuevo el método de Adamse [3.3]. Se pesan 4 g de trigo sarraceno, se trituran y se lixivian con 40 mL de una mezcla de metanol/agua/ácido fórmico en proporciones 60/40/0.4 (V/V/V) durante media hora. Después, una alícuota de 4 mL del sobrenadante se ultrafiltra a través de un filtro de centrifuga de 10 kDa. Sobre las muestras tratadas por esta metodología

es necesario aplicar el procedimiento de hidrólisis de la atropina explicado en el apartado 3.4.1, ya que no se han sometido a una etapa de hidrólisis previa, a diferencia del anterior tratamiento.

3.7 Bibliografía

- 3.1. Capitán-Vallvey LF, Palma AJ (2011) Recent developments in handheld and portable optosensing-A review. *Anal Chim Acta* 696:27–46
- 3.2. Garriga R, Jurewicz I, Romero E, Jarne C, Cebolla VL, Dalton AB, Muñoz E (2016) Two-Dimensional, pH-Responsive Oligoglycine-Based Nanocarriers. *ACS Appl Mater Interfaces* 8:1913–1921. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b10077>
- 3.3. Adamse P, Van Egmond HP (2010) Project number: 1207272001 Project title: Method development and analysis of mycotoxins and phycotoxins in food Tropane alkaloids in food

SECCIÓN

II

Capítulo 4: Estudio analítico y cinético fundamental de la Tropinona Reductasa

Capítulo 5: Desarrollo de un sensor enzimático colorimétrico para alcaloides del tropano

Capítulo 4:

Estudio analítico y cinético fundamental de la Tropinona Reductasa

4.1 Primeros estudios: Búsqueda de una reacción enzimática adecuada

Como se ha explicado en el Capítulo 1, las reacciones enzimáticas desarrolladas en esta Tesis pueden ser evaluadas mediante el uso de sensores enzimáticos colorimétricos. La combinación de la selectividad que caracteriza a una reacción enzimática con la sensibilidad y robustez de la absorción molecular UV-vis conforman un grupo de métodos analíticos muy empleados para la determinación de compuestos de naturaleza orgánica [4.1]. 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 [4.2].

Desde un punto de vista metodológico, estos métodos se pueden clasificar en dos grupos:

1. Empleo de las propiedades intrínsecas de la reacción (Capítulo 4).
2. Uso de una reacción auxiliar que genere cambios espectroscópicos asociados a un cambio de color (Capítulo 5).

En el primero de los casos, se emplea el cambio de absorbancia sufrido por un reactivo participante en la reacción o un cofactor de la enzima implicada; mientras que, en el segundo, es un colorante el que produce el cambio en el espectro de absorción.

Numerosos estudios previos a esta Tesis han empleado las propiedades espectroscópicas del cofactor NAD/NADH para la determinación de analitos implicados en una reacción mediada por una enzima deshidrogenasa, como puede ser la determinación de alcoholes empleando la enzima alcohol deshidrogenasa [4.3, 4.4]. Estas determinaciones se basan en las diferencias espectroscópicas entre la forma oxidada y la reducida de este cofactor y fue la primera opción que se estudió en esta Tesis para la determinación de alcaloides del tropano.

4.1.1 Posibilidades analíticas del cofactor NAD(P)/NAD(P)H

La forma reducida de la molécula de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y de su éster fosfato (NADPH) son cofactores enzimáticos con una gran importancia a nivel celular debido a su participación en numerosos procesos metabólicos, como funciones mitocondriales, inmunitarias, biosíntesis, expresión

génica, muerte celular o envejecimiento [4.5–4.9]. Los pares NADH/NAD^+ y $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ son portadores de electrones clave en las células, permitiendo la transferencia de átomos de hidrógeno y electrones de un metabolito a otro en muchas reacciones redox celulares [4.10]. Debido a su enorme presencia en reacciones enzimáticas que implican moléculas importantes a nivel vital, son cofactores muy interesantes desde el punto de vista analítico.

En cuanto a sus propiedades espectroscópicas, tanto la forma reducida como la oxidada de ambos pares cuentan con una banda de absorción molecular cuyo máximo se sitúa en torno a 260 nm, con un valor de ϵ igual a $14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [4.11] en disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de concentración 0.1 M. No obstante, al mantenerse constante esta banda durante la reacción redox, realmente carece de interés analítico.

Sin embargo, el espectro de absorción de ambas formas reducidas del cofactor (NADH y NADPH) tiene otra banda con un máximo de absorción en 340 nm ($\epsilon=6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de concentración 0.1 M [4.12]) que permite diferenciarlas de las formas oxidadas, posibilitando la monitorización de la reacción enzimática por medio de la medida del cambio de absorbancia a esa longitud de onda. El espectro de absorción de ambas moléculas se puede ver en la Figura 4.1.

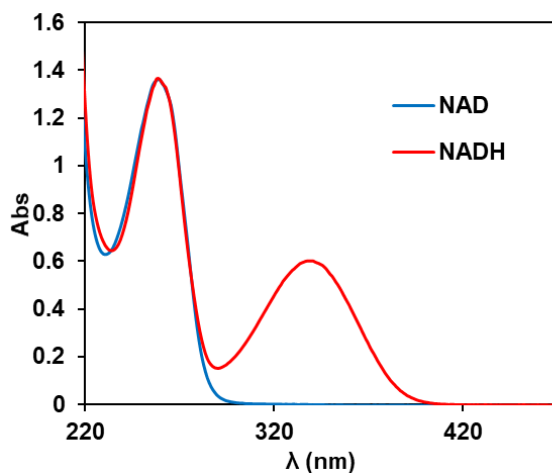


Figura 4.1: Espectro obtenido en la medida de una disolución de NAD y otra de NADH, ambas en agua y de la misma concentración. Los espectros obtenidos para el NADP/NADPH son idénticos.

En cuanto a las propiedades fluorescentes, ocurre una situación similar. La forma oxidada de ambos cofactores no es fluorescente, mientras que la reducida cuenta con un máximo de fluorescencia a 460 nm, como se ve en los espectros de la Figura 4.2.

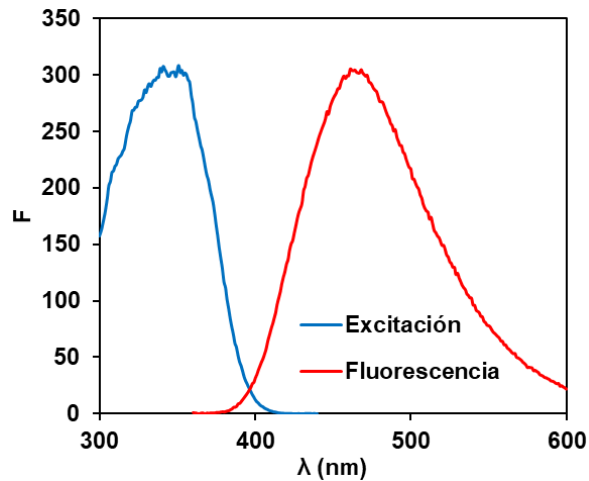


Figura 4.2: Espectro de excitación y de fluorescencia obtenidos para la disolución de NADH de la Figura 4.1. Los obtenidos para una disolución de la misma concentración de NADPH son idénticos.

Las propiedades de absorción del NAD(P)H han sido utilizadas a lo largo de este capítulo para la determinación de atropina y escopolamina siguiendo la ruta de degradación explicada en el Capítulo 1.

En cuanto a las propiedades fluorescentes del NAD(P)H, se emplean igualmente en este capítulo para llevar a cabo la determinación de atropina.

4.1.2 Estudios previos: Empleo de la enzima LKKRed

A pesar de que, como se ha citado en el Capítulo 1, la ruta de degradación más factible para la atropina emplea las enzimas Tropina Esterasa y Tropinona Reductasa; estas enzimas no se encontraban disponibles a nivel comercial, por lo que se buscó una opción diferente.

Se contactó con el Dr. Fernando López-Gallego (investigador en el CIC Biomagune), experto en el desarrollo y síntesis de enzimas, y se le planteó si alguna de las enzimas que él había sintetizado podría ser de utilidad para abordar este problema analítico. En esos momentos, el Dr. López-Gallego disponía de la

enzima *Lactobacillus kékfir* ketoreductasa (LKKRed, también conocida como *Lactobacillus kékfir* alcohol deshidrogenasa), enzima deshidrogenasa capaz de reducir cetonas como la 1-etoxi-3-hidroxipropan-2-ona [4.13], la 3-tiociclopentanona o la 3-oxaciclopentanona [4.14], compuestos muy empleados en la industria química y farmacéutica al ser precursores de una gran cantidad de fármacos. La utilidad de esta enzima radica en sus propiedades enantioselectivas, que permite emplearla tanto para la separación de mezclas racémicas [4.13] como en biocatálisis para la reducción estereoselectiva de cetonas [4.14]. La reacción que produce (Figura 4.3), involucra al cofactor NAD(P)H por lo que la oxidación o reducción del sustrato que participe en la reacción podrá monitorizarse por medio de los cambios espectroscópicos del cofactor.

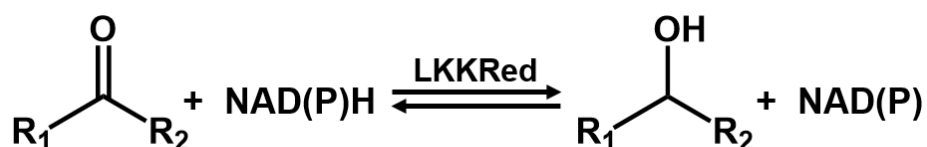


Figura 4.3: Esquema de la reacción catalizada por la enzima LKKRed.

Sugirió que esta enzima podría ser adecuada para este propósito, considerando la estructura del analito y su experiencia sobre el funcionamiento de la misma. Esto se basaba en resultados de numerosos estudios publicados, que avalaban el funcionamiento de esta enzima con un elevado número de cetonas cíclicas, lo que la convertía en una posibilidad atractiva para la determinación de tropina [4.13, 4.15] (primer intermedio en la ruta de degradación de la atropina), al ser su forma oxidada (tropinona) una molécula con estas características.

La enzima que proporcionó se encontraba disuelta en una mezcla de agua y glicerol, añadido este último para aportar estabilidad a la enzima. No obstante, este compuesto es capaz de reaccionar con el NAD provocando su reducción y, en consecuencia, actuando como una interferencia de la reacción que se quería estudiar. De este modo, previamente a utilizar la enzima, fue necesario eliminar el glicerol de la disolución.

El procedimiento para eliminar el glicerol consistió en una centrifugación durante 20 minutos empleando un centrifugador™ de 10kD. Una vez completada la centrifugación y eliminado el disolvente, se lavó la enzima un total de tres veces

con agua milli-Q para, finalmente, redissolverla en el mismo volumen, pero únicamente con agua milli-Q. La disolución de enzima resultante fue la que finalmente se empleó para llevar a cabo el estudio de la reacción.

Se realizó un primer experimento empleando unas concentraciones de NAD y tropina de $3.00 \cdot 10^{-3}$ M y $3.00 \cdot 10^{-2}$ M, respectivamente; y una concentración de enzima de 0.05 U/mL. Con estas condiciones y a 25°C, se hizo un estudio del pH, obteniendo que la reacción funcionaba mejor a pH 7.5.

No obstante, tras varios ensayos variando temperatura y concentraciones de reactivos, se observó que, si se disminuía la concentración de analito a rangos más adecuados para su análisis en alimentos, esta reacción no tenía lugar. Además, la reacción funcionaba exactamente igual sin la necesidad de añadir la enzima, por lo que se concluyó finalmente que la tropina no actúa como sustrato de la enzima LKKRed.

Dado que los resultados fueron negativos se contactó con la empresa biotecnológica Gecco™, cuyo ámbito profesional es desarrollar enzimas por medio de la expresión génica de estas en bacterias. Así, se consiguieron finalmente nuevas variantes sintéticas de las enzimas Tropinona Reductasa y Tropina Esterasa para proseguir el estudio. Todos los resultados que se muestran a continuación se obtuvieron con estas enzimas.

4.1.3 Tropinona Reductasa

La Tropinona Reductasa (TRasa) es, como se ha avanzado en el Capítulo 1, una enzima que cataliza la oxidación de la molécula de tropina a tropinona empleando como cofactor NAD(P) (Figura 4.4). Como producto se obtiene una molécula de NAD(P)H, por lo que la reacción se puede evaluar realizando un seguimiento de los cambios espectroscópicos de este cofactor.

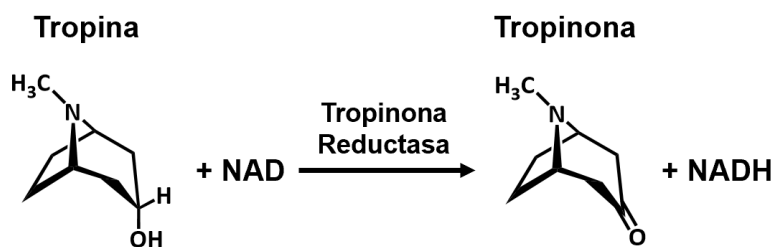


Figura 4.4: Reacción de oxidación de la tropina, por la cual se transforma a tropinona reduciendo el NAD a NADH.

Al no encontrarse datos previos acerca de la enzima, en primer lugar, se realizaron una serie de ensayos previos encaminados a encontrar unas condiciones iniciales de partida representativas. Finalmente, se eligieron una concentración de NAD igual a $1.00 \cdot 10^{-3}$ M y una concentración de tropina de $1.00 \cdot 10^{-4}$ M en disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M a pH 7.5. Como concentración de enzima se empleó 0.022 mg/mL y la temperatura fue de 30°C.

Para demostrar que la señal de absorción obtenida corresponde con la reacción esperada, se hicieron todas las combinaciones posibles del blanco de la reacción, eliminando en cada caso uno de los reactivos añadidos. Los espectros obtenidos para los blancos se muestran en la Figura 4.5.

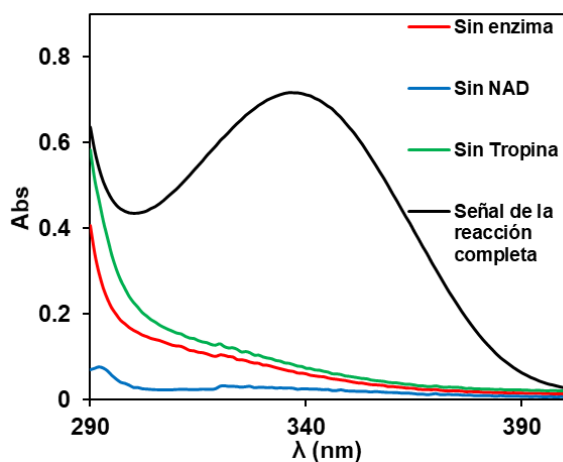


Figura 4.5: Blancos de la reacción en comparación con la señal de la reacción completa.

La única señal que aparece en estos espectros se corresponde con la banda de absorción del NAD (cuyo máximo se encuentra en torno a 260 nm), observable siempre al encontrarse en exceso.

Como los resultados obtenidos en estos estudios previos concordaban con la reacción esperada, fue esta enzima la que finalmente se escogió para el análisis de atropina empleando la ruta de degradación de la tropina.

4.1.4 Tropina Esterasa

Como se ha explicado en el Capítulo 1, la enzima Tropina Esterasa (TEasa) cataliza la reacción de desesterificación de la molécula de atropina, dando lugar a otras dos moléculas: ácido trópico y tropina (Figura 4.6). No obstante, esta enzima no cuenta con propiedades intrínsecas de absorción, por lo que, para estudiarla, fue necesario acoplarla a la reacción de oxidación de la tropina, explicada en el apartado 4.1.3, y monitorizarla por medio de la señal del NADH generado en esta segunda reacción.

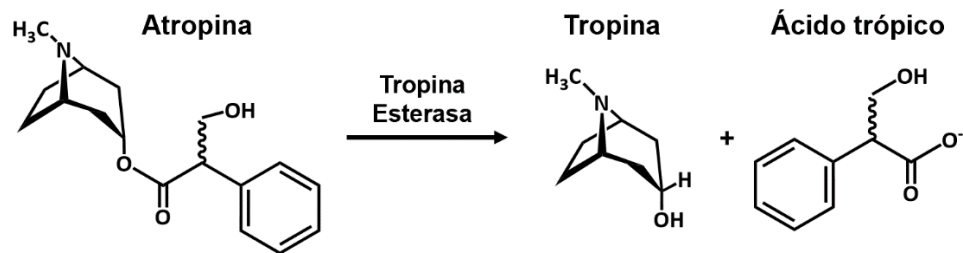


Figura 4.6: Reacción de desesterificación de la atropina.

Tras realizar unas primeras pruebas variando tanto temperatura como pH y concentración de enzima, no se consiguió observar ninguna reacción. De este modo, se plantearon dos posibles hipótesis:

1. La TEasa inhibe a la TRasa o viceversa.
2. La enzima cuenta con impurezas que provocan su inhibición.

Para comprobar la primera hipótesis, se estudió por un lado que la adición de TEasa sobre la segunda reacción no inhibía la oxidación de la tropina; y por otro, la adición de forma secuencial de ambas enzimas, dando tiempo a que la TEasa actúe antes de que se añadiera la TRasa. Tras realizar ambas comprobaciones, la reacción continuaba sin funcionar.

En cuanto a la segunda hipótesis, para comprobarla se purificó la enzima por medio de una ultrafiltración, sin obtener buenos resultados.

Tras contactar con la casa comercial, se decidió dejar incubando la enzima junto con otra enzima llamada SUMO Proteasa y mercaptoetanol. Esta enzima catalizaba la separación del grupo SUMO de la enzima.

Una vez realizado este tratamiento sobre la enzima, se estudió de nuevo si esta funcionaba al acoplarla a la reacción de oxidación de la tropina, formándose esta vez NADH como producto de esta segunda reacción, indicando que en estas condiciones la TEasa funcionaba. No obstante, la reacción producida era muy lenta y poco eficaz.

De este modo, se buscó llevar a cabo la etapa de hidrólisis de forma química, observándose que se podía obtener el mismo resultado hidrolizando la atropina en una disolución alcalina con hidróxido de sodio. Además, al llevar a cabo la hidrólisis en medio básico, el tiempo de reacción era de unos minutos mientras que, si esta reacción se catalizaba con la TEasa, tardaba en torno a 6 horas. Por este motivo, se procedió a utilizar esta reacción dejando de lado el uso de la TEasa.

4.1.5 Empleo de la ruta de degradación para el análisis de escopolamina

Tras haber encontrado la ruta de degradación apropiada para la determinación de atropina, se quiso comprobar si esta misma era apta para el análisis de escopolamina, mediante el empleo de una hidrólisis sobre la molécula de escopolamina (Figura 4.7) y la posterior reacción con tropinona reductasa y NAD de la molécula de escopina obtenida (Figura 4.8).

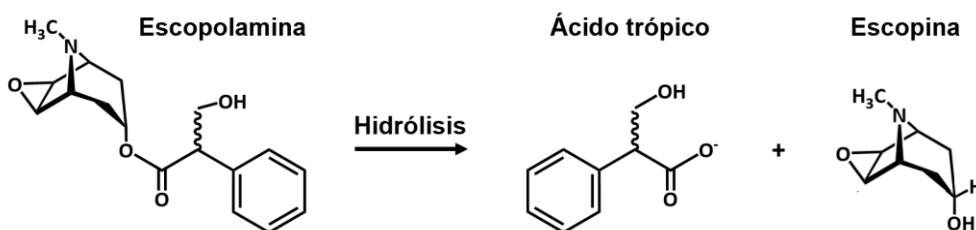


Figura 4.7: Reacción de hidrólisis de la escopolamina.

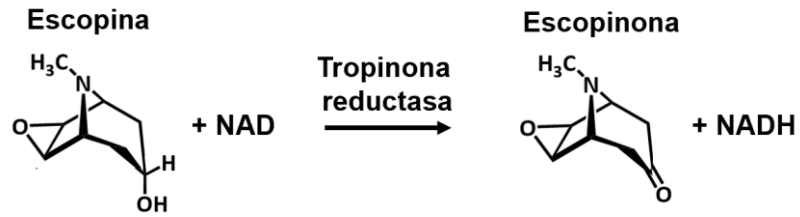


Figura 4.8: Reacción de oxidación de la escopina, por la cual se transforma a escopinona reduciendo el NAD a NADH.

Para ello, se hicieron los mismos estudios previos realizados con tropina y atropina sobre las moléculas de escopina y escopolamina.

En primer lugar, se comprobó que la escopina reaccionaba con tropinona reductasa y NAD dando lugar a la aparición de NADH, empleando las mismas condiciones que las utilizadas con la tropina; es decir, una concentración de NAD igual a $1.00 \cdot 10^{-3}$ M y una concentración de escopina de $1.00 \cdot 10^{-4}$ M en disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M a pH 7.5. Como concentración de enzima se empleó 0.022 mg/mL y la temperatura fue de 30°C . El espectro obtenido se muestra en la Figura 4.9 junto con los blancos de la reacción.

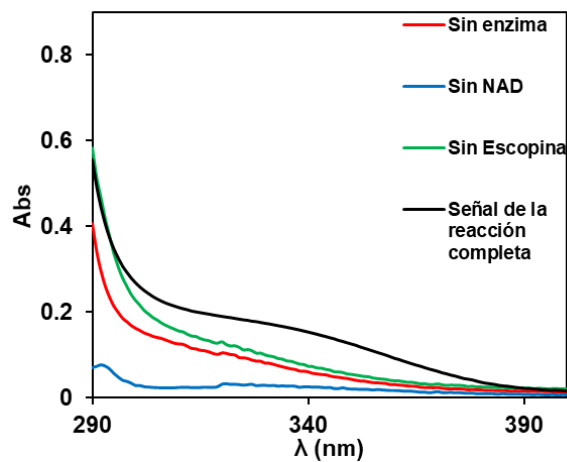


Figura 4.9: Blancos de la reacción en comparación con la señal de la reacción completa empleando escopina.

Como se observa en la Figura 4.9, la escopina actúa como sustrato de la enzima, aunque la reacción es menos eficaz que con la tropina.

Por último, se comprobó la hidrólisis de la escopolamina tanto con la enzima TEasa como con hidróxido de sodio, observándose en este caso los mismos resultados que los obtenidos con la atropina; es decir, que la hidrólisis se producía mucho más rápido (unos pocos minutos) por reacción con hidróxido de sodio que por reacción con la enzima (varias horas).

Estos primeros estudios muestran que la determinación de escopolamina y atropina es posible empleando la ruta de degradación de las enzimas TEasa y TRasa. No obstante, la reacción de hidrólisis en ambos analitos tiene lugar mucho más rápido por reacción con NaOH que por reacción con la enzima TEasa.

Partiendo de estos resultados previos, a lo largo de este capítulo se estudian en profundidad estas reacciones para el desarrollo de una metodología para la determinación de atropina y escopolamina.

Se presenta, en primer lugar, el estudio cinético de la enzima TRasa junto con el cálculo de sus constantes cinéticas empleando como analito tanto tropina como escopina. Más adelante, se evalúa el método para el análisis de atropina, que a su vez es extrapolable al análisis de tropina, tanto por absorción molecular como por fluorescencia. Por último, se estudia la aplicación de este método al análisis de escopolamina, así como al análisis de mezclas que contengan ambos analitos, desarrollando una metodología que permita diferenciarlos.

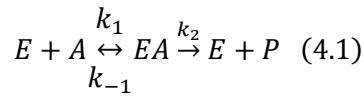
4.2 Estudio de la cinética de la Tropicóna Reductasa

4.2.1 Revisión de los modelos matemáticos descritos

Los mecanismos que regulan la cinética enzimática son un tema de gran importancia en diversas áreas de la Ciencia y la Tecnología. A lo largo de la historia, se han desarrollado diversos modelos matemáticos para describir el comportamiento cinético de las diferentes reacciones enzimáticas en función de la cantidad de sustrato, de enzima, del pH o del número de sustratos que intervengan.

El modelo cinético más conocido para representar el desarrollo de una reacción en la que una enzima (E) cataliza la reacción de un sustrato (A) hacia un producto

(P) viene representado por una reacción en dos pasos, que implica la formación de un intermedio (EA), según:



Michaelis y Menten (en 1913), propusieron su resolución (a partir de una idea previa enunciada por Henri en 1903), considerando que la formación del complejo EA era un equilibrio de constante K_s (4.2). Posteriormente, Briggs y Haldane (en 1925) dieron una resolución alternativa desarrollando el concepto de estado estacionario para la especie EA, según la cual su concentración permanece constante en el proceso (4.3). Esta última es la formulación más extendida para modelar la cinética de una reacción enzimática; pero denominándola, curiosamente, cinética de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = \frac{k_2[E]_0[A]}{K_s + [A]} \quad (4.2)$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = \frac{k_2[E]_0[A]}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right) + [A]} \quad (4.3)$$

Este modelo cinético asume que en la reacción enzimática solo participa un sustrato, lo que en la mayoría de las reacciones enzimáticas no es correcto. Ahora bien, si uno de los sustratos se encuentra en exceso (como ocurre, por ejemplo, en reacciones de hidrólisis llevadas a cabo en medio acuoso), se puede incluir su concentración dentro de una constante de velocidad aparente del correspondiente proceso.

Este apartado aborda el estudio de la cinética de la TRasa, por lo que se centra en el estudio de los mecanismos cinéticos que habitualmente describen las reacciones en las que intervienen dos sustratos: mecanismo de complejos binarios por sustitución y mecanismo de formación de complejos ternarios de orden obligatorio.

4.2.1.1 Complejos binarios por sustitución (mecanismo Ping-Pong)

En este mecanismo las reacciones con los dos sustratos y la liberación de los productos se producen de manera consecutiva. Es decir, entra el primer sustrato (A) y se produce el primer producto (P), que es liberado dejando a la enzima en una forma química diferente (E*). A continuación, entra el segundo sustrato (B), restituyendo la enzima a su forma original (E) mediante su transformación en un nuevo producto (Q). Este mecanismo se representa de forma desarrollada en el diagrama cuadrangular de la Figura 4.10A) y de forma esquemática en el diagrama de Cleland de la Figura 4.10B).

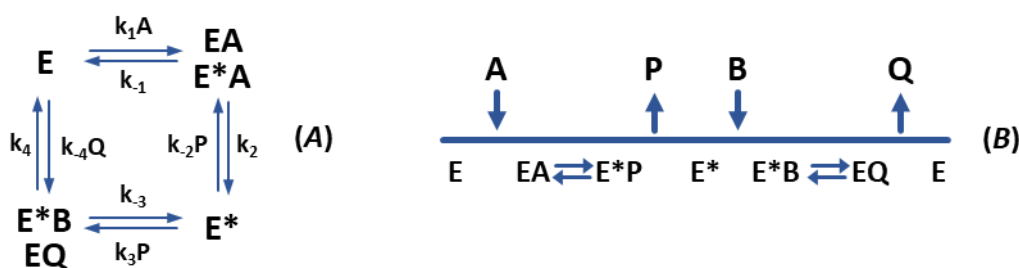


Figura 4.10: Representación del mecanismo Ping-Pong: **A)** Diagrama cuadrangular. **B)** Diagrama de Cleland.

La ecuación de velocidad general que describe este modelo es:

$$v = \frac{\frac{V_+ AB}{K_{iA} K_{mB}} - \frac{V_- PQ}{K_{iP} K_{mQ}}}{\frac{A}{K_{iA}} + \frac{K_{mAB}}{K_{iA} K_{mB}} + \frac{P}{K_{iP}} + \frac{K_{PQ}}{K_{iP} K_{mQ}} + \frac{AB}{K_{iA} K_{mB}} + \frac{AP}{K_{iA} K_{iP}} + \frac{K_{mABQ}}{K_{iA} K_{mB} K_{iQ}} + \frac{PQ}{K_{iP} K_{mQ}}} \quad (4.4)$$

Donde:

- v es la velocidad de la reacción, expresada como la velocidad de aparición de un producto a lo largo del tiempo.
- V_+ y V_- son la velocidad límite que se puede obtener en el sentido directo e inverso de la reacción, respectivamente. Estas velocidades vienen dadas por:

$$V_+ = k_{cat}[E]_0 \quad V_- = k'_{cat}[E]_0 \quad (4.5)$$

donde $[E]_0$ es la concentración de enzima, y k_{cat} y k'_{cat} son las constantes catalíticas (capacidad global de una enzima para catalizar un proceso) en

las direcciones directa e inversa; estas se obtienen a partir de las constantes de velocidad de disociación de los dos productos de la reacción.

- A y B son las concentraciones de sustratos; y P y Q las concentraciones de productos.
- K_{mA} , K_{mB} , K_{mP} y K_{mQ} son las constantes de Michaelis-Menten para cada uno de los sustratos y productos. En términos generales se obtienen como el cociente entre la suma de las constantes de velocidad de sus correspondientes procesos de desaparición entre la constante de velocidad del proceso de aparición directo en cada caso. Por ejemplo, para A y Q de la reacción (4.10) serían:

$$K_{mA} = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_1} \quad K_{mQ} = \frac{k_{-3} + k_{-4}}{k_4} \quad (4.6)$$

- K_{iA} , K_{iB} , K_{iP} y K_{iQ} son las constantes de los procesos de inhibición que coinciden con el inverso de la constante de formación de su correspondiente complejo con la enzima. Por ejemplo, para A y Q:

$$K_{iA} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad K_{iQ} = \frac{k_{-4}}{k_4} \quad (4.7)$$

A tiempos iniciales en los cuales se considera que la concentración de productos (P y Q) es igual a cero, la ecuación (4.4) se puede escribir como:

$$v = \frac{V_{lim}[A]_0[B]_0}{K_a[B]_0 + K_b[A]_0 + [A]_0[B]_0} = \frac{k_{cat}[E]_0[A]_0[B]_0}{K_a[B]_0 + K_b[A]_0 + [A]_0[B]_0} \quad (4.8)$$

Donde, para este caso:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4} \quad (4.9)$$

$[A]_0$ y $[B]_0$ representan las concentraciones iniciales de cada uno de los sustratos.

En estas condiciones se cumple que la concentración de producto formado en cada instante (de este intervalo de tiempos iniciales) es:

$$[P] = \frac{V_{lim}[A]_0[B]_0}{K_B[A]_0 + K_A[B]_0 + [A]_0[B]_0} t \quad (4.10)$$

Dado que en esta reacción se forma NADH como producto, que tiene buenas propiedades de absorción y fluorescencia, esta ecuación permite relacionar esas señales con la concentración de ambos sustratos.

4.2.1.2 Formación de complejos ternarios (orden obligatorio)

Tiene lugar en las reacciones en las que la enzima se encuentra formando un complejo con los dos sustratos al mismo tiempo. Estos complejos se forman siguiendo la secuencia:

1. La enzima se une al primer sustrato.
2. La enzima se une al segundo sustrato.
3. Se produce la reacción.
4. La enzima libera al primer producto.
5. La enzima libera al segundo producto.

Existen dos variantes de este modelo en función de si los dos sustratos se pueden unir en cualquier orden a la enzima (orden aleatorio), como ocurre en el caso de las enzimas transferasas, o siguen un orden de unión prefijado (orden obligatorio), como indica la Figura 4.11, que es el habitual en el caso de las enzimas NAD-dependientes, en las cuales la molécula de NAD se une primero [4.16].

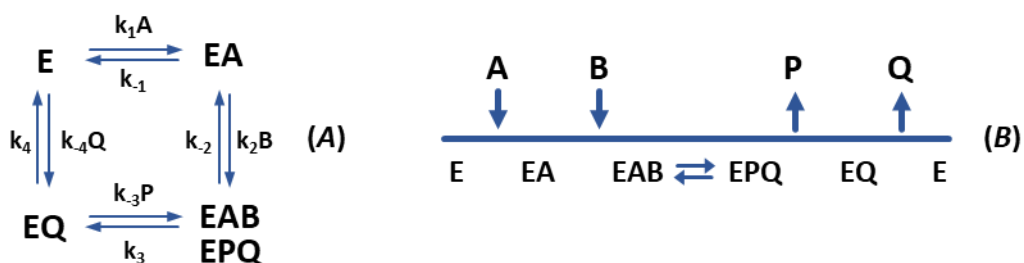


Figura 4.11: Representación del mecanismo de formación de complejos ternarios de orden obligatorio: **A)** Diagrama cuadrangular. **B)** Diagrama de Cleland.

En este modelo, la velocidad viene dada por la siguiente ecuación:

$$v = \frac{\frac{V+AB}{K_{iA}K_B} - \frac{V-PQ}{K_{iQ}K_P}}{1 + \frac{A}{K_{iA}} + \frac{K_{AB}}{K_{iA}K_B} + \frac{K_{QP}}{K_{iQ}K_P} + \frac{Q}{K_{iQ}} + \frac{AB}{K_{iA}K_B} + \frac{ABP}{K_{iA}K_{iP}K_B} + \frac{K_{ABQ}}{K_{iA}K_BK_{iQ}} + \frac{PQ}{K_{iQ}K_P} + \frac{K_{QAP}}{K_{iA}K_{iQ}K_P} + \frac{BPQ}{K_{iB}K_{iQ}K_P}} \quad (4.11)$$

Del mismo modo que en el apartado anterior, teniendo en cuenta que a tiempos iniciales no se han formado productos se obtiene:

$$v = \frac{k_{cat}[E]_0[A]_0[B]_0}{K_a[B]_0 + K_b[A]_0 + [A]_0[B]_0 + K_{iA}K_b} = \frac{V_{lim}[A]_0[B]_0}{K_a[B]_0 + K_b[A]_0 + [A]_0[B]_0 + K_{iA}K_b} \quad (4.12)$$

Donde, para este caso:

$$k_{cat} = \frac{k_3k_4}{k_3+k_4} \quad (4.13)$$

Como se ha hecho en el modelo Ping-Pong, esta ecuación se puede relacionar con la concentración de uno de los productos y de este modo con la absorbancia mediante:

$$[P] = \frac{v_0[A]_0[B]_0}{K_a[B]_0 + K_b[A]_0 + [A]_0[B]_0 + K_{iA}K_b} t \quad (4.14)$$

4.2.2 Comprobación del modelo cinético para la reacción con tropina y cálculo de sus parámetros cinéticos

4.2.2.1 Modelo cinético y cálculo aproximado de los parámetros cinéticos

La reacción de la enzima TRasa se trata, como se ha dicho, de una reacción con dos sustratos (NAD y tropina o escopina). Las reacciones NAD dependientes se ajustan al modelo de complejo ternario de orden obligatorio, dado por las ecuaciones (4.11) y (4.12), donde primero se une el NAD y luego el sustrato. No obstante, al tratarse de una enzima “nueva” de la que no se tienen referencias bibliográficas claras, se ensayaron ambos modelos.

Para comprobarlo existen diferentes métodos de cálculo. El más sencillo se basa en reordenar las ecuaciones (4.8) y (4.12) de acuerdo con el criterio de Lineweaver-Burk de las velocidades inversas. Considerando que el reactivo A es

el NAD y B es la tropina, se obtiene para el mecanismo Ping-Pong la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} &= \frac{K_{NAD}}{V_{lim}[NAD]_0} + \frac{K_{Trp}}{V_{lim}[Trp]_0} + \frac{1}{V_{lim}} \\ &= \left(\frac{K_{Trp}}{V_{lim}} \right) \frac{1}{[Trp]_0} + \left(\frac{K_{NAD}}{V_{lim}[NAD]_0} + \frac{1}{V_{lim}} \right) \end{aligned} \quad (4.15)$$

Mientras que para el mecanismo de complejo ternario de orden obligatorio se obtiene:

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} &= \frac{K_{NAD}}{V_{lim}[NAD]_0} + \frac{K_{Trp}}{V_{lim}[Trp]_0} + \frac{1}{V_{lim}} + \frac{K_{i,NAD}K_{Trp}}{V_{lim}[NAD]_0[Trp]_0} \\ &= \left(\frac{K_{Trp}}{V_{lim}} + \frac{K_{i,NAD}K_{Trp}}{V_{lim}[NAD]_0} \right) \frac{1}{[Trp]_0} + \left(\frac{1}{V_{lim}} + \frac{K_{NAD}}{V_{lim}[NAD]_0} \right) \end{aligned} \quad (4.16)$$

A partir de aquí, el método consiste en representar el valor inverso de la velocidad inicial frente a la inversa de la concentración de uno de los reactivos manteniendo el otro constante. De este modo, se obtienen una serie de rectas (una para cada una de las concentraciones del reactivo que permanece constante); la dependencia de las ordenadas en el origen y/o la pendiente de estas rectas con respecto al otro sustrato (NAD) permitirá ajustar la cinética a un modelo o al otro.

Para desarrollar este estudio, se prepararon una serie de 36 ensayos agrupados en 6 bloques de 6. En cada bloque se variaba la concentración de tropina y se mantuvo constante la de NAD; en todos ellos la concentración de enzima usada fue la misma (0.022 mg/mL). Se tomaron valores de absorbancia a lo largo del tiempo a 340 nm y a 25°C. A partir de las pendientes de esas medidas se calcularon las velocidades iniciales (Tabla 4.1) y los valores inversos de estas (Tabla 4.2).

Tabla 4.1: Valores de las velocidades iniciales (v_0 , $M s^{-1}$) calculadas a partir de las pendientes de las representaciones cinéticas.

[NAD]/ [Tropina] (M)	$5.00 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	$3.00 \cdot 10^{-4}$	$6.00 \cdot 10^{-4}$	$1.00 \cdot 10^{-3}$	$2.00 \cdot 10^{-3}$
$1.00 \cdot 10^{-5}$	$5.082 \cdot 10^{-4}$	$6.221 \cdot 10^{-4}$	$2.162 \cdot 10^{-3}$	$4.403 \cdot 10^{-3}$	$6.757 \cdot 10^{-3}$	$5.244 \cdot 10^{-3}$
$3.00 \cdot 10^{-5}$	$7.287 \cdot 10^{-4}$	$2.610 \cdot 10^{-3}$	$7.110 \cdot 10^{-3}$	$1.511 \cdot 10^{-2}$	$1.702 \cdot 10^{-2}$	$1.920 \cdot 10^{-2}$
$6.00 \cdot 10^{-5}$	$2.055 \cdot 10^{-3}$	$7.612 \cdot 10^{-3}$	$1.292 \cdot 10^{-2}$	$2.383 \cdot 10^{-2}$	$2.733 \cdot 10^{-2}$	$3.041 \cdot 10^{-2}$
$1.00 \cdot 10^{-4}$	$3.255 \cdot 10^{-3}$	$1.071 \cdot 10^{-2}$	$2.344 \cdot 10^{-2}$	$4.051 \cdot 10^{-2}$	$4.336 \cdot 10^{-2}$	$4.652 \cdot 10^{-2}$
$3.00 \cdot 10^{-4}$	$5.317 \cdot 10^{-3}$	$2.250 \cdot 10^{-2}$	$3.829 \cdot 10^{-2}$	$7.284 \cdot 10^{-2}$	$7.932 \cdot 10^{-2}$	$1.051 \cdot 10^{-1}$
$6.00 \cdot 10^{-4}$	$1.125 \cdot 10^{-2}$	$2.064 \cdot 10^{-2}$	$4.850 \cdot 10^{-2}$	$8.469 \cdot 10^{-2}$	$1.083 \cdot 10^{-1}$	$1.260 \cdot 10^{-1}$

Tabla 4.2: Valores inversos de las velocidades iniciales ($1/v_0$) de la Tabla 4.1.

[NAD]/ [Tropina] (M)	$5.00 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	$3.00 \cdot 10^{-4}$	$6.00 \cdot 10^{-4}$	$1.00 \cdot 10^{-3}$	$2.00 \cdot 10^{-3}$
$1.00 \cdot 10^{-5}$	1967.7679	1607.5102	462.5347	227.1179	147.9881	190.7087
$3.00 \cdot 10^{-5}$	1372.2503	383.1858	140.6489	66.2032	58.9881	52.0833
$6.00 \cdot 10^{-5}$	486.5706	131.3767	77.3754	41.9639	36.5858	32.8796
$1.00 \cdot 10^{-4}$	307.1819	93.4056	42.6621	24.6859	23.0606	21.4966
$3.00 \cdot 10^{-4}$	188.0830	44.4365	26.1158	13.7290	12.6065	9.5175
$6.00 \cdot 10^{-4}$	88.9205	48.4473	20.6198	11.8080	9.2302	7.9371

A continuación, se representó el inverso de la velocidad inicial de cada bloque en función del inverso de la concentración de tropina para cada concentración de NAD. Estas representaciones se muestran en la Figura 4.12.

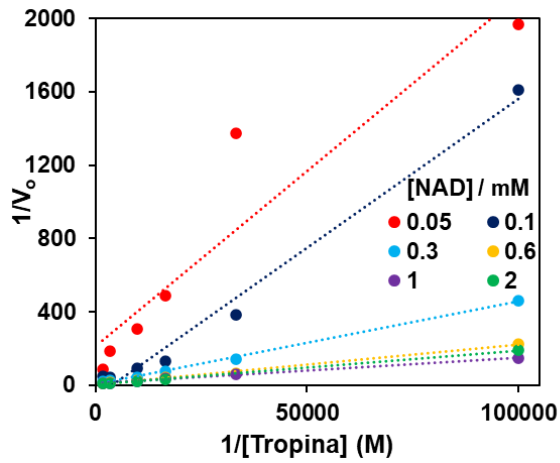


Figura 4.12: Recta obtenida para cada concentración de NAD representando la inversa de la concentración de tropina frente a la inversa de la velocidad inicial obtenida.

Tras eliminar los valores anómalos mediante un test de rechazo para regresión lineal, se obtienen las rectas representadas en la Figura 4.13. Sus pendientes y ordenadas en el origen aparecen en la Tabla 4.3.

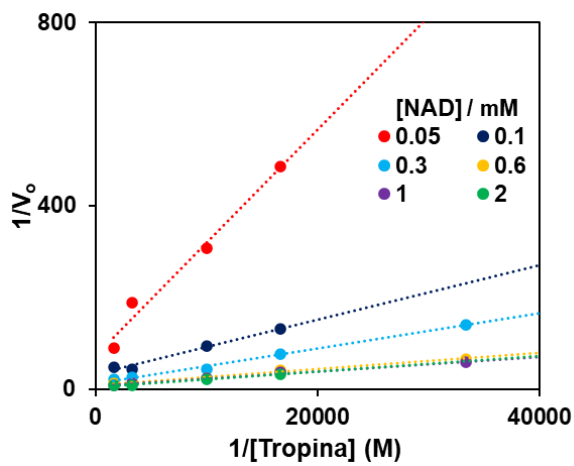


Figura 4.13: Rectas de la Figura 4.12 tras eliminar datos anómalos.

Tabla 4.3: Pendiente y ordenada en el origen de cada una de las rectas representadas en la Figura 4.13.

[NAD] / M	Pendiente	Ordenada en el origen
$5.00 \cdot 10^{-5}$	$2.4683 \cdot 10^{-2}$	72.280
$1.00 \cdot 10^{-4}$	$5.9422 \cdot 10^{-3}$	32.347
$3.00 \cdot 10^{-4}$	$3.8545 \cdot 10^{-3}$	11.494
$6.00 \cdot 10^{-4}$	$1.7626 \cdot 10^{-3}$	8.7641
$1.00 \cdot 10^{-3}$	$1.5712 \cdot 10^{-3}$	7.625
$2.00 \cdot 10^{-3}$	$1.6972 \cdot 10^{-3}$	4.5219

La ecuación (4.15) indica que si los resultados siguieran la cinética del mecanismo ping-pong, se debería observar el mismo valor (estadísticamente hablando) para todas las pendientes, cosa que no se observa. En cuanto al cumplimiento de la cinética de orden obligatorio, la ecuación (4.16) indica que tanto las pendientes como las ordenadas en el origen deberían variar linealmente con la concentración de NAD según:

$$Pendiente_{complejo\ ternario}: m = \frac{K_{Trp}}{V_{lin}} + \frac{K_{i,NAD}K_{Trp}}{V_{lim}[NAD]_0} \quad (4.17)$$

$$Ordenada_{complejo\ ternario}: n = \frac{1}{V_{lim}} + \frac{K_{NAD}}{V_{lim}[NAD]_0} \quad (4.18)$$

Que sí se observa al ajustar los datos por mínimos cuadrados convencionales (Figuras 4.14 y 4.15).

Una vez conocido el modelo al que se ajusta, se realizó un cálculo aproximado de los parámetros cinéticos que aparecen en la ecuación (4.10), es decir: K_{NAD} , K_{Trp} , V_{lim} y $K_{i,NAD}$.

Tanto K_{NAD} como V_{lim} se extraen de las ordenadas en el origen, que vienen dadas por la ecuación (4.18). De este modo, representando los valores de estas en la Tabla 4.3 frente a la inversa de cada [NAD] correspondiente, se obtiene una recta cuya ordenada en el origen es $1/V_{lim}$ y cuya pendiente es K_{NAD}/V_{lim} (Figura 4.14).

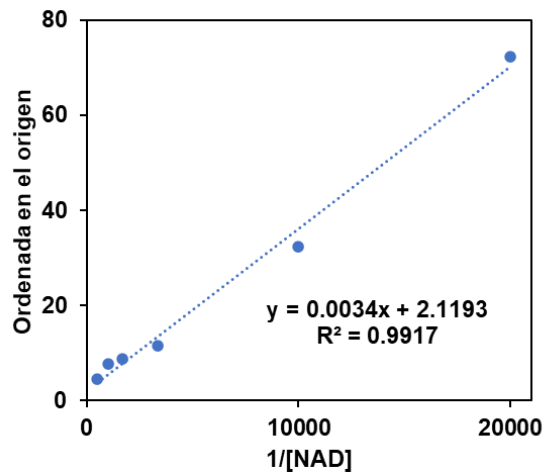


Figura 4.14: Recta obtenida al representar las ordenadas en el origen de cada recta de la Figura 4.13 frente a la inversa de su concentración de NAD correspondiente.

De estos valores se calcula:

$$V_{lim} = 0.47 \pm 0.28 \text{ Ms}^{-1} \quad K_{NAD} = 1.59 (\pm 0.95) \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Donde la imprecisión de cada dato se obtuvo del estudio de regresión lineal. A partir del valor de V_{lim} obtenido y de la concentración de enzima empleada durante los ensayos realizados ($0.022 \text{ mg/mL} = 7.59 \cdot 10^{-7} \text{ M}$), se puede obtener el valor de k_{cat} para esta reacción, por medio de la ecuación (4.5):

$$k_{cat} = 6.2 (\pm 3.7) \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$$

Por último, K_{Trp} y $K_{i,NAD}$ se calculan a partir de las pendientes que vienen dadas por la ecuación (4.17). Del mismo modo que antes, representando los valores de estas en la Tabla 4.3 frente a la inversa de la correspondiente $[NAD]$ para esa pendiente, se obtiene una recta de cuya pendiente y ordenada en el origen se pueden extraer $K_{i,NAD}$ y K_{Trp} , respectivamente (Figura 4.15).

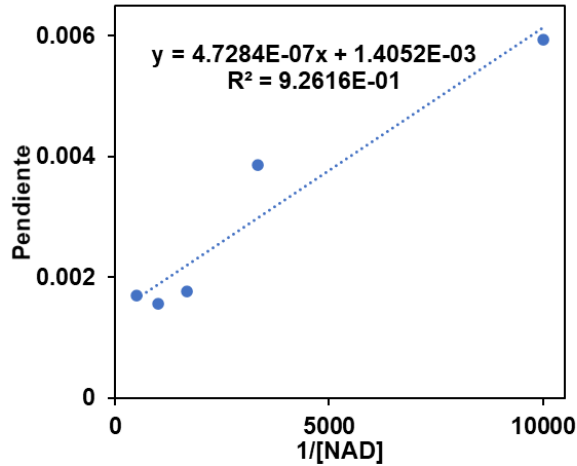


Figura 4.15: Recta obtenida al representar la pendiente de cada recta de la Figura 4.13 frente a la inversa de su concentración de NAD correspondiente.

De aquí se obtiene:

$$K_{Trp} = 6.6 (\pm 4.3) \cdot 10^{-4} M \quad K_{i,NAD} = 3.3 (\pm 2.8) \cdot 10^{-4} M$$

4.2.2.2 Cálculo fino de los parámetros cinéticos para la tropina

Una vez se calcularon las constantes de forma aproximada, estas fueron optimizadas por medio de su ajuste a la ecuación directa del mecanismo con la herramienta Solver. La ecuación (4.8) se puede escribir como:

$$v = \frac{V_{lim}[Trop]_0[NAD]_0}{K_{NAD}[Trop]_0 + K_{Trp}[NAD]_0 + [Trop]_0[NAD]_0 + K_{i,NAD}K_{Trp}} = \frac{\alpha[Trop]_0}{\beta[Trop]_0 + \gamma} \quad (4.19)$$

Donde:

$$\alpha = V_{lim}[NAD]_0 \quad \beta = K_{NAD} + [NAD]_0 \quad \gamma = K_{Trp}[NAD]_0 + K_{i,NAD}K_{Trp} \quad (4.20)$$

A partir de las constantes aproximadas, se calculó α , β y γ para cada [NAD] empleada, obteniendo los resultados de la Tabla 4.4.

Tabla 4.4: Valor calculado para los parámetros α , β y γ a partir de las constantes aproximadas.

[NAD] / M	α	β	γ
$5.00 \cdot 10^{-5}$	$2.35972 \cdot 10^{-5}$	$1.6543 \cdot 10^{-3}$	$2.50875 \cdot 10^{-7}$
$1.00 \cdot 10^{-4}$	$4.71854 \cdot 10^{-5}$	$1.7043 \cdot 10^{-3}$	$2.78922 \cdot 10^{-7}$
$3.00 \cdot 10^{-4}$	$1.41556 \cdot 10^{-4}$	$1.9043 \cdot 10^{-3}$	$3.91110 \cdot 10^{-7}$
$6.00 \cdot 10^{-4}$	$2.83112 \cdot 10^{-4}$	$2.2043 \cdot 10^{-3}$	$5.59392 \cdot 10^{-7}$
$1.00 \cdot 10^{-3}$	$4.71854 \cdot 10^{-4}$	$2.6043 \cdot 10^{-3}$	$7.83768 \cdot 10^{-7}$
$2.00 \cdot 10^{-3}$	$9.43708 \cdot 10^{-4}$	$3.6043 \cdot 10^{-3}$	$1.34471 \cdot 10^{-6}$

De este modo, se representaron tanto las velocidades obtenidas experimentalmente como las calculadas a partir de los parámetros α , β y γ obtenidos en la Tabla 4.4 para cada [NAD] frente a la concentración de tropina. Minimizando la suma de las diferencias al cuadrado de ambas representaciones, se optimizan los parámetros α , β y γ , obteniendo los resultados de la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Valor optimizado de los parámetros α , β y γ para cada concentración de NAD.

[NAD] / M	α	β	γ
$5.00 \cdot 10^{-5}$	$2.1958 \cdot 10^{-5}$	$1.7151 \cdot 10^{-3}$	$4.5696 \cdot 10^{-7}$
$1.00 \cdot 10^{-4}$	$4.7185 \cdot 10^{-5}$	$1.7043 \cdot 10^{-3}$	$2.4406 \cdot 10^{-7}$
$3.00 \cdot 10^{-4}$	$1.4156 \cdot 10^{-4}$	$1.9043 \cdot 10^{-3}$	$3.9111 \cdot 10^{-7}$
$6.00 \cdot 10^{-4}$	$2.8311 \cdot 10^{-4}$	$2.2043 \cdot 10^{-3}$	$5.4678 \cdot 10^{-7}$
$1.00 \cdot 10^{-3}$	$4.7185 \cdot 10^{-4}$	$2.6043 \cdot 10^{-3}$	$7.8377 \cdot 10^{-7}$
$2.00 \cdot 10^{-3}$	$7.8418 \cdot 10^{-4}$	$3.9683 \cdot 10^{-3}$	$1.2075 \cdot 10^{-6}$

Los parámetros cinéticos se recalculan aplicando (4.20) del siguiente modo:

- V_{lim} y K_{NAD} se obtienen a partir de α y β respectivamente utilizando la media de los seis valores calculados (uno para cada concentración de NAD).
- K_{Trp} y $K_{i,NAD}$ se obtienen representando γ frente a [NAD], para la cual se obtuvo la recta de la Figura 4.16. A partir de la pendiente de esta recta se obtiene $K_{i,NAD}$ mientras que K_{Trp} se obtiene de la ordenada en el origen.

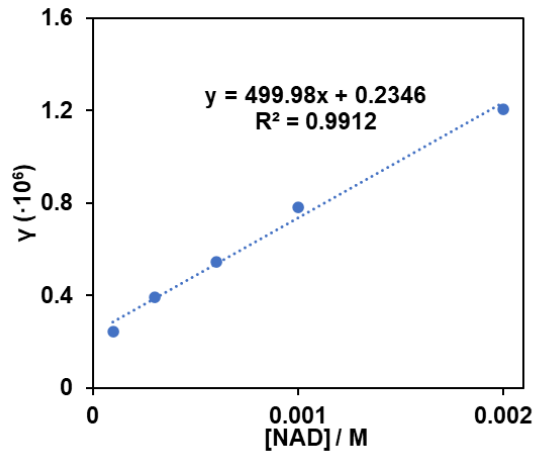


Figura 4.16: Representación de los valores optimizados de v para frente a la concentración de NAD.

Los valores optimizados obtenidos para las constantes son los siguientes:

$$V_{lim} = 0.47258 \pm 0.00038 \text{ M} \cdot \text{s}^{-1} \quad K_{NAD} = 1.62624(\pm 0.00038) \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$K_{Trp} = 5.01(\pm 0.27) \cdot 10^{-4} \text{ M} \quad K_{i,NAD} = 4.67(\pm 0.61) \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Igual que en el apartado anterior, a partir del valor de V_{lim} y de la concentración de enzima empleada se puede obtener el valor de k_{cat} para esta reacción:

$$k_{cat} = 6.2295(\pm 0.0050) \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$$

Estos valores indican que la enzima TRasa tiene una mayor afinidad por el NAD, al ser la constante obtenida para este sustrato en torno a tres veces superior a la obtenida para la tropina.

4.2.3 Comprobación del modelo cinético para la reacción con escopina y cálculo de sus parámetros cinéticos

4.2.3.1 Modelo cinético y cálculo aproximado de los parámetros cinéticos

Se realizó un estudio similar sobre el producto de la hidrólisis de la escopolamina (escopina) con objeto de caracterizar la enzima hacia este sustrato. Se preparó igualmente una serie de 36 ensayos agrupados en 6 bloques de 6, variando en cada bloque la concentración de escopina y dejando constante la de NAD, y manteniendo la concentración de enzima (0.022 mg/mL) y la temperatura

constantes. En este caso, la temperatura de reacción fue de 15°C, al ser la temperatura óptima a la que tiene lugar esta reacción, como se verá más adelante en el apartado 4.4.

Del mismo modo que en el caso de la tropina, las cinéticas de la reacción se intentaron ajustar tanto al mecanismo ping-pong como al mecanismo de complejo ternario de orden obligatorio por medio de las ecuaciones (4.15) y (4.16).

Para ello, de las representaciones cinéticas a 340 nm se obtuvieron las velocidades iniciales (Tabla 4.6) y sus respectivos valores inversos (Tabla 4.7).

Tabla 4.6: Valores calculados para las velocidades iniciales de cada una de las reacciones.

[NAD]/ [Esc] (M)	5.00·10 ⁻⁵	1.00·10 ⁻⁴	3.00·10 ⁻⁴	6.00·10 ⁻⁴	1.00·10 ⁻³	2.00·10 ⁻³
3.00·10 ⁻⁵	—	3.971·10 ⁻⁵	3.114·10 ⁻⁴	8.462·10 ⁻⁴	1.510·10 ⁻³	1.801·10 ⁻³
6.00·10 ⁻⁵	5.181·10 ⁻⁵	9.161·10 ⁻⁵	5.354·10 ⁻⁴	1.129·10 ⁻³	2.036·10 ⁻³	2.667·10 ⁻³
1.00·10 ⁻⁴	2.705·10 ⁻⁴	1.807·10 ⁻⁴	9.893·10 ⁻⁴	2.221·10 ⁻³	3.475·10 ⁻³	3.533·10 ⁻³
3.00·10 ⁻⁴	6.888·10 ⁻⁴	1.163·10 ⁻³	3.876·10 ⁻³	4.366·10 ⁻³	6.528·10 ⁻³	6.055·10 ⁻³
6.00·10 ⁻⁴	1.176·10 ⁻³	1.876·10 ⁻³	5.140·10 ⁻³	5.838·10 ⁻³	6.867·10 ⁻³	7.847·10 ⁻³
1.00·10 ⁻³	1.698·10 ⁻³	3.013·10 ⁻³	5.885·10 ⁻³	6.253·10 ⁻³	7.363·10 ⁻³	8.415·10 ⁻³

Tabla 4.7: Valor inverso de cada una de las velocidades iniciales de la Tabla 4.6.

[NAD]/ [Esc] (M)	5.00·10 ⁻⁵	1.00·10 ⁻⁴	3.00·10 ⁻⁴	6.00·10 ⁻⁴	1.00·10 ⁻³	2.00·10 ⁻³
3.00·10 ⁻⁵	—	25181.939	3213.987	1181.734	662.252	555.370
6.00·10 ⁻⁵	19302.038	10915.362	1867.658	885.661	491.063	374.981
1.00·10 ⁻⁴	3696.994	5532.503	1010.846	450.248	287.745	283.029
3.00·10 ⁻⁴	1451.842	859.623	258.011	229.043	153.191	165.161
6.00·10 ⁻⁴	850.557	532.964	194.556	171.291	145.632	127.437
1.00·10 ⁻³	588.824	331.862	169.926	159.910	135.812	118.828

Para cada una de las concentraciones de NAD, se representaron las inversas de las velocidades frente a las inversas de las concentraciones de escopina, obteniendo una serie de rectas (Figura 4.17).

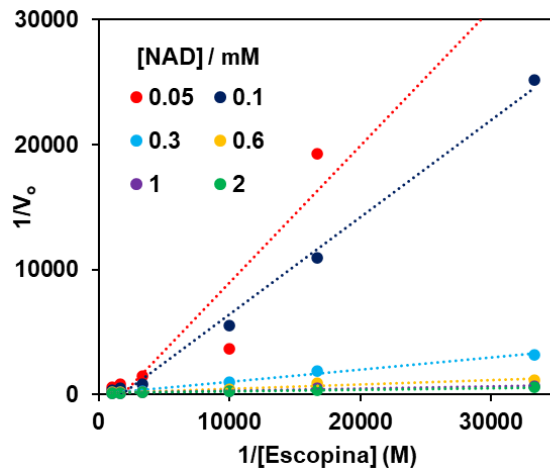


Figura 4.17: Recta obtenida para cada concentración de NAD representando la inversa de la concentración de escopina frente a la inversa de la velocidad inicial obtenida.

Eliminando los datos anómalos mediante un test de rechazo para regresión lineal, se obtienen las rectas de la Figura 4.18.

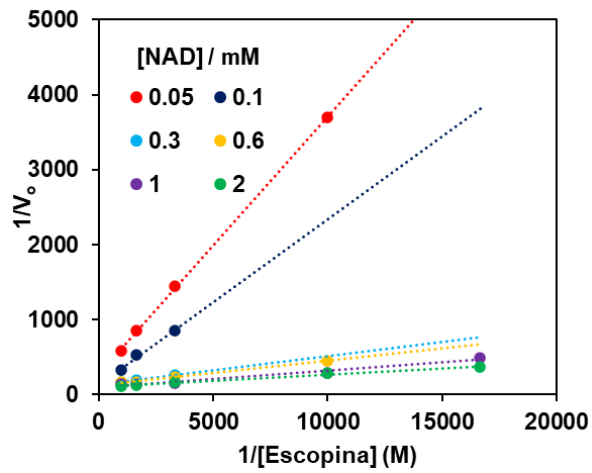


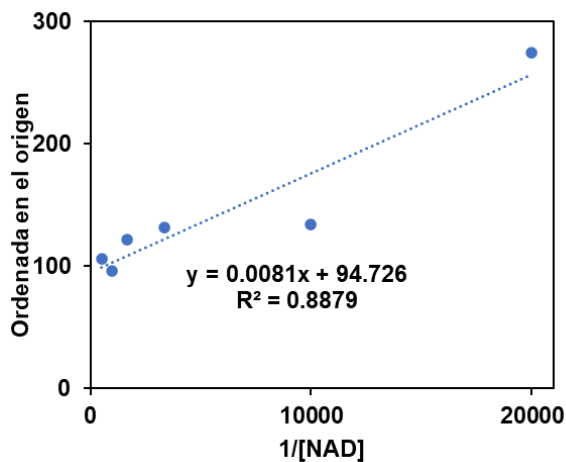
Figura 4.18: Rectas de la Figura 4.17 tras eliminar datos anómalos.

Tabla 4.8: Pendiente y ordenada en el origen de cada una de las rectas representadas en la Figura 4.18.

[NAD]	Pendiente	Ordenada en el origen
$5.00 \cdot 10^{-5}$	$3.4316 \cdot 10^{-1}$	274.42
$1.00 \cdot 10^{-4}$	$2.2038 \cdot 10^{-1}$	134.06
$3.00 \cdot 10^{-4}$	$3.7813 \cdot 10^{-2}$	131.87
$6.00 \cdot 10^{-4}$	$3.2804 \cdot 10^{-2}$	121.41
$1.00 \cdot 10^{-3}$	$2.2445 \cdot 10^{-2}$	96.047
$2.00 \cdot 10^{-3}$	$1.6596 \cdot 10^{-2}$	105.46

A partir de estos resultados, se hizo de nuevo el cálculo aproximado de las constantes siguiendo el procedimiento detallado en 4.2.2.1, solamente cambiando [Tropina] por [Escopina].

En este caso, los valores tampoco se ajustaron al mecanismo ping-pong, sino al mecanismo de complejo ternario de orden obligatorio. De este modo, representando las ordenadas en el origen de la Tabla 4.8 frente a la inversa de su concentración de NAD correspondiente, se obtuvo una representación lineal (Figura 4.19) a partir de la cual se calcularon V_{lim} y K_{NAD} .

**Figura 4.19:** Recta obtenida al representar las ordenadas en el origen de cada recta de la Figura 4.18 frente a la inversa de su concentración de NAD correspondiente.

Los valores obtenidos para estas constantes fueron:

$$V_{lim} = 0.01007 \pm 0.00047 \text{ Ms}^{-1} \quad K_{NAD} = 8.79(\pm 0.66) \cdot 10^{-5}$$

$$k_{cat} = 1.327(\pm 0.062) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$$

Finalmente, representando los valores obtenidos para las pendientes en la Tabla 4.8 frente a la inversa de su correspondiente concentración de NAD, se obtuvo una recta (Figura 4.20) de la que se calcularon K_{Esc} y K_{iNAD} .

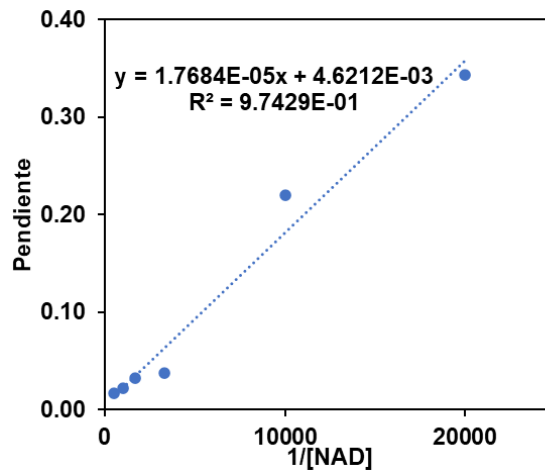


Figura 4.20: Recta obtenida al representar la pendiente de cada recta de la Figura 4.18 frente a la inversa de su concentración de NAD correspondiente.

Las constantes calculadas fueron:

$$K_{Esc} = 4.67(\pm 13) \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad K_{iNAD} = 3.83(\pm 11) \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

4.2.3.2 Cálculo fino de las constantes enzimáticas para la escopina

Una vez obtenidas las constantes aproximadas, se optimizó su cálculo igual que en el apartado anterior a partir de la ecuación directa de velocidad mediante los parámetros α , β y γ . En este caso, al calcular los parámetros empleando los valores aproximados de las constantes, se obtuvieron los resultados de la Tabla 4.9.

Tabla 4.9: Valor calculado para los parámetros α , β y γ a partir de las constantes aproximadas.

[NAD] / M	α	β	γ
$5.00 \cdot 10^{-5}$	$5.2784 \cdot 10^{-7}$	$1.3551 \cdot 10^{-4}$	$1.8913 \cdot 10^{-7}$
$1.00 \cdot 10^{-4}$	$1.0557 \cdot 10^{-6}$	$1.8551 \cdot 10^{-4}$	$1.9156 \cdot 10^{-7}$
$3.00 \cdot 10^{-4}$	$3.1670 \cdot 10^{-6}$	$3.8551 \cdot 10^{-4}$	$2.0132 \cdot 10^{-7}$
$6.00 \cdot 10^{-4}$	$6.3341 \cdot 10^{-6}$	$6.8551 \cdot 10^{-4}$	$2.1596 \cdot 10^{-7}$
$1.00 \cdot 10^{-3}$	$1.0557 \cdot 10^{-5}$	$1.0855 \cdot 10^{-3}$	$2.3547 \cdot 10^{-7}$
$2.00 \cdot 10^{-3}$	$2.1114 \cdot 10^{-5}$	$2.0855 \cdot 10^{-3}$	$2.8426 \cdot 10^{-7}$

A partir de estos parámetros se construyó la curva de velocidad para cada [NAD] empleada y se representó junto con la obtenida experimentalmente frente a la concentración de escopina. Minimizando la suma de las diferencias al cuadrado entre las dos curvas con la ayuda de Solver, se optimizan los parámetros α , β y γ , obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Valor optimizado de los parámetros α , β y γ .

[NAD] / M	α	β	γ
$5.00 \cdot 10^{-5}$	$5.2784 \cdot 10^{-7}$	$1.3551 \cdot 10^{-4}$	$1.8913 \cdot 10^{-7}$
$1.00 \cdot 10^{-4}$	$1.0557 \cdot 10^{-6}$	$1.8551 \cdot 10^{-4}$	$1.9156 \cdot 10^{-7}$
$3.00 \cdot 10^{-4}$	$3.1648 \cdot 10^{-6}$	$3.8551 \cdot 10^{-4}$	$1.5773 \cdot 10^{-7}$
$6.00 \cdot 10^{-4}$	$6.3341 \cdot 10^{-6}$	$6.8551 \cdot 10^{-4}$	$2.1596 \cdot 10^{-7}$
$1.00 \cdot 10^{-3}$	$1.0557 \cdot 10^{-5}$	$1.0855 \cdot 10^{-3}$	$2.1420 \cdot 10^{-7}$
$2.00 \cdot 10^{-3}$	$2.1114 \cdot 10^{-5}$	$2.0855 \cdot 10^{-3}$	$2.8426 \cdot 10^{-7}$

Del mismo modo que en el apartado anterior, V_{lim} y K_{NAD} se obtienen de α y β respectivamente, y K_{Esc} y K_{iNAD} de la representación de γ frente a [NAD] (Figura 4.21).

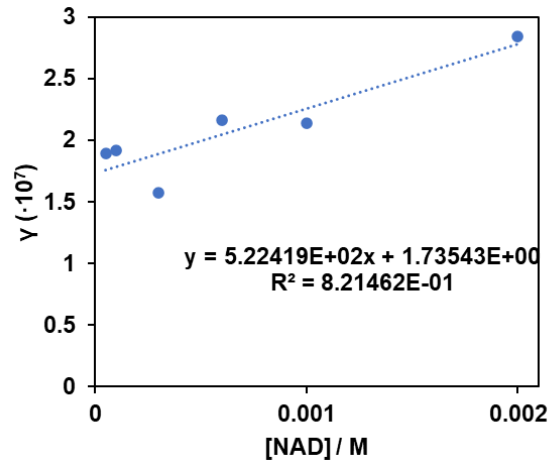


Figura 4.21: Representación de los valores optimizados de v para frente a la concentración de NAD.

De este modo, se obtienen los siguientes valores optimizados para las constantes:

$$V_{lim} = 0.010555 \pm 0.000014 \text{ Ms}^{-1} \quad K_{NAD} = 8.56(\pm 0.10) \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$$K_{Esc} = 5.2(\pm 1.2) \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad K_{iNAD} = 3.34(\pm 0.81) \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$k_{cat} = 13913(\pm 18) \text{ s}^{-1}$$

Al comparar estas constantes con las obtenidas para la tropina, se observa en primer lugar que la V_{lim} , que hace referencia a la velocidad máxima que alcanza la reacción, es varias veces superior para la tropina frente a la escopina, lo que concuerda con los datos obtenidos experimentalmente. Por otro lado, tanto para K_{Esc}/K_{Trp} como para K_{NAD} se obtienen valores menores en la reacción de la escopina, indicando que se encuentra más impedida, aportando una menor sensibilidad. Este último resultado se ve reforzado por el aumento de la constante K_{iNAD} , que señala que la reacción inversa de formación del complejo NAD-enzima está más favorecida en el caso de la escopina que en el caso de la tropina. No obstante, es importante tener en cuenta que las temperaturas de trabajo en ambos casos fueron distintas.

4.3 Estudio analítico de la reacción en disolución para tropina y atropina: Desarrollo del método analítico

En este apartado se ha estudiado la reacción de oxidación de tropina a tropinona por medio de la enzima TRasa y el cofactor NAD (Figura 4.4). Para observar esta reacción, se ha realizado un seguimiento de la señal de absorción molecular del NADH generado en la reacción a 340 nm. Posteriormente, se ha evaluado también la medida de su fluorescencia (excitación a 340 nm y fluorescencia a 460 nm).

4.3.1 Optimización y caracterización analítica para la tropina

El objetivo fundamental del estudio es la determinación de atropina por su importancia tanto a nivel alimentario como farmacológico. Como se ha comentado en el Capítulo 1, la determinación se basa en una desesterificación previa, que la transforma en tropina, y la reacción posterior con la enzima TRasa. Los estudios de optimización de la reacción se llevaron a cabo usando tropina ya que resulta más sencillo y los resultados son extrapolables directamente a la determinación de atropina. Pero además es importante indicar que la tropina en sí misma es un alcaloide que puede aparecer también en diferentes tipos de muestras [4.17] por lo que la determinación directa de esta sustancia tiene a su vez interés analítico.

La optimización se realizará midiendo la absorbancia máxima de la señal obtenida (una vez que la reacción llega al equilibrio), para mayor sensibilidad. Los parámetros que se estudiaron fueron la concentración de enzima, la naturaleza y el pH de la disolución amortiguadora y la temperatura. Como se puede ver en el estudio de los blancos realizado en el apartado 4.1.3 (Figura 4.5), a 340 nm la señal residual (en ausencia de reacción) es debida mayoritariamente al NAD. Para evitar una mayor señal de blanco se mantuvo la concentración de NAD fija en $1 \cdot 10^{-3}$ M a lo largo del estudio.

4.3.1.1 Naturaleza y pH de la disolución amortiguadora

Se realizaron medidas empleando disoluciones amortiguadoras de concentración 0.1 M a diferentes valores de pH y de distinta naturaleza, manteniendo el resto de variables constantes. En la Figura 4.22 se muestran los registros cinéticos

obtenidos a 340 nm para este estudio. En esta Figura se observa una mejoría tanto de la señal final como de la velocidad de reacción a medida que aumenta la basicidad de la disolución amortiguadora. No obstante, al estudiar pHs más básicos (11 y 12 con disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$) no se observó ningún tipo de respuesta por lo que finalmente se escogió como óptimo pH 10 con disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$.

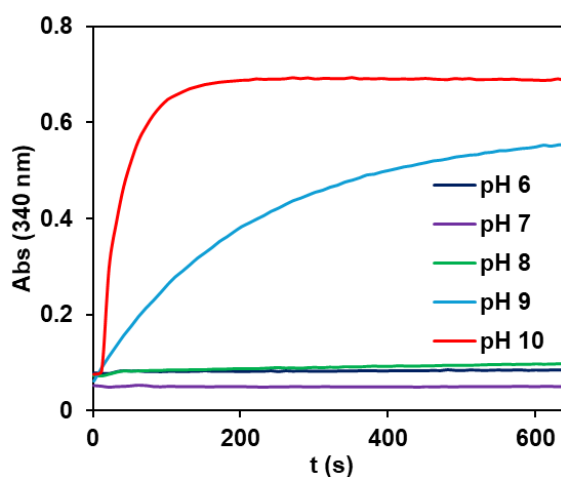


Figura 4.22: Registros cinéticos obtenidos en los estudios del pH de la reacción, empleando disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ para los valores de pH 6, 7 y 8 y $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ para pHs 9 y 10. $[\text{NAD}] = 1.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{Tropina}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{TRasa}] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $T^a = 30^\circ\text{C}$.

4.3.1.2 Temperatura de la reacción

La Figura 4.23 muestra los resultados obtenidos al llevar a cabo la reacción trabajando entre 10°C y 45°C . Estos resultados muestran que, si bien un incremento de temperatura aumenta la velocidad de la reacción, también produce una pérdida de sensibilidad, reflejada en el valor final de absorción. Es por ello que se elige una temperatura óptima de 25°C , al obtenerse la máxima señal sin perder velocidad.

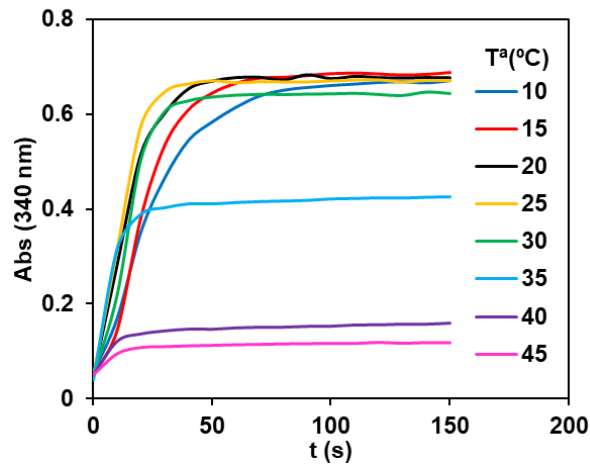


Figura 4.23: Registros cinéticos tomados en las medidas de optimización de la temperatura de la reacción. $[NAD] = 1.00 \cdot 10^{-3} M$, $[Tropina] = 1.00 \cdot 10^{-4} M$, $[TRasa] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $pH = 10$ ($HCO_3^-/CO_3^{2-} 0.1 M$).

Hay diferentes causas que pueden explicar el descenso de la absorción final producido al aumentar la temperatura:

1. Posible descomposición del NADH al aumentar la temperatura. Sin embargo, de acuerdo con la bibliografía, se requiere un tiempo muy largo (en torno a 16 horas) [4.18] y temperaturas por encima de 50°C para observar esta descomposición.
2. Descomposición de la enzima al aumentar la temperatura. Se ha visto en el laboratorio que se puede trabajar con esta enzima a temperatura ambiente ($20\text{-}25^\circ\text{C}$) durante una jornada sin que pierda actividad.
3. Carácter exotérmico de la reacción. La reacción de la tropina es exotérmica ya que la rotura de los enlaces C-H y O-H de la tropina requiere menos energía que la liberada al formar los enlaces C=O de la tropina y N-H del NADH. Por ello, conforme la temperatura baja la constante de equilibrio es mayor, pero en cambio la cinética es más lenta.

Para justificar esta última conclusión se va a calcular K_{eq} a las diferentes temperaturas utilizadas. Para ello, considerando las concentraciones de tropina y NAD empleadas en este ensayo (Figura 4.23) y la estequiometría de la reacción, es posible relacionar la K_{eq} de la reacción con la concentración de NADH formado, según:

$$K_{eq} = \left(\frac{[NADH]_{formada}}{[NAD]_0 - [NADH]_{formada}} \right)^2 \quad (4.21)$$

Considerando la absortividad molar para el NADH de $6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y los resultados de la Figura 4.24, se puede calcular la $[NADH]_{formada}$ y los correspondientes valores de K_{eq} a las diferentes temperaturas (Tabla 4.11).

Tabla 4.11: Valores de K_{eq} calculados a partir de $[NADH]_{formada}$ en la reacción.

$T^{\circ}(\text{°C})$	45	40	35	30	25	20
$[NADH]_{formada}$	$1.09 \cdot 10^{-5}$	$1.73 \cdot 10^{-5}$	$6.10 \cdot 10^{-5}$	$9.45 \cdot 10^{-5}$	$9.88 \cdot 10^{-5}$	$9.98 \cdot 10^{-5}$
K_{eq}	$1.21 \cdot 10^{-4}$	$3.12 \cdot 10^{-4}$	$4.22 \cdot 10^{-3}$	$1.09 \cdot 10^{-2}$	$1.20 \cdot 10^{-2}$	$1.23 \cdot 10^{-2}$

Como se puede ver en la Figura 4.24, los datos de la Tabla 4.11 cumplen la ecuación de Van 't Hoff (4.22):

$$\ln K_{Eq} = -\frac{\Delta G^0}{RT} = -\frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (4.22)$$

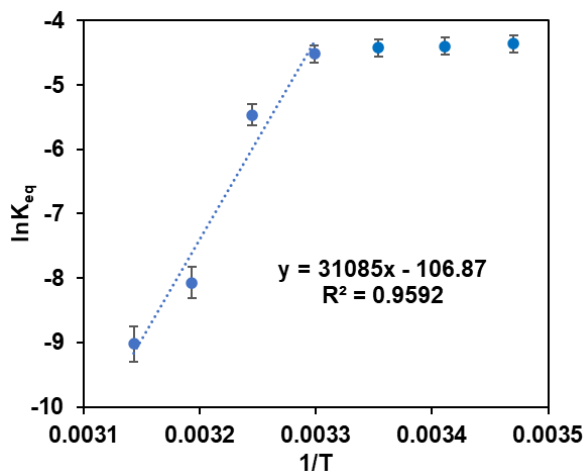


Figura 4.24: Recta obtenida al ajustar los valores obtenidos para K_{eq} en función de la temperatura a la ecuación de Van 't Hoff.

Lo que permite calcular los valores de ΔH^0 y ΔS^0 para esa reacción.

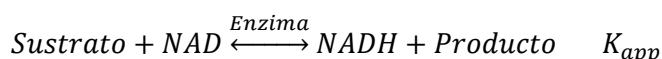
$$\Delta H^0 = -258440.7 \text{ J/mol} \quad \Delta S^0 = -888.5 \text{ J/mol K}$$

Estos valores permiten, además de caracterizar la reacción enzimática, predecir el comportamiento de la reacción a otras temperaturas.

4.3.1.3 Concentración de Tropinona Reductasa

Se midieron reacciones con concentraciones de enzima de 0.0044, 0.0088, 0.022 y 0.044 mg/mL. Los registros cinéticos obtenidos se muestran en la Figura 4.25. En estas medidas se puede observar que la señal obtenida aumenta al incrementar la concentración de enzima hasta alcanzar un máximo para una concentración de TRasa de 0.022 mg/mL.

Puede llamar la atención este efecto de la concentración de enzima en la absorbancia final obtenida, es decir, en la K_{eq} de la reacción. La teoría de la cinética enzimática explica que la concentración de enzima afecta a la velocidad del proceso, pero no a la K_{eq} . Sin embargo, ya en el año 1951 Theorell [4.19] observó este comportamiento con una deshidrogenasa (Alcohol Deshidrogenasa) y posteriormente, Alberty con otra (Lactato Deshidrogenasa) [4.20]. La razón argumentada por los autores es que se requiere la formación del complejo enzima-sustrato entre la enzima y el NAD (y NADH) para que la reacción se produzca por lo que el equilibrio final expresado, aparentemente, como:



Es, en realidad:



La relación entre las dos constantes (K_{app} y K_{real}) viene dada por:

$$\frac{K_{app}}{K_{real}} = \frac{K_{E-NAD}([E]_0 + K_{E-NADH})}{K_{E-NADH}([E]_0 + K_{E-NAD})} \quad (4.23)$$

Donde K_{E-NAD} y K_{E-NADH} son las constantes de disociación de los correspondientes complejos E-NAD y E-NADH. Como se observa, cuando la concentración de enzima es muy alta la ecuación (4.23) tiende a:

$$\frac{K_{app}}{K_{real}} = \frac{K_{E-NAD}}{K_{E-NADH}} \quad (4.24)$$

Por lo que la K_{eq} deja de depender de la concentración de enzima, que es lo que se observa en la Figura 4.25.

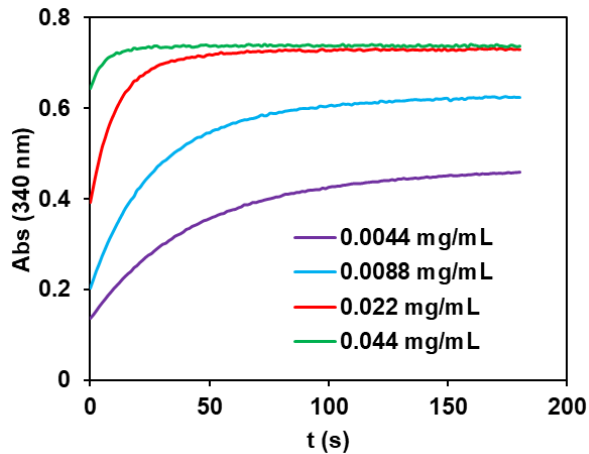


Figura 4.25: Medidas cinéticas tomadas a 340 nm en la optimización de la concentración de enzima tras haber optimizado el resto de parámetros. $[NAD] = 1.00 \cdot 10^{-3} M$, $[Tropina] = 1.00 \cdot 10^{-4} M$, $T^a = 25^{\circ}C$, $pH = 10$ ($HCO_2^-/CO_3^{2-} 0.1 M$).

De este modo, se escoge una concentración de 0.022 mg/mL como concentración óptima, ya que concentraciones superiores no producen un aumento de la señal y la cinética, si bien es algo más rápida, no supone una gran mejora en relación al gasto de enzima.

4.3.1.4 Características analíticas

Los resultados obtenidos durante el estudio de calibración empleando el máximo de absorción del NADH a 340 nm se muestran en la Figura 4.26.

Si se transforma la pendiente de la recta de calibrado ($6.151 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a unidades de $M^{-1}\text{cm}^{-1}$, se obtiene un valor de $6151 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, que es muy próximo al teórico de la absorptividad molar del NADH ($6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) indicado anteriormente [4.12]. Esto indica que aproximadamente un 98% de la tropina se transforma en producto, por lo que la reacción enzimática es, en estas condiciones y a efectos prácticos, irreversible.

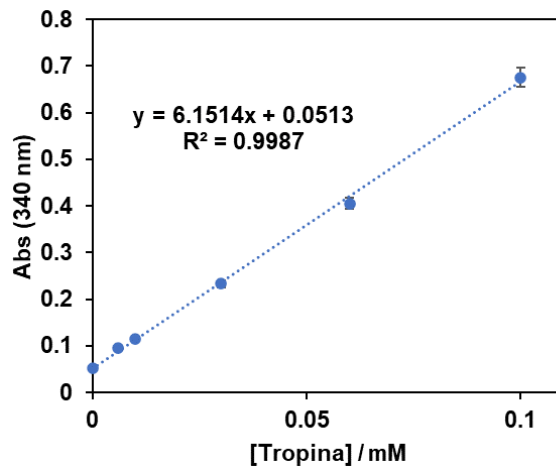


Figura 4.26: Recta de calibrado obtenida tomando el máximo de absorción a 340 nm para diferentes concentraciones de tropina. $[\text{NAD}] = 1.00 \cdot 10^{-3}$, $[\text{TRasa}] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $T^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 10$ (Disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

A partir de esta recta de calibrado, se calcularon las características analíticas del método, obteniendo los valores mostrados en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12: Características analíticas obtenidas para la tropina.

LD	$2.69 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
LC	$8.97 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
Rango Lineal	$8.97 \cdot 10^{-6} - 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
DER ($6.00 \cdot 10^{-5}$, n=5)	2.23 %

4.3.2 Optimización y caracterización analítica para la atropina. Absorción molecular

4.3.2.1 Hidrólisis de la atropina

En este apartado, se optimizó la reacción de la Figura 4.6 con el objetivo de poder emplear la optimización de los apartados anteriores también a la medida de atropina por medio de la adición de un paso más a la reacción de la Figura 4.4.

Como se ha mencionado en el apartado 4.1.4, para este paso se hicieron unas primeras pruebas con la enzima TEasa. Como la reacción observada era muy lenta, la desesterificación de la atropina se llevó a cabo mediante hidrólisis en

medio alcalino empleando NaOH. El procedimiento que se siguió para ello fue el explicado en el apartado 3.5.1. Para optimizar este procedimiento, se realizó un estudio del tiempo necesario para que terminará la hidrólisis. Los resultados de este estudio, que se muestran en la Figura 4.27, reflejan que, para tiempos de hidrólisis superiores a 5 minutos, los resultados no varían, por lo que se seleccionó este tiempo como óptimo.

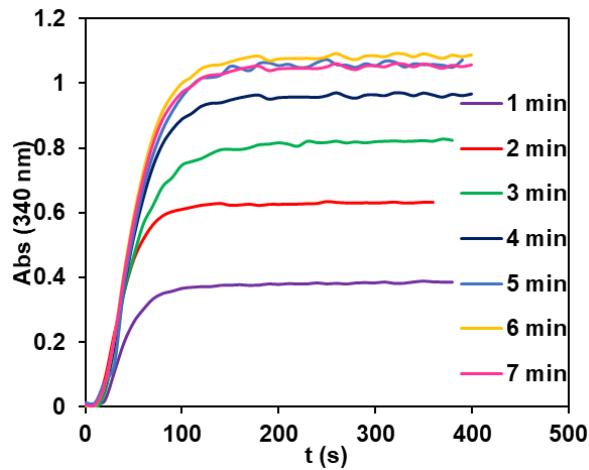


Figura 4.27: Registros cinéticos obtenidos en la optimización del tiempo de hidrólisis de la atropina con NaOH. $[NAD] = 1.00 \cdot 10^{-3} M$, $[Atropina] = 2.00 \cdot 10^{-4} M$, $[TRasa] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $T^a = 25^{\circ}C$, $pH = 10$ (Disolución amortiguadora de HCO_3^-/CO_3^{2-} 0.1 M).

4.3.2.2 Características analíticas para la atropina. Rendimiento de hidrólisis

Siguiendo el procedimiento descrito, se elaboró una recta de calibrado con diferentes concentraciones de atropina (Figura 4.28).

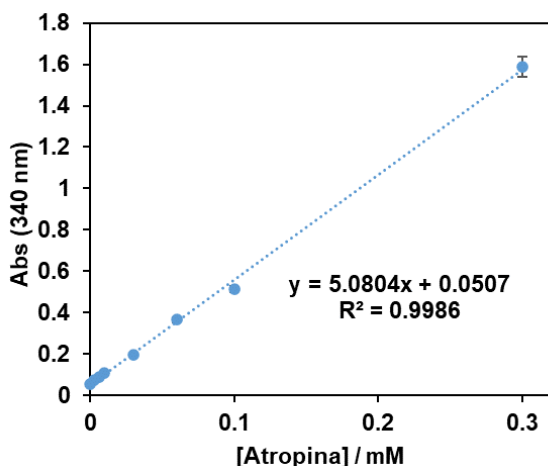


Figura 4.28: Recta de calibrado obtenida tomando el máximo de absorción a 340 nm para diferentes concentraciones de atropina. $[\text{NAD}] = 1.00 \cdot 10^{-3}$, $[\text{TRasa}] = 0.022$ mg/mL, $T^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 10$ (Disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

Del mismo modo que se hizo con la tropina, a partir de la recta de calibrado se calcularon las características analíticas del método, obteniendo los valores de la Tabla 4.13.

Tabla 4.13: Características analíticas obtenidas para la atropina.

LD	$3.47 \cdot 10^{-6}$ M
LC	$1.16 \cdot 10^{-5}$ M
Rango Lineal	$1.16 \cdot 10^{-5} - 3.00 \cdot 10^{-4}$ M
DER ($6.00 \cdot 10^{-5}$, n=5)	2.96 %

El rendimiento del proceso de hidrólisis se puede obtener considerando que cada molécula de atropina debe producir una molécula de tropina. Si se comparan las pendientes de las rectas de calibrado de las Figuras 4.26 y 4.28, se observa que la correspondiente a la atropina tiene un valor de 0.83 veces la de la tropina, por lo que el rendimiento de la hidrólisis es del 83 ± 1 %. Este rendimiento es constante independientemente de la concentración de atropina, ya que en ambos analitos la calibración obtenida es una recta.

De ahora en adelante, se utilizará este procedimiento de medida tanto para atropina como para tropina, teniendo en cuenta que siempre que se trate de

atropina el análisis vendrá acompañado de una etapa de hidrólisis previa a la adición de la disolución amortiguadora correspondiente y al resto de reactivos.

4.3.3 Optimización y caracterización analítica para la atropina. Fluorescencia molecular

Como se ha indicado anteriormente, se estudió también la posibilidad de determinar la atropina por medio de la fluorescencia del NADH generado.

En primer lugar, se comprobó que las condiciones óptimas de la reacción medida por absorción coincidían con las óptimas al medir por fluorescencia, estudiando tanto el efecto del pH como la concentración de enzima, ya que esta puede presentar fluorescencia que interfiera en la medida debido a la presencia de los aminoácidos tirosina y triptófano [4.21].

- Efecto del pH y naturaleza de la disolución amortiguadora:** se estudiaron disoluciones amortiguadoras de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pHs 7 y 8, y de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ de pHs 9 y 10; todas ellas de concentración 0.1 M. La Figura 4.29 muestra los espectros de fluorescencia una vez completada la reacción para todas ellas. Como se puede observar, la que mejores resultados ofrece, igual que ocurría en la optimización por absorción, es la disolución amortiguadora de carbonato de pH 10.

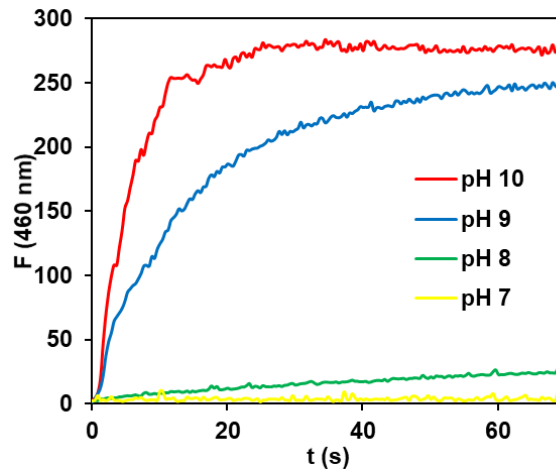


Figura 4.29: Registros cinéticos obtenidos en la optimización del pH de la reacción mediante la medida por fluorescencia. Las disoluciones de pHs 7 y 8 son de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ mientras que las de valores 9 y 10 son de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$. $[\text{Atropina}] = 1.00 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{NAD}] = 1.00 \cdot 10^{-3}$, $[\text{TRasa}] = 0.022$ mg/mL, $T^a = 25^\circ\text{C}$.

- Efecto de la concentración de enzima:** del mismo modo que en la optimización de la reacción por medida de la absorción molecular, se midieron las cinéticas de la reacción empleando concentraciones de enzima de 0.0044, 0.0088, 0.022 y 0.044 mg/mL. En la Figura 4.30 se recogen los perfiles cinéticos obtenidos midiendo la emisión a 460 nm. Igual que en absorción, la concentración de enzima óptima es 0.022 mg/mL, ya que la reacción alcanza el máximo de emisión a partir de esta concentración. Si bien es cierto que poniendo una concentración aun mayor la velocidad aumenta, la diferencia no es significativa y el gasto de enzima es considerable.

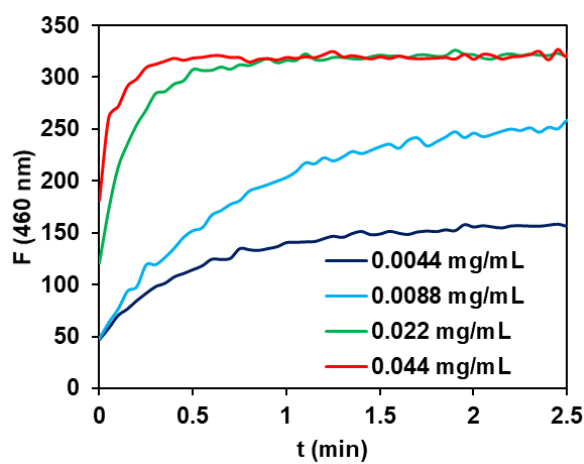


Figura 4.30: Registros cinéticos obtenidos durante la optimización de la concentración de enzima en la reacción por medida de la fluorescencia a 460 nm. [Atropina] = $1.00 \cdot 10^{-4}$ M, [NAD] = $1.00 \cdot 10^{-3}$, T° = 25°C, pH = 10 (Disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

Con las condiciones de medida optimizadas y tras verificar que se obtienen resultados prometedores, se construyó la recta de calibrado de la Figura 4.31.

A partir de esta recta de calibrado, se calcularon los límites de detección y de cuantificación del método, obteniendo unos valores de $4.70 \cdot 10^{-8}$ y $1.57 \cdot 10^{-7}$ M, respectivamente. Como puede observarse, estos valores son dos órdenes de magnitud inferiores a los que se obtienen empleando absorción molecular, indicando que este método puede ser empleado cuando se quieran medir

concentraciones que no puedan detectarse por medio del método estudiado en los apartados anteriores.

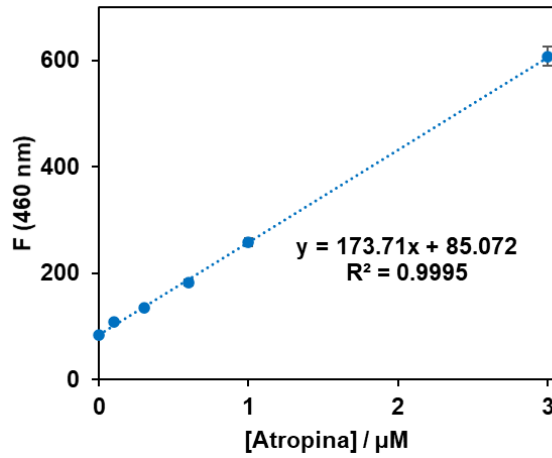


Figura 4.31: Recta de calibrado obtenida tomando el máximo de fluorescencia a 460 nm para diferentes concentraciones de atropina. [NAD] = $1.00 \cdot 10^{-3}$, [TRasa] = 0.022 mg/mL, $T^a = 25^{\circ}\text{C}$, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

4.3.4 Aplicación del método sobre una muestra real

La reacción optimizada fue aplicada a la determinación de atropina en una muestra de chía sometida a una etapa previa de extracción, descrita en el apartado 3.6.1. El resultado obtenido por ambos métodos (absorción y fluorescencia) fue una concentración de atropina inferior al límite de detección, por lo que se repitió el análisis dopando la muestra con atropina de forma que esta contara con una concentración de 0.870 mg/g de muestra. La determinación se realizó empleando la técnica de absorción molecular ya que la muestra provoca un elevado efecto matriz en fluorescencia, debido a la presencia de proteínas.

Tras medir esta nueva muestra la concentración de atropina obtenida fue de 0.840 ± 0.056 mg/g (n=3), lo que supone una recuperación del 96.3 ± 6.0 %, indicando que el método es eficaz para análisis de atropina en esta matriz.

4.4 Estudio de la determinación simultánea de escopolamina y atropina

4.4.1 Estudio de la determinación de escopolamina

Se estudió también el posible empleo de la enzima TRasa para el análisis de escopolamina. Para ello, se utilizaron todos los parámetros optimizados para la atropina y las medidas se llevaron a cabo realizando la hidrólisis en las mismas condiciones. Tras comprobar el adecuado funcionamiento de la reacción, se elaboró una recta de calibrado (Figura 4.32). En esta se observó que la sensibilidad era menor que la obtenida para la atropina, pasando de $5.08 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $1.59 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (unas 3 veces menor) y, por tanto, mayores LD y LC, con unos valores de $1.11 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y $3.70 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, respectivamente.

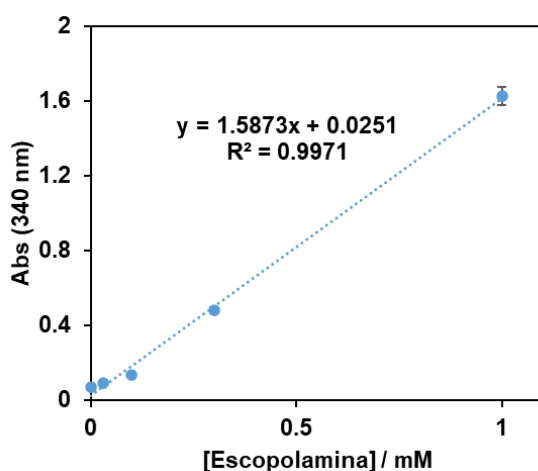


Figura 4.32: Recta de calibrado obtenida tomando el máximo de absorción a 340 nm para diferentes concentraciones de escopolamina. $[\text{NAD}] = 1.00 \cdot 10^{-3}$, $[\text{TRasa}] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $T^{\text{a}} = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 10$ ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-} 0.1 \text{ M}$).

Para intentar mejorar la sensibilidad y obtener unos valores similares a los conseguidos con la atropina, se estudiaron diferentes opciones y solamente cambiando las temperaturas se observó un cambio importante en la señal. Como se puede ver en la Figura 4.33, la enzima presenta una mayor actividad para la escopolamina cuando la reacción tiene lugar a temperaturas más bajas.

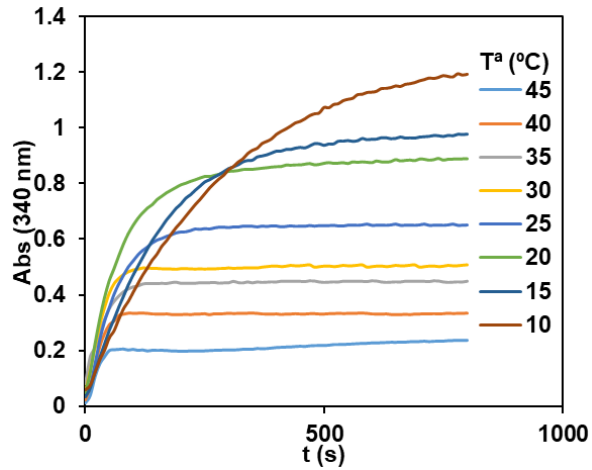


Figura 4.33: Registros cinéticos obtenidos durante el estudio de la temperatura en la reacción de la tropinona reductasa empleando como analito escopolamina. $[NAD] = 1.00 \cdot 10^{-3}$, $[TRasa] = 0.022$ mg/mL, $[Escopolamina] = 3.00 \cdot 10^{-4}$ M, pH = 10 (HCO_3^-/CO_3^{2-} 0.1 M).

Trabajando de igual manera que en el caso de la tropina, la Tabla 4.14 muestra los resultados obtenidos en el cálculo de K_{eq} a diferentes temperaturas, mientras que en la Figura 4.34 puede observarse el ajuste a la ecuación (4.22).

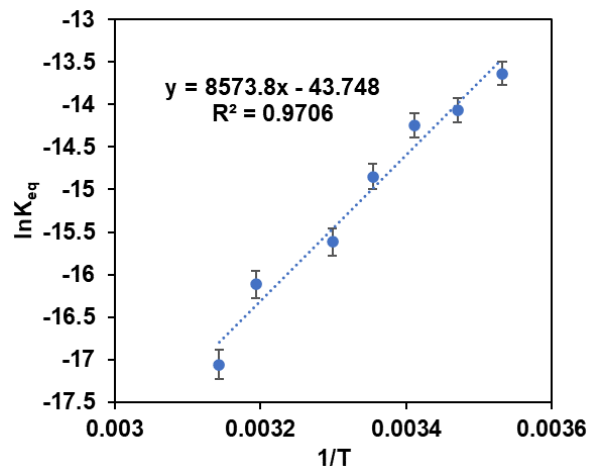


Figura 4.34: Recta obtenida al ajustar los valores obtenidos para K_{eq} en función de la temperatura a la ecuación de Van 't Hoff.

Tabla 4.14: Valores de K_{eq} calculados a partir de $[NADH]_{formada}$ en la reacción.

T^a ($^{\circ}C$)	10	15	20	25	30	40	45
$[NADH]_{formada}$ ($\cdot 10^{-4}$)	1.90	1.53	1.39	1.03	0.70	0.55	0.34
K_{eq} ($\cdot 10^{-7}$)	12.00	7.81	6.48	3.56	1.65	1.00	0.39

Para este caso los valores de ΔH y ΔS obtenidos son:

$$\Delta H^0 = -71282.6 \text{ J/mol} \quad \Delta S^0 = -363.7 \text{ J/mol K}$$

De este modo, tomando $15^{\circ}C$ como temperatura óptima (ya que a temperaturas menores la sensibilidad es algo mayor, pero las cinéticas se vuelven sumamente lentas), se repite la calibración anterior, manteniendo intactas el resto de variables. La recta de calibrado obtenida se muestra en la Figura 4.35.

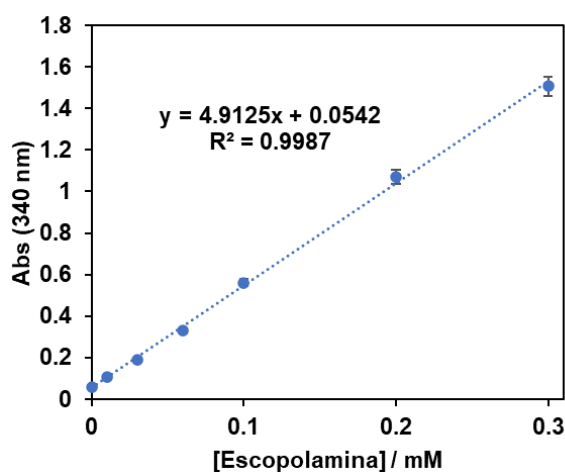


Figura 4.35: Recta de calibrado obtenida tomando el máximo de absorción a 340 nm para diferentes concentraciones de escopolamina. $[NAD] = 1.00 \cdot 10^{-3}$, $[TRasa] = 0.022$ mg/mL, $T^a = 15^{\circ}C$, $pH = 10$ ($HCO_3^-/CO_3^{2-} 0.1$ M).

Como se puede observar, empleando esta nueva temperatura de reacción, mejoran las características analíticas del método obteniendo los valores mostrados en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15: Características analíticas obtenidas para la escopolamina.

LD	$3.60 \cdot 10^{-6}$ M
LC	$1.20 \cdot 10^{-5}$ M
Rango Lineal	$1.20 \cdot 10^{-5} - 3.00 \cdot 10^{-4}$ M
DER ($6.00 \cdot 10^{-5}$, n=5)	3.23 %

En este caso, a diferencia de la tropina, la escopina no es un analito que por si mismo suscite interés analítico. No obstante, se elaboró una recta de calibrado empleando este sustrato para, igual que en el caso de la tropina/atropina, obtener el rendimiento de hidrólisis. La recta de calibrado obtenida se muestra en la Figura 4.36. Al comparar la pendiente de esta recta con la de la Figura 4.35, se observa que la correspondiente a la escopolamina tiene un valor de 0.98 veces la de la escopina, por lo que el rendimiento de la hidrólisis es, en este caso, del 98 ± 2 %.

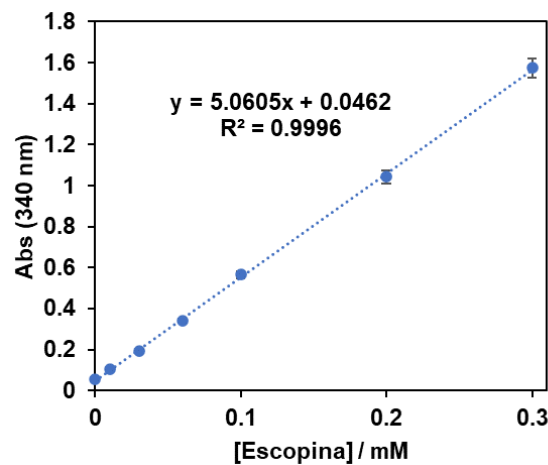


Figura 4.36: Recta de calibrado obtenida tomando el máximo de absorción a 340 nm para diferentes concentraciones de escopina. [NAD] = $1.00 \cdot 10^{-3}$, [TRasa] = 0.022 mg/mL, $T^a = 15^\circ\text{C}$, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

Esta reacción se aplicó a la determinación de escopolamina en la muestra de chía del apartado 4.3.4, sometida a la extracción descrita en el apartado 3.6.1. Tras obtener una concentración de escopolamina inferior al límite de detección, se repitió el análisis dopando la muestra con escopolamina de forma que esta contuviera una concentración de 3.03 mg/g de muestra. Al tomar medidas de la muestra dopada se obtuvo una concentración de escopolamina de 2.857 ± 0.071

mg/g (n=3), lo que supone una recuperación del $94.3 \pm 2.2 \%$, indicando que el método es eficaz para análisis de escopolamina en esta matriz.

4.4.2 Determinación simultánea de atropina y escopolamina

Los resultados obtenidos en el estudio anterior indican que tanto la escopolamina como la atropina se pueden determinar mediante el método planteado, pero existen diferencias importantes en cuanto al comportamiento cinético de ambas sustancias que se traducen en que: 1) la cinética de la atropina es más rápida que la de la escopolamina, especialmente cuando se trabaja a 25°C; 2) la temperatura óptima de trabajo para la atropina y la escopolamina son muy diferentes. Tomando esto como base se planteó la posibilidad de realizar determinaciones simultáneas de atropina y escopolamina. Para ello, se elaboraron dos procedimientos diferentes.

En el primero de ellos, se tuvieron en cuenta las **diferencias cinéticas** entre ambos compuestos, trabajando a una temperatura fija de 25°C. Se basa, por tanto, en combinar la información que se obtiene al **medir las señales a diferentes tiempos de reacción** en mezclas de ellas.

En el segundo, los dos compuestos se diferenciaron en base a los cambios observados según la temperatura de reacción, trabajando, por tanto, a **dos temperaturas diferentes**.

4.4.2.1 Determinación simultánea a partir de las diferencias cinéticas

Esta estrategia fue desarrollada trabajando a 25°C y a partir de dos premisas que se observaron en las determinaciones de ambos analitos por separado, que son:

- La reacción con atropina es bastante más rápida que con escopolamina.
- Para un mismo analito, la señal se estabiliza antes cuanto menor sea la concentración de este.

De este modo, en el caso de la atropina, tomando como concentración máxima $3.00 \cdot 10^{-4}$ M por ser el límite del rango lineal, se entiende que de todas las concentraciones que se pueden analizar, esta será la reacción que más tiempo tarde en llegar al equilibrio que, como se ve en la Figura 4.37, es en torno a 60 segundos. Teniendo en cuenta este dato, se puede asumir que los cambios producidos en cualquier reacción que contenga una mezcla de atropina y

escopolamina a partir de un tiempo de reacción posterior a 60 segundos son debidos únicamente a la reacción de la escopolamina (Figura 4.37).

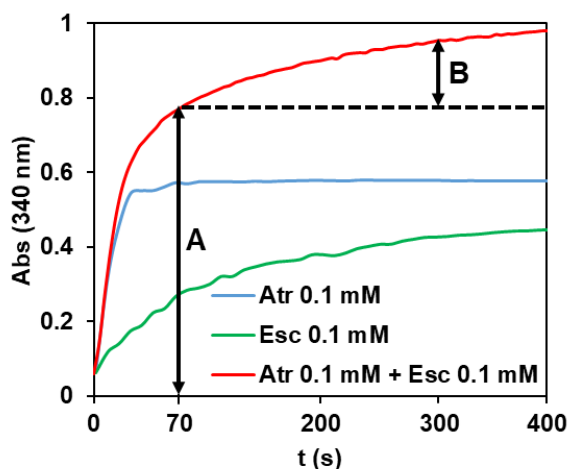


Figura 4.37: Comparación entre la cinética de una reacción que contiene 0.1 mM de atropina y otra que contiene 0.1 mM de escopolamina, frente a una que contiene 0.1 mM de atropina y 0.1 mM de escopolamina. El cambio de absorbancia A en la mezcla es debido a la reacción de ambos compuestos, mientras que el cambio de absorbancia B es únicamente producido por reacción de la escopolamina.

A) Determinación de escopolamina

Asumiendo esta hipótesis, la concentración de escopolamina de una mezcla se calcula a partir de la diferencia de absorbancia obtenida a un tiempo de reacción suficientemente largo (se escogió la obtenida en el segundo 300 de reacción, A+B en la Figura 4.37) y la absorbancia en el segundo 70 (se escogió este segundo como tiempo en el cual toda la atropina ya ha reaccionado, A en la Figura 4.37).

Esta diferencia de absorbancia se interpola en una recta de calibrado de escopolamina elaborada de la misma forma. La Figura 4.38 A) muestra las absorbancias obtenidas a los dos tiempos (300 s y 70 s, respectivamente) y la Figura 4.38 B) la recta diferencia.

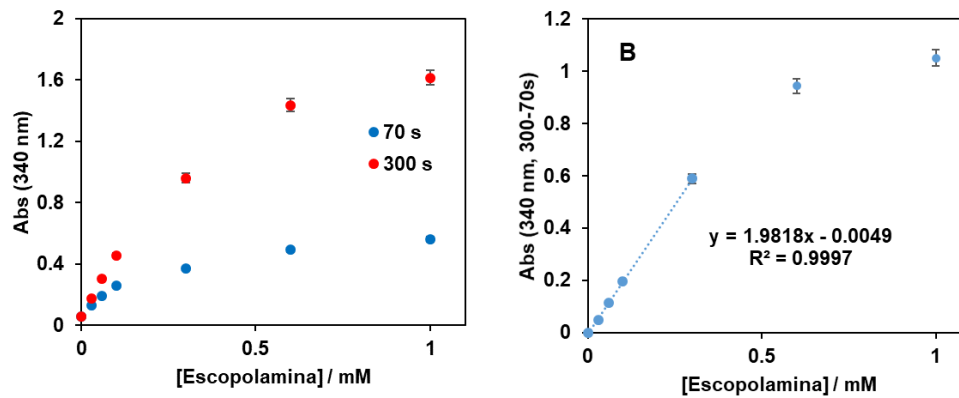


Figura 4.38: A) Curvas de calibrado para escopolamina a 70 y a 300 segundos de reacción. **B)** Curva de calibrado obtenida calculando la diferencia entre las dos curvas de la Figura 4.38 A).

Para comprobar la validez del método, se estudiaron cuatro mezclas de atropina y escopolamina (Tabla 4.16) siguiendo el mismo procedimiento de reacción que si se analizaran por separado (empleando una temperatura de 25°C). Los registros cinéticos obtenidos durante las reacciones junto con sus condiciones experimentales se muestran en la Figura 4.39.

Tabla 4.16: Mezclas de atropina y escopolamina preparadas junto con sus absorbancias a 340 nm tras 70 y 300 segundos de reacción.

Nº Exp	[Atr] / M	[Esc] / M	Abs (70s)	Abs (300s)
1	$3.00 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	0.4058	0.5893
2	$1.00 \cdot 10^{-4}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	0.7603	0.9502
3	$3.00 \cdot 10^{-5}$	$3.00 \cdot 10^{-4}$	0.5749	1.1433
4	$1.00 \cdot 10^{-4}$	$3.00 \cdot 10^{-4}$	0.8383	1.5026

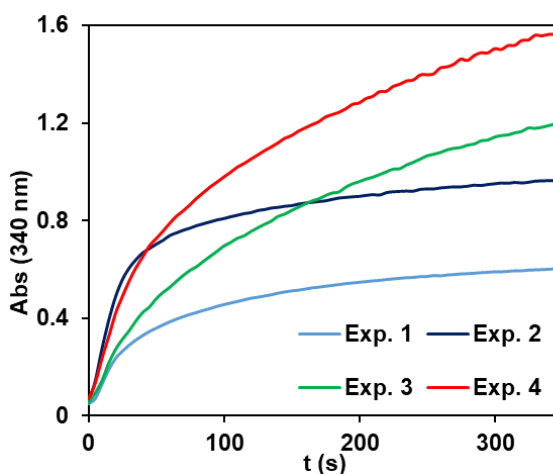


Figura 4.39: Registros cinéticos obtenidos para las cuatro mezclas de atropina y escopolamina medidas.

Tras calcular las diferencias entre la absorbancia obtenida a 300 y a 70 segundos (Abs_{calc}), y comparar estos valores con los resultados obtenidos en las calibraciones de **escopolamina** ($Abs_{teórica}$), se obtienen los resultados de la Tabla 4.17.

Tabla 4.17: Comparación entre los valores de absorbancia obtenidos para las mezclas frente a los esperados y las concentraciones calculadas tras interpolar en la recta frente a la real.

Nº	Abs_{calc} (300-70s)	$Abs_{teórica}$ (300-70s)	$[Esc]_{obtenida}$ / M	$[Esc]_{real}$ / M	Error (%)
1	0.1836	0.1959	$9.51 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	4.90
2	0.1899	0.1959	$9.83 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	1.71
3	0.5684	0.5896	$2.89 \cdot 10^{-4}$	$3.00 \cdot 10^{-4}$	3.57
4	0.6643	0.5896	$3.37 \cdot 10^{-4}$	$3.00 \cdot 10^{-4}$	12.6

Como puede observarse, el error en el cálculo de la concentración de escopolamina es inferior al 5%, excepto para la última mezcla en la que se obtiene un error superior al 12%. Esto se debe a que esta concentración de escopolamina se encuentra en el límite del rango lineal de la recta de calibrado calculada a partir de las diferencias cinéticas. Al combinarse con una elevada concentración de atropina, se genera una señal muy alta, próxima a los valores de saturación.

B) Determinación de atropina

En cuanto a la concentración de **atropina**, esta se calcula restando a la absorbancia obtenida a 300 segundos para la mezcla, el valor de absorbancia correspondiente a la escopolamina de esa concentración y ese tiempo, obtenido de la curva de la Figura 4.38 A).

Para las cuatro mezclas estudiadas anteriormente, se restó la absorbancia correspondiente a la escopolamina a ese mismo tiempo, según (4.25) y las diferencias obtenidas se compararon con las absorbancias esperadas para concentraciones de atropina de ese mismo valor (Tabla 4.18). Las absorbancias esperadas para la atropina se extrajeron de la recta de calibrado de la Figura 4.28, por interpolación de las concentraciones de atropina empleadas en las mezclas. Para interpolar en la recta de la Figura 4.28, en este caso, no se debe tener en cuenta la ordenada en el origen, al ser esta debida a la señal que produce el NAD por encontrarse en exceso. Al estar calculando una diferencia entre valores de absorbancia y no una absorbancia total, esta señal se anula.

$$Abs_{Total,300s} - Abs_{Esc,300s} = Abs_{Atr,300s} \quad (4.25)$$

Tabla 4.18: Cálculo de la absorbancia debida a la señal de la atropina a partir de la diferencia entre la obtenida para la mezcla y la correspondiente a la escopolamina; y comparación frente a la absorbancia esperada.

Nº	Abs _{total}	Abs _{esc}	Abs _(total-esc)	[Atr] _{obtenida} / M	[Atr] _{real} / M	Error (%)
1	0.5893	0.4562	0.1331	$2.60 \cdot 10^{-5}$	$3.00 \cdot 10^{-5}$	3.33
3	1.1433	0.9613	0.1819	$3.62 \cdot 10^{-5}$		
2	0.9502	0.4562	0.4940	$9.71 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	1.89
4	1.5026	0.9613	0.5413	$1.07 \cdot 10^{-4}$		

Así, calculando la media de los dos resultados obtenidos en la Tabla 4.18 para cada una de las dos concentraciones de atropina diferentes en las mezclas y comparando este valor con el esperado, se obtiene un error del 3.33% para $3 \cdot 10^{-5}$ M mientras que para $1 \cdot 10^{-4}$ M el error es del 1.89%. Al comparar los resultados obtenidos para la atropina con los obtenidos para la escopolamina, se puede observar que esta metodología es más eficaz para concentraciones bajas de

escopolamina que para concentraciones altas. Sin embargo, en el cálculo de la concentración de atropina, funciona mejor para concentraciones mayores de este analito.

4.4.2.2 Determinación simultánea a partir de los cambios en la sensibilidad según la temperatura de la reacción

Como se ha visto en apartados anteriores de este capítulo (Figuras 4.23 y 4.33), la K_{eq} de ambas reacciones es mayor (mayor sensibilidad) a temperaturas bajas a costa de aumentar el tiempo de reacción. No obstante, estos cambios en la sensibilidad son más pronunciados en el caso de la escopolamina que en la atropina. De este modo, trabajando a 35°C, a tiempos cortos de reacción la escopolamina apenas da señal.

Partiendo de esta hipótesis, al hacer reaccionar una disolución que contenga una mezcla de atropina y escopolamina a 35°C, toda la señal obtenida, en un tiempo establecido, puede considerarse que es debida a la atropina. Por otra parte, para obtener la concentración de escopolamina, esta misma disolución se hará reaccionar a 15°C. A la señal obtenida, se le restará la correspondiente a una concentración de atropina igual a la calculada previamente, pero medida a 15°C.

Para comprobar esta estrategia se hicieron dos nuevas calibraciones con atropina:

- Una a 35°C que se empleará para interpolar la señal de las mezclas medidas a esa temperatura (Figura 4.40 A)), de la cual se hallará la concentración de atropina de la mezcla.
- Otra a 15°C, que servirá para conocer que señal da la concentración de atropina hallada a esta otra temperatura, y poder restársela a la señal de la mezcla; obteniendo una diferencia correspondiente con la señal de escopolamina (Figura 4.40 B)).

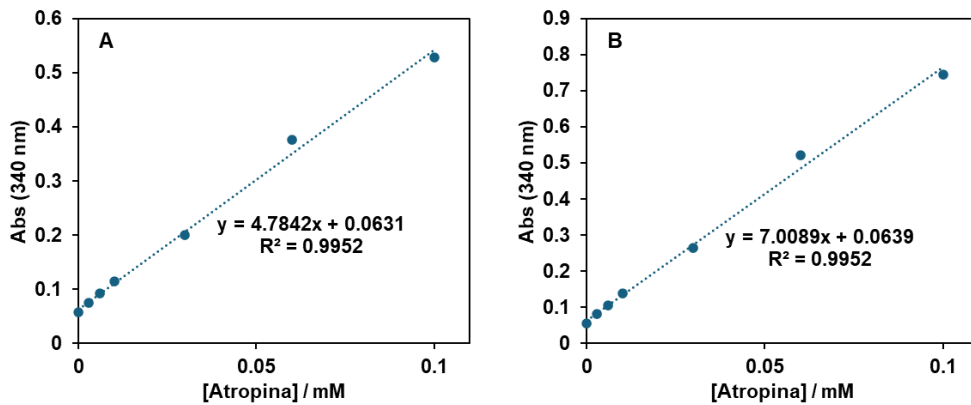


Figura 4.40: A) Recta de calibrado de atropina a 35°C. **B)** Recta de calibrado de atropina a 15°C.

Por otra parte, se estudiaron las cuatro mezclas de atropina y escopolamina de la Tabla 4.16 siguiendo el mismo procedimiento de reacción que si se analizaran por separado. Las cuatro mezclas se midieron tanto a 15°C (Figura 4.41 A)) como a 35°C (Figura 4.41 B)).

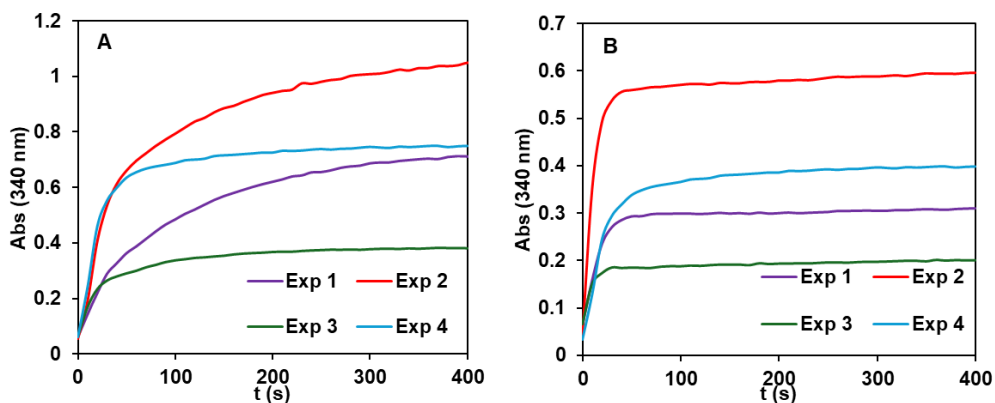


Figura 4.41: A) Cinéticas obtenidas para las mezclas a 15°C. **B)** Cinéticas obtenidas para las mezclas a 35°C.

Estos resultados muestran que la hipótesis planteada de que a 35°C la concentración de escopolamina no debe interferir en la medida de atropina no es correcta, ya que con los experimentos 1 y 3 se debería obtener la misma señal al contar con concentraciones de atropina iguales; y lo mismo ocurre con los experimentos 2 y 4.

Debido a estos resultados, la metodología anterior (diferenciación por cinéticas de reacción) será la empleada para las determinaciones conjuntas de atropina y escopolamina.

4.4.2.3 Aplicación de la determinación simultánea a partir de diferencias cinéticas sobre una muestra de chía

La metodología diseñada para la determinación simultánea de atropina y escopolamina en el apartado 4.4.2.1 fue aplicada sobre la muestra de chía empleada a lo largo de este capítulo. Como ya se había comprobado tanto para atropina como para escopolamina, la concentración de esta muestra era inferior al límite de detección, por lo que se dopó tanto con atropina como con escopolamina de forma que tuviera unas concentraciones de 2.89 mg/g de muestra y 3.03 mg/g de muestra, respectivamente. Tras realizar las medidas como se ha desarrollado en el apartado 4.4.2.1, se obtuvo una concentración de atropina de 2.710 ± 0.087 mg/g ($n=3$) y una concentración de escopolamina de 2.794 ± 0.067 mg/g ($n=3$), lo que se corresponde con unas recuperaciones del 93.7 ± 3.0 % y 92.1 ± 2.2 %, respectivamente.

4.5 Conclusiones

Los estudios realizados permiten concluir que la enzima TRasa cataliza la oxidación tanto de tropina como de escopina de acuerdo con un modelo cinético de complejo ternario de orden obligatorio, lo que ha permitido caracterizar las constantes cinéticas de ambos. Es de reseñar el efecto negativo de la temperatura sobre la K_{eq} de la reacción de ambos sustratos, así como el efecto de la concentración de la enzima de la K_{eq} .

A partir de estos resultados se han desarrollado sendas metodologías para la determinación de atropina y escopolamina mediante de la señal del NADH generado en la reacción de la TRasa a 340 nm. Si bien esta metodología ofrece buenos resultados, presenta el inconveniente de que la señal analítica se encuentra en el rango del UV, por lo que no es adecuada para la construcción de un sensor colorimétrico. Por esta razón, en el siguiente capítulo se va a acoplar una reacción colorimétrica a esta metodología con el objetivo de conseguir una señal analítica en el rango del espectro visible.

Por último, la diferencia de cinética de ambos analitos permite su determinación simultánea. Esto es una ventaja analítica importante frente a los métodos de determinación basados en inmunoensayo en los que la selectividad del inmuno-reactivo solo permite la determinación de atropina o de escopolamina.

4.6 Bibliografía

- 4.1. Chen C, Wang J (2020) Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review. *Analyst* 145:1605–1628. <https://doi.org/10.1039/C9AN01998G>
- 4.2. Chen YT, Lee YC, Lai YH, Lim JC, Huang NT, Lin CT, Huang JJ (2020) Review of Integrated Optical Biosensors for Point-of-Care Applications. *Biosensors* 10:209. <https://doi.org/10.3390/bios10120209>
- 4.3. Chien PJ, Ye M, Suzuki T, Toma K, Arakawa T, Iwasaki Y, Mitsubayashi K (2016) Optical isopropanol biosensor using NADH-dependent secondary alcohol dehydrogenase (S-ADH). *Talanta* 159:418–424. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.036>
- 4.4. Kudo H, Sawai M, Wang X, Gessei T, Koshida T, Miyajima K, Saito H, Mitsubayashi K (2009) A NADH-dependent fiber-optic biosensor for ethanol determination with a UV-LED excitation system. *Sens Actuators B Chem* 141:20–25. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.06.008>
- 4.5. Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L (2004) Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev* 18:12–16. <https://doi.org/10.1101/gad.1164804>
- 4.6. Rutter J, Reick M, Wu LC, Mcknight SL (2001) Regulation of Clock and NPAS2 DNA Binding by the Redox State of NAD Cofactors. *Science* (1979) 293:510–514. <https://doi.org/10.1126/science.1060698>
- 4.7. Zhang Q, Piston DW, Goodman RH (2002) Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science* (1979) 295:1895–1897. <https://doi.org/10.1126/science.1069300>

- 4.8. Eto K, Tsubamoto Y, Terauchi Y, Sugiyama T, Kishimoto T, Takahashi N, Yamauchi N, Kubota N, Murayama S, Aizawa T, Akanuma Y, Aizawa S, Kasai H, Yazaki Y, Kadowaki T (1999) Role of NADH Shuttle System in Glucose-Induced Activation of Mitochondrial Metabolism and Insulin Secretion. *Science* (1979) 283:981-985. <https://doi.org/10.1126/science.283.5404.981>
- 4.9. Seimiya H, Muramatsu Y, Ohishi T, Tsuruo T (2005) Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell* 7:25-37. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.021>
- 4.10. Zhou Y, Xu Z, Yoon J (2011) Fluorescent and colorimetric chemosensors for detection of nucleotides, FAD and NADH: Highlighted research during 2004-2010. *Chem Soc Rev* 40:2222-2235. <https://doi.org/10.1039/c0cs00169d>
- 4.11. Hald E, Lehmann P, Ziegenhorn J (1975) Molar Absorptivities of f3-NADH and /3-NAD at 260 nm. *Clin. Chem.* 21:884-887. <https://doi.org/10.1093/clinchem/21.7.884>
- 4.12. Mccomb RB, Bond LW, Burnett RW, Keech RC, Bowers GN (1976) Determination of the Molar Absorptivity of NADH. *Clin. Chem* 22:141-150. <https://doi.org/10.1093/clinchem/22.2.141>
- 4.13. Orrego AH, Andrés-Sanz D, Velasco-Lozano S, Sanchez-Costa M, Berenguer J, Guisan JM, Rocha-Martin J, López-Gallego F (2021) Self-sufficient asymmetric reduction of β -ketoesters catalysed by a novel and robust thermophilic alcohol dehydrogenase co-immobilised with NADH. *Catal Sci Technol* 11:3217-3230. <https://doi.org/10.1039/d1cy00268f>
- 4.14. Noey EL, Tibrewal N, Jiménez-Osés G, Osuna S, Park J, Bond CM, Cascio D, Liang J, Zhang X, Huisman GW, Tang Y, Houk KN (2015) Origins of stereoselectivity in evolved ketoreductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E7065-E7072. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507910112>
- 4.15. Andrés-Sanz D, Maiz-Iginitz A, Bolivar JM, Orrego AH, Sardon H, López-Gallego F (2024) Enantiodivergent biosynthesis of β -hydroxy esters by

self-sufficient heterogeneous biocatalysts in a continuous flow. *Green Chemistry* 26:4563–4573. <https://doi.org/10.1039/d4gc00369a>

- 4.16. Cornish-Bowden A (1979) *Fundamentals of enzyme kinetics*. Butterworth & Co Ltd
- 4.17. Mulder PPJ, de Nijs M, Castellari M, Hortos M, MacDonald S, Crews C, Hajslova J, Stranska M (2016) Occurrence of tropane alkaloids in food. *EFSA Supporting Publications* 13:.. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.en-1140>
- 4.18. Hofmann D, Wirtz A, Santiago-Schübel B, Disko U, Pohl M (2010) Structure elucidation of the thermal degradation products of the nucleotide cofactors NADH and NADPH by nano-ESI-FTICR-MS and HPLC-MS. *Anal Bioanal Chem* 398:2803–2811. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4111-z>
- 4.19. Theorell H, Nygaard A, Bonnichsen R (1955) Studies on Liver Alcohol Dehydrogenase. *Acta Chem. Scand.* 9:1148-1165
- 4.20. Robert Alberty BA (1953) The Effect of Enzyme Concentration on the Apparent Equilibrium Constant for an Enzyme-catalyzed Reaction. Contribution from de Departament of Chemistry, University of Wisconsin
- 4.21. Kyrychenko A, Ladokhin AS (2024) Fluorescent Probes and Quenchers in Studies of Protein Folding and Protein-Lipid Interactions. *Chemical Rec* 202300232:.. <https://doi.org/10.1002/tcr.202300232>

Capítulo 5:

Desarrollo de un sensor enzimático colorimétrico para alcaloides del tropano

5.1 Introducción

La reacción optimizada en el capítulo anterior ofrece buenas prestaciones analíticas. Sin embargo, la señal analítica del NADH presenta su máximo a 340 nm, por lo que no es óptimo a la hora de desarrollar un sensor enzimático colorimétrico. Con este fin, se sometió el NADH obtenido en la reacción enzimática a una reacción posterior con un colorante. En esta reacción, catalizada por la enzima NADH-deshidrogenasa, conocida comúnmente como Diaforasa, el NADH se oxida a NAD y el cromógeno pasa a su forma reducida; esta enzima sería al NADH lo que es la peroxidasa al H_2O_2 , es decir, una enzima que cataliza la oxidación del NADH a NAD por la acción de un gran número de sustratos. Inicialmente se utilizó como cromógeno para esta determinación el diclorofenol-indofenol (DCPIP), pero posteriormente empezaron a usarse sales de tetrazolio, como el trifenil tetrazolio (TTC), MTT, WST-8 o el utilizado en este trabajo cloruro de iodonitrotetrazolio (INT), que se reduce a un compuesto tipo formazán que presenta un color rojizo [5.1, 5.2]. Estas sales son ampliamente utilizadas tanto para la determinación de la concentración de NADH como de la actividad de la Diaforasa [5.3]. En este capítulo se presenta la optimización de esta reacción indicadora y su acoplamiento a la reacción optimizada en el capítulo anterior con la TRasa, como se muestra de forma esquematizada en la Figura 5.1.

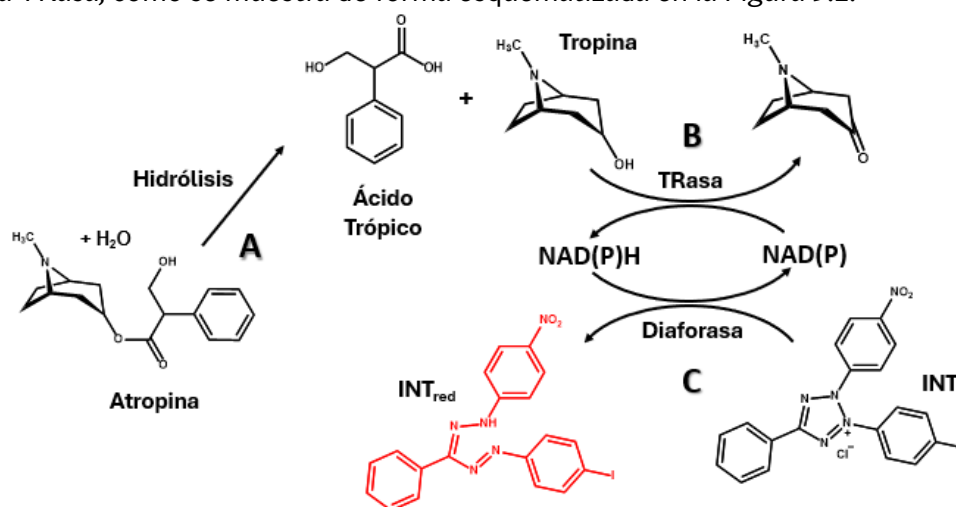


Figura 5.1: Esquema de reacciones en la degradación enzimática de la atropina. **A)** Desesterificación de la atropina por medio de una reacción de hidrólisis con NaOH. **B)** Oxidación de la tropina empleando la enzima tropinona reductasa y NAD como cofactor. **C)** Reducción del colorante por medio de la enzima diaforasa.

Como se ha comentado, el objetivo era desarrollar un sensor que se pudiera implementar fácilmente en diferentes tipos de situaciones analíticas. Por ello, inicialmente se estudió y desarrolló el método en disolución, pero posteriormente se implementó en soportes sólidos de celulosa. Para este tipo de soportes las medidas se realizaron mediante colorimetría sobre una imagen digital obtenida utilizando un teléfono móvil tipo “smartphone” y usando como señal analítica coordenadas de color del espacio RGB. De esta forma se ha buscado desarrollar una tecnología que aporte información acerca del analito de forma rápida, económica y fácilmente accesible.

5.2 Colorimetría digital

La existencia de detectores tipo CCD (Charge-Couple Device) en equipamientos de bajo coste, como cámaras, teléfonos móviles, webcams o escáneres digitales, en combinación con el uso de espacios de color [5.4] constituye una nueva alternativa analítica instrumental que permite una lectura y un procesamiento de información muy rápido, con precisión razonable y a un coste moderado [5.5]. Actualmente, este tipo de plataformas analíticas está experimentando un gran auge, poniéndose a la altura de incluso determinaciones a través de métodos de espectrometría molecular o fluorescencia, tanto en disolución como implementados sobre soportes (sensores) derivados de ellos. Esta implementación está dirigida a áreas que demandan una gran cantidad de análisis y a la obtención de información analítica de manera rápida, tales como el diagnóstico clínico o el control “in-situ” de alimentos [5.6].

Por medio de los cambios de color de una imagen digital se puede obtener información cuantitativa acerca de un analito. De este modo, empleando las cámaras digitales integradas en un smartphone se puede llevar a cabo la determinación cuantitativa de una reacción analítica por medio de la medida de las coordenadas RGB de esta (o variaciones de estas coordenadas a lo largo del tiempo) [5.7].

Para evaluar la calidad de esa información es necesario relacionar los valores de las coordenadas de color recogida con la concentración de la sustancia coloreada que se mide. Estas relaciones cambiarán en función de si se está midiendo luz

transmitida (por ejemplo, una disolución) o luz reflejada, como el caso de una sustancia sólida, que es lo que se va a usar en este trabajo.

Para una sustancia sólida absorbente, las señales de las tres coordenadas de color ($E_{(R,G,B)}$) se relacionan con la concentración de las especies absorbentes a través de la siguiente expresión matemática [5.8]:

$$E_{(R,G,B)} = A \sum_{\lambda} (I_{\lambda} P_{\lambda} R_{\lambda} + I_{p,\lambda}) \quad (5.1)$$

Donde A es una constante, independiente de la longitud de onda, que incluye factores relacionados con el diseño de la cámara, el ángulo sólido, y diferentes conversiones de magnitudes en la cámara (luz a voltaje y analógico a digital); I_{λ} es la potencia espectral (“intensidad”) de la fuente de iluminación que suele ser conocida e independiente de las características del sólido a medir; P_{λ} es la sensibilidad espectral de la cámara (es decir, la respuesta del detector a cada λ); $I_{p,\lambda}$ es la luz parásita del sistema y R_{λ} es la reflectancia del sólido, es decir, la fracción de la luz incidente que es reflejada tras el proceso de absorción (soportes de celulosa, en este caso). Este último parámetro depende de las especies coloreadas presentes en el sólido (concentración, en M y ϵ_{λ} , en $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) y el coeficiente de dispersión del sólido (s_{λ} , en cm). Se han propuesto varios modelos para relacionar el parámetro R_{λ} con ϵ_{λ} , s_{λ} , y C, siendo el más utilizado el que deriva de la teoría Kubelka-Munk adaptada a las medidas en cromatografía de capa fina [5.9].

$$R_{\lambda} = \frac{1}{\alpha_{\lambda} + \beta_{\lambda} \text{Coth}(\beta_{\lambda} s_{\lambda} L)} \quad (5.2)$$

donde $\alpha_{\lambda} = \frac{2.3\epsilon_{\lambda}C + s_{\lambda}}{s_{\lambda}}$ y $\beta_{\lambda} = \sqrt{\alpha_{\lambda}^2 - 1}$, Coth es la cotangente hiperbólica y L el paso óptico. La combinación de las ecuaciones 5.1 y 5.2 da lugar a:

$$E_{(R,G,B)} = A \sum_{\lambda} \left(I_{\lambda} P_{\lambda} \frac{1}{\alpha_{\lambda} + \beta_{\lambda} \text{Coth}(\beta_{\lambda} s_{\lambda} L)} + I_{p,\lambda} \right) \quad (5.3)$$

Esta ecuación sugiere una relación compleja entre $E_{(R,G,B)}$ y la concentración de analito, pero puede ser simplificada aplicando la aproximación de la función a un polinomio de Taylor. Como es 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 calibrado, si bien para algún rango de concentraciones se puede ajustar una relación lineal. Al llevar a cabo la aplicación el resultado obtenido es:

$$E_{(R,G,B)} = A \left[\sum_i I_{\lambda} P_{\lambda} \left(\frac{s_{\lambda} L}{1+s_{\lambda} L} \right) - \sum_{\lambda} I_{\lambda} P_{\lambda} \left[\left(\frac{s_{\lambda} L}{1+s_{\lambda} L} \right)^2 \left(\frac{3+2s_{\lambda} L}{3s_{\lambda}} \right) \right] 2.3 \varepsilon_{\lambda} c + \sum_{\lambda} 2 I_{\lambda} P_{\lambda} \left[\left(\frac{s_{\lambda} L}{1+s_{\lambda} L} \right)^3 \left(\frac{30+45s_{\lambda} L+24(s_{\lambda} L)^2+4(s_{\lambda} L)^3}{45s_{\lambda}^2} \right) \right] (2.3 \varepsilon_{\lambda} c)^2 + I_{p,\lambda} \right] \quad (5.4)$$

La ecuación anterior se puede hacer más fácilmente manejable si se considera que:

- En ausencia de analito (es decir, para un blanco de reacción), $c=0$ y la ecuación queda [5.10]:

$$E_0 = A \left[\sum_i I_{\lambda} P_{\lambda} \left(\frac{s_{\lambda} L}{1+s_{\lambda} L} \right) + I_{p,\lambda} \right] \quad (5.5)$$

- Se pueden agrupar los términos que dependen de s_{λ} , ε_{λ} y L de acuerdo con:

$$V_{\lambda} = \left[\left(\frac{s_{\lambda} L}{1+s_{\lambda} L} \right) \left(\frac{3+2s_{\lambda} L}{3s_{\lambda}} \right) \right] 2.3 \varepsilon_{\lambda} \quad (5.6A)$$

$$W_{\lambda} = 2 \left[\left(\frac{s_{\lambda} L}{1+s_{\lambda} L} \right)^2 \left(\frac{30+45s_{\lambda} L+24(s_{\lambda} L)^2+4(s_{\lambda} L)^3}{45s_{\lambda}^2} \right) \right] (2.3 \varepsilon_{\lambda})^2 \quad (5.6B)$$

Con lo que queda:

$$E = E_0 - V_{\lambda} E_0 c + W_{\lambda} E_0 c^2 \quad (5.7)$$

Al hacer la corrección de los valores de E con los de E_0 se evita el efecto de la luz parásita:

$$\Delta E = E_0 - E \quad (5.8)$$

Si bien se ha descrito un modelo matemático que justifica la relación entre la señal y la concentración de analito, es importante abordar también una serie de problemas que presenta esta tecnología, así como las diferentes soluciones que se han desarrollado en el grupo de investigación para resolverlos.

La primera proviene de la diferencia de construcción y respuesta de los detectores (CCDs) que van implementados en cada móvil, que impide que los resultados obtenidos sean comparables entre ellos. Esto se resolvió en el grupo de investigación mediante la construcción de un algoritmo que aplicado a cada móvil permite estandarizar las respuestas [5.7] y que se ha implementado en una aplicación (AppColorimetryV1).

Un segundo problema fue la diferencia de formato en el cual se almacena la información acerca del color. Esto se corrigió introduciendo también en la misma App un método de procesado adecuado. En definitiva, la AppColorimetryV1 permite obtener medidas de las coordenadas RGB reproducibles siempre y cuando la imagen se tome en las mismas condiciones de iluminación y a la misma distancia entre la cámara y el soporte (distancia focal). Además, presenta un método de corrección que estandariza cada una de las medidas frente a un sistema común y bien definido, el sistema RGB, aportando una reducción significativa de los errores relacionados con la medida.

Existe una tercera mejora que se ha introducido en el sistema de medida, que tiene que ver con conseguir una iluminación homogénea y reproducible de la muestra sólida cuyas coordenadas de color se quiere medir. Para ello el grupo diseñó y construyó un dispositivo (caja de iluminación o “lighting box”) cuyo esquema general se muestra en la Figura 5.2. a. Este dispositivo está fabricado con una impresora 3D (por lo que resulta muy económico) y es virtualmente adaptable a cualquier móvil (Figura 5.2).

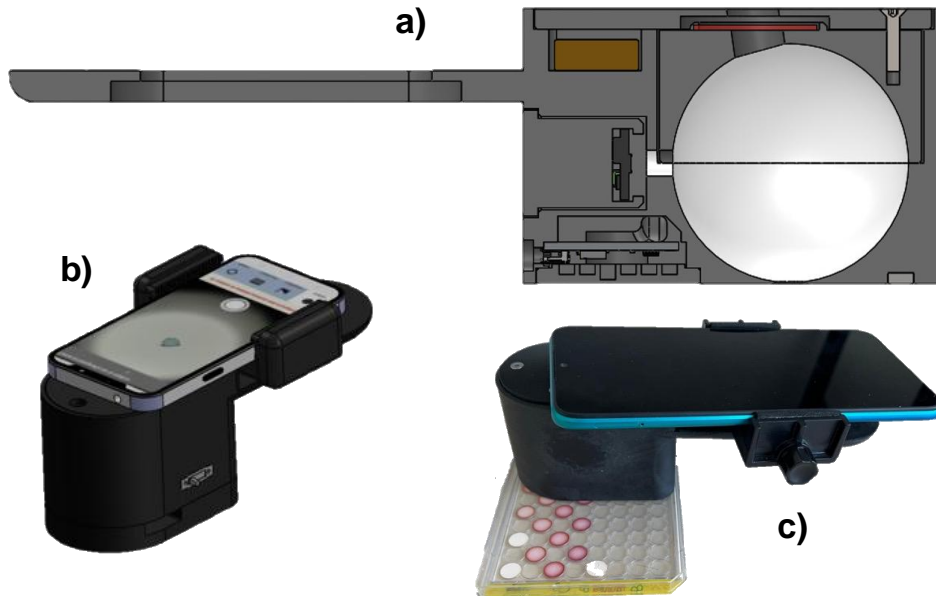


Figura 5.2: **a)** Esquema transversal de la caja de iluminación (el móvil iría situado horizontalmente en la parte superior. **b)** Caja de iluminación acoplada a un smartphone. **c)** Medidas tomadas sobre un soporte sólido con el dispositivo conjunto caja de iluminación-smartphone.

5.3 Estudio de la reacción en disolución

5.3.1 Optimización de la reacción con el colorante

En primer lugar, se optimizó la reacción del NADH generado con el colorante elegido (Figura 5.1 C). Como primera toma de contacto, se realizaron medidas de absorción a 500 nm (máximo de absorción del colorante), empleando las siguientes concentraciones de reactivos: $[\text{NADH}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{INT}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ y $[\text{Diaforasa}] = 0.56 \text{ U/mL}$, que fueron escogidas en base a estudios previos en el grupo de investigación en los que se empleaba este colorante en la determinación de etanol mediante la enzima alcohol deshidrogenasa.

Partiendo de estas condiciones y tras comprobar que la reacción tiene lugar, se realizó una optimización secuencial en la que se estudiaron los siguientes parámetros:

- pH.** Se hicieron ensayos empleando disoluciones amortiguadoras de $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$ de pH 5; de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ de valores de pH 9, 10 y 11; de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de pHs 6, 7, 8 y de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH 12. En la Figura 5.3 aparecen representados los registros cinéticos obtenidos a 500 nm para cada una de las medidas, excepto a valores de pH 11 y 12 a los cuales no tuvo lugar la reacción. Como se puede ver, el valor de pH al cual la reacción aporta un mayor valor de absorbancia, y que se elige como pH óptimo, es 10, que además coincide con el pH óptimo de la reacción a la que se tiene que acoplar posteriormente, optimizada en el Capítulo 4. Si bien a valores de pH superiores se observó que la reacción también tenía lugar, no se tuvieron en consideración los resultados debido a que la enzima TRasa no tiene actividad por encima de pH 10, lo que impediría un acoplamiento de las dos reacciones.

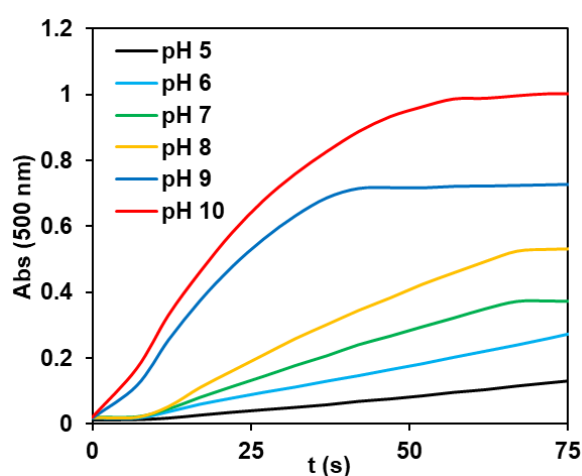


Figura 5.3: Variación de la absorbancia a 500 nm frente al tiempo de reacción a diferentes valores de pH. $[\text{NADH}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{Diaforasa}] = 0.28 \text{ U/mL}$, $[\text{INT}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ y $T^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$.

- Temperatura.** Se realizaron medidas variando la temperatura en intervalos de 5°C entre 25 y 50°C . En este caso también se observa una disminución de la señal en el equilibrio al aumentar la temperatura (Figura 5.4), consecuencia, como en el capítulo anterior, de su efecto en la K_{eq} de la reacción; no se ha calculado esta constante dado que, excepto para las temperaturas de 45 y 50°C , las diferencias son pequeñas y el cálculo incierto. Se eligió como temperatura óptima 25°C , haciéndola coincidir de

nuevo con la temperatura óptima a la cual tiene lugar la reacción de la TRasa.

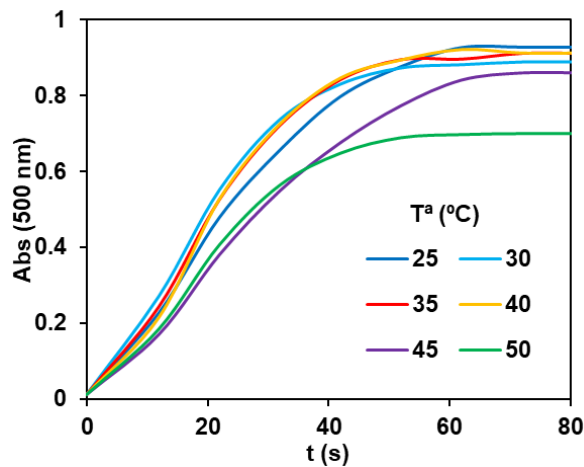


Figura 5.4: Variación de la absorbancia a 500 nm frente al tiempo de reacción a diferentes temperaturas. $[\text{NADH}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{Diaforasa}] = 0.28 \text{ U/mL}$, $[\text{INT}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 10$ ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-} 0.1 \text{ M}$).

- Concentración de diaforasa.** Los registros cinéticos obtenidos durante la reacción se muestran en la Figura 5.5, observándose un aumento en la velocidad de reacción a medida que aumenta la concentración de Diaforasa. También se observa un efecto similar al comentado en el apartado anterior del efecto de la concentración de diaforasa en la K_{eq} de la reacción, aunque menos acusado que en el caso de la TRasa. No obstante, finalmente se escoge como concentración óptima 0.56 U/mL ya que la señal de absorbancia a la cual la reacción estabiliza es la misma que para concentraciones superiores de enzima y de esta forma se consigue un ahorro de reactivo.

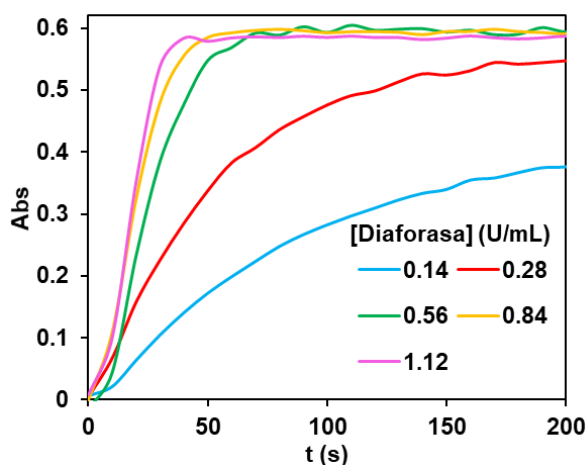


Figura 5.5: Variación de la absorbancia a 500 nm durante el transcurso de la reacción para diferentes concentraciones de Diaforasa. pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M), $[\text{NADH}] = 5.00 \cdot 10^{-5}$ M, $[\text{INT}] = 1.00 \cdot 10^{-4}$ M y $T^a = 25^\circ\text{C}$.

4. **Concentración de INT.** Como se puede observar en los registros cinéticos obtenidos en la Figura 5.6, la señal a la que estabiliza la reacción aumenta al aumentar la concentración de colorante. De nuevo se observa que es necesario optimizar esta concentración al afectar a la extensión del equilibrio. No obstante, para concentraciones de colorante superiores a $2.00 \cdot 10^{-4}$ M la sensibilidad de la reacción no mejora, por lo que esta fue la concentración elegida como óptima. A partir de la Figura 5.6 es posible estimar la absorptividad molar del producto de la reacción ya que para concentraciones de 0.2 y 0.3 mM se puede considerar que todo el NADH se ha transformado en producto. Con ello se obtiene que:

$$\varepsilon_{\text{INT,red}} = 1.34 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (5.9)$$

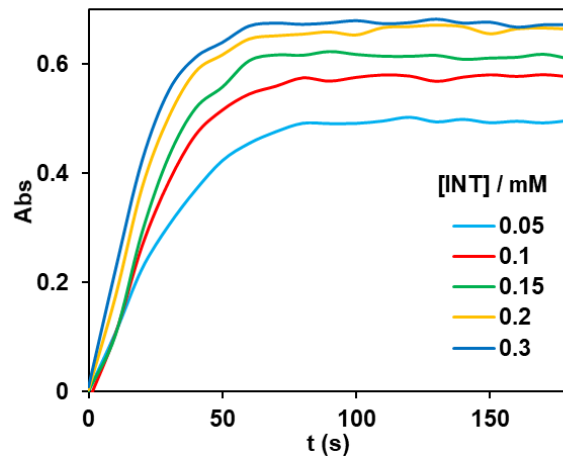


Figura 5.6: Registro cinético obtenidos a 500 nm para la reacción empleando diferentes concentraciones de colorante. pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M), $[\text{NADH}] = 5.00 \cdot 10^{-5}$ M, $[\text{Diaforasa}] = 0.56$ U/mL y $T^{\text{a}} = 25^{\circ}\text{C}$.

5.3.2 Características analíticas de la reacción colorimétrica

Con todos los parámetros de la reacción de reducción del colorante INT optimizados, se elaboró una recta de calibrado empleando diferentes concentraciones de NADH, cuyos resultados se muestran en la Figura 5.7.

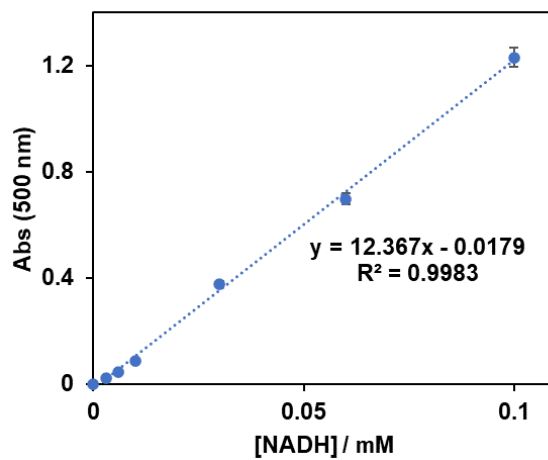


Figura 5.7: Recta de calibrado obtenida empleando diferentes concentraciones de NADH y tomando medidas de absorción a 500 nm. $[\text{Diaforasa}] = 0.56$ U/mL, $[\text{INT}] = 2.00 \cdot 10^{-4}$ M, $T^{\text{a}} = 25^{\circ}\text{C}$, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

A partir de esta recta se calcularon las características analíticas de esta reacción, obteniendo los valores de la Tabla 5.1. Considerando el valor de absorptividad molar del producto coloreado (5.9) y comparándolo con la pendiente de esta recta se observa que la transformación de NADH en el producto final es del 92.3%.

Tabla 5.1: Características analíticas de la reacción colorimétrica.

LD	$6.47 \cdot 10^{-7}$ M
LC	$2.15 \cdot 10^{-6}$ M
Rango Lineal	$2.15 \cdot 10^{-6} - 1.00 \cdot 10^{-4}$ M
DER ($3.00 \cdot 10^{-5}$, n=5)	2.12 %

5.3.3 Acoplamiento de las dos reacciones

Utilizando las condiciones optimizadas de la sección anterior, las dos reacciones se acoplaron de modo que el NADH generado como producto de la primera reacción, actúe como reactivo de la segunda (Figura 5.1).

Tras observar que la reacción funcionaba correctamente, se estudiaron de nuevo los parámetros de la reacción (concentración de enzima y concentración de NADH) sin observarse cambios frente a los valores optimizados previamente.

Empleando los valores optimizados de todas las variables de la reacción, se realizó un estudio de calibrado empleando diferentes concentraciones de atropina. La variación del espectro del colorante frente a la concentración de atropina se muestra en la Figura 5.8. La recta de calibrado obtenida puede observarse en la Figura 5.9.

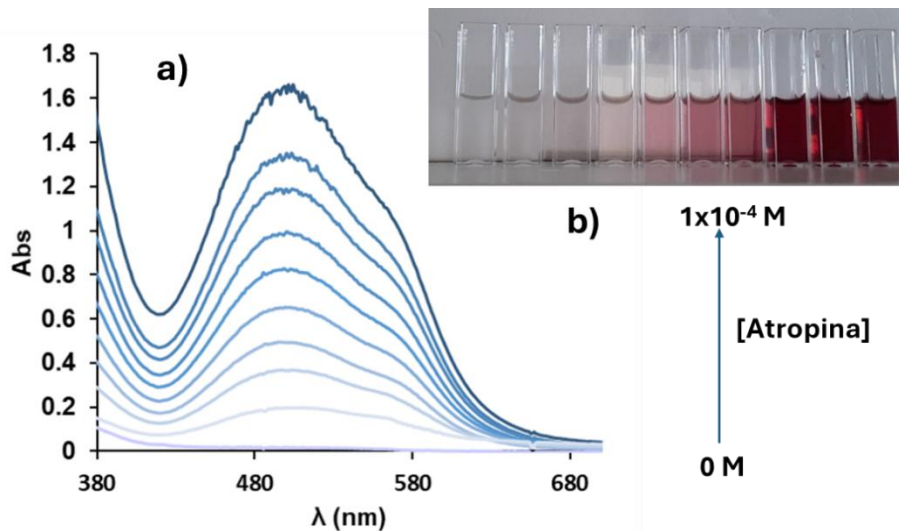


Figura 5.8: a) Espectros obtenidos para el colorante en su forma reducida a medida que se incrementa la concentración de atropina en la reacción. b) Fotografía de las disoluciones medidas.

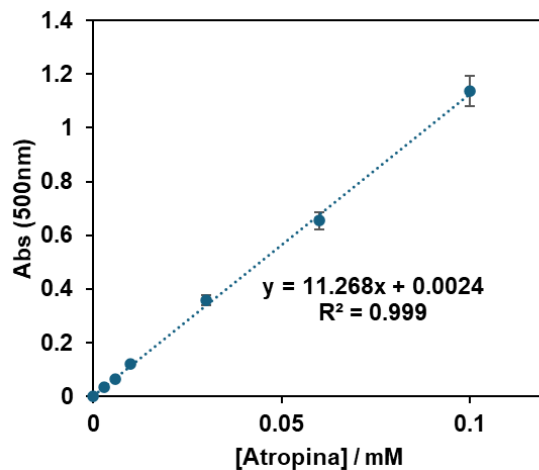


Figura 5.9: Recta de calibrado obtenida empleando diferentes concentraciones de atropina y tomando medidas de absorción a 500 nm. [Diaforasa] = 0.56 U/mL, [INT] = $2.00 \cdot 10^{-4}$ M, [NAD] = $1.00 \cdot 10^{-3}$ M, [TRasa] = 0.022 mg/mL, $T^a = 25^\circ\text{C}$, pH = 10 ($\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

Por último, se calcularon los parámetros analíticos del método, obteniendo los valores mostrados en la Tabla 5.2. Del mismo modo que en el apartado anterior, a partir de la pendiente de esta recta y el resultado de (5.9) se puede deducir que la transformación de atropina en el producto final es del $84 \pm 1\%$.

Tabla 5.2: Características analíticas del método.

LD	$7.10 \cdot 10^{-7}$ M
LC	$2.37 \cdot 10^{-6}$ M
Rango Lineal	$2.37 \cdot 10^{-6} - 1.00 \cdot 10^{-4}$ M
DER ($3.00 \cdot 10^{-5}$, n=5)	2.84 %

5.3.4 Aplicación del método en disolución sobre muestras reales

Para demostrar la eficacia de este método, se aplicó a la determinación de atropina en papillas para bebés. Las muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio de Salud Pública (Gobierno de Aragón, España). Estas muestras habían sido previamente analizadas en este laboratorio (de acuerdo a la UNE EN: 15,662:2019) empleando un método validado basado en el análisis por medio de un equipo HPLC-MS/MS [5.11]. Sus resultados mostraron que la concentración de atropina contenida en las muestras se encontraba por debajo del límite de detección del método desarrollado. De este modo, las muestras fueron dopadas con concentraciones conocidas de atropina. Sobre estas muestras se hizo un estudio de recuperación, cuyos resultados aparecen reflejados en la Tabla 5.3. Estos resultados demuestran la validez del método para el análisis de muestras reales, al no observarse efecto matriz apreciable.

Tabla 5.3: Resultados obtenidos en el ensayo de recuperación realizado sobre la muestra.

[Atropina] añadida (M)	Porcentaje de recuperación (%)
$1.00 \cdot 10^{-5}$	111 (± 6)
$6.00 \cdot 10^{-5}$	93 (± 2)
$1.00 \cdot 10^{-4}$	97 (± 2)

5.4 Estudio de la reacción en soporte sólido

A partir de los estudios realizados en disolución se optimizó el método sobre soportes sólidos para el diseño del sensor, para lo cual es necesario:

- Estudiar el soporte sólido, en este caso de celulosa, sobre el cual se van a inmovilizar los reactivos.

- Comprobar la estabilidad de los reactivos inmovilizados.
- Optimizar las variables de la reacción (concentraciones de reactivos y pH de la reacción).

5.4.1 Diseño de los soportes de celulosa

Para diseñar un sensor desechable es importante que la cinética de la reacción sea lo suficientemente rápida como para obtener buenos resultados en un tiempo breve. Además, la intensidad y la homogeneidad del color generado por medio de la reacción son fundamentales para garantizar tanto la sensibilidad como la reproducibilidad del método. Para cumplir estos requisitos, hay que atender a dos aspectos:

- El analito debe difundir de manera controlada a través del soporte empleado, evitando la aparición de fenómenos no deseados como el “anillo de café”. Este fenómeno ocurre cuando el producto coloreado se acumula en los bordes exteriores de la zona de reacción, creando una distribución no uniforme que puede alterar la precisión de los resultados.
- La enzima utilizada no debe perder su actividad después de ser inmovilizada sobre el soporte, ya que comprometería tanto la sensibilidad como la reproducibilidad del test.

Ambos aspectos están intrínsecamente relacionados con las propiedades del material empleado para el soporte y con la metodología empleada para inmovilizar la enzima.

El primer estudio consistió en la optimización del porcentaje de celulosa empleado en la preparación del soporte. Para ello, se hicieron ensayos con dispersiones que contenían un 3 y un 5% de celulosa en agua. Sobre los soportes de celulosa preparados como se describe en el apartado 3.3.1 y una vez secos, se añadieron los reactivos. Con este propósito, se prepararon dos disoluciones en distintos viales. El primer vial contenía una concentración de $6.66 \cdot 10^{-3}$ M de NAD, 1.47 mg/mL de TRasa y $6.66 \cdot 10^{-4}$ M de tropina en disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ de pH 10 0.1 M, es decir, los reactantes necesarios para la reacción B de la Figura 5.1. Por otra parte, el segundo vial contenía concentraciones de $1.33 \cdot 10^{-3}$ M de INT y de 3.73 U/mL de Diaforasa en la misma disolución amortiguadora, reactivos necesarios para la reacción indicadora (Figura 5.1 C). De

cada uno de estos viales se toman 25 μL y se añaden sobre el soporte de celulosa quedando, lógicamente, diluidas a la mitad las concentraciones inicialmente presentes en los viales, por lo que la concentración de tropina a determinar fue $3.33 \cdot 10^{-4}$ M. Las placas se introducen en la incubadora durante una hora (25°C) y, una vez secas, se miden las coordenadas RGB de los soportes de celulosa.

La Tabla 5.4 registra las coordenadas obtenidas midiendo como se explica en el apartado 3.3.3 para los soportes de celulosa al 5%, donde la coordenada G muestra una sensibilidad mayor. Asimismo, el valor $\Delta G = G_0 - G$ (5.8) también aporta una mayor reproducibilidad que otros parámetros, siendo G_0 la coordenada G obtenida para el blanco de reacción. De este modo, el parámetro escogido para trabajar en soportes sólidos es ΔG .

Tabla 5.4: Resultados obtenidos según la coordenada (o combinación de ellas) empleado en la medida.

Coordenada	Valor	s	DER (%)
R	151.0	7.07	4.7
G	134.5	0.7	0.5
B	136.5	4.9	3.6
ΔR	48.0	7.1	14.7
ΔG	138.5	0.7	0.5
ΔB	51.5	4.9	9.6

En la Tabla 5.5 pueden observarse los resultados obtenidos para soportes preparados con dispersiones de celulosa al 3 y al 5%. Los soportes hechos con un 5% presentan una señal más reproducible, por lo que este se escogerá como el porcentaje óptimo al cual se trabajará.

Tabla 5.5: Medidas tomadas empleando dispersiones de celulosa al 3 y al 5%.

Porcentaje de celulosa	3%	5%
ΔG	133.5	138.5
Desviación Estándar	12.0	0.7
DER (%)	9.0	0.5

5.4.2 Optimización de las condiciones experimentales

Una vez se escogió la disolución de celulosa que se emplearía para el desarrollo de los soportes sólidos (celulosa 5%), el siguiente paso consistió en la inmovilización y optimización de forma secuencial de cada uno de los reactivos que van a participar en el sensor. Otro objetivo importante era cuales de los reactivos participantes en la reacción (INT, diaforasa, TRasa y NAD) se podían añadir durante el proceso de fabricación del soporte sólido, ya que en algunos casos la inmovilización del mismo durante el proceso de preparación de los soportes puede conducir a su desactivación.

Por ello, el proceso de optimización se realizó añadiendo el reactivo a evaluar en la mezcla de celulosa para que quedara formando parte del soporte. Una vez optimizado ese reactivo ya quedaría formando parte del soporte para los siguientes estudios de optimización del resto.

En primer lugar, se estudió la concentración de INT que debería presentar la suspensión de celulosa, para lo cual se añadieron diferentes cantidades de colorante sobre la suspensión, de forma que las concentraciones finales de INT en el soporte fueran $3.95 \cdot 10^{-4}$, $7.91 \cdot 10^{-4}$, $1.18 \cdot 10^{-3}$, $1.78 \cdot 10^{-3}$ y $2.37 \cdot 10^{-3}$ M.

Una vez se secaron los soportes, se volvieron a preparar los dos viales con reactivos como en el apartado 5.4.1, solo que esta vez la disolución de INT añadida en el segundo vial se reemplaza por disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ a pH 10 de concentración 0.1 M. Este procedimiento se realizó del mismo modo para el resto de reactivos inmovilizados; es decir, a medida que se inmovilizaba uno, se sustituía en el vial por disolución amortiguadora.

En cuanto a la disolución de tropina añadida en los viales, se probaron dos concentraciones diferentes, $1.00 \cdot 10^{-2}$ y $1.00 \cdot 10^{-3}$ M, ($3.33 \cdot 10^{-4}$ M y $3.33 \cdot 10^{-5}$ M sobre soporte respectivamente), denominadas C_1 y C_2 , respectivamente. La medida de dos concentraciones de tropina diferentes permitió optimizar no solo la intensidad de la señal final sino también obtener una aproximación de la sensibilidad (que se denomina sensibilidad aparente, S_{ap}) obtenida para cada concentración de INT. Para ello se dividía la diferencia de señal obtenida entre la diferencia de las concentraciones (5.10). Se habla de S_{ap} ya que, al calcularse

únicamente con dos puntos, no se puede hacer un ajuste de segundo grado que sería el correcto. No obstante, sirve como una aproximación para la optimización.

$$S_{aparente} = \frac{\Delta G_{C_1} - \Delta G_{C_2}}{C_1 - C_2} \quad (5.10)$$

De cada uno de los viales se añadieron 25 μL sobre cada soporte y las placas se introdujeron en la incubadora durante una hora a una temperatura de 25°C. Por último, se tomaron medidas de las coordenadas RGB, mostrándose en la Tabla 5.6 los valores correspondientes a ΔG , así como el valor de S_{ap} . De estos resultados se deduce que la concentración de INT que aporta una mayor sensibilidad al método es $3.95 \cdot 10^{-4}$ M.

Tabla 5.6: Resultados obtenidos durante la optimización de la concentración del colorante.

[Tropina]/M	[INT]/M	$3.95 \cdot 10^{-4}$	$7.91 \cdot 10^{-4}$	$1.18 \cdot 10^{-3}$	$1.78 \cdot 10^{-3}$	$2.37 \cdot 10^{-3}$
$3.33 \cdot 10^{-4}$ (C_1)	ΔG	133.3	129.3	134.7	139.3	142.7
	S	5.8	5.8	1.2	9.9	14.2
	DER (%)	4.3	4.7	0.9	7.1	9.9
$3.33 \cdot 10^{-5}$ (C_2)	ΔG	23.0	26.7	31.7	38.3	43.0
	s	12.0	8.5	10.3	2.1	7.5
	DER (%)	52.2	31.9	32.4	5.4	17.6
	$S_{ap} (M^{-1})$	368146	342565	343677	337004	332555

Con el colorante ya inmovilizado en su concentración óptima se procedió a optimizar también la concentración de Diaforasa. Para ello, sobre la suspensión de celulosa al 5%, se añade la cantidad de INT requerida para que su concentración en el soporte fuera igual a $3.95 \cdot 10^{-4}$ M, junto con diferentes cantidades de Diaforasa, de manera que se obtuvieran unas concentraciones de enzima en el soporte de 0, 0.67, 1.12, 1.57 y 2.02 U/mL. Una vez se han secado los soportes, se hicieron reaccionar con el resto de reactivos como se ha explicado al comienzo de este apartado. Tras la reacción, se obtienen los valores de ΔG de los soportes obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7: Resultados obtenidos durante la optimización de la concentración de Diaforasa.

[Tropina]/M	[Diaforasa]/U/mL	0	0.67	1.12	1.57	2.02
3.33·10 ⁻⁴	ΔG	120.7	156.0	152.0	160.0	159.3
	s	3.1	12.8	10.4	11.5	3.8
	DER (%)	2.5	8.2	6.8	7.2	2.4
3.33·10 ⁻⁵	ΔG	33.3	33.7	40.3	44.0	32.3
	s	5.7	5.9	4.2	0	9.7
	DER (%)	17.1	17.4	10.3	0	30.0
	S _{ap} (mL/U)	241403	408186	372595	387054	423757

Se observa que la concentración de Diaforasa que aporta una mayor sensibilidad es 2.02 U/mL. No obstante, tras aplicar un test t sobre los resultados comparando las S_{ap} obtenidas para 2.02 U/mL y 0.67 U/mL ($t_{\text{calculado}} = 1.3717$ es menor que $t_{\text{tabulado}} = 2.1318$), se obtuvo que las diferencias entre ellas no son significativas, por lo que finalmente se escoge trabajar con una concentración de diaforasa de 0.67 U/mL, reduciendo de este modo el consumo de enzima.

Por último, se inmovilizó también el NAD. Se llevó a cabo un procedimiento similar solo que ahora en lugar de ensayarse dos concentraciones de tropina se ensayaron cuatro. Los valores del parámetro ΔG se indican en la Tabla 5.8. Como se puede ver, la concentración de 3.33·10⁻⁴ M permite evaluar un rango mayor de concentraciones de tropina.

Tabla 5.8: Valor del parámetro ΔG obtenido para las dos concentraciones de NAD diferentes inmovilizadas en función de la concentración de tropina.

[Tropina] / M	[NAD] / M	
	1.00·10 ⁻³	3.33·10 ⁻³
0	0	0
1.00·10 ⁻⁵	14.5	13.5
3.00·10 ⁻⁵	33.0	34.5
1.00·10 ⁻⁴	19.5	44.0

En cuanto a la enzima TRasa, a pesar de haberse conseguido inmovilizar junto con el resto de reactivos, y obtener una señal al añadir tropina, se obtuvieron mejores resultados al añadirla junto con la disolución de tropina (o de muestra). Esto se debe principalmente a dos razones. En primer lugar, parte de la actividad de la enzima se perdía al ser inmovilizada. Por otra parte, el soporte construido en estas condiciones contaba con una tensión superficial muy elevada. Esto último dificultaba en gran medida el posterior reparto homogéneo de la disolución de analito sobre la celulosa, puesto que esta actuaba como una capa impermeable que imposibilitaba la difusión de la disolución. Este efecto se muestra en la imagen de la Figura 5.10.



Figura 5.10: Tensión superficial observada al depositar la disolución de analito sobre el soporte de celulosa con la enzima TRasa inmovilizada.

Con todas las concentraciones de reactivos optimizadas, se estudió el efecto que producía un aumento de la fuerza iónica en la reacción sobre el sensor diseñado. Tiene sentido estudiarlo porque se ha visto que la fuerza iónica afecta a la extensión de la reacción. Para esto, se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl durante la preparación de las suspensiones de celulosa. Del mismo modo que en la sección de optimización, cada concentración de NaCl se probó con dos concentraciones diferentes de tropina para comprobar como afectaba a la señal en función de la concentración de analito. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9: Resultados obtenidos durante el estudio del efecto producido por el incremento de la fuerza iónica.

[Tropina]/M	[NaCl] / M	0	0.05	0.1	0.2	0.3
$3.33 \cdot 10^{-4}$ (C ₁)	ΔG	95.1	86.6	80.7	73.1	67.4
	s	2.7	2.2	1.4	3.8	2.1
	DER (%)	3.4	2.6	1.7	4.2	2.4
$3.33 \cdot 10^{-5}$ (C ₂)	ΔG	29.1	35.2	31.6	34.5	27.1
	s	3.9	1.9	3.2	3.5	4.2
	DER (%)	2.7	1.4	2.4	2.8	3.3

Tras realizar un test estadístico t comparando las medidas obtenidas para una concentración de 0.3 M de NaCl frente a la media de todas las medidas del resto de concentraciones, se pudo observar que la fuerza iónica no provoca ningún cambio en la señal del sensor para concentraciones de tropina bajas (para $3.33 \cdot 10^{-5}$ M de tropina, $t_{\text{calc}} = 1.451$ es menor que $t_{\text{tab}} = 2.571$); mientras que para concentraciones altas, un aumento de la fuerza iónica produce una pérdida de señal (para $3.33 \cdot 10^{-4}$ M de tropina, $t_{\text{calc}} = 2.581$ es mayor que $t_{\text{tab}} = 2.571$).

5.4.3 Características analíticas

Por último y con el objetivo de establecer los parámetros analíticos del método, se realizó un estudio de calibración. Si bien a lo largo de la optimización la reacción se ha llevado a cabo empleando tropina como analito, por una cuestión de rapidez y sencillez al evitar la etapa de hidrólisis, para la curva de calibrado se empleó atropina; es decir, requiere de una etapa de hidrólisis previa, que se lleva a cabo como se explica en el apartado 3.5.1.

Las concentraciones de atropina empleadas varían entre 0 y $6.00 \cdot 10^{-5}$, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 5.10. La curva de calibrado obtenida a partir de estos resultados aparece en la Figura 5.11 y, como se ve, se ajusta al modelo matemático desarrollado (5.8).

Tabla 5.10: Valores de ΔG obtenidos en la calibración con diferentes concentraciones de atropina, junto con su desviación estándar y su DER.

[Atropina] / M	ΔG	s	DER (%)
0	0	0.7	-
$6.00 \cdot 10^{-6}$	3.9	1.0	0.7
$1.00 \cdot 10^{-5}$	5.2	1.3	0.9
$3.00 \cdot 10^{-5}$	16.5	1.7	1.3
$6.00 \cdot 10^{-5}$	34.1	2.8	2.4
$1.00 \cdot 10^{-4}$	50.1	1.9	1.8
$3.00 \cdot 10^{-4}$	79.4	2.1	2.6

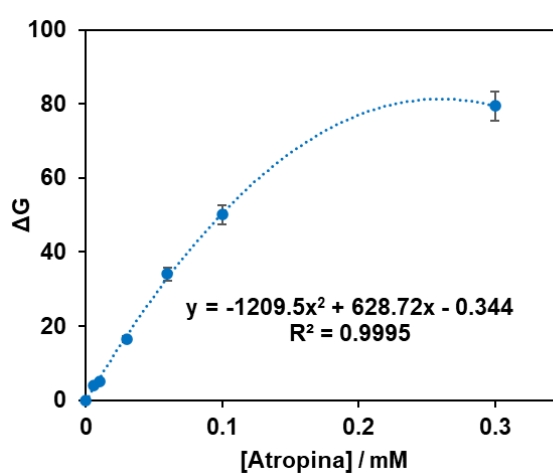


Figura 5.11: Curva de calibrado obtenida tras representar el parámetro ΔG frente a la concentración de atropina. [Diaforasa] = 0.67 U/mL, [INT] = $3.95 \cdot 10^{-4}$ M, [NAD] = $3.33 \cdot 10^{-3}$ M, [TRasa] = 0.022 mg/mL, T^a = 25°C, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

Por otra parte, en la Figura 5.12 se puede observar una fotografía de los soportes tras haber reaccionado con las diferentes concentraciones de atropina.



Figura 5.12: Fotografía de los sensores empleados para hacer la calibración una vez transcurrida la reacción. Las concentraciones de atropina empleadas en las reacciones de la fotografía son, por parejas de izquierda a derecha y de arriba a abajo: Celulosas sin reaccionar, 0, $6.00 \cdot 10^{-6}$, $1.00 \cdot 10^{-5}$, $3.00 \cdot 10^{-5}$, $6.00 \cdot 10^{-5}$, $1.00 \cdot 10^{-4}$, $3.00 \cdot 10^{-4}$ y $6.00 \cdot 10^{-4}$ M.

Para calcular el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC), la desviación estándar de la señal obtenida para el blanco se multiplica por 3 (para el LD) o por 10 (para el LC), y el valor obtenido se sustituye en la ecuación de segundo grado. Los valores de concentración obtenidos en la ecuación se corresponden con el LD y el LC, respectivamente. En la Tabla 5.11 se muestran los parámetros analíticos del método en soporte sólido.

Tabla 5.11: Parámetros analíticos obtenidos para el método en soporte sólido.

Rango dinámico / M	$1.21 \cdot 10^{-5} - 3.00 \cdot 10^{-4}$
LD / M	$4.01 \cdot 10^{-6}$
LC / M	$1.22 \cdot 10^{-5}$
DER ($3.00 \cdot 10^{-5}$ M, n=3)	3.13 %

Por último, se estudió su estabilidad con el paso del tiempo, parámetro clave para su implementación como sensor. Para ello, se prepararon 54 soportes de celulosa con los reactivos inmovilizados y se almacenaron a 4°C . Cada día se añadía, sobre 3 de ellos, tres concentraciones diferentes de tropina (0, $3.33 \cdot 10^{-5}$ y $3.33 \cdot 10^{-4}$ M) junto con la enzima TRasa, durante un total de 18 días. Tras tomar medidas de las coordenadas RGB de las reacciones obtenidas, se obtuvieron los resultados de la Tabla 5.12.

Tabla 5.12: Valores obtenidos para el parámetro G_0-G en función de la concentración de tropina y del número de días que han transcurrido desde la preparación del sensor.

[Tropina] / M	1	2	3	4	8	11	15	18
0	0	0	0	0	0	0	0	0
$3.33 \cdot 10^{-5}$	16.2	24.4	20.5	22.1	23.1	20.2	22.1	18.2
$3.33 \cdot 10^{-4}$	77.6	73.4	65.8	74.9	72.6	64.3	73.3	62.4
$S_{ap}(\cdot 10^{-5})$	2.05	1.64	1.51	1.76	1.65	1.47	1.71	1.47

Al aplicar sobre el resultado del primer día el test de Grubbs, se obtiene que el resultado se puede rechazar ($G(T)_{exp} = 2.04$ y $G(T)_{tabulado} = 2.03$). El resto de resultados dan oscilaciones aleatorias, no sistemáticas, que no indican que haya una degradación de los reactivos. La DER obtenida con estos resultados es del 7.3%. Esto quiere decir que los soportes se pueden emplear durante al menos 18 días tras su preparación.

5.5 Aplicación del método sobre muestras reales

La metodología fue aplicada, en primer lugar, a la determinación de atropina en las muestras de papillas estudiadas para el método en disolución en el apartado 5.3.3 (Tabla 5.13), demostrando la capacidad de estas plataformas para la determinación de atropina en muestras reales.

Tabla 5.13: Resultados obtenidos en el ensayo de recuperación realizado sobre la muestra en el sensor.

[Atropina] añadida (M)	Porcentaje de recuperación (%)
$6.00 \cdot 10^{-5}$	88 (± 3)
$1.00 \cdot 10^{-4}$	108 (± 4)

El método fue aplicado también a una muestra de trigo sarraceno sometida a una etapa previa de extracción. El procedimiento de extracción de la muestra es el descrito en el apartado 3.6.2. Este procedimiento lleva incorporado la etapa de hidrólisis por lo que la atropina de la muestra ya se encontraba en forma de

tropina tras el tratamiento de muestra. Los soportes de celulosa se prepararon como se ha indicado anteriormente y, tras su secado, se realizó una adición estándar sobre el extracto de trigo sarraceno para eliminar posibles efectos matriz. El resultado obtenido fue una concentración de atropina en el trigo sarraceno de 0.0612 ± 0.0016 g/kg ($n=3$). En este caso no se disponía de un valor certificado de la muestra, obtenido mediante el análisis por un método de referencia, por lo que no existe un valor con el que comparar el resultado. No obstante, esta cantidad se encuentra dentro de los valores habituales según la EFSA [5.12].

5.6 Estudio del método con escopolamina

Tras haber demostrado que el método desarrollado es válido para la determinación de tropina o atropina, se quiso probar su eficacia también en la reacción con escopolamina. En primer lugar, se estudió su funcionamiento en disolución mediante la elaboración de una recta de calibrado, utilizando las condiciones optimizadas para la atropina, es decir: disolución amortiguadora de carbonato 0.1 M a pH 10, 25°C, [Diaforasa] = 0.56 U/mL, [NAD] = $1.00 \cdot 10^{-3}$ M y [INT] = $2.00 \cdot 10^{-4}$ M.

La Figura 5.13 muestra la representación gráfica de la calibración obtenida, mientras que la Tabla 5.14 recoge los parámetros analíticos calculados a partir de estas medidas. Estos resultados muestran una sensibilidad peor para el análisis de escopolamina que el obtenido con la atropina, así como unos LD y LC más altos, lo cual era esperable tras haber visto estas mismas diferencias en el Capítulo 4 al analizar atropina y escopolamina por medio de la señal del NADH generado en la reacción a 340 nm. La pendiente de la recta de calibrado obtenida es menor que para el caso de la atropina, lo que indica un menor rendimiento de conversión. Al comparar la pendiente con (5.9) se deduce que la conversión de la escopolamina es del 67% en estas condiciones.

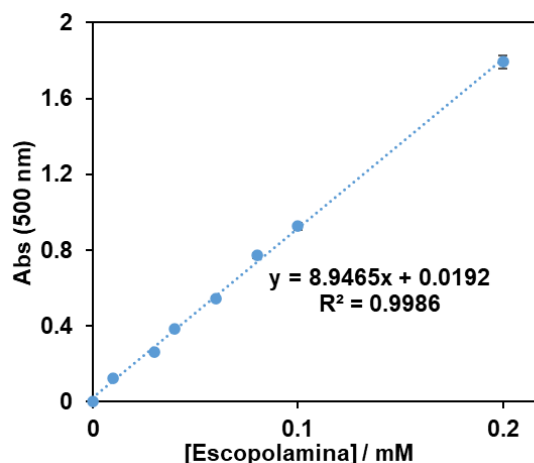


Figura 5.13: Recta de calibrado obtenida empleando diferentes concentraciones de escopolamina y tomando medidas de absorbancia a 500 nm. [Diaforasa] = 0.56 U/mL, [INT] = $2.00 \cdot 10^{-4}$ M, [NAD] = $1.00 \cdot 10^{-3}$ M, [TRasa] = 0.022 mg/mL, $T^a = 25^\circ\text{C}$, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

Tabla 5.14: Parámetros analíticos del método empleando escopolamina.

LD	$4.56 \cdot 10^{-6}$ M
LC	$2.02 \cdot 10^{-5}$ M
Rango Lineal	$2.02 \cdot 10^{-5} - 2.00 \cdot 10^{-4}$ M
DER ($1.00 \cdot 10^{-4}$ M, n=3)	3.42 %

Tras comprobar que la reacción también tiene lugar al emplear escopolamina en lugar de atropina en disolución, se construyen los sensores desarrollados a lo largo de este capítulo con el fin de hacer una nueva calibración empleando diferentes concentraciones de escopolamina esta vez, cuyos resultados tras tomar los valores del parámetro ΔG del mismo modo que se hizo en el caso de la atropina, aparecen en la Figura 5.14.

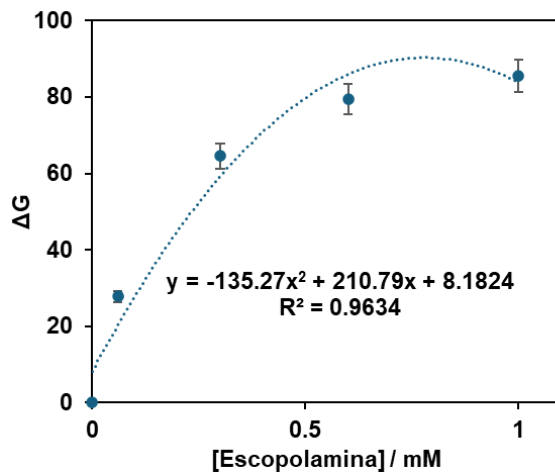


Figura 5.14: Curva de calibrado obtenida tras representar el parámetro G_0-G frente a la concentración de escopolamina. $[Diaforasa] = 0.67 \text{ U/mL}$, $[INT] = 3.95 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[NAD] = 3.33 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[TRasa] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $T^a = 25^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 10$ ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-} 0.1 \text{ M}$).

Como puede observarse, tanto el ajuste como la sensibilidad es bastante peor que el obtenido con la atropina. No obstante, sigue siendo un método válido para la determinación semi-cuantitativa de escopolamina, como muestra la Figura 5.15, en la que aparece una fotografía de los sensores empleados en la calibración una vez transcurrida la reacción con escopolamina.



Figura 5.15: Fotografía de los sensores empleados para la calibración una vez transcurrida la reacción con escopolamina. Las concentraciones empleadas en las reacciones de la fotografía son, por parejas de izquierda a derecha y de arriba a abajo: Celulosas sin reaccionar, 0 , $6.00 \cdot 10^{-5}$, $1.00 \cdot 10^{-4}$, $3.00 \cdot 10^{-4}$, $6.00 \cdot 10^{-4}$, $1.00 \cdot 10^{-3}$, $3.00 \cdot 10^{-3}$ y $6.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Estos resultados plantean que la escopolamina puede suponer una interferencia en el análisis de atropina en muestras, al no existir en este caso un modo de diferenciar las señales como si lo había en el capítulo anterior. No obstante, la concentración de escopolamina siempre es menor que la de atropina en muestras

con posible contenido en AT (según los valores habituales recogidos en la bibliografía [5.12]). Esto evita una posible interferencia ya que, en un rango de concentraciones inferior al de la atropina, la escopolamina no reacciona en el soporte de celulosa.

5.7 Conclusiones

A lo largo de este capítulo se ha acoplado exitosamente la reacción de determinación de AT estudiada en el Capítulo 4 a una reacción colorimétrica; mediante la reoxidación del NADH generado en la primera por acción de la enzima diaforasa, para dar lugar a la reducción de un colorante (INT), cuyo máximo de absorción se encuentra en el espectro visible (500 nm).

Esta nueva metodología cuenta con ciertas ventajas sobre la optimizada en el capítulo anterior, como una mayor sensibilidad (la absorptividad molar del colorante en el máximo de absorción es mayor que la del NADH), evitar numerosas interferencias que aparecen en el espectro UV y, sobre todo, la posibilidad de desarrollar un sensor de un solo uso basado en la aparición de la nueva señal. En este sentido, se ha desarrollado el sensor sobre soportes de celulosa, mediante la inmovilización y la optimización de los reactivos, y se ha comprobado su eficacia y su estabilidad en el tiempo para el análisis de atropina.

Además, se ha estudiado este mismo sistema de reacciones con escopolamina, tanto en disolución como en soporte sólido, comprobándose que, si bien la reacción funciona y es cuantitativa, las características analíticas son bastante peores que las obtenidas con la atropina.

5.8 Bibliografía

- 5.1. Altman FP (1976) Tetrazolium salts and formazans. Progress in histochemistry and cytochemistry 9:III-51. [https://doi.org/10.1016/S0079-6336\(76\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6336(76)80015-0)
- 5.2. Towill LE, Mazur P (1975) Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures.

- Canadian Journal of Botany 53:1097–1102. <https://doi.org/10.1139/b75-129>
- 5.3. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A (2018) Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem* 120:159–167. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
 - 5.4. Capitán-Vallvey LF, Palma AJ (2011) Recent developments in handheld and portable optosensing-A review. *Anal Chim Acta* 696:27–46. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.005>
 - 5.5. Scheeline A (2010) Teaching, Learning, and Using Spectroscopy with Commercial, Off-the-Shelf Technology. *Applied spectroscopy* 64:256A–268A. <https://doi.org/10.1366/000370210792434378>
 - 5.6. Sun W, Li H, Wang H, Xiao S, Wang J, Feng L (2015) Sensitivity enhancement of pH indicator and its application in the evaluation of fish freshness. *Talanta* 143:127–131. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.021>
 - 5.7. Cebrián P, Pérez-Sienes L, Sanz-Vicente I, López-Molinero Á, de Marcos S, Galbán J (2022) Solving Color Reproducibility between Digital Devices: A Robust Approach of Smartphones Color Management for Chemical (Bio)Sensors. *Biosensors* (Basel) 12:341. <https://doi.org/10.3390/bios12050341>
 - 5.8. Connah D, Westland S, Thomson MGA (2001) Recovering spectral information using digital camera systems. *Coloration Technology* 117:309–312. <https://doi.org/10.1111/j-1478-4408.2001.tb00080.x>
 - 5.9. Goldman J (1973) Quantitative analysis on thin-layer chromatograms: Theory of absorption and fluorescent densitometry. *Journal of Chromatography A* 78:7–19. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)99031-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)99031-4)
 - 5.10. Sanz-Vicente I, López-Molinero Á, de Marcos S, Navarro J, Cebrián P, Arruego C, Visiedo V, Galbán J (2020) Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in

food. Anal Bioanal Chem 412:4261–4271. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02677-7>

- 5.11. Laboratorio de Salud Pública del Gobierno de Aragón (2021) Determinación de Alcaloides Tropánicos por Cromatografía de Líquidos con Detector de Espectrometría de Masas (LC-MS/MS). ITE FQ096 05
- 5.12. Mulder PPJ, de Nijs M, Castellari M, Hortos M, MacDonald S, Crews C, Hajslova J, Stranska M (2016) Occurrence of tropane alkaloids in food. EFSA Supporting Publications 13:. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.en-1140>

SECCIÓN

III

Capítulo 6: Nanomateriales de oro como indicadores en reacciones enzimáticas

Capítulo 7: Estudio de la reacción entre iones metálicos y NAD(P)H

Capítulo 8: Determinación enzimática de atropina por generación in-situ de nanomateriales

Capítulo 9: Tectómeros como base de sensores para la generación in-situ de nanomateriales

Capítulo 6:

Nanomateriales de oro como indicadores en reacciones enzimáticas

6.1 Introducción: Tipos de nanomateriales de oro

La utilización de nanomateriales, en particular nanoestructuras metálicas, ha generado enormes avances en la investigación en determinaciones ópticas, mejorando las metodologías, reduciendo los costos y acortando los tiempos de análisis. En particular, los nanomateriales de oro han ganado un gran protagonismo debido a sus ventajosas propiedades ópticas y fisicoquímicas. Estas propiedades dependen tanto del tipo de nanomaterial de oro, como de si cuenta o no con algún tipo de recubrimiento superficial o se encuentra funcionalizado con moléculas orgánicas (Figura 6.1) [6.1]. Según su forma y tamaño se pueden clasificar en:

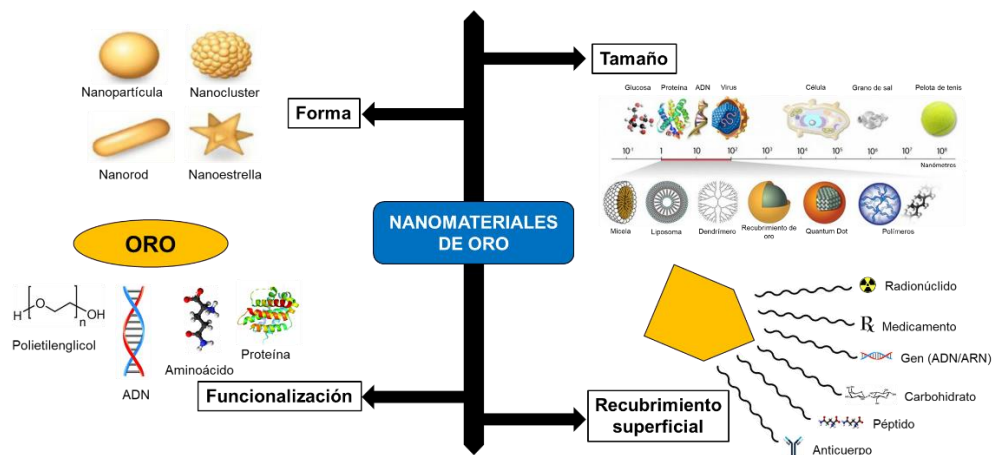


Figura 6.1: Clasificación de las nanoestructuras de oro en función de su tamaño y su forma y sus posibles aplicaciones [6.1].

A) Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son partículas de tamaño nanométrico que están formadas por un núcleo de oro, que determina las características intrínsecas de la nanopartícula; y un revestimiento superficial, que puede ser modificado para favorecer la interacción y aportar estabilidad [6.2].

Este tipo de nanomaterial cuenta con unas propiedades ópticas (banda de plasmón con un máximo de absorción normalmente entre 500 y 600 nm) y unas capacidades de funcionalización que las hacen muy versátiles, lo que ha propiciado su integración en el desarrollo de biosensores ópticos. La señal

analítica proviene de alteraciones en sus propiedades fisicoquímicas durante la reacción enzimática. Se han empleado para determinar analitos en reacciones enzimáticas y para estudiar actividades enzimáticas, utilizando principalmente estrategias de detección colorimétrica [6.3–6.5]; aunque también se han aprovechado tanto la capacidad de las AuNPs en la potenciación de la señal Raman (SERS) [6.6, 6.7] como sus funciones catalizadoras, gracias a sus propiedades de imitación de enzimas [6.8, 6.9].

B) Nanoclusters de oro

Los nanoclusters de oro (AuNCs) son nanoestructuras metálicas de unos pocos cientos de átomos, de un tamaño de entre 1 y 3 nm, con ligandos orgánicos en su superficie que influyen en su estabilidad. Estos ligandos sirven como agentes estabilizadores para prevenir la agregación (“capping”). Sus atractivas propiedades fisicoquímicas y fluorescentes [6.10] han llevado a su aplicación en varios campos de investigación, como la bioimagen, los biosensores y el tratamiento del cáncer [6.11]. Las propiedades de fluorescencia de los AuNCs, como las longitudes de onda de emisión y los rendimientos cuánticos, están influenciadas por su tamaño y los ligandos utilizados para su síntesis [6.12], por lo que se pueden modular.

C) Nanorods de oro

Los nanorods de oro (AuNRs) suponen una gran alternativa a las AuNPs gracias a que presentan dos bandas plasmónicas bien diferenciadas: una longitudinal con un máximo en torno a 520 nm, que coincide con la banda original de las AuNPs, y una transversal que puede aparecer entre 600 y 1100 nm, influenciada por la relación longitud:anchura del AuNR [6.13]. Las dimensiones de los AuNRs pueden alterarse mediante técnicas de crecimiento [6.14] o decrecimiento [6.15], produciendo desplazamientos en la banda del plasmón, lo que puede emplearse como parámetro analítico.

D) Nanoestrellas de oro

Las nanoestrellas de oro (AuNSs) son estructuras plasmónicas anisotrópicas caracterizadas por un núcleo central con puntas que se expanden. Esta estructura presenta diversas bandas de Resonancia de Plasmón Superficial Localizado (LSPR), lo que ofrece un potencial significativo para aplicaciones biomédicas

[6.16]. Además, estas bandas plasmónicas, que aparecen en el NIR, absorben eficazmente la luz y la convierten en calor, lo que se puede emplear para el desarrollo de biosensores [6.17]. Asimismo, estas nanoestructuras muestran una gran capacidad para producir incremento de la señal de dispersión Raman en moléculas orgánicas por efecto SERS (dispersión Raman potenciada en la superficie), debido a la presencia de múltiples puntas afiladas que actúan como “puntos calientes” [6.18].

Estas propiedades ópticas han posibilitado que los nanomateriales de Au (AuNMs) hayan tenido una enorme aplicación en el desarrollo de métodos analíticos basados en su fluorescencia, absorción UV-visible o capacidad SERS. Muchos de estos métodos analíticos se basan en interacciones inespecíficas de los AuNMs con los correspondientes analitos, por lo que, salvo excepciones, presentan baja selectividad, y requieren del acoplamiento de algún tipo de reacción que se la proporcione. Teniendo en cuenta el objetivo de esta Tesis Doctoral, en el siguiente apartado se profundizará en las alternativas que se han desarrollado haciendo uso de reacciones enzimáticas como método de conseguir esa selectividad.

6.2 Nanomateriales de oro como indicadores de reacciones enzimáticas: Metodologías generales

Como se ha mencionado en el Capítulo 1, las limitaciones que presentaban otras metodologías analíticas han fomentado la combinación de enzimas con nanomateriales, que aportan nuevas posibilidades en la reacción indicadora. Los mecanismos por los que actúan se muestran de forma esquematizada en la Figura 6.2; implicando la mayoría de ellos una síntesis previa del nanomaterial.

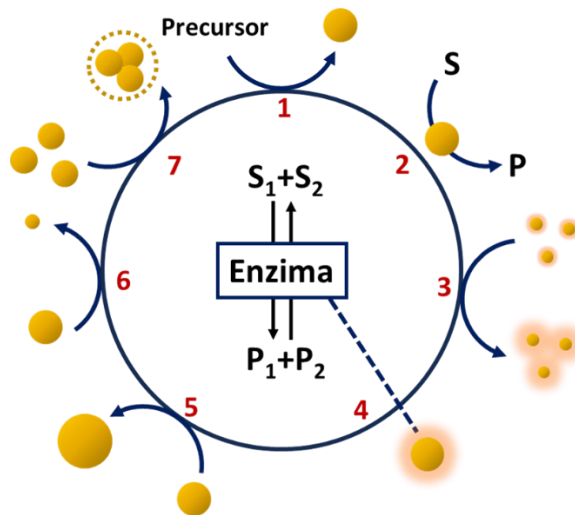


Figura 6.2: Esquema de los principales mecanismos basados en la interacción de la enzima con un nanomaterial. 1) Generación in situ de nanomateriales durante las reacciones enzimáticas. 2) Actividad catalítica. 3) Desactivación de la fluorescencia. 4) Mediador de las propiedades de las enzimas. 5) Recrecimiento de nanomateriales. 6) Decrecimiento o etching. 7) Agregación.

6.2.1 Mecanismo 2: Actividad catalítica

Este mecanismo hace referencia a los nanomateriales que pueden actuar como catalizadores de algunas reacciones en las que habitualmente se emplean enzimas. Es especialmente relevante la aparente capacidad de algunos de ellos de catalizar reacciones de oxidación por medio del H_2O_2 , por lo que se les conoce como “imitadores de la peroxidasa (HRP)” (peroxidase-like o HRP-like) [6.8].

Las AuNPs se han utilizado como imitadores de la HRP para catalizar la oxidación de colorantes o fluoróforos por el H_2O_2 provocando un cambio de color que se ha aplicado al desarrollo de métodos enzimáticos [6.9, 6.19]. Los AuNCs también han sido empleados en este sentido para la determinación de analitos que inhiben su actividad catalítica, impidiendo la oxidación del colorante o fluoróforo [6.20, 6.21].

Las principales ventajas de estos nanomateriales en comparación con la HRP incluyen su funcionamiento a niveles de pH en los que la enzima no responde, su precio, su capacidad para ser almacenados a largo plazo y, en general, su mayor robustez. Por el contrario, estos materiales muestran una selectividad menor, el mecanismo catalítico subyacente sigue sin conocerse adecuadamente, es

necesario utilizar cantidades mucho mayores que de enzimas y su cinética es más lenta que la obtenida con HRP.

6.2.2 Mecanismo 3: Desactivación de la fluorescencia

Los métodos englobados en el Mecanismo 3 emplean generalmente AuNCs [6.22, 6.23], que interactúan con alguna de las especies implicadas en la reacción enzimática, modificando su intensidad o tiempo de vida de fluorescencia por mecanismos como:

- **Efecto de filtro interno**, empleado para medir la actividad enzimática, ya sea por interacción con otros nanomateriales, como en el caso de Liu et al. [6.24], en el que las AuNPs absorben la fluorescencia de los AuNCs y su posterior agregación con prolamina mitiga el filtro interno, permitiendo determinar la actividad enzimática; o con compuestos orgánicos, como el nitrofenilfosfato [6.25], cuyo espectro coincide con el de excitación de los AuNCs, permitiendo la medida de la actividad de la fosfatasa alcalina.
- **Desactivación de la fluorescencia (estática)**, por medio del empleo de compuestos que reaccionan con el ligando que actúa de “capping”. Por ejemplo, el Cu(II) desactiva la fluorescencia del AuNC por formación de complejos con la BSA, pudiéndose restaurar mediante el empleo de analitos con mayor afinidad por el Cu(II), lo que permite determinar la actividad de la acetilcolina esterasa [6.26] o concentraciones de proteínas quinasas [6.27].
- **Desactivación de la fluorescencia (dinámica)**, debido a las interacciones en el estado excitado, que pueden producirse por la aceptación de electrones de los componentes de la reacción enzimática, permitiendo detectar, por ejemplo, pesticidas organofosforados al inhibir estos la reacción TYR/dopamina, siendo el dopaminocromo el aceptor de electrones [6.28]; por asociación de AuNCs a péptidos [6.29], que protege contra la desactivación de la fluorescencia provocada por el O₂ y permite medir la actividad enzimática en las reacciones que consumen O₂; o por funcionalización de los AuNCs con compuestos que interactúan con los analitos, como los AuNCs funcionalizados con ácido aminofenilborónico, que se desactivan en presencia de catecol [6.30].

- **Transferencia de energía o electrones**, como en las interacciones entre el citocromo C y los AuNCs para la detección de tripsina mediante teléfonos inteligentes y el software ImageJ [6.31].

6.2.3 Mecanismo 4: Mediador de las propiedades de las enzimas

Hace referencia a aquellas reacciones en las que la enzima se modifica químicamente (de forma covalente) con un nanomaterial fluorescente, con el objetivo de que el nanomaterial amplifique los cambios que se producen en las propiedades ópticas de la enzima. Durante la reacción enzimática, los cambios en el estado de oxidación del cofactor provocan cambios en la fluorescencia del nanomaterial, ya sea por FRET o por filtro interno. Por ejemplo, es la situación que se observa cuando las flavoenzimas se unen a AuNCs. Durante la reacción enzimática, el FAD y el FADH₂ producen un FRET diferencial sobre la fluorescencia de los AuNCs; esto, combinado con el efecto del quenching producido por el O₂ [6.32] sobre los AuNCs modifica la intensidad de la fluorescencia de manera proporcional a la concentración de sustrato. Empleando esta metodología se han desarrollado métodos basados en colina y acetilcolina utilizando colina oxidasa (una flavoenzima) [6.33].

6.2.4 Mecanismos 6 y 7: Cambios de tamaño del nanomaterial

Los métodos basados en el decrecimiento o etching (Mecanismo 6) o en la agregación (Mecanismo 7) son menos empleados. Se fundamentan en que un cambio en el tamaño del nanomaterial modifica sus propiedades ópticas. El etching enzimático se refiere casi exclusivamente a aquel basado en reacciones en las que intervienen enzimas oxidasas, es decir, que transforma el O₂ en H₂O₂. Estos métodos emplean las propiedades oxidantes del H₂O₂ [6.34, 6.35] sobre AuNPs, produciendo una reducción de su tamaño que origina AuNPs más pequeñas, cuyo máximo de absorción se encuentra en longitudes de onda más bajas; o AuNCs, cuya fluorescencia se relaciona con la actividad enzimática de la reacción. Se han utilizado como prueba de concepto principalmente para la determinación de glucosa y, de forma más aplicada, como indicador en inmunoensayos ELISA para detección visual de biomarcadores de enfermedades [6.35].

En cuanto a los métodos de agregación, el diseño de AuNPs modificadas químicamente, provoca que el producto de la reacción enzimática induzca la agregación de estas, permitiendo una detección de dicho producto gracias a los cambios espectrales debidos a la deslocalización de los electrones de conducción, que produce un cambio de color en la disolución de rojo (máximo de absorción aproximadamente a 520 nm), a un azul-violeta (con máximo en torno a 650 nm). Esta metodología ha permitido la detección de células cancerosas mediante el empleo de AuNPs conjugadas con aptámeros [6.36]. Además, este mecanismo produce una potenciación de las propiedades catalíticas del nanomaterial sobre la reacción indicadora; permitiendo, por ejemplo, la detección de Pb^{2+} , que induce la agregación de los AuNCs [6.37].

6.2.5 Mecanismo 5: Recrecimiento de nanomateriales

Los métodos recogidos dentro del Mecanismo 5 se refieren a aquellos que implican el recrecimiento de semillas durante la reacción enzimática, es decir, se parte de nanomateriales que no poseen propiedades ópticas y su aumento de tamaño se las confiere. Algunos de estos mecanismos emplean metodologías similares a los basados en la generación de nanomateriales y se mencionarán más adelante.

6.3 Sensores basados en la formación de nanopartículas metálicas

6.3.1 Mecanismo 1: Generación in situ de nanomateriales durante las reacciones enzimáticas

Todos los mecanismos explicados anteriormente han demostrado aportar un buen rendimiento; sin embargo, implican la preparación previa de los materiales antes de la etapa de detección del analito, lo que conlleva su síntesis, purificación y, si es necesario, una posterior modificación. La principal ventaja que presenta la generación in situ de nanomateriales con propiedades ópticas durante la reacción enzimática es que el parámetro analítico es la señal del nanomaterial formado, por lo que no depende del aumento o disminución de una señal óptica generada previamente. Esta metodología: 1) evita tener que disponer del nanomaterial; 2) no tiene que controlar el tamaño de la NP a emplear en la determinación; 3) dado que en ausencia de analito no hay nanomaterial, no hay una señal de blanco que

pueda afectar a la precisión; 4) se pueden conseguir métodos de mayor sensibilidad, dependiendo de las características del nanomaterial formado.

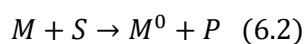
Existen varios tipos generales de metodologías, dependiendo del tipo de nanomaterial formado durante la reacción. Este apartado se centra únicamente en la formación de nanomateriales de Au(III), donde el nanomaterial se genera gracias a la intervención de sustancias en la reacción enzimática capaces de reducir el ion metálico y estabilizar la nanopartícula formada. En este sentido es importante, por un lado, revisar los tipos de mecanismos que pueden dar lugar a la formación de nanopartículas a partir de Au(III) durante una reacción enzimática (y, por tanto, en que tipos de reacciones es potencialmente posible aplicar esta metodología); y por otro, evaluar de forma teórica, y dentro de lo posible, la sensibilidad potencial que se puede esperar de estos métodos, para poder predecir qué sensibilidad se podría esperar de ellos. Estos dos aspectos se tratan a continuación.

6.3.2 Predicción de la sensibilidad

Las propiedades espectroscópicas de las NPs dependen en gran medida del metal, la forma, el tamaño (radio, r), el entorno (índice de refracción, μ) y su composición, como se ha indicado en el apartado 6.1. Es por ello que un aspecto interesante de los métodos basados en la generación de NM durante las reacciones enzimáticas es la posibilidad de predecir la sensibilidad que puede ofrecer el método (a diferencia de lo que ocurre con los NCs). Cuando la radiación de la región UV-vis incide sobre una disolución que contiene NPs (donde C_{NP} es la concentración en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), en un medio con un paso óptico l (en cm), se produce tanto absorción como dispersión. El efecto conjunto de ambos fenómenos viene dado por medio del coeficiente de extinción molar (ϵ_{NP} , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), por lo que la absorbancia observada será:

$$Abs_{NP} = \epsilon_{NP} l C_{NP} \quad (6.1)$$

Si la reacción entre el reductor que participa en el proceso (S) y el ion precursor (M) del nanomaterial es 1:1:



Si cada NP contiene A átomos de metal:

$$Abs_{NP} = \frac{\varepsilon_{NP}}{A} \ell C_s = \varepsilon_{NP,A} \ell C_s = \varepsilon_s \ell C_s \quad (6.3)$$

donde $\varepsilon_{NP,A}$ es el coeficiente de extinción por mol de metal reducido. La teoría de Mie establece que el valor de $\varepsilon_{NP,A}$ de las NPs esféricas depende del volumen de la NP (o de su diámetro al cubo, d_{NP}^3) [6.38] y, en menor medida, tanto de la molécula de recubrimiento utilizada en su síntesis como del medio en el que se encuentra. Se han realizado diversas pruebas para comprobar esta hipótesis y predecir los valores de $\varepsilon_{NP,A}$ en función del tamaño de la AuNP. De este modo, los valores de $\varepsilon_{NP,A}$ obtenidos por Huo [6.39] con AuNPs de tamaños de entre 4 y 35 nm, obtenidas en diferentes disolventes (tolueno, agua, THF) y con diferentes ligandos superficiales (citrato, oleilamina, decanotiol) concordaban con la expresión:

$$\varepsilon_{NP,A} = 49020 d_{AuNP}^{3.3} \quad (6.4)$$

Khlobystov [6.40], trabajando con AuNPs de entre 2 y 4 nm estabilizadas con dodecanotiol en tolueno, obtuvo:

$$\varepsilon_{NP,A} = 26200 d_{AuNP}^{3.83} \quad (6.5)$$

Y El-Sayed [6.41], con AuNPs de entre 30 y 90 nm, obtenidas por reducción con citrato en medio acuoso, observó:

$$\varepsilon_{NP,A} = 130000 d_{AuNP}^3 \quad (6.6)$$

De las AuNPs disponibles comercialmente se pueden deducir resultados similares [6.42]. Asumiendo que las AuNPs son esféricas y que el Au cristaliza con una estructura de red cúbica centrada en la cara (fcc), el número de átomos metálicos puede estimarse en función de su diámetro, de la siguiente forma:

$$N_{NP} = \frac{\pi \rho d_{AuNP}^3}{6M} \rightarrow d_{AuNP}^3 = \frac{6M N_{NP}}{\pi \rho} \quad (6.7)$$

Siendo M y ρ la masa atómica y la densidad del metal, respectivamente ($\rho=19.3 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ para el Au); por lo que la ecuación queda:

$$d_{AuNP}^3 = \frac{N_{NP}}{30,9} \quad (6.8)$$

Cuando se combina la ecuación (6.5) con los resultados experimentales dados por (6.1–6.3) se obtiene un valor medio de:

$$\varepsilon_{NP,A} = \varepsilon_S = 3000 \pm 1000 M^{-1}cm^{-1} \quad (6.9)$$

Este valor indica la sensibilidad esperada con la que se determinará el sustrato en un método espectrofotométrico basado en la generación de AuNPs. Esta sensibilidad es ligeramente inferior a la obtenida midiendo la absorbancia del NAD(P)H.

6.3.3 Mecanismo de reducción I: Propiedades reductoras del centro activo de la enzima

Muchas enzimas oxidasas contienen un centro activo redox unido covalentemente. Esto incluye las flavoenzimas, las hemoproteínas y las oxidasas que contienen cobre. En estas enzimas, el sustrato reduce el sitio activo, que posteriormente es reoxidado por el O_2 , produciendo H_2O_2 . Las investigaciones indican que la $FADH_2$ de ciertas flavoproteínas puede regenerarse mediante compuestos metálicos [6.43], lo que implica que los iones precursores de los nanomateriales podrían regenerar de manera similar el sitio activo de la enzima, lo que permitiría la síntesis in-situ, simultáneamente a la reacción enzimática, de nanomateriales metálicos.

Estudios previos del grupo [6.44] explicaron la formación de AuNPs durante la reacción de tiramina con tiramina oxidasa (TAO) en presencia de Au (III). Los autores investigaron el papel de las especies implicadas en la reacción (4-hidroxifenilacetaldehído, O_2 , H_2O_2 y TAO) en la formación de AuNPs. Aunque se observó una leve reducción de Au en presencia del producto, la formación de AuNPs se explicó por la participación del centro activo de la enzima. La tiramina reduce el Cu(II) que forma parte del centro activo de la TAO a Cu(I), que es reoxidado por el Au(III), reduciéndose a Au^0 . La estructura proteica de la enzima estabiliza las AuNPs formadas (Figura 6.3).

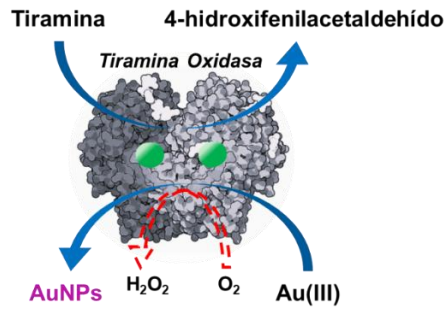


Figura 6.3: Formación de AuNPs durante la reacción con Tiramina Oxidasa [44].

Al medir la absorbancia a 540 nm, se obtuvo un perfil cinético similar al de la Figura 6.3, y se desarrolló un modelo matemático basado en el mecanismo de Finke-Watzy. La curva de calibrado mostró una forma sigmoideal en el rango de 0.33 a 0.025 mM y se usó para determinar tiramina en muestras de queso. El principal inconveniente fue el tiempo de reacción necesario para alcanzar la absorbancia máxima (aproximadamente 4 min a 50°C) y la deriva observada en la señal. Posteriormente, se mejoró utilizando una mezcla de Au(III) y Pt(II) [6.45] para producir las NPs, ampliando el intervalo de respuesta de 1 a 250 mM, y sin necesidad de calentamiento. Este estudio sugiere que el Pt(II) reduce el Au(III) a Au(I), facilitando la formación de AuNPs. Un aspecto clave es la concentración de la enzima, ya que concentraciones más altas reducen la señal. De hecho, los resultados mostraron que concentraciones altas favorecen la nucleación, pero no el crecimiento (Figura 6.4).

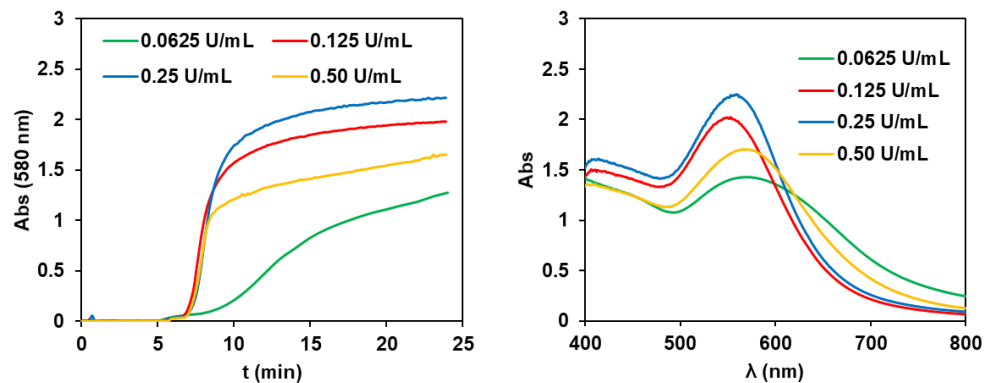


Figura 6.4: Resultados de la optimización de la concentración de enzima en la formación de AuNPs en presencia de platino [6.45].

Esta metodología también se ha demostrado con flavoenzimas. En el grupo de investigación [6.46] se estudió el papel de la glucosa oxidasa (GOx) en la determinación de glucosa a partir de la formación de nanomateriales de oro durante la reacción enzimática con GOx en presencia de Au (III). Se demostró que, dependiendo de las condiciones experimentales, se puede obtener la formación de AuNCs o AuNPs. Los resultados sugieren que las AuNCs se forman utilizando GOx como semillas de nucleación y las AuNPs (que pertenecen al tipo ramificado) se obtienen por coalescencia de AuNCs. Este mecanismo es coherente con los resultados experimentales obtenidos, que mostraron que cuanto mayor es la concentración de enzima, mayor es la fluorescencia y menor la absorbancia; además, cuanto mayor es el pH, mayor es la fuerza iónica del tampón fosfato, lo que favorece la fusión de AuNCs (Figura 6.5).

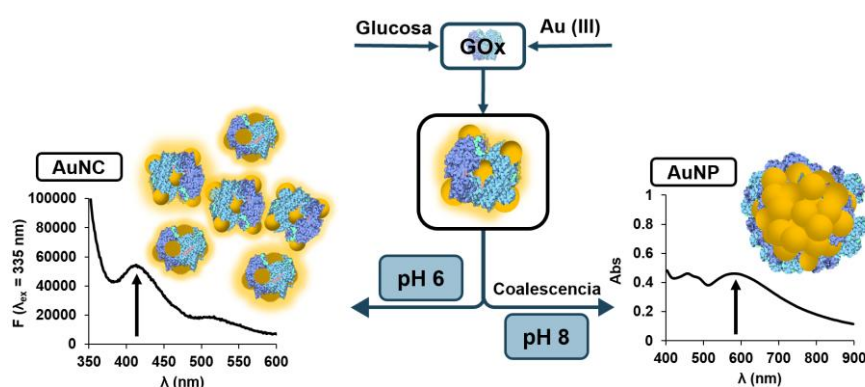


Figura 6.5: Formación de AuNPs o AuNCs en la reacción de la GOx en función de las condiciones experimentales [6.46].

Otros autores también han sugerido la formación de AuNPs durante la reacción enzimática de glucosa y la implicación de FAD [6.47].

6.3.4 Mecanismo de reducción II: Propiedades reductoras del producto de la reacción

Diversas sustancias (bio)orgánicas pueden reducir iones metálicos, especialmente Au(III) o Ag(I), y en algunos casos estabilizar estas especies reducidas en estructuras de nanomateriales como nanopartículas o nanoclusters. Entre estas sustancias se encuentran aldehídos [6.48], aminoácidos [6.49, 6.50] y antioxidantes como ácido cítrico o ascórbico, carotenoides, α -tocoferoles, catecoles, polifenoles y fosfolípidos [6.51]. Se han desarrollado métodos para

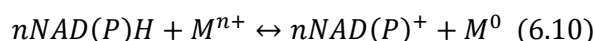
determinar algunas de estas sustancias mediante la reducción directa de Au(III) a nanomateriales de Au, sin necesidad de reacciones enzimáticas. Ejemplo de ello son la determinación de neurotransmisores (a través de la generación de AuNPs y medición de absorbancia) [6.52] o tiramina [6.53] (formación de AuNCs y medición de fluorescencia), en el rango de mM.

En las reacciones enzimáticas que producen estas sustancias, la formación de nanomateriales metálicos podría ser una herramienta útil para la detección selectiva de sustratos. Sin embargo, son pocos los estudios que han explorado esta alternativa, y generalmente utilizan las propiedades reductoras del producto para la determinación de la enzima. Por ejemplo, la tirosinasa, que cataliza la oxidación de L-tirosina a L-dopa, se determinó mediante la generación de AuNPs al reducir L-dopa con Au(III). La reducción de metales por el producto principal de la reacción se ha centrado en la formación de AuNPs, ya que no se han encontrado ejemplos para otros metales. Un caso relevante es el de la peroxidasa, que genera nanopartículas de plata mediante un paso previo que requiere borohidruro para crear las semillas de las nanopartículas [6.54].

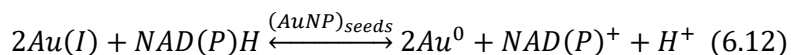
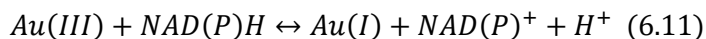
Otro tipo de enzimas que se puede determinar por metodologías similares son las hidrolasas. Esto ocurre cuando los productos provienen de alquenos cíclicos, que no solo reducen Au(III) a Au⁰, sino que también estabilizan las AuNPs. Ejemplos de esta alternativa son la determinación de hidrolasas, mediante la desfosforilación de sustratos como fmoc-tirosina fosfato [6.55] para la detección de fosfatasa alcalina, o ascórbico-2-fosfato para la determinación de fosfatasa alcalina [6.56] o ácida [6.57]. En este último caso, no se miden las AuNPs, sino que se utilizan para catalizar la oxidación de TMB mediante H₂O₂.

6.3.5 Mecanismo de reducción III: Propiedades reductoras de la coenzima/cofactor

En las reacciones catalizadas por una enzima deshidrogenasa, el cofactor NAD(P)H tiene propiedades reductoras, por lo que puede combinarse con la generación de nanopartículas metálicas de acuerdo a la reacción:

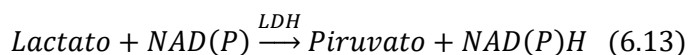


Los primeros estudios que explotaron las posibilidades de esta reacción como base para métodos analíticos fueron realizados por Willner et al. [6.58] y se encontró que el NAD(P)H, a través de su grupo nicotinamida, era capaz de reducir Au(III) (en forma de AuCl_4^-) en un proceso que constaba de dos pasos:



Como se puede observar, el segundo paso de la reacción que consiste en la reducción a Au^0 , no es directo, sino que es catalizado por semillas de AuNPs previamente añadidas (en concreto de 13 nm). En resumen, se observó que el NAD(P)H era capaz de reducir al Au(III) pero no de formar AuNPs directamente. Desde el punto de vista de la aplicación analítica, los resultados de su estudio permiten extraer dos conclusiones importantes:

1. Para una concentración dada de Au(III), el intervalo de concentración en el que la absorbancia de las AuNPs (525 nm) varía con la concentración de NADH es muy pequeño (aproximadamente medio orden de magnitud). Las señales mínimas de AuNPs se observan para relaciones NAD(P)H/Au(III) de aproximadamente 0.5/1 y el máximo se obtiene para relaciones 2.5/1. La $\text{Abs} = f([\text{NAD(P)H}])$ muestra una respuesta en forma de S con una sensibilidad máxima de aproximadamente $2500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, que se encuentra en el intervalo esperado según (6.9).
2. Es posible acoplar la secuencia de reacciones (6.11) y (6.12) como método indicador de la reacción enzimática del lactato con lactato deshidrogenasa (LDH).



Aunque el rango de concentraciones que se puede determinar es similar al del NAD(P)H pero con una sensibilidad mucho menor.

Los mismos autores establecieron una variante muy interesante de este procedimiento, que consiste en hacer crecer AuNPs con cobre, que también tiene capacidad SPR (Resonancia de Plasmón Superficial) [6.59, 6.60]. Lo que observaron fue que en lugar de un aumento de la señal SPR de las AuNPs, se producía un desplazamiento del máximo de absorción proporcional a la

concentración de NAD(P)H, desplazamiento que se ajusta al modelo teórico de dispersión para este tipo de partículas derivado de la ecuación de Mie, lo que parece indicar que también podría aplicarse a elementos distintos del cobre, aunque esto no ha sido comprobado. En este método, el parámetro utilizado es el desplazamiento en nm del máximo de absorción; sorprendentemente, permite determinaciones de mayor sensibilidad, del orden de décimas de mM (aunque no de mayor rango lineal), tanto para NAD(P)H como para etanol, una vez acoplado a la reacción de la enzima alcohol deshidrogenasa. Los resultados mostrados por este grupo buscaban ser una prueba analítica de concepto, por lo que no hay estimación de límites de detección, estudios de interferencias o aplicaciones a muestras reales. Una estrategia similar ha sido propuesta por Peng para la determinación del explosivo RDX (también conocido como T4) tras su reacción con NADH [6.61]. Desde el artículo inicial de Willner et al., se han desarrollado nuevos estudios, pero buscando ahora la generación in-situ de nanomateriales sin necesidad de semillas y avanzar en la posibilidad de emplear NADH para la generación in situ de nanomateriales [6.62].

Un resultado muy interesante fue encontrado por Byamiller [6.63], quien sintetizó directamente AuNPs (absorción a 535 nm) por reacción entre Au(III) y NADH sin necesidad de incorporar semillas. El NADH actúa tanto de reductor como de estabilizador de las AuNPs formadas. Estos autores observaron cambios en la absorbancia de las AuNPs para proporciones de NADH/Au(III) entre 0.6/1 y 4/1, confirmando el bajo rango de concentraciones útiles anteriormente descrito, aunque no investigaron su aplicación a métodos enzimáticos. Otros autores han demostrado la capacidad del NADH tanto para reducir el ion metálico precursor como para estabilizar el metal reducido en forma de nanomaterial, partiendo de Au(III) [6.64], Pd(II), mezclas de ambos [6.65] o, lo que es más interesante, de Ag(I) [6.66, 6.67]; pero sin aplicarlo a determinaciones analíticas.

Este último es interesante porque los autores proponen que la reducción de Ag(I) a Ag⁰ tiene lugar con NADH en el estado excitado (triplete); los autores explican esto señalando que mientras que en el estado básico el potencial de reducción del par NAD/NADH es de 0.93 V, lo que impide la reducción de Ag(I) ($E_{0\text{Ag(I)}/\text{Ag}}=0.80$ V), en el estado excitado el potencial de reducción de NADH disminuye en casi 3 unidades, permitiendo la reducción. Es muy posible que este importante efecto de la luz explique las diferencias observadas entre los distintos autores.

La generación in situ de nanopartículas metálicas formadas por NAD(P)H como método indicador en reacciones enzimáticas se encuentra todavía en sus primeras fases y sus posibles aplicaciones están aún por desarrollar. Hay diferentes aspectos que deben estudiarse con más detalle, como son:

- La forma química en la que está presente el ion metálico, ya que esto afecta a su capacidad oxidante. En este sentido, el efecto del tipo de disolución amortiguadora es muy importante, ya que los iones metálicos con propiedades SPR como el Au(III), son capaces de formar complejos y modificar así su carácter oxidante.
- El estado de oxidación del ion metálico. Por ejemplo, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han llevado a cabo con Au(III), pero el uso de Au(I) (según el esquema dado por las reacciones (6.8) y (6.9), mejoraría la sensibilidad. Es importante señalar que se han sintetizado muchos compuestos organometálicos de Au(I) solubles en agua.
- El mecanismo por el cual el NAD(P)H conduce a la reducción y estabilización del nanomaterial. Es importante tener en cuenta que los iones metálicos como el Au(III) forman complejos con el grupo adenina del NAD(P)H y esto puede dificultar el proceso de reacción [6.68]. Con este fin, el uso de miméticos de NAD(P) [6.69], que conservan el grupo nicotinamida, pero simplifican el resto de la molécula, pueden mejorar los resultados.
- El aumento de la sensibilidad, mediante la generación in situ de nanopartículas metálicas mixtas o utilizando reacciones amplificadas. En este sentido, es muy interesante el trabajo recientemente publicado por Grzelczak y Paul, que muestra que nanopartículas ya formadas pueden actuar como regeneradores fotoquímicos de NADH, ya que un fotoelectrón de la NP puede reducir al NAD, aunque se necesita un sustrato (ácido fórmico) para devolver el electrón a la NP. El NADH puede reducir al Au(III) para generar nuevas nanopartículas (no para hacer crecer las existentes). De este modo, cabría esperar que la misma molécula de NADH pudiera reducir varios iones precursores, aumentando así la sensibilidad [6.70].

Son estos aspectos los que se estudian en esta sección de la Tesis, explorando las posibilidades que ofrecen en el desarrollo de sensores enzimáticos para la determinación de AT.

6.4 Bibliografía

- 6.1. Yaqoob SB, Adnan R, Rameez Khan RM, Rashid M (2020) Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications. *Front Chem* 8:376. <https://doi.org/fchem.2020.00376>
- 6.2. Lakshmi Priya T, Gopinath SCB (2021) 1 - Introduction to nanoparticles and analytical devices. In: Gopinath SCB, Gang F (eds) *Nanoparticles in Analytical and Medical Devices*. Elsevier, pp 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821163-2.00001-7>
- 6.3. Singh L, Singh R, Zhang B, Cheng S, Kumar Kaushik B, Kumar S (2019) LSPR based uric acid sensor using graphene oxide and gold nanoparticles functionalized tapered fiber. *Optical Fiber Technology* 53:. <https://doi.org/10.1016/j.yofte.2019.102043>
- 6.4. Xing S, Xu X, Fu P, Xu M, Gao T, Zhang X, Zhao C (2019) Colorimetric detection of single base-pair mismatches based on the interactions of PNA and PNA/DNA complexes with unmodified gold nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 181:333–340. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.069>
- 6.5. Wu S, Li D, Wang J, Zhao Y, Dong S, Wang X (2017) Gold nanoparticles dissolution based colorimetric method for highly sensitive detection of organophosphate pesticides. *Sens Actuators B Chem* 238:427–433. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.067>
- 6.6. Wang H, Cui Y, Wang J, Liu S, Zhang X, Song X, Wang Y, Huang J, Yu J (2019) A facile and robust SERS platform for highly sensitive and reproducible detection of uracil-DNA glycosylase using target-activated plasmonic coupling. *Sens Actuators B Chem* 287:535–543. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.02.054>

- 6.7. Wu Z, Liu Y, Liu Y, Xiao H, Shen A, Zhou X, Hu J (2015) A simple and universal “turn-on” detection platform for proteases based on surface enhanced Raman scattering (SERS). *Biosens Bioelectron* 65:375–381. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.065>
- 6.8. Rahin Ahmed S, Kim J, Suzuki T, Lee J, Park EY (2016) Detection of influenza virus using peroxidase-mimic of gold nanoparticles; Detection of influenza virus using peroxidase-mimic of gold nanoparticles. *Biotechnol Bioeng* 113:2298–2303. <https://doi.org/10.1002/bit.25982/abstract>
- 6.9. Chen Z, Tan L, Wang S, Zhang Y, Li Y (2016) Sensitive colorimetric detection of K(I) using catalytically active gold nanoparticles triggered signal amplification. *Biosens Bioelectron* 79:749–757. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.110>
- 6.10. Yu P, Wen X, Toh YR, Ma X, Tang J (2015) Fluorescent metallic nanoclusters: Electron dynamics, structure, and applications. *Particle and Particle Systems Characterization* 32:142–163. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201400040>
- 6.11. Moriarty P (2001) Nanostructured materials. *Reports on progress in Physics* 64:297. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/64/3/201>
- 6.12. Lin C-AJ, Yuan C, Kuan J, Li J, Lee C-H, Hsieh J-T, Wang H-H, Li JK, Shen J-L, Chan W-H, Yeh H-I, Chang WH (2009) Review: Synthesis of Fluorescent Metallic Nanoclusters toward Biomedical Application: Recent Progress and Present Challenges. *J Med Biol Eng* 29:276–283
- 6.13. Chakraborty D, Venkatesan M, Ethiraj KR, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2020) Development of thickness-tunable gold nanorods for anti-oxidant detection. *Mater Chem Phys* 239:. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122295>
- 6.14. Coronado-Puchau M, Saa L, Grzelczak M, Pavlov V, Liz-Marzán LM (2013) Enzymatic modulation of gold nanorod growth and application to nerve

- gas detection. *Nano Today* 8:461–468. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2013.08.008>
- 6.15. Liu Y, Lv B, Liu A, Liang G, Yin L, Pu Y, Wei W, Gou S, Liu S (2018) Multicolor sensor for organophosphorus pesticides determination based on the bi-enzyme catalytic etching of gold nanorods. *Sens Actuators B Chem* 265:675–681. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.023>
- 6.16. Dondapati SK, Sau TK, Hrelescu C, Klar TA, Stefani FD, Feldmann J (2010) Label-free biosensing based on single gold nanostars as plasmonic transducers. *ACS Nano* 4:6318–6322. <https://doi.org/10.1021/nn100760f>
- 6.17. Wang X, Li G, Ding Y, Sun S (2014) Understanding the photothermal effect of gold nanostars and nanorods for biomedical applications. *RSC Adv* 4:30375–30383. <https://doi.org/10.1039/c4ra02978j>
- 6.18. Abalde-Cela S, Aldeanueva-Potel P, Mateo-Mateo C, Rodríguez-Lorenzo L, Alvarez-Puebla RA, Liz-Marzán LM (2010) Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles. *J R Soc Interface* 7. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0125.focus>
- 6.19. Tseng CW, Chang HY, Chang JY, Huang CC (2012) Detection of mercury ions based on mercury-induced switching of enzyme-like activity of platinum/gold nanoparticles. *Nanoscale* 4:6823–6830. <https://doi.org/10.1039/c2nr31716h>
- 6.20. Wang GL, Jin LY, Dong YM, Wu XM, Li ZJ (2015) Intrinsic enzyme mimicking activity of gold nanoclusters upon visible light triggering and its application for colorimetric trypsin detection. *Biosens Bioelectron* 64:523–529. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.071>
- 6.21. Wang YW, Tang S, Yang HH, Song H (2016) A novel colorimetric assay for rapid detection of cysteine and Hg²⁺ based on gold clusters. *Talanta* 146:71–74. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.015>
- 6.22. Chen LY, Wang CW, Yuan Z, Chang HT (2015) Fluorescent gold nanoclusters: Recent advances in sensing and imaging. *Anal Chem* 87:216–229. <https://doi.org/10.1021/ac503636j>

- 6.23. Sonia, Komal, Kukreti S, Kaushik M (2021) Gold nanoclusters: An ultrasmall platform for multifaceted applications. *Talanta* 234. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122623>
- 6.24. Liu Q, Yan X, Lai Q, Su X (2019) Bimetallic gold/silver nanoclusters-gold nanoparticles based fluorescent sensing platform via the inner filter effect for hyaluronidase activity detection. *Sens Actuators B Chem* 282:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.040>
- 6.25. Liu H, Li M, Xia Y, Ren X (2017) A Turn-On Fluorescent Sensor for Selective and Sensitive Detection of Alkaline Phosphatase Activity with Gold Nanoclusters Based on Inner Filter Effect. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:120–126. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11920>
- 6.26. Sun J, Yang X (2015) Gold nanoclusters–Cu²⁺ ensemble-based fluorescence turn-on and real-time assay for acetylcholinesterase activity and inhibitor screening. *Biosens Bioelectron* 74:177–182
- 6.27. Liu Q, Na W, Wang L, Su X (2017) Gold nanocluster-based fluorescent assay for label-free detection of protein kinase and its inhibitors. *Microchim Acta* 184:3381–3387
- 6.28. Yan X, Li H, Hu T, Su X (2017) A novel fluorimetric sensing platform for highly sensitive detection of organophosphorus pesticides by using egg white-encapsulated gold nanoclusters. *Biosens Bioelectron* 91:232–237. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.058>
- 6.29. Wen Q, Gu Y, Tang LJ, Yu RQ, Jiang JH (2013) Peptide-templated gold nanocluster beacon as a sensitive, label-free sensor for protein post-translational modification enzymes. *Anal Chem* 85:11681–11685. <https://doi.org/10.1021/ac403308b>
- 6.30. Liu Q, Li H, Jin R, Li N, Yan X, Su X (2019) Ultrasensitive detection alkaline phosphatase activity using 3-aminophenylboronic acid functionalized gold nanoclusters. *Sens Actuators B Chem* 281:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.083>
- 6.31. Li H, Yang M, Kong D, Jin R, Zhao X, Liu F, Yan X, Lin Y, Lu G (2019) Sensitive fluorescence sensor for point-of-care detection of trypsin using

- glutathione-stabilized gold nanoclusters. *Sens Actuators B Chem* 282:366–372. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.077>
- 6.32. Martín-Barreiro A, de Marcos S, Galbán J (2018) Gold nanoclusters as a quenchable fluorescent probe for sensing oxygen at high temperatures. *Microchimica Acta* 185:1–7. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2676-y>
 - 6.33. Martín-Barreiro A, de Marcos S, de la Fuente JM, Grazú V, Galbán J (2018) Gold nanocluster fluorescence as an indicator for optical enzymatic nanobiosensors: choline and acetylcholine determination. *Sens Actuators B Chem* 277:261–270. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.08.116>
 - 6.34. Zhang Z, Wang H, Chen Z, Wang X, Choo J, Chen L (2018) Plasmonic colorimetric sensors based on etching and growth of noble metal nanoparticles: Strategies and applications. *Biosens Bioelectron* 114:52–65. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.015>
 - 6.35. Singh MM, Satija J (2022) Enzyme-assisted metal nanoparticles etching based plasmonic ELISA: Progress and insights. *Anal Biochem* 654. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114820>
 - 6.36. Vilela D, González MC, Escarpa A (2012) Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. *Anal Chim Acta* 751:24–43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.08.043>
 - 6.37. Alizadeh N, Salimi A (2021) Multienzymes activity of metals and metal oxide nanomaterials: applications from biotechnology to medicine and environmental engineering. *J Nanobiotechnology* 19:1–31. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00771-1>
 - 6.38. Kreibig U, Genzel L (1985) Optical absorption of small metallic particles. *Surf Sci* 156:678–700. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(85\)90239-0](https://doi.org/10.1016/0039-6028(85)90239-0)
 - 6.39. Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q (2007) Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf B Biointerfaces* 58:3–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>

- 6.40. Liao H, Nehl CL, Hafner JH, Kreibig U, Vollmer M, Katz E, Willner I, Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW, De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE (2006) Optical Properties of Metal Clusters. Wei, A e-J Surf Sci Nanotech 10:6620–6625. <https://doi.org/10.1007/s00216>
- 6.41. Link S, El-Sayed MA (1999) Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. Journal of Physical Chemistry B 103:8410–8426. <https://doi.org/10.1021/jp9917648>
- 6.42. Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html> (último acceso Febrero 2025)
- 6.43. 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. Angewandte Chemie - International Edition 57:3143–3147. <https://doi.org/10.1002/anie.201800288>
- 6.44. Navarro J, de Marcos S, Galbán J (2020) Colorimetric-enzymatic determination of tyramine by generation of gold nanoparticles. Microchimica Acta 187:1–8. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4141-y>
- 6.45. Camacho-Aguayo J, de Marcos S, Felices C, Galbán J (2023) In situ enzymatic generation of Au/Pt nanoparticles as an analytical photometric system: proof of concept determination of tyramine. Microchimica Acta 190:114. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05698-y>
- 6.46. Camacho-Aguayo J, de Marcos S, Mora-Sanz V, Galbán J (2022) Selective generation of gold nanostructures mediated by flavo-enzymes to develop optical biosensors. Biosens Bioelectron 215. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114579>
- 6.47. Caseli L, dos Santos DS, Aroca RF, Oliveira ON (2009) Controlled fabrication of gold nanoparticles biomediated by glucose oxidase

- immobilized on chitosan layer-by-layer films. *Materials Science and Engineering C* 29:1687–1690. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.013>
- 6.48. Zhang Q, Li J, Wang Y, Ma Y, He M, Zhao D, Huo D, Lu L, Hou C (2021) Detection of aldehydes by gold nanoparticle colorimetric array based on Tollens' reagent. *Analytical Methods* 13:5478–5486. <https://doi.org/10.1039/d1ay01431e>
- 6.49. Figat AM, Bartosewicz B, Liszewska M, Budner B, Norek M, Jankiewicz BJ (2023) α -Amino Acids as Reducing and Capping Agents in Gold Nanoparticles Synthesis Using the Turkevich Method. *Langmuir* 39:8646–8657. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c00507>
- 6.50. Wangoo N, Kaur S, Bajaj M, Jain DVS, Sharma RK (2014) One pot, rapid and efficient synthesis of water dispersible gold nanoparticles using alpha-amino acids. *Nanotechnology* 25:. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/43/435608>
- 6.51. Sharma D (2013) Single step, pH induced gold nanoparticle chain formation in lecithin/water system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 107:262–266. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.024>
- 6.52. Baron R, Zayats M, Willner I (2005) Dopamine-, L-DOPA-, adrenaline-, and noradrenaline-induced growth of Au nanoparticles: Assays for the detection of neurotransmitters and of tyrosinase activity. *Anal Chem* 77:1566–1571. <https://doi.org/10.1021/ac048691v>
- 6.53. Navarro J, Cepriá G, Camacho-Aguayo J, Martín S, González Orive A, de Marcos S, Galbán J (2024) Towards new fluorometric methodologies based on the in-situ generation of gold nanoclusters. *Talanta* 266:. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125119>
- 6.54. Nanda Kumar D, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2018) Horseradish peroxidase-mediated in situ synthesis of silver nanoparticles: application for sensing of mercury. *New Journal of Chemistry* 42:13763–13769. <https://doi.org/10.1039/c8nj02083c>

- 6.55. Rasale DB, Maity I, Das AK (2013) Colorimetric Enzyme Sensing Assays via In Situ Synthesis of Gold Nanoparticles. *J Clust Sci* 24:1163–1170. <https://doi.org/10.1007/s10876-013-0606-z>
- 6.56. Jiang Z, Wu M, Liu G, Liang A (2012) A sensitive enzyme-catalytic nanogold-resonance scattering spectral assay for alkaline phosphate. *Bioprocess Biosyst Eng* 35:781–787. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0658-0>
- 6.57. Ahmed SR, Chen A (2020) In Situ Enzymatic Generation of Gold Nanoparticles for Nanozymatic Label-free Detection of Acid Phosphatase. *ACS Appl Nano Mater* 3:9462–9469. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c02067>
- 6.58. Xiao Y, Pavlov V, Levine S, Niazov T, Markovitch G, Willner I (2004) Catalytic Growth of Au Nanoparticles by NAD(P)H Cofactors: Optical Sensors for NAD(P) + -Dependent Biocatalyzed Transformations. *Angewandte Chemie* 116:4619–4622. <https://doi.org/10.1002/ange.200460608>
- 6.59. Shlyahovsky B, Katz E, Xiao Y, Pavlov V, Willner I (2005) Optical and electrochemical detection of NADH and of NAD⁺-dependent biocatalyzed processes by the catalytic deposition of copper on gold nanoparticles. *Small* 1:213–216. <https://doi.org/10.1002/smll.200400057>
- 6.60. Zhang L, Li Y, Li DW, Jing C, Chen X, Lv M, Huang Q, Long YT, Willner I (2011) Single gold nanoparticles as real-time optical probes for the detection of NADH-dependent intracellular metabolic enzymatic pathways. *Angewandte Chemie - International Edition* 50:6789–6792. <https://doi.org/10.1002/anie.201102151>
- 6.61. Peng T, Qin W, Wang K, Shi J, Fan C, Li D (2015) Nanoplasmonic Imaging of Latent Fingerprints with Explosive RDX Residues. *Anal Chem* 87:9403–9407. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02248>
- 6.62. Willner I, Baron R, Willner B (2006) Growing metal nanoparticles by enzymes. *Advanced Materials* 18:1109–1120. <https://doi.org/10.1002/adma.200501865>

- 6.63. Baymiller M, Huang F, Rogelj S (2017) Rapid one-step synthesis of gold nanoparticles using the ubiquitous coenzyme NADH. *Matters (Zur)*. <https://doi.org/10.19185/matters.201705000007>
- 6.64. Hosomomi Y, Niide T, Wakabayashi R, Goto M, Kamiya N (2016) Biocatalytic formation of gold nanoparticles decorated with functional proteins inside recombinant *Escherichia coli* cells. *Anal Sci* 32:295–300. <https://doi.org/10.2116/analsci.32.295>
- 6.65. Zheng S, Gu H, Yin D, Zhang J, Li W, Fu Y (2020) Biogenic synthesis of AuPd nanocluster as a peroxidase mimic and its application for colorimetric assay of acid phosphatase. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 589:. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124444>
- 6.66. Bera RK, Das AK, Raj CR (2010) Enzyme-cofactor-assisted photochemical synthesis of Ag nanostructures and shape-dependent optical sensing of Hg(II) ions. *Chemistry of Materials* 22:4505–4511. <https://doi.org/10.1021/cm1013762>
- 6.67. Das AK, Retna Raj C (2013) Shape and surface structure-dependent electrocatalytic activity of Au nanoparticles. *Electrochim Acta* 107:592–598. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.06.057>
- 6.68. Gibson DW, Beer M, Barnett RJ (1971) Gold (III) complexes of adenine nucleotides. *Biochem* 10:3669–3679. <https://doi.org/10.1021/bi00796a006>
- 6.69. Paul CE, Hollmann F (2016) A survey of synthetic nicotinamide cofactors in enzymatic processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:4773–4778. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7500-1>
- 6.70. Sánchez-Iglesias A, Kruse J, Chuvilin A, Grzelczak M (2021) Coupling plasmonic catalysis and nanocrystal growth through cyclic regeneration of NADH. *Nanoscale* 13:15188–15192. <https://doi.org/10.1039/d1nr04400a>

Capítulo 7:

**Estudio de la reacción entre iones
metálicos y NAD(P)H**

7.1 Introducción

Como se ha introducido en el capítulo anterior, la irrupción de la nanociencia ha traído consigo un cambio significativo en el campo de la química analítica [7.1], principalmente debido a la capacidad de adsorción de los nanomateriales, que los convierte en prometedores agentes de extracción [7.2] y a sus propiedades catalíticas, como las *nanozimas*, que se investigan como alternativas a las enzimas [7.3]. Sin embargo, son sus propiedades ópticas las que han ofrecido mejores posibilidades en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas, y entre esos nanomateriales destacan las nanopartículas o los nanoclusters de metales nobles (Au, Pt, Ag) [7.4–7.6].

En este capítulo, se presenta un avance en el uso de reacciones enzimáticas combinadas con nanomateriales. Este se basa en la generación in situ de nanopartículas metálicas durante reacciones dependientes de enzimas deshidrogenasas (que utilizan NAD(P)H como cofactor). En anteriores publicaciones del grupo de investigación se ha demostrado que enzimas del tipo oxidasas son capaces de reducir iones metálicos a nanomateriales estables con propiedades ópticas (absorción, fluorescencia) que pueden ser relacionadas con la concentración del analito correspondiente [7.7, 7.8]; como en la determinación de tiramina con tiramina oxidasa mediante la generación in situ de nanopartículas de oro y platino [7.9] o a través de la fluorescencia de nanoclusters de cobre [7.10].

Partiendo de los primeros estudios realizados por Willner et al. mencionados en el Capítulo 6 [7.11], en este capítulo se ha investigado la posibilidad de emplear NADH para la generación in situ de nanopartículas de oro en ausencia de semillas, ya que este cofactor puede actuar también como agente estabilizante de las nanopartículas formadas. El método desarrollado en este capítulo se acoplará en el capítulo siguiente a la determinación enzimática de atropina optimizada previamente, donde el NAD(P)H formado en su degradación es capaz de reducir Au(III) a AuNPs in situ, cuya banda de plasmón puede ser relacionada con la concentración de atropina en la muestra.

7.2 Determinación de NAD(P)H por generación de nanomateriales

7.2.1 Formación de nanopartículas de oro

Los primeros resultados obtenidos en este trabajo confirmaron que el NAD(P)H es capaz de generar nanopartículas de oro sin la necesidad de emplear semillas para su crecimiento, obteniéndose un máximo de absorción a 540 nm. En la Figura 7.1 se muestra tanto el espectro de absorción molecular obtenido como el perfil cinético obtenido en función del tiempo de reacción en el máximo de absorción. En la curva cinética se puede observar que durante los primeros minutos de la reacción se obtiene una curva sigmoideal, que después se distorsiona dando un incremento continuo de señal.

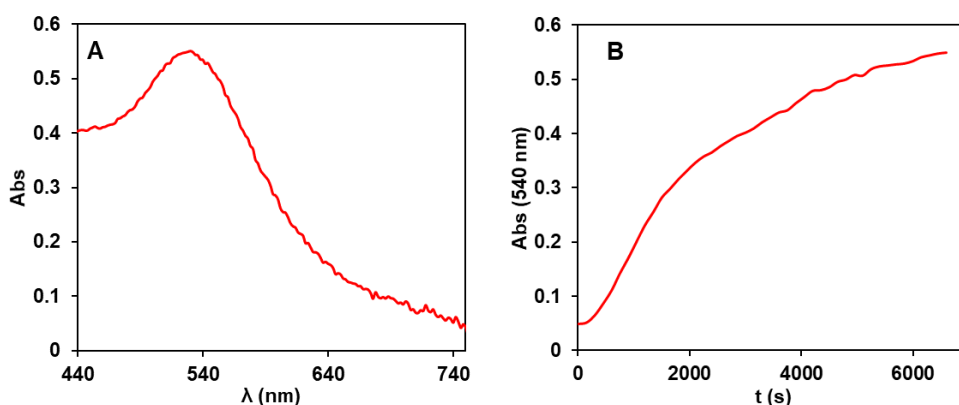


Figura 7.1: **A)** Espectro de absorción molecular obtenido en la medida de las AuNPs sintetizadas por reacción entre el NADPH y el Au(III). **B)** Registro cinético obtenido a 540 nm durante la misma reacción. $[\text{NADPH}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{Au(III)}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 7$ ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} 0.1 \text{ M}$), $T^a = 25^\circ\text{C}$.

7.2.1.1 Caracterización físico-química

En los análisis de caracterización (Figura 7.2) llevados a cabo mediante TEM, se pudo observar que se obtenían nanopartículas de oro esféricas y reproducibles, con una pequeña tendencia a agregarse.

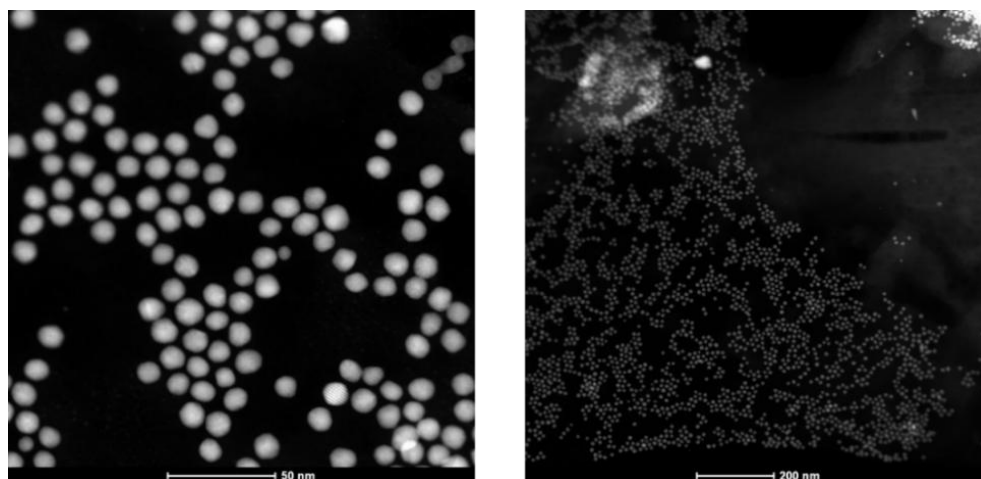


Figura 7.2: Imágenes obtenidas en la medida de las AuNPs mediante TEM.

7.2.1.2 Optimización del método

Durante el estudio de optimización se observó que la formación de nanopartículas de oro a partir de Au(III) y NADPH depende en gran medida de la naturaleza de la disolución amortiguadora, del pH y de la fuerza iónica del medio.

El efecto del pH es importante en todas las reacciones en las que el NADPH se encuentre involucrado, incluido las reacciones enzimáticas. Por una parte, este compuesto se degrada con el transcurso del tiempo [7.12] (siguiendo un mecanismo explicado por Alivisatos [7.13]), de tal forma que cuanto menor sea el pH de la disolución, mayor será su degradación [7.14]. Esto se confirma en la Figura 7.3, que muestra las cinéticas de degradación del NADPH a un valor de pH igual a 5, tanto en disolución amortiguadora de acetato como de fosfato.

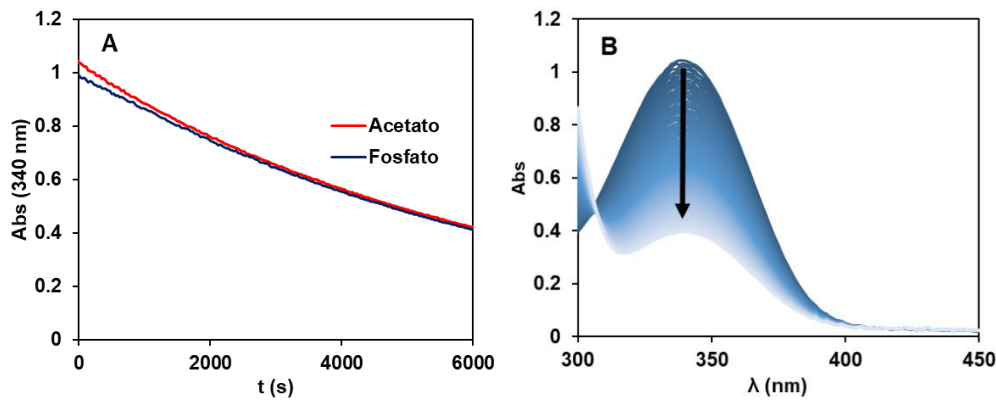


Figura 7.3: Inestabilidad del NADPH a pH 5. **A)** Registro cinético a 340 nm para acetato y fosfato. **B)** Evolución del espectro de absorción con el tiempo.

El ajuste de los datos de la Figura 7.3.A a una ecuación de velocidad de primer orden permite calcular la constante de velocidad del proceso:

- Acetato:

$$\log \frac{Abs_0}{Abs_t} = -0.0039t - 0.006 \quad R^2 = 0.9998 \quad (7.3)$$

$$k' = \frac{kC_{ac}}{2.303} = 0.0039 \rightarrow k = 0.090 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1} \quad (7.4)$$

- Fosfato:

$$\log \frac{Abs_0}{Abs_t} = -0.0038t + 0.003 \quad R^2 = 0.9998 \quad (7.5)$$

$$k' = \frac{kC_{fosf}}{2.303} = 0.0038 \rightarrow k = 0.088 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1} \quad (7.6)$$

Donde Abs_0 es la absorbancia a tiempo cero, t es el tiempo en minutos, k' es la constante cinética de pseudo primer orden y k es la constante cinética. De este modo, esta reacción de degradación sigue una cinética de primer orden con unas constantes del orden de $0.1 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ en ambas disoluciones, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Wu et al. [7.14]. Por otra parte, el potencial normal de reducción del NADPH incrementa al aumentar el pH de la disolución, lo que disminuye su poder reductor. Por lo tanto, el pH óptimo de la reacción se encuentra en un punto medio entre estas dos situaciones. La Figura 7.4 muestra que a pH 7 con disolución amortiguadora de fosfato se obtienen los mejores resultados. A valores de pH superiores, las nanopartículas también se forman, pero de forma más lenta y en menor proporción.

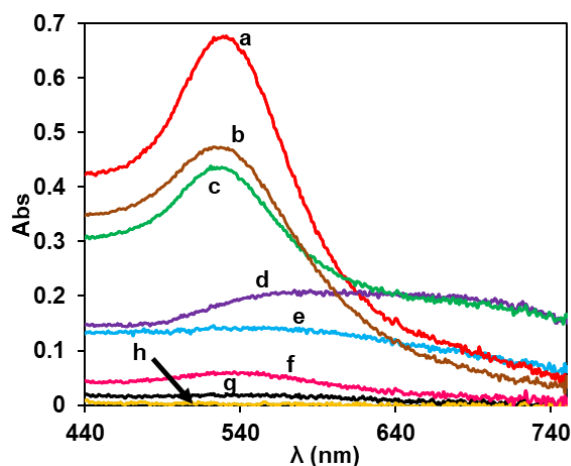


Figura 7.4: Optimización del pH empleando diferentes disoluciones amortiguadoras. **a)** HAc/Ac⁻ pH 5. **b)** H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ pH 7. **c)** HAc/Ac⁻ y H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ pH 5. **d)** HPO₄²⁻/PO₄³⁻ pH 11. **e)** H₃PO₄/H₂PO₄⁻ pH 3. **f)** HCO₃⁻/CO₃²⁻ y H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ pH 9. **g)** HCO₃⁻/CO₃²⁻ pH 9. **h)** TRIS pH 9. En todas las medidas: [Au(III)] = 1.00·10⁻⁴ M y [NADPH] = 2.00·10⁻⁴ M.

La concentración de la disolución amortiguadora también es importante. A medida que esta aumenta, también lo hace la degradación (como se puede ver en la Figura 7.5) y la fuerza iónica, que se encuentra estrechamente relacionada con la formación de las nanopartículas (a mayor fuerza iónica, mayor absorción). No obstante, a concentraciones de disolución amortiguadora superiores a 0.1 M, aparece un segundo máximo de absorción en torno a 700 nm (Figura 7.5), junto con una disminución de la absorción a 540 nm, debida a la agregación de las nanopartículas que reduce la sensibilidad a 540 nm. En estos casos, se podría emplear la absorción integrada de todo el rango espectral medido, pero esto no mejora la sensibilidad. En definitiva, la Figura 7.5 muestra que los mejores resultados se obtienen con una concentración de 0.1 M de la disolución amortiguadora de fosfato (pH = 7).

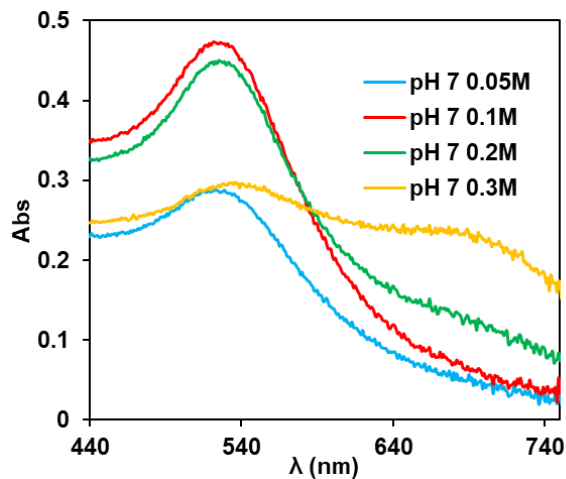


Figura 7.5: Optimización de la fuerza iónica de la disolución amortiguadora. En todos los casos la disolución amortiguadora empleada es de fosfato, $[Au(III)] = 1.00 \cdot 10^{-4} M$ y $[NADPH] = 2.00 \cdot 10^{-4} M$.

Por otra parte, se estudió el efecto de la concentración de oro empleada sobre las prestaciones analíticas del método bajo las condiciones óptimas de la reacción, mostrándose los resultados obtenidos en la Figura 7.6.

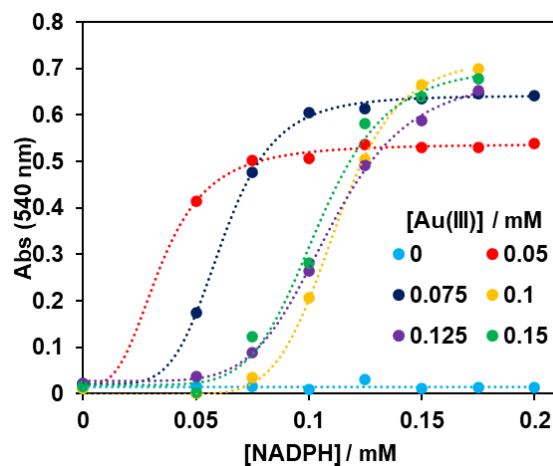


Figura 7.6: Efecto de la concentración de Au(III) en la formación de AuNPs con NADPH. En todas las reacciones la disolución amortiguadora empleada es de fosfato 0.1 M pH 7.

Al hacer este estudio se observó que un aumento en la concentración de oro permite cuantificar una mayor concentración de NADPH, pero, por otra parte, se distinguen peor las concentraciones bajas, ya que el límite de detección aumenta.

Es decir, el mejor resultado para esta reacción se obtiene cuando el oro y el NADPH se encuentran en proporciones estequiométricas. Finalmente, se escogió trabajar con una concentración de Au(III) de $1.00 \cdot 10^{-4}$ M ya que, por encima de esta concentración los resultados obtenidos no mejoraban ni en sensibilidad ni en rango lineal.

7.2.1.3 Características del método analítico

Como se puede observar (Figura 7.7), existe una relación sinusoidal entre la absorbancia y la concentración de NAD(P)H. Dado que, cuanto mayor sea la concentración de Au(III), mayor será la sensibilidad y menor será el rango de respuesta, la concentración de Au(III) puede elegirse adecuadamente en función del rango de concentración de NADPH que se vaya a investigar. La Figura 7.7 A muestra una curva de calibrado obtenida para una concentración de Au(III) igual a $1.00 \cdot 10^{-4}$ M en la que el rango de respuesta va de $8.00 \cdot 10^{-5}$ M a $1.70 \cdot 10^{-4}$ M. Este rango de respuesta tan corto se corresponde con el obtenido por otros autores empleando semillas de nanopartículas de oro [7.15].

La curva sigmoideal obtenida puede ser ajustada matemáticamente a una curva logística de cuatro parámetros, que viene dada por la expresión:

$$Abs = Abs_{\infty} + \frac{Abs_0 - Abs_{\infty}}{1 + \left(\frac{C}{C_{1/2}}\right)^B} \quad (7.7)$$

Donde Abs es la absorbancia obtenida para cada una de las concentraciones (C), Abs_{∞} y Abs_0 son el máximo y el mínimo de absorbancias obtenidas, respectivamente; $C_{1/2}$ es la concentración a mitad de altura (punto de inflexión) y B es un parámetro adimensional llamado factor de forma, el cual está relacionado con la curvatura. El ajuste a curvas logísticas de 4 parámetros entre la variable dependiente (Abs en este caso) e independiente (C), es interesante porque admite una fácil linealización si se conocen los valores de Abs_0 y Abs_{∞} (mínimo y máximo de la representación respectivamente). Reordenando la ecuación y tomando logaritmos se obtiene una expresión matemática que se ajusta a una recta (Figura 7.7 B) siguiendo la ecuación:

$$\log\left(\frac{Abs - Abs_0}{Abs_{\infty} - Abs}\right) = B \log C - B \log C_{\frac{1}{2}} \quad (7.8)$$

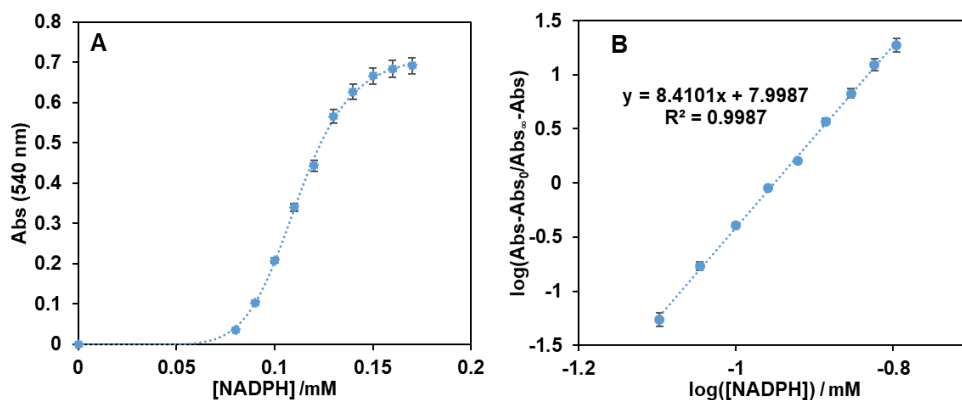


Figura 7.7: **A)** Relación sigmoideal entre la absorbancia de las AuNPs generadas a 540 nm y la concentración de NADPH. $[\text{Au(III)}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 7$ ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, 0.1 M), $T^{\text{a}} = 25^{\circ}\text{C}$. **B)** Linealización según la ecuación 7.8.

Las características analíticas de este método se muestran en la Tabla 7.1, donde se puede apreciar el bajo rango de respuesta.

Tabla 7.1: Características analíticas obtenidas en el método basado en la formación de AuNPs por reacción del Au(III) con NADPH.

LD	$2.40 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
LC	$8.00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
Rango de respuesta	$8.00 \cdot 10^{-5} - 1.70 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
DER ($1.50 \cdot 10^{-4} \text{ M NADPH}$, $n=5$)	3.45%

7.2.2 Formación de nanopartículas de oro y platino

En trabajos anteriores del grupo de investigación, se ha observado que las características analíticas obtenidas en la generación in-situ de nanopartículas durante reacciones analíticas pueden ser mejoradas mediante el empleo de mezclas Au(III)/Pt(II) como iones metálicos precursores [7.9]. Existen dos razones principales para que esto ocurra. En primer lugar, el ion Pt(II) es capaz de reducir Au(III) a Au(I). Por otra parte, la absorptividad molar de las nanopartículas de oro-platino es mayor [7.9, 7.16].

En este caso, también se ha estudiado si la metodología analítica se puede mejorar de esta manera. En primer lugar, se ha optimizado la relación Pt(II)/Au(III), obteniéndose los mejores resultados al emplear una concentración

de platino cuatro veces superior a la de oro (Figura 7.8), lo que coincide con estudios anteriores.

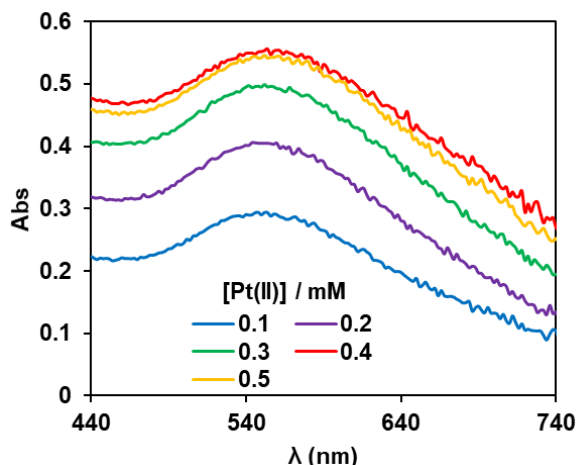


Figura 7.8: Espectros finales obtenidos para las AuPtNPs formadas con una concentración de NADPH de $1.00 \cdot 10^{-5}$ M, $1.00 \cdot 10^{-4}$ M de Au(III) y diferentes concentraciones de Pt(II).

La adición de platino de forma conjunta con el oro supone un cambio en el color de las nanopartículas (desplazamiento del máximo de absorción), además de obtenerse espectros de absorción más anchos (Figura 7.9 A). Por otra parte, se obtienen cinéticas de reacción diferentes como puede observarse también en la Figura 7.9 B.

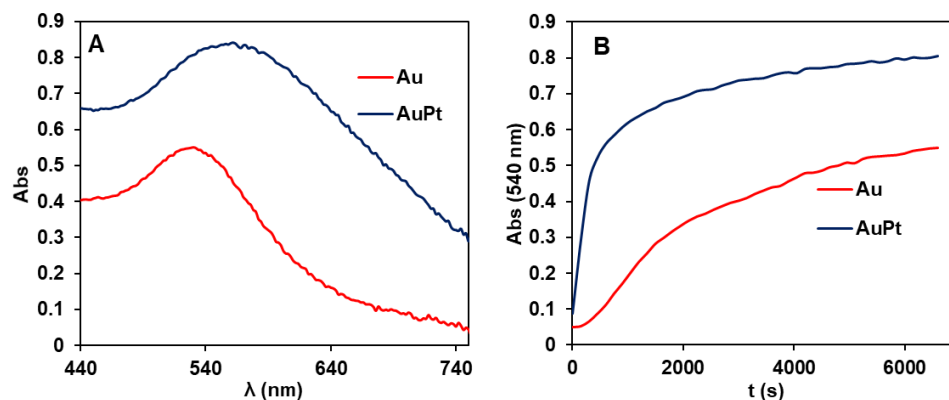


Figura 7.9: A) Espectro de absorción molecular obtenido para las AuPtNPs formadas y comparación con el obtenido para las AuNPs. **B)** Registros cinéticos obtenidos a 540 nm para ambos tipos de nanopartículas. En los dos casos la concentración de NADPH empleada fue de $1.00 \cdot 10^{-4}$ M. $[Au(III)] = 1.00 \cdot 10^{-4}$ M, $[Pt(II)] = 4.00 \cdot 10^{-4}$ M, pH = 7 ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, 0.1 M), $T^{\circ} = 25^{\circ}C$.

7.2.2.1 Caracterización físico-química

Con el propósito de obtener una mayor cantidad de información acerca de la morfología y la naturaleza de las estructuras formadas se llevaron estudios de caracterización mediante las técnicas de TEM y XPS.

Las medidas realizadas por TEM (Figura 7.10) reflejan que ese cambio en la cinética y el ensanchamiento de los espectros, es debido a la forma de las nanopartículas. Como se ve, presentan una mayor agregación y un tamaño de nanopartícula considerablemente superior en comparación con las obtenidas sin platino, que se manifiesta en una estructura en racimo.

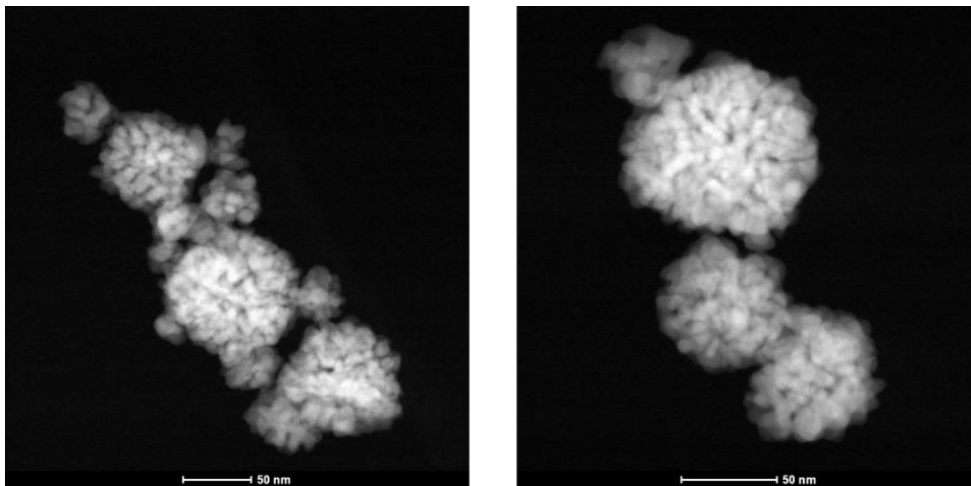


Figura 7.10: Imágenes obtenidas en la medida de las AuPtNPs mediante TEM.

En cuanto a las medidas realizadas por XPS se observó (Figura 7.11) que las energías de enlace obtenidas para la señal del Au (Au 4f 7/2, 84.2 eV) son ligeramente superiores a las descritas para Au⁰ (83.9 eV), correspondiéndose con el rango en el que suelen aparecer entornos de Au(I). Esto demuestra que el platino favorece la reacción por medio de la reducción del Au(III) a esta especie intermedia. Además, se obtuvo una señal muy grande en 73.3 eV, compatible con entornos de Pt(II) según la bibliografía [7.17], correspondiente con el Pt(II) en exceso.

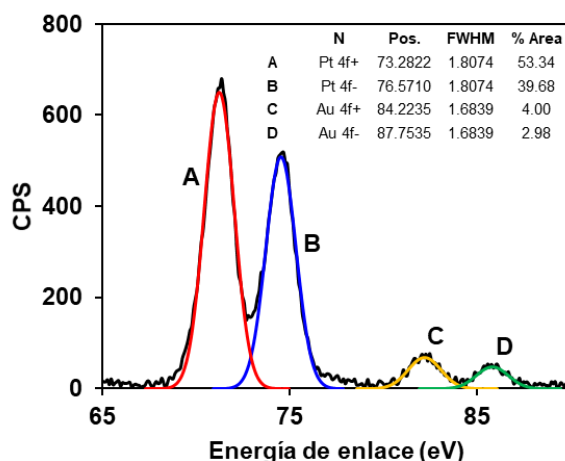


Figura 7.11: Espectro obtenido en las medidas realizadas por XPS.

7.2.2.2 Características del método analítico

La adición de platino (II) al sistema permite la determinación de cantidades menores de NADPH, así como un rango de respuesta mayor. Del mismo modo que en la calibración sólo con Au(III), y empleando disolución amortiguadora de fosfato pH=7 0.1 M, y una concentración de Au(III) = $1.00 \cdot 10^{-4}$ y Pt(II) = $4.00 \cdot 10^{-4}$ M, se representa la absorción obtenida en el máximo de absorción (550 nm en este caso) para cada concentración de NADPH. Esta representación cubre un rango de concentraciones de $2.40 \cdot 10^{-7}$ a $1.00 \cdot 10^{-5}$ M. Esta curva se ajusta a múltiples representaciones matemáticas, sin embargo, para poder ser comparada con el método basado en nanopartículas de oro, los datos finalmente se ajustan a la ecuación 7.7 (Figura 7.12 A), y se pueden linealizar de nuevo según la ecuación 7.8 (Figura 7.12 B).

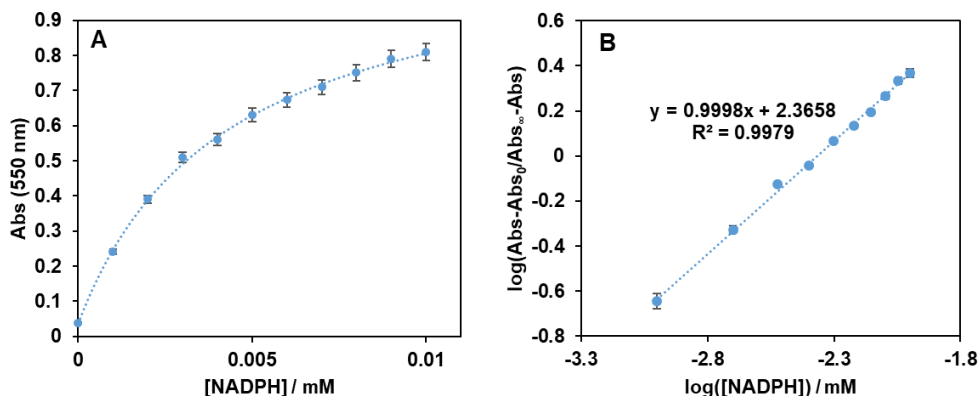


Figura 7.12: Curva de calibrado para la reacción del NADPH con Au(III) y Pt(II) empleando las siguientes concentraciones de metales: $[Au(III)] = 1.00 \cdot 10^{-4}$ M; $[Pt(II)] = 4.00 \cdot 10^{-4}$ M. pH=7 ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ C$. **A)** Representación de la absorción en función de la concentración empleada de NADPH. **B)** Linealización según la ecuación 7.8.

Como se puede observar, el empleo de nanopartículas de oro y platino permite tanto la determinación de concentraciones inferiores de NADPH como un rango de respuesta mayor, aportando mejores posibilidades analíticas. Las características analíticas de esta curva de calibrado se muestran en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2: Características analíticas obtenidas en la curva de calibrado obtenida para la formación de AuPtNPs por reacción con NADPH.

LD	$1.03 \cdot 10^{-7}$ M
LC	$2.40 \cdot 10^{-7}$ M
Rango de respuesta	$2.40 \cdot 10^{-7} - 1.00 \cdot 10^{-5}$ M
DER ($8.00 \cdot 10^{-5}$ M NADPH, n=5)	3.71%

7.3 Desarrollo de un modelo para la formación de NP metálicas por acción del NAD(P)H

Uno de los objetivos de este trabajo es poder desarrollar un modelo matemático que explique el mecanismo de la formación de las NP a partir de sus precursores con objeto de conocer mejor el proceso y sistematizar el efecto de alguna de las variables que afectan. El desarrollo de este modelo se basará en antecedentes previamente desarrollados por otros investigadores, por lo que antes de empezar

es necesario llevar a cabo una descripción de la información bibliográfica al respecto.

7.3.1 Revisión de los modelos matemáticos descritos en la bibliografía

7.3.1.1 Aspectos generales

El estudio teórico destinado a dilucidar los mecanismos que subyacen a la formación de nanopartículas constituye un tema que ha generado un interés significativo en la comunidad científica. En consecuencia, se han propuesto numerosos modelos para explicar eficazmente el proceso y crear representaciones matemáticas acertadas. Una revisión exhaustiva de estos modelos facilita su clasificación en dos categorías principales (Figura 7.13), en función de los procesos fundamentales de los que se originan [7.18]:

Modelos clásicos: Estos modelos se basan en el mecanismo inicialmente propuesto por La Mer-Dinegar durante la década de 1950. De acuerdo con este mecanismo (atom-mediated nucleation and growth), los átomos son las unidades fundamentales a partir de las cuales se generan las partículas mediante un proceso de dos pasos, que posteriormente se amplió a tres pasos.

1. Nucleación: Los iones que constituyen las partículas se reducen químicamente hasta convertirse en átomos, y la nucleación se produce cuando la disolución alcanza la saturación con estos átomos y se supera la barrera energética necesaria para la formación del núcleo.
2. Crecimiento: Tras producirse la nucleación, la disolución ya se encuentra saturada por lo que los nuevos átomos que intervienen ya no crean más núcleos, sino que se acumulan en partículas ya existentes hasta alcanzar el tamaño de partícula máximo. La formulación matemática de esta fase depende de si el proceso se rige por difusión o por reacción.
3. Maduración o ripening: Al finalizar el proceso (cuando el iniciador desaparece), el nanomaterial se reorganiza para convertirse en un producto final. Diversos mecanismos, como la maduración digestiva o la maduración de Ostwald, pueden facilitar este proceso.

Modelos no clásicos [7.19]: Estos modelos siguen inclinándose por la presencia de los procesos fundamentales de nucleación y crecimiento; sin embargo, divergen en su premisa fundamental: rechazan al átomo como la unidad

fundamental en la generación de nanomateriales. Estos modelos se han desarrollado para aclarar fenómenos específicos encontrados durante la formación de nanomateriales que parecen desviarse de la secuencia postulada por los modelos clásicos. Los más destacados son el modelo de “agregación de clusters” y el modelo de “agregación de complejos”.

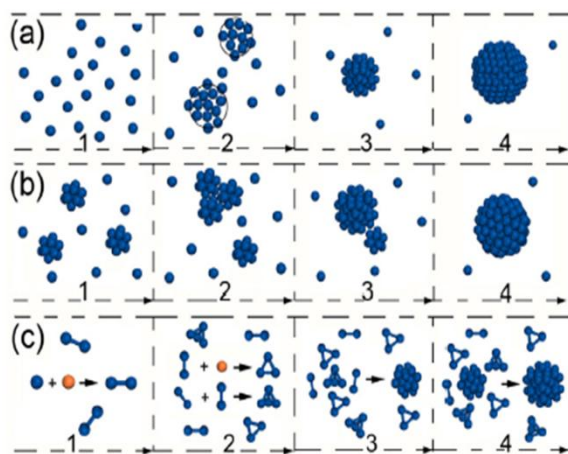


Figura 7.13: a) Modelo clásico. b) Modelo no clásico basado en la agregación de clusters. c) Modelo no clásico basado en la agregación de complejos. Las distintas imágenes en cada modelo representan la formación de las nanopartículas a lo largo del tiempo [7.19].

El modelo matemático inicial que describe el proceso de formación de NPs se remonta a las investigaciones simultáneas realizadas por Kolmogorov [7.20] y Johnson-Mehl [7.21] a finales de la década de 1930. Estas investigaciones buscaban caracterizar de una forma simple la cinética implicada en los mecanismos de enfriamiento y recristalización de los metales, con implicaciones para la industria metalúrgica. Su objetivo era formular un modelo cinético asociado a la alteración volumétrica de la fase sólida a medida que emerge dentro de una fase líquida como consecuencia de un proceso físico. Posteriormente, estos estudios llevaron a Avrami [7.22], a principios de la década de 1940, a proponer una ecuación sencilla para describir el proceso, que, a pesar de no haber sido concebido inicialmente para este propósito, desde entonces ha sido reconocido como el “modelo estándar” fundamental para la generación de nanomateriales mediante procesos de reducción atómica. Este modelo no diferencia entre las fases de nucleación y crecimiento, ni agrega una fase de maduración posterior, sino que se limita a representar un mero cambio de fase.

Cuando se estudia la formación de nanopartículas metálicas que presentan bandas plasmónicas (y, en consecuencia, absorción UV-vis) o nanoclusters metálicos, es habitual monitorear el proceso cuantificando la absorbancia o la intensidad de fluorescencia; por lo tanto, la ecuación se expresa con frecuencia en términos de estas señales [7.23]:

$$\frac{S_t}{S_\infty} = 1 - e^{-(k_{Av}t)^n} \quad (7.9)$$

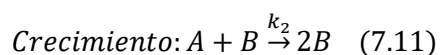
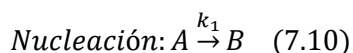
Donde k_{Av} es la llamada constante de Avrami, n está relacionado con la dimensionalidad de las partículas formadas, y S_t y S_∞ son las señales en cada instante y al final del proceso, respectivamente. Este modelo explica simplemente el hecho experimental de que la respuesta sigue una curva sigmoideal. Se trata, por tanto, de una ecuación muy general que, como se ha dicho, se utiliza para describir un cambio de fase y que puede ayudar a comprender muchos de los fenómenos observados durante la formación de nanoestructuras.

Aunque los modelos no clásicos son capaces de explicar ciertos comportamientos en la generación de nanomateriales, los modelos clásicos parecen ser más útiles para simplificar y dar una respuesta adecuada a la generación enzimática de nanomateriales, por lo que se explicarán con más detalle en este apartado.

7.3.1.2 Modelos clásicos: etapas de nucleación y crecimiento

A diferencia del modelo de Avrami, existen dos modelos que tratan las fases de nucleación y crecimiento de forma independiente y se orientan más específicamente hacia la formación de nanomateriales. Los más importantes son los modelos propuestos por Finke-Watsy [7.24] y Zhou [7.25]:

Finke-Watsy: En este modelo el reductor se encuentra en exceso frente al ion metálico (representado por A). Las etapas de nucleación (núcleos representados por B) y crecimiento (representado por 2B) suceden según las ecuaciones:



Donde k_1 y k_2 son las constantes cinéticas de los dos pasos. Este modelo conduce a una ecuación que, partiendo de una concentración inicial de ion metálico ($[M]_0$),

permite calcular la concentración de NPs ($[NP]_t$) y de ion metálico libre ($[M]_t$) en disolución en cualquier momento, según:

$$[M]_t = 1 - \frac{k_1 + k_2[M]_0}{k_2[M]_0 k_1 e^{(k_1+k_2[M]_0 t)} - k_1} = \frac{k_1 e^{(k_1+k_2[M]_0 t)} - k_1}{k_2[M]_0 + k_1 e^{(k_1+k_2[M]_0 t)}} \quad (7.12)$$

$$[NP]_t = [M]_0 - [M]_t = [M]_0 \left(\frac{k_1 e^{(k_1+k_2[M]_0 t)} - k_1}{k_2 C_{L,0} + k_1 e^{(k_1+k_2[M]_0 t)}} \right) \quad (7.13)$$

Posteriormente, se introdujeron modificaciones que añadieron una tercera etapa de maduración compuesta por dos subetapas que implicaban la agregación de partículas intermedias y la aglomeración autocatalítica, lo que no dio lugar a un modelo matemático sencillo.

Zhou: Este autor propone una etapa química previa en la fase líquida de reducción de iones metálicos, seguido de una etapa de nucleación similar a (7.10) y una de crecimiento. A partir de estas premisas, se obtiene un modelo similar a (7.13), que permite determinar $[NP]_t$ y, posteriormente, el cambio de absorbancia en el tiempo atribuido a la banda plasmónica de las NPs.

$$\begin{aligned} Abs_t &= Abs_0 \left(1 - \frac{k_{0,1} + k_{0,2}[M]_0}{k_{0,2}[M]_0 + k_{0,1} e^{(k_{0,1}+k_{0,2}[M]_0 t)}} \right) \\ &= Abs_0 \left(\frac{k_{0,1} e^{(k_{0,1}+k_{0,2}[M]_0 t)} - k_{0,1}}{k_{0,2}[M]_0 + k_{0,1} e^{(k_{0,1}+k_{0,2}[M]_0 t)}} \right) \quad (7.14) \end{aligned}$$

Donde $k_{0,1}$ coincide con k_1 siempre que todo el ion metálico esté reducido (en caso contrario, k_1 debería multiplicarse por la fracción reducida) y $k_{0,2}$ está relacionada con k_2 , pero también con la masa atómica (M_M) y la densidad (ρ_M) del ion, y con el radio medio (r_t) de las NPs en cada instante.

$$k_{0,2} = \frac{3M_M}{\rho_M r_t} k_2 \quad (7.15)$$

7.3.1.3 Modelos clásicos: Etapa de maduración

El modelo tradicional basado en dos etapas (nucleación y crecimiento) plasmadas por las ecuaciones de Avrami (7.9), Finke-Watsy (7.13) o Zhou (7.14), postula que el parámetro observado (S_t o $[NP]_t$) debería mostrar un perfil sigmoidal, aproximándose finalmente a un valor máximo (S_∞ o $[NP]_\infty$). Sin embargo, las

observaciones empíricas revelan que, al alcanzar este valor asintótico, se produce una transformación adicional en la variable, lo que resulta en una representación similar a la ilustrada en la Figura 7.14.

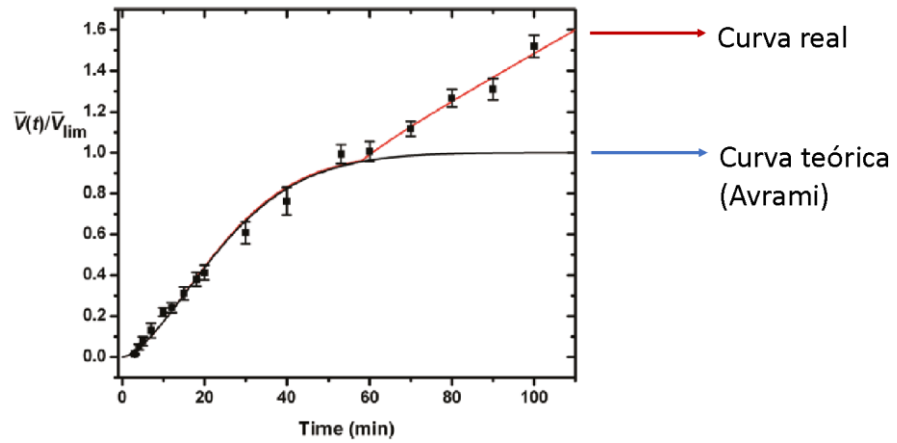


Figura 7.14: Variación teórica según el modelo de Avrami frente a la real obtenida en la formación de nanopartículas de plata [7.26].

Esta representación gráfica corrobora la presencia de una tercera etapa de “maduración”, que está influenciada por la difusión de las nanopartículas y, en consecuencia, por las condiciones ambientales del medio circundante. Los investigadores han determinado que el enfoque más eficaz para modelar esta etapa es tratarla de manera independiente a las dos anteriores. Se han sugerido una gran cantidad de modelos, que oscilan entre dos alternativas diferentes:

Maduración de Ostwald: Este modelo [7.26] postula que, una vez finalizada la etapa de crecimiento, las nanoestructuras más pequeñas se disuelven en entidades atómicas que, posteriormente, contribuyen al crecimiento del resto. Este mecanismo se expresa cuantitativamente mediante el modelo de Lifshitz, Slyozov y Wagner (LSW), que describe el crecimiento del diámetro del nanomaterial residual (D_t) en función de:

$$D_t = D_0 + k_{OR} t^{\frac{1}{n}} \quad (7.16)$$

Donde D_0 es el diámetro del nanomaterial antes del inicio de la maduración, K_{OR} es una constante que depende del material y de la temperatura, y n es un parámetro relacionado con el modo en el que se produce el crecimiento.

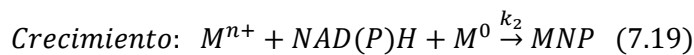
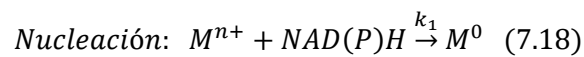
Coalescencia de unión orientada: En este caso [7.27], los nanomateriales más pequeños se combinan para formar otros más grandes. El modelo que describe este proceso ha sido propuesto, entre otros, por Huang, quien asume que las partículas se unen de dos en dos; para la coalescencia simultánea de un número mayor (n) de partículas, la ecuación toma la forma:

$$D_t = D_0 \left(\frac{\sqrt{n}kt + 1}{kt + 1} \right) \quad (7.17)$$

7.3.2 Desarrollo de un modelo para la formación de nanopartículas de Au(III) y NADPH

Tomando como base los mecanismos explicados en el apartado anterior, principalmente en el de Finke-Watsky, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado modelos matemáticos cinéticos para la formación de nanopartículas durante la reacción que tiene lugar entre el Au(III) y el NADPH. Estos mecanismos tratan de predecir la señal que se obtendrá durante la reacción analítica en función de la concentración de NADPH basándose en la forma obtenida para las diferentes representaciones cinéticas tomadas.

Si la representación cinética obtenida es puramente sigmoideal, de acuerdo con el modelo de Finke-Watsky, se propone que la formación de las nanoestructuras tiene lugar a través de un proceso en dos etapas simultáneas que se corresponden con los procesos de nucleación y de crecimiento, y que en este caso en concreto vendrían dados por las ecuaciones:



En el que se asume que hay un proceso de reducción provocado por el NAD(P)H en ambas etapas. Siendo M^{n+} la concentración de ion metálico precursor (Au(III) en este caso) y MNP la concentración formada de nanopartículas metálicas.

Teniendo en cuenta (7.13), la ecuación que describe la absorbancia obtenida según este modelo viene dada por:

$$Abs_t = K_{Au} \left(\frac{1 - e^{-A_{Au}t}}{e^{-A_{Au}t} + B_{Au}} \right) \quad (7.20)$$

Donde A_{Au} , B_{Au} y K_{Au} son:

$$A_{Au} = C_{Au} \left(k_1 + \left(\frac{k_2}{n_{Au}} \right) C_{NADPH} \right) \quad (7.21)$$

$$B_{Au} = \frac{k_1}{\left(\frac{k_2}{n_{Au}} \right) C_{NADPH}} \quad (7.22)$$

$$K_{Au} = \left(\frac{\varepsilon_{AuNP}}{n_{Au}} \right) \frac{k_1}{\left(\frac{k_2}{n_{Au}} \right)} \quad (7.23)$$

Siendo ε_{Au} la absorptividad molar de las AuNPs formadas, n_{Au} el número de átomos en cada AuNP, C_{Au} y C_{NADPH} las concentraciones totales de Au(III) y NADPH; y k_1 y k_2 las constantes cinéticas de las etapas de nucleación y crecimiento, respectivamente.

Por otra parte, si la curva no es puramente sigmoideal, sino que termina en un incremento de la absorbancia de forma continua (no se estabiliza) se debe añadir una tercera etapa (agregación):



Para describir esta última etapa de agregación, se decidió utilizar la ecuación de Avrami, la cual es adecuada para explicar procesos de transformación de una fase líquida en una fase sólida a partir de la primera, es decir, un crecimiento puro. En este caso, la etapa de agregación vendría dada por:

$$Abs_t = (1 - e^{-k_3 t}) \quad (7.25)$$

por lo que el modelo matemático tras combinar ambos procesos (7.26) quedaría como se representa en la Figura 7.15:

$$Abs_t = \varepsilon_{AuNP,n} \frac{k_1}{k_{2,n}} \left(\frac{1 - e^{-C_{Au}(k_1 + k_{2,n} C_{NADPH})t}}{e^{-C_{Au}(k_1 + k_{2,n} C_{NADPH})t} + \frac{k_1}{k_2 C_{NADPH}}} \right) (1 - e^{-k_3 t}) \quad (7.26)$$

Siendo $\varepsilon_{AuNP,n}$ la absorptividad molar por átomo, $k_{2,n}$ la constante cinéticas de crecimiento por átomo de oro en cada AuNP y k_3 la constante de Avrami.

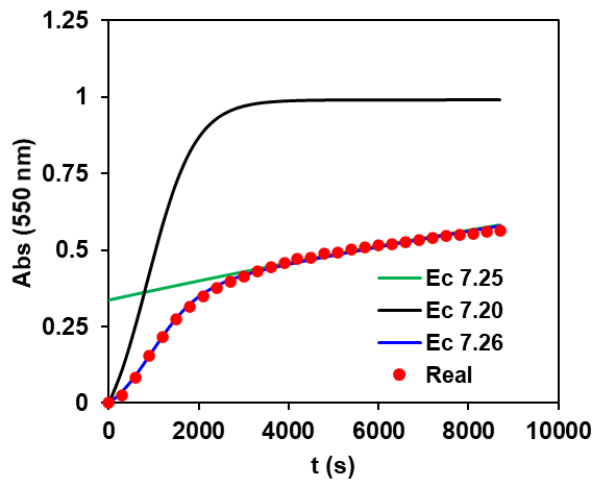


Figura 7.15: Representación de la ecuación correspondiente a las etapas de nucleación y crecimiento (7.20), la ecuación de Avrami (7.25) y la combinación de ambas (7.26); y comparación frente a las absorbancias reales obtenidas en la reacción. $[Au(III)] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[NADPH] = 1.60 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Para validar el modelo, se ajustaron los registros cinéticos obtenidos experimentalmente (Figura 7.16) para diferentes concentraciones de NADPH a la ecuación (7.26) y se calcularon las correspondientes constantes.

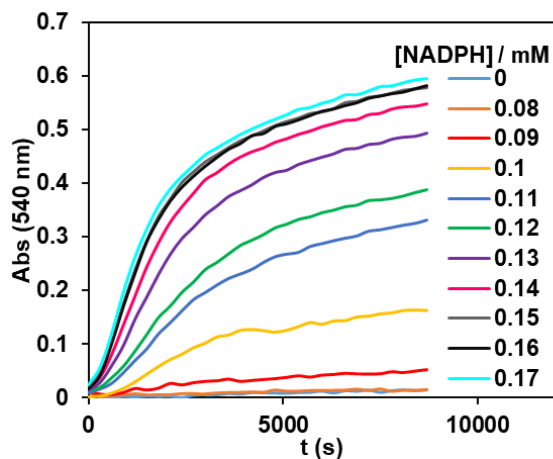


Figura 7.16: Perfil cinético obtenido para las AuNPs formadas a partir de diferentes concentraciones de NADPH. $[Au(III)] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 7$ ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} 0.1 \text{ M}$), $T^\circ = 25^\circ\text{C}$.

La Figura 7.17 muestra la representación de la absorción en función del tiempo correspondiente a los puntos de la curva de calibrado y la comparación con el ajuste teórico de estos puntos a la ecuación.

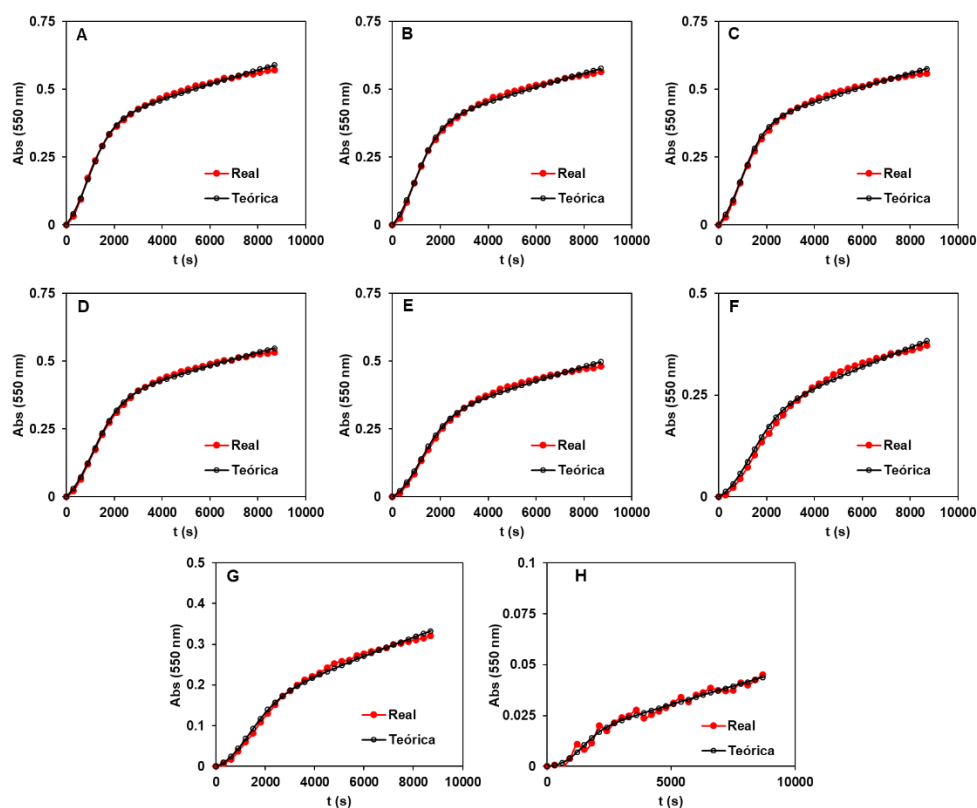


Figura 7.17: Comparación entre los perfiles cinéticos obtenidos experimentalmente y los teóricos (de acuerdo a la ecuación (7.26)) correspondientes a las concentraciones de NADPH empleadas en la Figura 7.16: **A)** $1.70 \cdot 10^{-4}$ M, **B)** $1.60 \cdot 10^{-4}$ M, **C)** $1.50 \cdot 10^{-4}$ M, **D)** $1.40 \cdot 10^{-4}$ M, **E)** $1.30 \cdot 10^{-4}$ M, **F)** $1.20 \cdot 10^{-4}$ M, **G)** $1.10 \cdot 10^{-4}$ M, **H)** $9.00 \cdot 10^{-5}$ M.

A partir de los ajustes de las representaciones cinéticas obtenidas para los puntos de la calibración (Figura 7.17) se obtuvieron los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 7.3. En comparación con los valores obtenidos anteriormente para la determinación de tiramina mediante generación in-situ de nanopartículas de oro, tanto k_1 como k_2 muestran valores mayores en esta nueva reacción, lo que quiere decir que tanto la etapa de nucleación como la de crecimiento son más rápidas y, por lo tanto, el método en general es más rápido.

Tabla 7.3: Valores obtenidos para los parámetros cinéticos asociados a la reacción de formación de AuNPs por reacción con NADPH.

$\epsilon_{\text{AuNP},n}$	$3700 \pm 200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
k_1	$15.5 \pm 6.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
k_2	$7.9 \cdot 10^4 \pm 2.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$
k_3	$3.84 \cdot 10^{-4} \pm 0.95 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

7.3.3 Desarrollo de un modelo para la formación de nanopartículas mixtas de Au(III)/Pt(II) y NADPH

Por otra parte, se estudió también el mecanismo de formación de nanopartículas de oro y platino durante su reacción. La Figura 7.18 muestra los perfiles cinéticos obtenidos experimentalmente para diferentes concentraciones de NADPH.

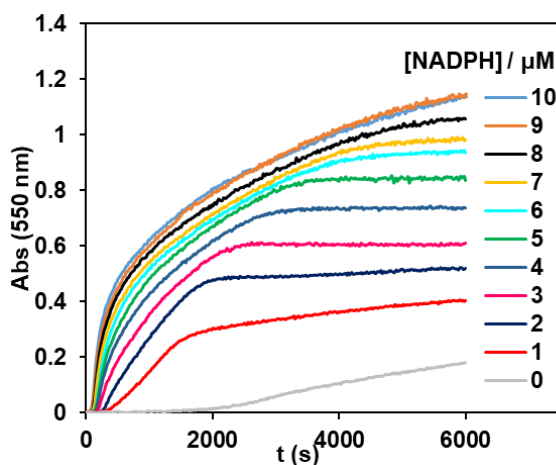


Figura 7.18: Registro cinético obtenido para diferentes concentraciones de NADPH en la reacción de formación de AuPtNPs. $[\text{Au(III)}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{Pt(II)}] = 4.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 7$ ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} 0.1 \text{ M}$), $T^a = 25^\circ\text{C}$.

En este caso, además de ser más rápidas que la formación de nanopartículas de oro, los perfiles cinéticos no muestran una forma sigmoide, lo que significa que las dos primeras etapas (nucleación y crecimiento) no pueden ser separadas (ambas etapas se incluyen en una constante mixta $k_{1/2}$). Por lo tanto, el mecanismo consiste únicamente de dos etapas: nucleación-crecimiento y

agregación. Este tipo de modelos se han descrito anteriormente en el grupo de investigación, y se ajustan a la siguiente ecuación:

$$Abs_t = \varepsilon_{AuNP,n} c_{NADPH} c_{Au} \left(\frac{e^{(c_{Au}-c_{NADPH})k_{1/2}t} - 1}{c_{Au} e^{(c_{Au}-c_{NADPH})k_{1/2}t} + c_{NADPH}} \right) (1 - e^{-k_3 t}) \quad (7.27)$$

Donde la etapa de nucleación-crecimiento viene dada por:

$$Abs_t = \varepsilon_{AuNP,n} c_{NADPH} c_{Au} \left(\frac{e^{(c_{Au}-c_{NADPH})k_{1/2}t} - 1}{c_{Au} e^{(c_{Au}-c_{NADPH})k_{1/2}t} + c_{NADPH}} \right) \quad (7.28)$$

Mientras que la etapa de agregación sigue estando definida por la ecuación de Avrami (7.25). La Figura 7.19 muestra la representación de ambas etapas por separado y de forma conjunta.

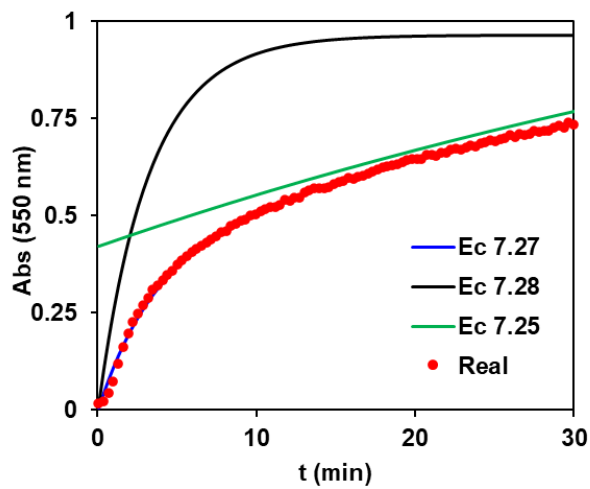


Figura 7.19: Registro cinético correspondiente a la combinación de las etapas de nucleación y crecimiento con la ecuación de Avrami (Ecuación (7.27)).

La Figura 7.20 muestra la representación de la absorbancia en función del tiempo correspondiente a los puntos de la curva de calibrado y la comparación con el ajuste teórico de estos puntos a la ecuación.

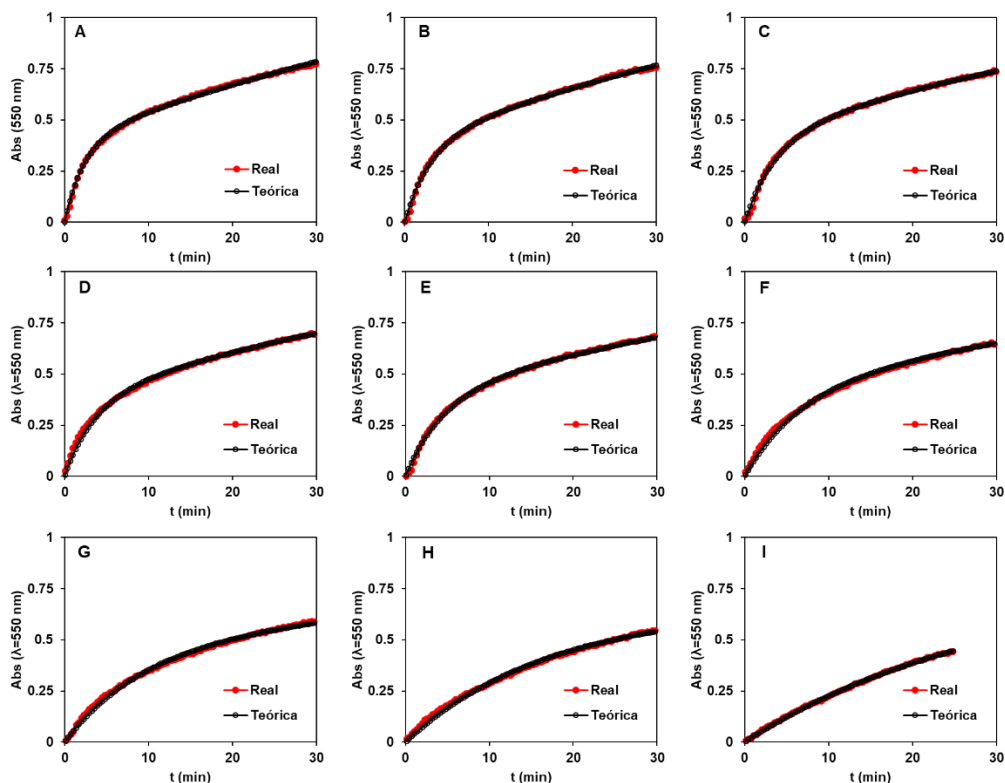


Figura 7.20: Comparación entre los perfiles cinéticos obtenidos experimentalmente y los teóricos (según la ecuación (7.27)) correspondientes a las concentraciones de NADPH empleadas en la Figura 5.19: **A)** $1.00 \cdot 10^{-5}$ M, **B)** $9.00 \cdot 10^{-6}$ M, **C)** $8.00 \cdot 10^{-6}$ M, **D)** $7.00 \cdot 10^{-6}$ M, **E)** $6.00 \cdot 10^{-6}$ M, **F)** $5.00 \cdot 10^{-6}$ M, **G)** $4.00 \cdot 10^{-6}$ M, **H)** $3.00 \cdot 10^{-6}$ M, **I)** $1.00 \cdot 10^{-6}$ M.

A partir de las representaciones cinéticas obtenidas de los puntos de la calibración se extraen los valores de los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 7.4. En este caso, ϵ presenta un valor más elevado, lo que puede asociarse a un incremento de la línea base. En cuanto a $k_{1/2}$, es complicado establecer una comparación con los resultados obtenidos en el apartado anterior ya que en este caso la constante agrupa tanto la etapa de nucleación como la de crecimiento.

Tabla 7.4: Valores obtenidos para los parámetros cinéticos asociados a la reacción de formación de AuPtNPs por reacción con NADPH.

$\epsilon_{\text{AuNP},n}$	$1.245 \cdot 10^5 \pm 0.042 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$k_{1/2}$	$51 \pm 20 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$
k_3	$2.58 \cdot 10^{-4} \pm 0.46 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$

7.4 Diferencias entre NADH y NADPH

Es conocido que el cofactor de las enzimas deshidrogenasas puede ser tanto NADP como NAD o sus correspondientes formas reducidas NADPH y NADH, dependiendo del sentido en el que se aplique una reacción o de la reacción en concreto. Muchas reacciones enzimáticas pueden emplear ambos, mientras que otras requieren el uso específico de uno de ellos. Por ejemplo, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa prefiere NADP por encima de NAD [7.28, 7.29]. Además, estos dos compuestos presentan diferentes aplicaciones de señalización en el organismo. Es por lo tanto interesante ser capaz de distinguir entre ambos dos. Sin embargo, las técnicas analíticas más habituales que emplean este tipo de reacciones como la absorción molecular UV-visible o la fluorescencia no permiten diferenciar entre las dos formas. Por una parte, NAD y NADP presentan espectros de absorción prácticamente iguales y solo en la zona del UV; por otra parte, sus formas reducidas NADH y NADPH, si bien tienen mejores propiedades espectroscópicas que las oxidadas, son también muy similares entre sí e indistinguibles.

La generación in situ de nanomateriales de Au o de Au/Pt si puede aportar una herramienta para su diferenciación. Para comprobar esto, se investigó la generación de nanopartículas de oro o de oro y platino a partir de ambos cofactores. Lo que se pudo ver fue que el Au(III) reacciona de forma diferente frente a estos dos compuestos, ya que el NADH prácticamente no forma nanopartículas de oro, mientras que el NADPH sí. Sin embargo, cuando se emplean Au(III) y Pt(II) de manera conjunta en la reacción, ambos compuestos presentan la misma señal.

Estos resultados (Figura 7.21) muestran que estas reacciones pueden ser empleadas tanto para la determinación conjunta de NADH y NADPH como para la diferenciación de las dos moléculas. Para la determinación conjunta, se calculará la concentración total de NAD(P)H empleando la reacción en presencia de platino, ya que ambos analitos cuentan con la misma sensibilidad dentro del rango lineal. Más adelante, la concentración de NADPH se determinará empleando la reacción sin platino, donde el NADH no produce ningún tipo de reacción en este caso.

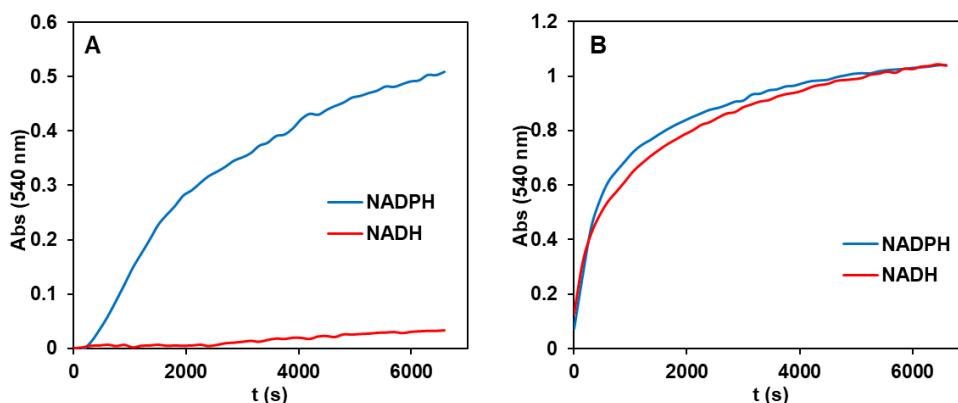


Figura 7.21: Comparación de las cinéticas de reacción obtenidas para el NADPH y el NADH ($1.5 \cdot 10^{-4}$ M de ambos compuestos en A), $1.5 \cdot 10^{-5}$ M de ambos en B)). **A)** $[\text{Au(III)}] = 1.00 \cdot 10^{-4}$ M, $\text{pH} = 7$ ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ\text{C}$; **B)** $[\text{Au(III)}] = 1.00 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{Pt(II)}] = 4.00 \cdot 10^{-4}$ M, $\text{pH} = 7$ ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ\text{C}$.

Para explicar el comportamiento con Au(III) es importante tener en cuenta, en primer lugar, que el NAD y el NADP (y sus formas reducidas) puede aportar diferentes estructuras conformacionales, a saber, plegadas (las más estables en disolución) o extendidas (las más estables cuando se unen a enzimas) (Figura 7.22) [7.30, 7.31] y, dependiendo de ello, puede cambiar la capacidad de unirse a los iones metálicos.

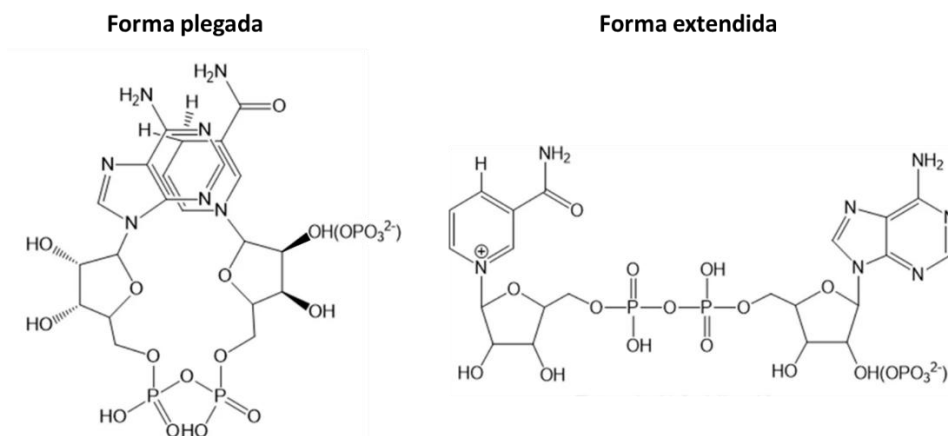


Figura 7.22: Formas plegada y extendida del NAD y del NADP. La del NADP se corresponde con el radical puesto entre paréntesis.

Los estudios publicados han demostrado que, aunque existen seis posibles sitios de unión para la coordinación de iones metálicos a estos dinucleótidos, los grupos fosfato y ribosa son los preferidos. Sin embargo, los resultados finales aportados por diferentes investigadores no coinciden completamente en cuál de los sitios es más probable.

Para el NAD, los estudios llevados a cabo por Hoffman [7.30] con Cu(II) mostraron que el complejo responde a una estequiometría 2:1 NAD:Cu(II), con el Cu(II) coordinándose a la ribosa del grupo adenosina de cada NAD (Figura 7.23 A). Sin embargo, Herrero [7.32] sugiere la coordinación a través del grupo fosfato de la adenosina.

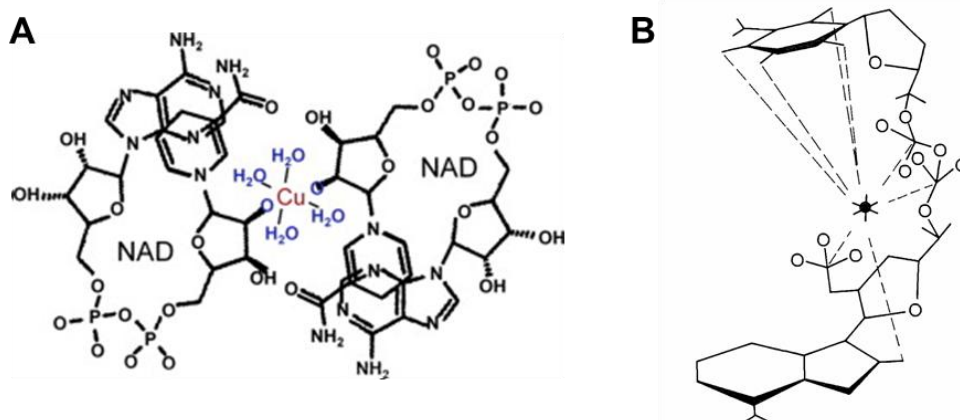


Figura 7.23: Estructuras de los complejos: **A)** Cu(II) con NAD, y **B)** Mn(II) con NADP (el Mn(II) viene representado por la estrella negra interior).

Para el NADP, los resultados obtenidos por Green [7.33] con Mn(II) y Mondelli [7.34] con Mg(II) y Cr(III) indican que el ion metálico está unido a los tres fosfatos (Figura 7.23 B).

Estudios recientes de Kruszynski [7.35] con NADPH y LiCoO₂ confirman este hecho y muestran que la unión a la fracción fosfato-ribosa es esencial para la reducción del ion metálico. Se puede pensar que al trabajar en disolución amortiguadora de fosfatos todas estas diferencias que van asociadas al grupo fosfato del NADP quedarían, de alguna forma, enmascaradas; sin embargo, este mismo autor [7.35] ha demostrado que el fosfato añadido externamente no solo actúa igual que el del dinucleótido, sino que inhibe la interacción de la ribosa con el ion metálico. Por lo tanto, se puede concluir que el diferente comportamiento

de NAD y NADP con Au(III) se debe a la diferente forma en la que el ion metálico coordina el dinucleótido.

En cuanto al sistema Au(III)/Pt(II), se ha indicado ya que el Pt(II) es capaz de reducir el Au(III) a Au(I), por lo que los complejos se forman sobre esta especie. No hay muchos estudios sobre iones metálicos monovalentes. Los publicados para Li(I) con NAD (por cristalografía de rayos X) [7.36] muestran que se uno a dos moléculas de NAD. Si Au(I) sigue este comportamiento, se debería formar la misma unión tanto si se trata de una molécula de NADH como de NADPH y no se deberían observar diferencias entre ellas.

Si bien esto explica los resultados obtenidos, son unos resultados preliminares, siendo necesaria la realización de más estudios para el desarrollo de una metodología que permita diferenciar ambos compuestos.

7.5 Empleo de cofactores de nicotinamida sintéticos para la formación de NPs metálicas

7.5.1 Problemática

La Figura 7.7 muestra el rango de respuesta obtenido cuando se emplea la reacción entre Au(III) y NADPH. Como se ha comentado, este rango corto, es del mismo orden que han obtenido otros investigadores usando semillas de nanopartículas, luego no va asociado a la metodología concreta desarrollada en esta Tesis sino al propio sistema. Este problema se acrecienta cuando se utiliza como método indicador de reacciones enzimáticas. Se ha visto que anteriormente que los iones metálicos son capaces de formar complejos con el NAD y NADP, así como con sus correspondientes formas reducidas. Aunque estos complejos permiten diferenciar NADPH y NADH pueden ser los causantes del problema del bajo rango lineal. De hecho, la bibliografía indica la gran capacidad del Au(III) para formar complejos robustos con NAD(P)/NAD(P)H (a través del fragmento de adenina [7.37]). Para solucionar este problema, se desarrollaron diferentes tipos de estrategias para reducir esa capacidad complejante sobre el Au(III).

Por un lado, se estudió la adición de diferentes tipos de iones metálicos (Ni(II), Zn(II) y otros) que compitieran con el Au(III) para saturar esas posiciones de coordinación del dinucleótido, sin éxito. Por otro lado, se trató de enmascarar la adenina de la molécula de NAD por medio de la unión a esta de una molécula de timina o uracilo, de modo que, como en el ADN o el ARN, se formaran pares adenina-timina o adenina-uracilo por puentes de hidrógeno, que impidieran la formación de un posterior complejo con Au(III). Tras realizar estudios variando las concentraciones de estos dos compuestos, los tiempos de espera y la temperatura, se observó que, en lugar de mejorar, la reacción empeoraba. Esto podía ser debido a que el oro ya no solo formara complejos con la adenina, sino también con la timina y el uracilo.

7.5.2 Empleo de cofactores de nicotinamida sintéticos para la formación de NPs metálicas

En un intento de superar esta limitación, se realizaron unos primeros estudios con cofactores sintéticos de nicotinamida como BNAH (1-benzil-1,4-dihidronicotinamida, Figura 7.24) y AmNAH, que pueden actuar como imitadores de NAD(P)H, pero que carecen del grupo adenina. Estas moléculas han sido sintetizadas y propuestas por el grupo de investigación de la Dra. Paul de la Universidad de Delft (Países Bajos) [7.38–7.40], que nos proporcionó muestras para poder hacer ensayos. El objetivo es obtener condiciones experimentales que permitan a estos imitadores actuar como NAD(P)H en la reacción con Au(III) o con mezclas de Au(III) y Pt(II).

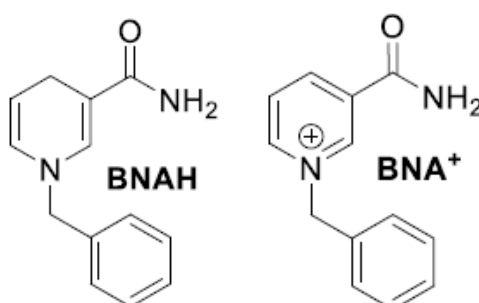


Figura 7.24: Moléculas de BNAH y de su forma oxidada BNA⁺.

En primer lugar, se investigó la reacción directa entre Au(III) y mezclas de Au(III) y Pt(II) con los cofactores sintéticos. Con el cofactor BNAH se obtuvieron buenos resultados, mientras que con el AmNAH solamente se observó un precipitado

gris muy tenue en la reacción con Au(III) y Pt(II). De este modo, se continuó optimizando únicamente la reacción con BNAH.

7.5.2.1 Optimización

Como punto de partida, empleando las condiciones experimentales optimizadas en la reacción con NADPH (pH 7, disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M, $[\text{Au(III)}] = 1.00 \cdot 10^{-4}$ M y $[\text{BNAH}] = 1.50 \cdot 10^{-4}$ M), se hizo reaccionar BNAH con Au(III) observándose la aparición de nanopartículas de color azul (con un máximo de absorción a 600 nm), que se formaban muy rápidamente, pero que precipitaban con el tiempo (Figura 7.25). Esto se debe a la ausencia de la parte de la adenina en este cofactor que, al formar el complejo con el oro, actuaba simultáneamente como estabilizante en la formación de las nanopartículas.

Para conseguir evitar el problema, se añadió a la disolución seroalbúmina bovina (BSA) antes de la reacción, de forma que esta proteína actuara como agente estabilizante. En esta nueva reacción, las nanopartículas se mantenían estables en disolución, como puede observarse en la Figura 7.25.

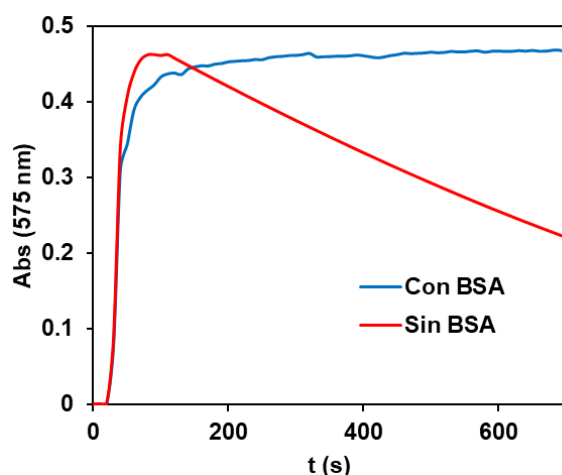


Figura 7.25: Comparación del perfil cinético obtenido en la formación de AuPtNPs con BNAH en presencia y ausencia de BSA. $[\text{Au(III)}] = 5.00 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{Pt(II)}] = 2.00 \cdot 10^{-3}$ M, pH=7 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ\text{C}$, $[\text{BSA}] = 0.5$ mg/mL.

No obstante, al realizar un estudio de calibración se observó que la variación de la concentración de BNAH no suponía un cambio en la formación de AuNPs, haciendo que esta reacción no fuera cuantitativa y, por tanto, que no se pudiera emplear con fines analíticos.

Se han desarrollado anteriormente en este capítulo las posibilidades analíticas que ofrece el empleo conjunto de Au(III) y Pt(II) para la generación de nanopartículas al reaccionar con el NADPH. Al realizar este mismo ensayo con el mimético BNAH se obtuvieron resultados positivos, lo que permitió establecer unas condiciones de partida para desarrollar el procedimiento. De este modo, se hizo una optimización de la concentración de BSA en disolución, obteniendo los resultados de la Figura 7.26; y posteriormente una optimización de la concentración de Pt(II) cuyos resultados se muestran en la Figura 7.27.

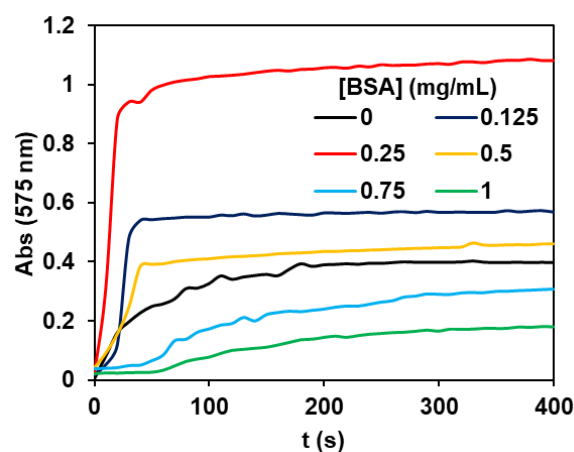


Figura 7.26: Optimización de la concentración de BSA en la reacción de formación de nanopartículas con BNAH. $[Au(III)] = 5.00 \cdot 10^{-4}$ M. $[Pt(II)] = 2.00 \cdot 10^{-3}$ M. $[BNAH] = 3.00 \cdot 10^{-4}$ M.

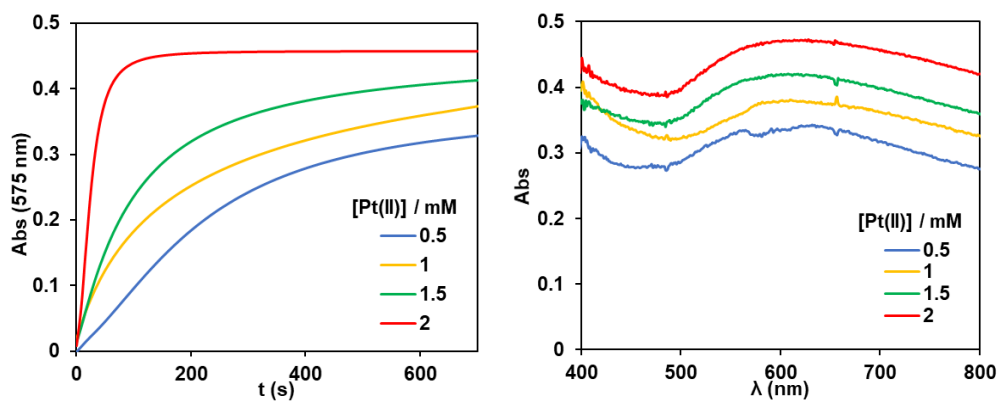


Figura 7.27: Optimización de la concentración de platino en la reacción de formación de AuPtNPs. **A)** Registro cinético a 575 nm. **B)** Espectros finales. $[Au(III)] = 5.00 \cdot 10^{-4}$ M. $[BNAH] = 1.50 \cdot 10^{-4}$ M.

Estos resultados muestran un gran aumento de la reacción al emplear una concentración de BSA de 0.25 mg/mL con respecto al resto de concentraciones, además de una formación más rápida de las AuPtNPs al emplear una concentración de Pt(II) de $2.00 \cdot 10^{-3}$ M. Por otra parte, atendiendo a los espectros finales de las AuPtNPs, esta concentración de platino aumenta la línea base con respecto a las demás. No obstante, este incremento no impidió que pudiera desarrollarse adecuadamente el método analítico.

7.5.2.2 Caracterización físico-química

Al analizar las NPs obtenidas (Figura 7.28) se observa en las imágenes del TEM una fuerte agregación en comparación con las AuNPs de NADPH, similar a la obtenida en las AuPtNPs de NADPH, lo que impide la determinación de su tamaño y de su forma, pero explica el aumento de la línea base de su espectro de absorción (Figura 7.27 B).

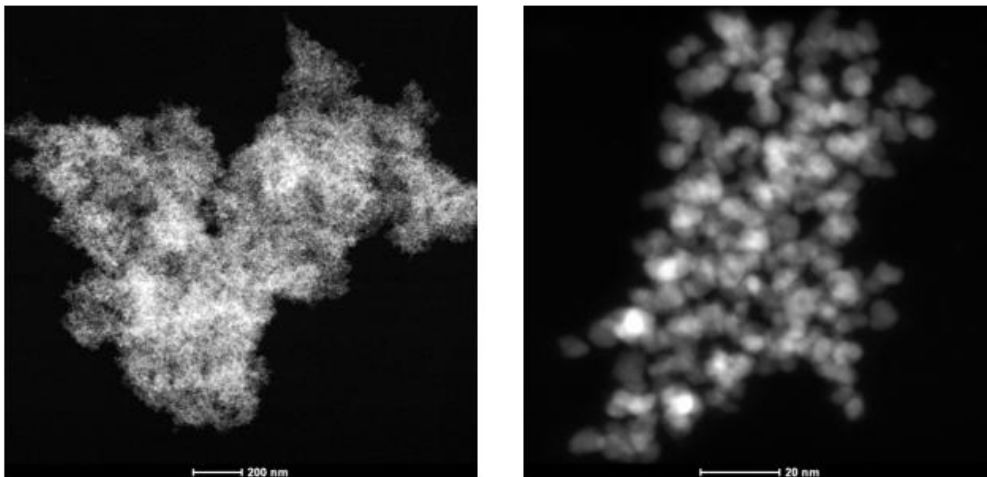


Figura 7.28: Imágenes del TEM obtenidas en la medida de las AuPtNPs formadas por reacción con BNAH.

7.5.2.3 Características analíticas

Con las condiciones optimizadas del apartado anterior se hizo un estudio de calibración cuyos resultados se muestran en la Figura 7.29.

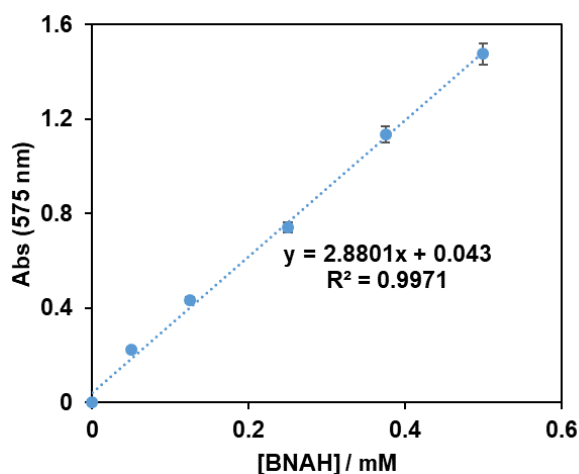


Figura 7.29: Recta de calibrado obtenida en la formación de AuPtNPs por reacción con BNAH.

Al comparar esta recta con los resultados obtenidos empleando NADPH, se observa que hay una mejora tanto en la sensibilidad como en el rango lineal (Tabla 7.5). Además, se obtienen unos LD y LQ que, si bien es cierto que son parámetros peores que en la calibración de Au(III) y Pt(II) con NADPH, siguen siendo unos buenos resultados. Estas características analíticas hacen del BNAH una alternativa prometedora en el desarrollo de nanobiosensores.

Tabla 7.5: Características analíticas obtenidas en el método basado en la formación de AuPtNPs por reacción con BNAH.

LD	$1.53 \cdot 10^{-6}$ M
LC	$5.11 \cdot 10^{-6}$ M
Rango lineal	$5.11 \cdot 10^{-6} - 5.00 \cdot 10^{-4}$ M
DER ($3.00 \cdot 10^{-4}$ M BNAH, n=5)	3.26%

Los estudios realizados por la Dra. Paul han demostrado que los miméticos del NADPH se pueden utilizar como coenzimas solo con algunas deshidrogenasas, siendo particularmente útiles con la familia de las eno-reductasas [7.40]. Sin embargo, al intentar sustituir el cofactor NAD por BNA^+ en la reacción de oxidación de la tropina, se encontró que este no actuaba como cofactor de la enzima tropinona reductasa, por lo que no se pudo implementar en el desarrollo

de un método enzimático para esta Tesis. No obstante, su uso queda abierto para futuras investigaciones.

7.6 Conclusiones

En este capítulo se ha demostrado que la formación de nanoestructuras de oro y de oro-platino por reacción con NADPH es factible y no requiere el empleo de semillas de nanopartículas. Este método es una gran alternativa debido a sus posibilidades de ser acoplado a la determinación de analitos que intervengan en una reacción mediada por una enzima deshidrogenasa, ya que evita el uso de reacciones indicadoras en las que intervengan colorantes químicos y enzimas peroxidadas.

A pesar de obtenerse una sensibilidad razonablemente buena, es ligeramente inferior a la de los sistemas colorante-peroxidasa, y es necesario introducir mejoras, que probablemente impliquen la generación in situ de otro tipo de nanomateriales.

Además, la generación de AuNPs y AuPtNPs a partir de Au(III) y Au(III)/Pt(II), respectivamente, permite diferenciar entre NADH y NADPH, abriendo nuevas oportunidades para determinaciones enzimáticas simultáneas o estudios selectivos de estos dos dinucleótidos.

En cuanto a los inconvenientes de esta técnica, como su limitado rango lineal, se ha demostrado que se pueden mejorar mediante el empleo de otras nicotinamidas, que eviten la formación de complejos con Au(III). No obstante, se requiere profundizar en este estudio y es necesario encontrar una nicotinamida que actúe como cofactor de enzimas deshidrogenasas como lo hace el NAD(P)H.

7.7 Bibliografía

- 7.1. López-Lorente ÁI, Valcárcel M (2016) The third way in analytical nanoscience and nanotechnology: Involvement of nanotools and nanoanalytes in the same analytical process. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 75:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.011>

- 7.2. Azzouz A, Kailasa SK, Lee SS, J. Rascón A, Ballesteros E, Zhang M, Kim KH (2018) Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 108:347–369. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.009>
- 7.3. Singh S (2019) Nanomaterials exhibiting enzyme-like properties (Nanozymes): Current advances and future perspectives. *Front Chem* 7:46. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00046>
- 7.4. Zhang Q, Zheng S, Zhang J, Li W, Fu Y (2021) Peroxidase Mimicking Activity of Palladium Nanocluster Altered by Heparin. *Catal Letters* 151:2537–2546. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03530-x>
- 7.5. Bera RK, Das AK, Raj CR (2010) Enzyme-cofactor-assisted photochemical synthesis of Ag nanostructures and shape-dependent optical sensing of Hg(II) ions. *Chemistry of Materials* 22:4505–4511. <https://doi.org/10.1021/cm1013762>
- 7.6. Das AK, Retna Raj C (2013) Shape and surface structure-dependent electrocatalytic activity of Au nanoparticles. *Electrochim Acta* 107:592–598. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.06.057>
- 7.7. Fang C, Dharmarajan R, Megharaj M, Naidu R (2017) Gold nanoparticle-based optical sensors for selected anionic contaminants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 86:143–154. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.10.008>
- 7.8. Liu G, Lu M, Huang X, Li T, Xu D (2018) Application of gold-nanoparticle colorimetric sensing to rapid food safety screening. *Sensors* 18:4166. <https://doi.org/10.3390/s18124166>
- 7.9. Camacho-Aguayo J, de Marcos S, Felices C, Galbán J (2023) In situ enzymatic generation of Au/Pt nanoparticles as an analytical photometric system: proof of concept determination of tyramine. *Microchimica Acta* 190:. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05698-y>
- 7.10. Camacho-Aguayo J, de Marcos S, Pericás M, Galbán J (2023) Enzymatically mediated fluorescent copper nanocluster generation for

- tyramine determination. *Anal Bioanal Chem* 415:2037–2044.
<https://doi.org/10.1007/s00216-023-04571-4>
- 7.11. Willner I, Baron R, Willner B (2006) Growing metal nanoparticles by enzymes. *Advanced Materials* 18:1109–1120.
<https://doi.org/10.1002/adma.200501865>
- 7.12. Wong CH, Whitesides GM (1981) Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration by using glucose-6-phosphate and the glucose-5-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of the American Chemical Society* 103:4890–4899.
<https://doi.org/10.1021/ja00406a037>
- 7.13. Alivisatos SG, Ungar F, Abraham G (1964) Non-enzymatic interactions of reduced coenzyme I with inorganic phosphate and certain other anions. *Nature* 203:973–975. <https://doi.org/10.1038/203973a0>
- 7.14. Wu JT, Wu LH, Knight JA (1986) Stability of NADPH: Effect of Various Factors on the Kinetics of Degradation. *Clinical Chemistry* 32:314–319.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/32.2.314>
- 7.15. Xiao Y, Pavlov V, Levine S, Niazov T, Markovitch G, Willner I (2004) Catalytic Growth of Au Nanoparticles by NAD(P)H Cofactors: Optical Sensors for NAD(P) + -Dependent Biocatalyzed Transformations. *Angewandte Chemie* 116:4619–4622.
<https://doi.org/10.1002/ange.200460608>
- 7.16. Maye MM, Han L, Kariuki NN, Ly NK, Chan W Ben, Luo J, Zhong CJ (2003) Gold and alloy nanoparticles in solution and thin film assembly: Spectrophotometric determination of molar absorptivity. *Anal Chim Acta* 496:17–27. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00986-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00986-3)
- 7.17. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Reference pages: <https://www.xpsfitting.com/search/label/Platinum>. (Último acceso Febrero 2025)
- 7.18. 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>
- 7.19. Thanh NTK, 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>
- 7.20. Burbelko AA, Fraś E, Kapturkiewicz W (2005) About Kolmogorov’s statistical theory of phase transformation. *Materials Science and Engineering: A* 413–414:429–434. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2005.08.161>
- 7.21. Johnson WA, Mehl RF (1940) Reaction kinetics in processes of nucleation and growth. *Trans Am Inst Min Met Eng* 135:416–442
- 7.22. Avrami M (1941) Granulation, phase change, and microstructure kinetics of phase change. III. *J Chem Phys* 9:177–184. <https://doi.org/10.1063/1.1750872>
- 7.23. 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. *Chemistry of Materials* 22:3212–3225. <https://doi.org/10.1021/cm100458b>
- 7.24. 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>
- 7.25. Zhou Y, Wang H, Lin W, Lin L, Gao Y, Yang F, Du M, Fang W, Huang J, Sun D, Li Q (2013) Quantitative nucleation and growth kinetics of gold nanoparticles via model-assisted dynamic spectroscopic approach. *J Colloid Interface Sci* 407:8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.06.027>
- 7.26. Brazeau AL, Jones ND (2009) Growth mechanisms in nanocrystalline lead sulfide by stopped-flow kinetic analysis. *Journal of Physical Chemistry C* 113:20246–20251. <https://doi.org/10.1021/jp907270x>

- 7.27. Huang F, Zhang H, Banfield JF (2003) Two-Stage Crystal-Growth Kinetics Observed during Hydrothermal Coarsening of Nanocrystalline ZnS. *Nano letters* 3:373–378. <https://doi.org/10.1021/nl025836>
- 7.28. Perozich J, Kuo I, Wang BC, Boesch JS, Lindahl R, Hempel J (2000) Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *Eur J Biochem* 267:6197–6203. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01697.x>
- 7.29. Dehydrogenase G-S, Levy HR, Daouk GH (1979) Simultaneous Analysis of NAD- and NADP-linked Activities of Dual Nucleotide-specific Dehydrogenases. Application to *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 254:4843–4847. [https://doi.org/10.1016/S00021-9258\(17\)30089-3](https://doi.org/10.1016/S00021-9258(17)30089-3)
- 7.30. Hoffman SK, Goslar J, Lijewski S, Basinski K, Gasowska A, Lomozik L (2012) EPR and potentiometric studies of copper (II) binding to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in water solution. *J Inorg Biochem* 111:18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.02.028>
- 7.31. Seo PW, Kim GJ, Kim JS (2024) A short guide on blue fluorescent proteins: limits and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 108:208. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13012-w>
- 7.32. Herrero LA, Cerro-Garrido JC, Apella MC, Terrón-Homar A (2002) Interactions in solution of cobalt (II) and nickel (II) with nicotinamide adenine nucleotide: A potentiometric and calorimetric study. *J Biol Inorg Chem* 7:313–317. <https://doi.org/10.1007/s00775-001-0300-8>
- 7.33. Green MK, Kotowycz G (1979) The nature of the NADP complex with manganese(II) ions as studied by proton and phosphorus magnetic resonance. *Can J Chem* 57:2434–2443. <https://doi.org/10.1139/v79-389>
- 7.34. Mazzini S, Mondelli R, Ragg E, Scaglioni L (1995) Interaction between metal ions and NAD(P) coenzymes. ¹H, ³¹P, ¹³C and ⁵⁹Co NMR spectroscopy and conformational analysis. *J Chem Soc Perkin Trans* 2:285–294. <https://doi.org/10.1039/P29950000285>

- 7.35. Earl CEK, Henke AH, Laudadio ED, Hamers RJ (2024) Understanding the reaction mechanisms of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) with lithium cobalt oxide and other metal oxide nanomaterials. *Environ Sci Nano* 11:518–528. <https://doi.org/10.1039/D3EN00351E>
- 7.36. Saenger W, Reddy BS, Muhlegger K, Weimann G (1977) X-ray study of the lithium complex of NAD⁺. *Nature* 267:225–229. <https://doi.org/10.1038/267225a0>
- 7.37. Gibson DW, Beer M, Barnett RJ (1971) Gold (III) complexes of adenine nucleotides. *Biochemistry* 10:3669–3679. <https://doi.org/10.1021/bi00796a006>
- 7.38. Paul CE, Hollmann F (2016) A survey of synthetic nicotinamide cofactors in enzymatic processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:4773–4778. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7500-1>
- 7.39. Paul CE, Gargiulo S, Opperman DJ, Lavandera I, Gotor-Fernández V, Hollmann F (2013) Mimicking Nature: Synthetic Nicotinamide cofactors for C=C Bioreduction Using Enoate Reductases. *Organic letters* 15:180–183. <https://doi.org/10.1021/ol303240a>
- 7.40. Knaus T, Paul CE, Levy CW, De Vries S, Mutti FG, Hollmann F, Scrutton NS (2016) Better than nature: nicotinamide biomimetics than outperform natural coenzymes. *J Am Chem Soc* 138:1033–1039. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b12252>

Capítulo 8:

**Determinación enzimática de
atropina por generación in-situ de
nanomateriales**

8.1 Introducción

La reacción optimizada en el capítulo anterior ofrece grandes posibilidades analíticas, como son la versatilidad, ya que puede emplearse como reacción indicadora en el análisis de cualquier analito que participe en una reacción mediada por una enzima deshidrogenasa; y la capacidad de generar nanopartículas in situ sin la necesidad de emplear semillas. Además, esta reacción evita el empleo de reacciones indicadoras que involucren colorantes y enzima peroxidasa, eliminando posibles reacciones laterales.

A lo largo de este capítulo, se ha acoplado la reacción de formación de nanopartículas por reacción con NAD(P)H a la oxidación de la tropina por medio de la enzima tropinona reductasa, siguiendo el esquema de reacciones de la Figura 8.1, y se probó la metodología sobre muestras alimenticias para demostrar su validez. Por último, se inmovilizó el sistema sobre muestras de celulosa para el desarrollo de un sensor enzimático.

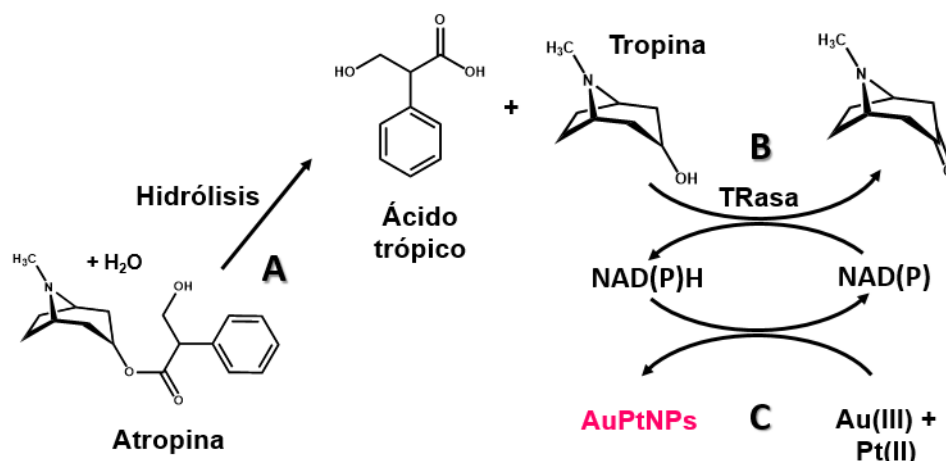


Figura 8.1: Esquema de reacciones en la degradación enzimática de la atropina. **A)** Desesterificación de la atropina por medio de una reacción de hidrólisis con NaOH. **B)** Oxidación de la tropina empleando la enzima tropinona reductasa y NAD como cofactor. **C)** Reducción del Au(III) por medio del NADH generado en la reacción B.

8.2 Acoplamiento de la reacción de formación de nanopartículas a la determinación de atropina

8.2.1 Optimización de la reacción

Como se ha mencionado en el apartado 8.1, el objetivo de la reacción optimizada en el capítulo anterior es poder acoplarla a una reacción dependiente de una enzima deshidrogenasa, en este caso, la mediada por la TRasa. Durante la preparación de la muestra, la atropina ya ha sido hidrolizada a tropina, por lo que el análisis se hará realmente sobre tropina, evitando la etapa anterior. Las condiciones óptimas para la oxidación de la tropina por medio de la reacción (8.1) son las optimizadas en el Capítulo 4 (pH =10 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M y 0.022 mg/mL de TRasa), tras comprobar que la reacción funciona indistintamente con NAD y NADP.



Por otra parte, las condiciones óptimas en la reacción de formación de nanopartículas se dan empleando disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1M de pH 7. Esto supone un problema a la hora de acoplar ambas reacciones ya que ninguna de las dos es capaz de funcionar al pH óptimo de la otra. De este modo, es necesario estudiar en primer lugar si existe un pH intermedio al cual funcionen ambas reacciones de forma conjunta.

Además, el exceso de NAD(P) que favorece la reacción de la tropina con la tropinona reductasa, impide la reacción posterior de formación de nanomateriales por dos motivos. En primer lugar, la formación de complejos del Au(III) con el cofactor NAD(P)H por interacción con la adenina (explicada en el capítulo anterior) también tiene lugar con la forma oxidada del cofactor. Esto supone que cada átomo de Au(III) complejado con una molécula de NAD(P) en exceso se encontrará más impedido para participar en la reacción en la reacción de formación de nanopartículas. El segundo motivo es meramente termodinámico: un exceso de producto (NAD(P)) de la segunda reacción desplazará el equilibrio dando como resultado una menor formación de nanopartículas.

Para solucionar estos problemas, se redujo la concentración de NADP empleada como óptima en el Capítulo 4 y se probaron ambas reacciones de forma conjunta a pHs 8, 8.5 y 9. Los resultados obtenidos no fueron buenos, por lo que se diseñó una metodología (apartado 3.5.2) que permitía llevar a cabo la reacción de oxidación de tropina en primer lugar a pH 10 para, una vez completada, llevar la disolución de medida a pH 7 y añadir el ion precursor correspondiente para la formación de nanopartículas.

Empleando esta nueva metodología se observó que la reacción solamente con Au(III) no tenía lugar, mientras que si se hacía reaccionar con Au(III) y Pt(II), se observaba la formación de nanopartículas.

En el Capítulo 7 se ha observado que si bien la reacción entre Au(III) y NADPH, o Au(III), Pt(II) y NADPH tiene lugar empleando diferentes concentraciones de iones metálicos, existen ciertas proporciones entre los reactivos que aportan una mayor sensibilidad al método. Es por ello que, manteniendo constante la relación entre la concentración de Au(III) y la de Pt(II) (1:4, como la optimizada en el Capítulo 7), se optimizó la concentración de ambos iones metálicos frente al resto de reactivos participantes en las dos reacciones acopladas. Las concentraciones de Au(III) empleadas en este estudio fueron $1.00 \cdot 10^{-4}$, $2.00 \cdot 10^{-4}$, $3.00 \cdot 10^{-4}$, $4.00 \cdot 10^{-4}$ y $5.00 \cdot 10^{-4}$ M, escogiendo finalmente como concentración óptima $3.00 \cdot 10^{-4}$ M de Au(III) (y respectivamente $1.20 \cdot 10^{-3}$ M de Pt(II)). Esta concentración fue elegida ya que, como se observa en la Figura 8.2 A, a pesar de obtenerse una mayor señal empleando concentraciones superiores de Au(III) y Pt(II), la línea base del espectro se eleva mucho, aumentando la turbidez de la disolución y disminuyendo, en realidad, la sensibilidad a la hora de determinar diferentes concentraciones de tropina. Por su parte, la Figura 8.2 B muestra los registros cinéticos obtenidos en esta optimización midiendo en el máximo de absorción a 550 nm.

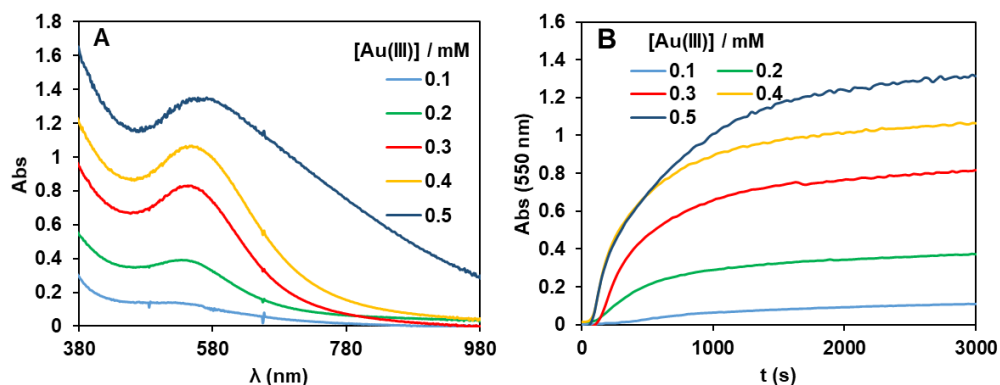


Figura 8.2: Efecto de la concentración de oro y platino sobre la reacción. En todos los casos la relación $[\text{Au(III)}]:[\text{Pt(II)}]$ es 1:4. **A)** Espectros finales. **B)** Registros cinéticos obtenidos a 540 nm. $[\text{Tropina}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{TRasa}] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $[\text{NADP}] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $T^{\text{a}} = 25^{\circ}\text{C}$.

8.2.2 Reacción con diferentes concentraciones de atropina

Tras haber conseguido optimizar el funcionamiento de ambas reacciones de forma conjunta, se trató de elaborar una curva de calibrado que permitiera diferenciar distintas concentraciones de tropina. Al hacer esto, se observó que el máximo de absorción obtenido en la formación de las nanopartículas tiende a ser el mismo independiente de la concentración de tropina empleada, formándose siempre la misma cantidad de nanopartículas. Esto se puede observar en la Figura 8.3, que recoge los registros cinéticos obtenidos para cada una de las concentraciones de tropina empleadas en este estudio.

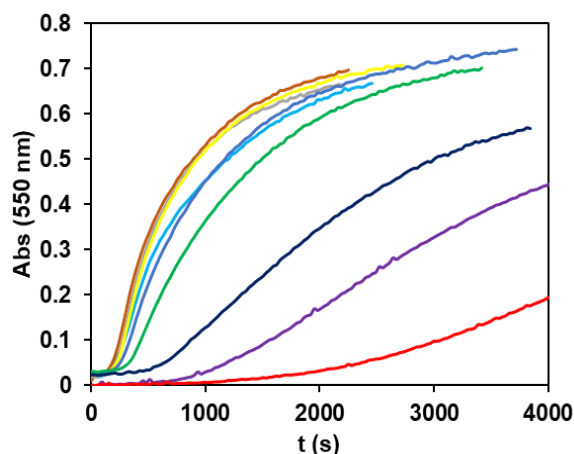


Figura 8.3: Registros cinéticos obtenidos para la medida de concentraciones de tropina de $2.00 \cdot 10^{-5}$ a $1.00 \cdot 10^{-4}$ M.

No obstante, desde el punto de vista analítico, existe una diferencia importante en la naturaleza de los perfiles cinéticos obtenidos. Como se puede ver en la Figura 8.3, las cinéticas de generación de las AuPtNPs dependen de la concentración de tropina, a pesar de que todos los perfiles tiendan al mismo valor final. En este caso, el parámetro analítico que se puede relacionar con la concentración de tropina puede ser o la absorbancia alcanzada a un tiempo de reacción concreto o el área debajo del perfil cinético a un tiempo elegido. Ambos parámetros dan buenos resultados; no obstante, se obtiene una mejor precisión empleando el área.

La Figura 8.4 muestra el área integrada de los perfiles cinéticos obtenidos a 540 nm para cada concentración de tropina entre 0 y 2000 segundos de reacción.

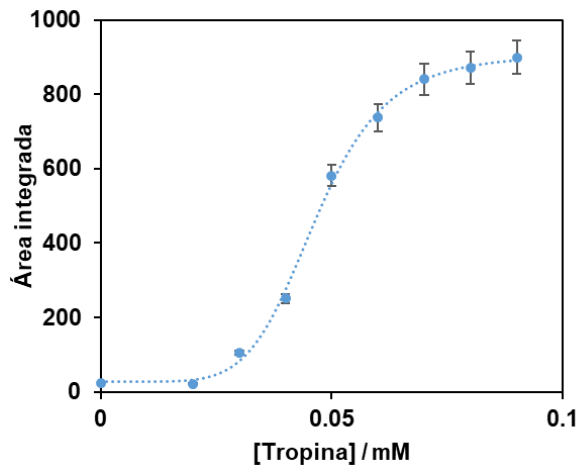


Figura 8.4: Curva de calibrado obtenida para la determinación de tropina empleando el área integrada bajo la curva del registro cinético. $[Au(III)] = 4.00 \cdot 10^{-4} M$, $[Pt(II)] = 1.60 \cdot 10^{-3} M$, $[NADP] = 1.00 \cdot 10^{-4} M$, $[Tropinona Reductasa] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $T^a = 25^{\circ}C$.

Como se puede observar, se obtiene una curva sigmoideal, similar a la observada en el Capítulo 7 (8.2) en la cual, tras aplicarle la transformación dada por la ecuación (8.3), se obtiene una recta (Figura 8.5).

$$A = A_{\infty} + \frac{A_0 - A_{\infty}}{1 + \left(\frac{C}{C_{1/2}}\right)^B} \quad (8.2)$$

$$\log \left(\frac{A - A_0}{A_{\infty} - A} \right) = B \log C - B \log C_{1/2} \quad (8.3)$$

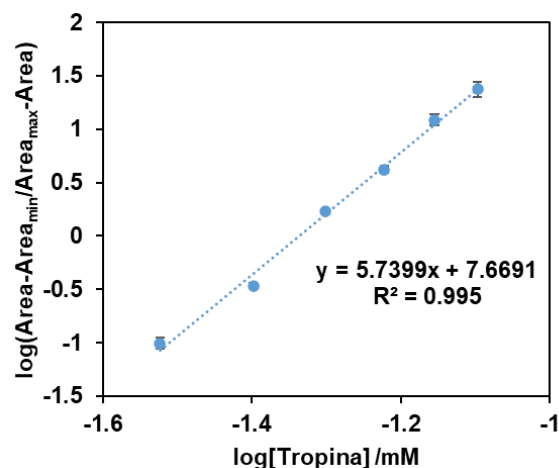


Figura 8.5: Linealización de la curva obtenida en la Figura 8.4 por medio de la ecuación (8.3).

Los límites de detección y cuantificación se calcularon empleando la curva de calibrado donde el área a interpolar se correspondería con el valor obtenido tras calcular: $Area_b = 3s_b + Area_{min}$ y $Area_b = 10s_b + Area_{min}$, respectivamente. Los valores obtenidos junto con el resto de características analíticas se muestran en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1: Características analíticas obtenidas para la determinación de atropina empleando el área integrada bajo la curva del registro cinético.

LD	$2.04 \cdot 10^{-5}$ M
LC	$2.53 \cdot 10^{-5}$ M
Rango Lineal	$2.53 \cdot 10^{-5} - 9.00 \cdot 10^{-5}$ M
DER ($8.00 \cdot 10^{-5}$ M, n=5)	3.07 %

Si bien es cierto que la sensibilidad del método no es tan alta como la que aportan métodos enzimáticos basados en las propiedades clásicas colorimétricas o fluorescentes de un colorante; tiene, como se ha mencionado en el apartado 8.1, otro tipo de ventajas, como que no requieren enzimas adicionales, como la HRP, que pueden sufrir numerosas reacciones laterales (como por ejemplo con fenoles), que se previene el empleo de colorantes fácilmente oxidables, o que se suprimen las interferencias provocadas por las especies reactivas del H_2O_2 .

8.3 Aplicación de la metodología sobre muestras reales

El método se aplicó sobre una muestra de trigo sarraceno, que previamente había sido sometida a una extracción como se describe en la sección 3.6.3. La muestra analizada tenía una concentración de tropina por debajo del límite de cuantificación del método, de acuerdo con los valores normales registrados en este tipo de alimentos por la EFSA [8.1]. De este modo, la muestra se fortificó para que tuviera una concentración de tropina en la disolución preparada con ella de $6.00 \cdot 10^{-5}$ M y se estudió el efecto matriz que producía la adición de diferentes volúmenes de matriz sin fortificar sobre la medida de la muestra fortificada. Como se puede ver en la Tabla 8.2, cuanto mayor volumen de matriz se añade, el valor de recuperación obtenido es menor, lo que supone una interferencia proporcional.

Tabla 8.2: Estudio del efecto matriz sobre la concentración de tropina añadida a la muestra de trigo sarraceno.

Volumen de matriz (μL)	Concentración obtenida ($\times 10^5$ M)	DER (% , n=4)	Recuperación (%)
40	5.88	6.25	98.0
60	5.49	4.13	91.4
80	4.22	2.46	70.4

Por lo tanto, fue necesario aplicar el método de adición estándar para eliminar las interferencias proporcionales. Para hacer la adición estándar, existe la desventaja de que la calibración tiene una forma sigmoideal y no recta, por lo que no se puede hacer una extrapolación. De este modo, se diseñó un método que permitiera realizar una adición estándar sobre una curva sigmoideal.

En las ecuaciones (8.2) y (8.3), A el área integrada del perfil cinético obtenido en la medida de cada disolución de analito entre 0 y 2000 segundos, A_0 el área mínima obtenida (asíntota cuando la concentración tiende a cero), A_∞ el área máxima obtenida (asíntota en el extremo superior del rango lineal), $C_{1/2}$ la concentración en el punto de inflexión, C la concentración empleada en esa medida y B un parámetro adimensional llamado factor de forma, relacionado con la curvatura.

Como es sabido, cuando existe una interferencia proporcional, lo que ocurre es que todas las señales quedan modificadas por un factor que es independiente de la concentración de analito. Así, si el analito se encuentra afectado por una interferencia proporcional, la ecuación (8.2) quedaría:

$$A_s = A_{\infty,s} + \frac{A_{0,s} - A_{\infty,s}}{1 + \left(\frac{C}{C_{1/2}}\right)^B} \quad (8.4)$$

Donde las nuevas áreas (representadas por el subíndice s) están relacionadas con las áreas originales por medio del factor de proporcionalidad P:

$$A_s = P \cdot A \quad (8.5)$$

Al combinar las ecuaciones (8.4) y (8.5) se obtiene:

$$A \cdot P = A_{\infty} \cdot P + \frac{A_0 \cdot P - A_{\infty} \cdot P}{1 + \left(\frac{C}{C_{1/2}}\right)^B} \rightarrow A = A_{\infty} + \frac{A_0 - A_{\infty}}{1 + \left(\frac{C}{C_{1/2}}\right)^B} \quad (8.6)$$

Esto indica que tanto el valor de $C_{1/2}$ como el de B correspondientes a la curva de calibrado original se ven inalterados por la interferencia proporcional. Esto se aprecia de una forma más clara al linealizar esta ecuación mediante su forma logarítmica, que viene dada por (8.3), y que, en presencia de una interferencia proporcional, queda de la siguiente forma:

$$\log\left(\frac{A_s - A_{0,s}}{A_{\infty,s} - A_s}\right) = \log\left(\frac{A \cdot P - A_0 \cdot P}{A_{\infty} \cdot P - A \cdot P}\right) = \log\left(\frac{A - A_0}{A_{\infty} - A}\right) \quad (8.7)$$

De este modo, para poder emplear la curva de calibrado original sobre una muestra en la que existe interferencia proporcional, únicamente es necesario calcular el parámetro P asociado a la interferencia proporcional de esa matriz, lo que se puede obtener por medio de los valores de $A_{0,s}$ y $A_{\infty,s}$ asociados a esa matriz.

Para demostrarlo, se realizaron varias medidas con disoluciones que contenían un volumen constante (20 μ L) de matriz de la muestra, pero diferentes concentraciones de tropina, obteniendo la curva que se muestra en la Figura 8.6.

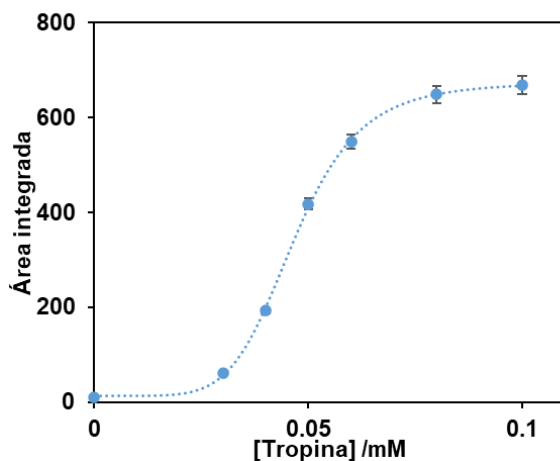


Figura 8.6: Curva de calibrado obtenida con diferentes concentraciones de tropina bajo efecto matriz empleando el área integrada bajo la curva del registro cinético y ajuste a la ecuación (8.2) (línea discontinua). $[Au(III)] = 4.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[Pt(II)] = 1.60 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[NADP] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[Tropinona \text{ Reductasa}] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $T^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$.

Tabla 8.3: Valores de recuperación obtenidos en la medida de disoluciones de tropina con matriz de la muestra de la Figura 8.5.

[Tropina] / M	Área obtenida	Área esperada	Recuperación (%)
$3.00 \cdot 10^{-5}$	61.21	81.63	74.98
$4.00 \cdot 10^{-5}$	192.35	273.77	70.26
$5.00 \cdot 10^{-5}$	417.50	559.39	74.64
$6.00 \cdot 10^{-5}$	548.94	752.19	72.98
$8.00 \cdot 10^{-5}$	649.27	876.09	74.11

Como se puede observar en la Tabla 8.3, la recuperación para cada una de las concentraciones es constante (con un valor promedio de 73.4% y una DER del 2.6%, lo que quiere decir que el supuesto planteado mediante las ecuaciones (8.6) y (8.7) se cumple.

Ajustando los valores obtenidos en la Figura 8.5 a la ecuación 8.2, se obtienen unos valores de $A_{\infty,s}$ y $A_{0,s}$ de **674.23** y **13.01**, respectivamente.

Conociendo estos valores, la muestra se fortifica con cuatro concentraciones diferentes de tropina, y después de interpolar en la recta de la Figura 8.4 con las constantes recalculadas para esta matriz, se obtienen los resultados que se muestran en la Tabla 8.4.

Tabla 8.4: Concentraciones de tropina obtenidas en las muestras fortificadas junto con sus valores de recuperación.

[Tropina] / M	Área integrada	[Tropina] obtenida / mM	Recuperación (%)
$3.00 \cdot 10^{-5}$	58.04	$2.92 \cdot 10^{-5}$	97.46
$4.00 \cdot 10^{-5}$	178.65	$3.81 \cdot 10^{-5}$	95.26
$5.00 \cdot 10^{-5}$	413.59	$4.97 \cdot 10^{-5}$	99.41
$6.00 \cdot 10^{-5}$	525.47	$5.72 \cdot 10^{-5}$	95.35

Estos resultados demuestran que es posible la determinación de tropina en muestras de trigo sarraceno a partir de la formación de AuPtNPs con una recuperación del 96.9 ± 2.0 %.

En un ámbito más general, también se ha demostrado que cuando se obtiene una calibración de tipo sigmoideal, el método de adición estándar es perfectamente aplicable de una forma tan sencilla como la empleada cuando la calibración corresponde a una línea recta.

8.4 Estudio de la reacción en soportes de celulosa

Partiendo de los estudios realizados en el Capítulo 5, se estudió la inmovilización del conjunto de reacciones optimizado en los apartados anteriores de este capítulo sobre soportes de celulosa para el desarrollo de un sensor. Para ello, se probó en primer lugar únicamente la reacción entre Au(III) y NADPH, inmovilizando el oro en el soporte como se explica en el apartado 3.3.2. Para determinar la concentración de oro óptima se prepararon soportes empleando suspensiones de celulosa al 5% que contenían tres concentraciones diferentes de oro: $1.00 \cdot 10^{-4}$, $3.00 \cdot 10^{-4}$ y $1.00 \cdot 10^{-3}$ M. Para cada concentración de oro, se añadieron diferentes concentraciones de NADPH con el objetivo de evaluar la sensibilidad de la reacción. Los resultados obtenidos tras tomar medidas de las reacciones con

la aplicación AppColorimetry y escoger el parámetro G_0-G se recogen en la Figura 8.7.

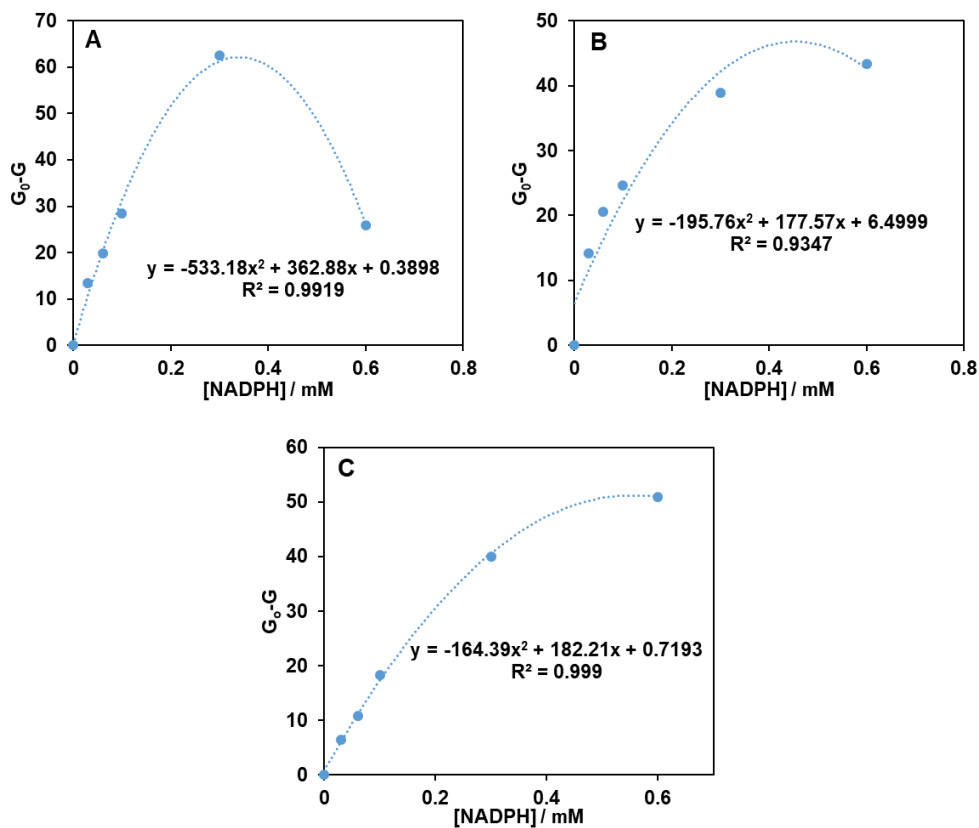


Figura 8.7: Calibraciones sobre soportes de celulosa variando la concentración de NADPH. **A)** $[Au(III)] = 1.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. **B)** $[Au(III)] = 3.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. **C)** $[Au(III)] = 1.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Estos resultados muestran un mejor ajuste abarcando un rango lineal más amplio al emplear una concentración de $Au(III)$ de $1.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en la preparación de los soportes de celulosa, por lo que esta es la concentración empleada de ahora en adelante. La imagen de los soportes de celulosa empleados en esta calibración se muestra en la Figura 8.8.

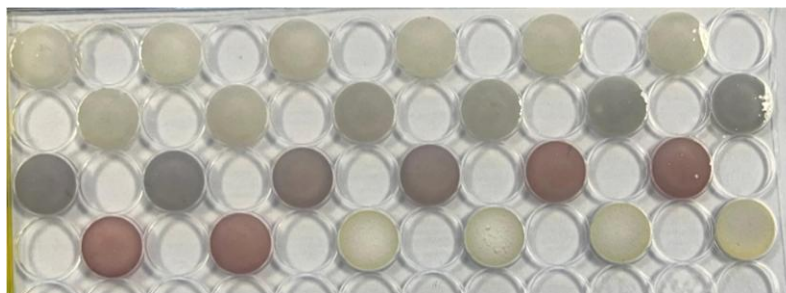


Figura 8.8: Soportes de celulosa empleados en la calibración con $1.00 \cdot 10^{-3}$ M de Au(III) tras la reacción. Las concentraciones empleadas en las reacciones de la fotografía son, por parejas de izquierda a derecha y de arriba a abajo: 0, $3.00 \cdot 10^{-5}$, $6.00 \cdot 10^{-5}$, $1.00 \cdot 10^{-4}$, $3.00 \cdot 10^{-4}$, $6.00 \cdot 10^{-4}$, $1.00 \cdot 10^{-3}$, $3.00 \cdot 10^{-3}$, $6.00 \cdot 10^{-3}$ y $1.00 \cdot 10^{-2}$ M.

A partir de este punto se estudió, por un lado, añadir platino a esta reacción con el objetivo de mejorarla y, por otro, inmovilizar NAD para poder acoplar la reacción de la tropina.

Para lo primero, se inmovilizó platino junto con oro empleando unas concentraciones de $1.00 \cdot 10^{-3}$, $2.00 \cdot 10^{-3}$, $3.00 \cdot 10^{-3}$ y $4.00 \cdot 10^{-3}$ M al preparar las suspensiones de celulosa. El resultado en todos los casos fue la reacción entre el platino y el oro en la etapa de secado del soporte dando lugar a la aparición de un color negro intenso, haciendo imposible su posterior reacción con NADPH.

Por otra parte, al inmovilizar Au(III) de forma conjunta con NAD, se hizo un estudio variando tanto el pH como la concentración de NAD, no obteniendo en ninguno de los casos una reacción posterior al añadir tropina junto con la enzima tropinona reductasa.

Debido a estas limitaciones, en los siguientes capítulos se estudiarán estas y otras reacciones empleando otro tipo de soportes, de forma que mejoren las prestaciones que aportan los sensores basados en soportes de celulosa.

8.5 Conclusiones

Este capítulo demuestra que la formación de AuPtNPs por reacción con NADPH formado tras reacciones enzimáticas en las que intervienen enzimas

deshidrogenasas es viable y puede aplicarse a la determinación de atropina en muestras de trigo sarraceno.

No obstante, es necesario investigar su aplicación a otros sustratos y a otras enzimas de tipo deshidrogenasa.

Igualmente demuestra que la aplicación de la adición estándar sobre una calibración de forma sigmoideal es posible y no presenta problemas adicionarles a aplicarla en un método convencional con calibración lineal.

En cuanto a su inmovilización en soportes de celulosa, se obtienen buenos resultados para la formación de AuNPs inmovilizando Au(III) y haciéndolo reaccionar con NADPH. Sin embargo, no se ha conseguido acoplar todo el sistema de reacciones. Para solucionar este problema, en los siguientes capítulos de esta Tesis se han buscado otro tipo de soportes que aporten diferentes posibilidades.

8.6 Bibliografía

- 8.1. Mulder PPJ, de Nijs M, Castellari M, Hortos M, MacDonald S, Crews C, Hajslova J, Stranska M (2016) Occurrence of tropane alkaloids in food. EFSA Supporting Publications 13:.. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.en-1140>

Capítulo 9:

**Tectómeros como base de sensores
para la generación in-situ de
nanomateriales**

9.1 Introducción

9.1.1 Empleo de tectómeros como soportes de sensores

En el ámbito del desarrollo de materiales avanzados y nanodispositivos, existe un gran interés por el autoensamblaje de moléculas pequeñas sobre superficies sólidas para formar estructuras supramoleculares organizadas y controlables. Las razones principales son que permiten un control muy preciso y homogéneo del tamaño de revestimientos, lo que en el mundo de los sensores supone una gran robustez, reproducibilidad y capacidad de control. A estas moléculas capaces de formar estas estructuras se les denomina genéricamente tectómeros (por similitud con la palabra “monómero”, que se usa en la síntesis de polímeros por uniones covalentes), si bien este término se suele aplicar tanto a los monómeros como a los polímeros formados a partir de ellos.

La mayoría de los sistemas propuestos para conseguirlos, se basan en que los tectómeros se ensamblan mediante puentes de hidrógeno, las estructuras bidimensionales o tridimensionales que se forman son estables en disolventes orgánicos, pero suelen no serlo en disoluciones acuosas debido a la competencia por los puentes de hidrógeno en este tipo de disolventes.

En este sentido, los tectómeros formados por oligoglicinas de cadena corta (generalmente $n=5$ o $n=7$) dispuestas de la manera representada en la Figura 9.1, tienen la capacidad de formar monocapas autoensambladas rígidas sobre una amplia variedad de materiales, gracias a la alta densidad de enlaces de hidrógeno entre sus cadenas. La gran estabilidad otorgada por estos enlaces hace que la estructura generada en 2D mantenga la estabilidad en disolventes acuosos [9.1]. Como se puede ver estos polímeros pueden formar estructuras de 2, 3 o 4 cadenas (denominadas bi-, tri- o tetraantenarias; o 2T, 3T y 4T, respectivamente).

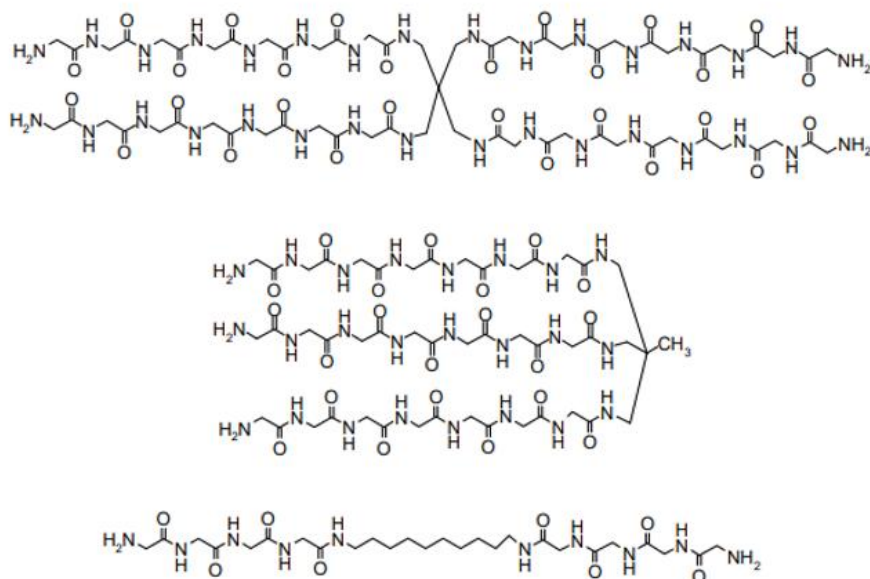


Figura 9.1: Estructura molecular de los tectómeros tetra-, tri- y biantenarios [9.2].

La capacidad de retener otras moléculas que hayan interactuado previamente con ellos sobre diferentes superficies mediante la formación de monocapas cristalinas en 2D, aporta a los tectómeros un gran potencial de servir como plataforma para la fabricación de nanodispositivos, convirtiéndolos en materiales muy atractivos desde el punto de vista de la nanotecnología.

Los tectómeros biantenarios y triantenarios (tectómero 2T y 3T, respectivamente) pueden formar tanto monocapas como bicapas debido a una zona hidrófoba en su región central que permite la unión de otro tectómero en sentido opuesto. Sin embargo, la adherencia entre estas capas es baja debido a que la interacción intermolecular es débil. Por otro lado, los tectómeros tetraantennarios solo pueden formar monocapas. La distancia entre las cadenas peptídicas en la estructura formada es de aproximadamente 0.5 nm [9.1], mientras que las alturas de las monocapas y bicapas formadas por tectómeros 2T son de 2.0 y 3.7 nm, respectivamente; por tectómeros 3T, de 2.8 y 4.5 nm; y por tectómeros 4T, de 4.5 nm [9.2].

En la Figura 9.2 aparecen de forma esquematizada las estructuras que forman los tectómeros 2T, 3T y 4T al depositar sus disoluciones sobre una superficie de mica.

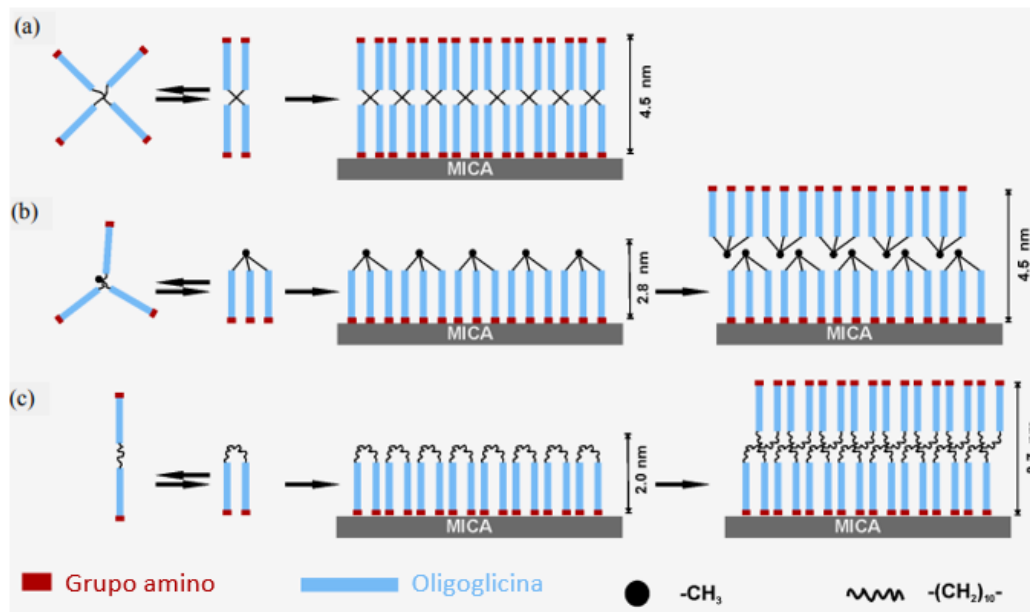


Figura 9.2: Asociación de oligoglicinas sobre una superficie de mica. El tectómero 4T forma monocapas mientras que los tectómeros 2T y 3T pueden formar tanto monocapas como bicapas unidas por la parte hidrófoba [9.2].

El control del pH es crucial al formar estructuras 2D con tectómeros en disolución acuosa, ya que este influye en la protonación y desprotonación de los grupos amino terminales. En un entorno ácido (pH inferior a 3.0), los grupos amino se protonan, lo que genera repulsiones entre las antenas hidrofílicas e impide la formación del ensamblaje. Por otra parte, a pH básico (superior a 7.4), los grupos amino terminales se desprotonan provocando que las moléculas de tectómero formen un agregado, que se separa de la fase acuosa, llegando a precipitar. No obstante, el autoensamblaje del tectómero es inmediatamente reversible en disolución acuosa mediante el cambio del pH de la disolución [9.3]. De este modo, el pH adecuado para formar estructuras 2D con estos materiales es entre 3.0 y 7.4. Por otra parte, si se quiere romper la estructura formada, basta con llevar la disolución en la que se encuentran a valores de pH inferiores a 3.0.

En esta Tesis, se han estudiado las posibilidades de los tectómeros como base para el diseño de sensores basados en la generación de nanopartículas. El sensor contiene una primera capa de plástico (que actúa de soporte), sobre la que se añade el tectómero junto con los iones metálicos precursores del nanomaterial

que se encuentra retenido en él. Estas estructuras se implementarán en forma de test rápidos que puedan ser empleados en muestras de alimentos. En estudios previos del grupo de investigación se habían probado este tipo de nanomateriales con diferentes plásticos, obteniendo unos mejores resultados en la formación de monocapas sobre ácido poliláctico (PLA), por lo que este será el polímero empleado como base del sensor.

9.1.2 Tiramina: Toxicología e importancia de su determinación

A pesar de que el objetivo de esta Tesis es desarrollar sensores para la determinación de alcaloides del tropano en alimentos, los primeros estudios realizados buscaron comprobar la capacidad de los tectómeros para inmovilizar reactivos. Por ello, se llevaron a cabo empleando como analito tiramina para, más adelante, extrapolarlo al análisis de atropina mediante el empleo del sistema de reacciones optimizado en los capítulos anteriores. Esto es debido, por un lado, a la mayor sencillez del sistema de reacciones empleado, ya que en este caso únicamente se requiere la inmovilización del Au(III) para su reacción directa con tiramina y; por otro lado, a que se aprovechó este estudio como parte de un proyecto de seguridad alimentaria donde uno de los analitos era la tiramina, que se había visto que tenía capacidad de formar AuNPs.

La tiramina es una amina biógena que actúa como neuromodulador en el organismo, estimulando la liberación de hormonas como la dopamina, la adrenalina y la noradrenalina. Además, tiene efectos sobre el sistema cardiovascular y modula la respuesta inmunitaria [9.4, 9.5]. Se forma en los alimentos debido a la acción de microorganismos que favorecen la descarboxilación de su aminoácido precursor, la tirosina, mediante enzimas descarboxilasas [9.6] (Figura 9.3).

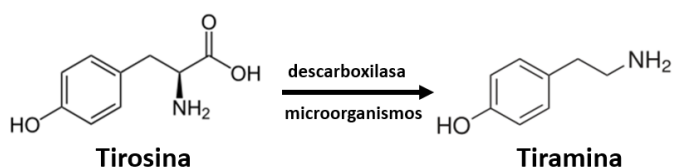


Figura 9.3: Reacción de descarboxilación del aminoácido libre tirosina por medio de una enzima descarboxilasa para dar lugar a la formación de tiramina.

Esta amina se encuentra en altas concentraciones en alimentos fermentados como el queso, la cerveza y el vino, siempre que contengan tirosina, debido a la alta actividad microbiana en estos productos [9.7]. Asimismo, también puede aparecer en alimentos no fermentados donde los microorganismos proliferan por contaminación, ya sea antes, durante o después del proceso de elaboración, o bien por su deterioro. Por lo tanto, el contenido de tiramina (o de AB) en un alimento puede servir como indicador de su calidad [9.8].

La intoxicación por tiramina es conocida como “reacción del queso”, y sus síntomas incluyen náuseas, migrañas, hipertensión y problemas respiratorios [9.9]. A pesar de los riesgos que representa la tiramina para la seguridad alimentaria, no existe una legislación específica sobre su límite, ya que los niveles de toxicidad dependen del individuo. Por esta razón, la Unión Europea aún no ha establecido un límite legal. No obstante, algunos países han fijado recomendaciones o límites obligatorios, como en Eslovaquia, donde se ha establecido que la concentración máxima tolerable de tiramina en quesos es de 200 mg/kg [9.10].

Los métodos más ampliamente empleados para determinar tiramina se basan en técnicas de separación instrumentales como cromatografía en capa fina de alta resolución [9.11], electroforesis capilar [9.12] o cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) [9.13]. No obstante, estos métodos requieren de largos tiempos de análisis y son muy costosos. Esto ha generado una demanda en la industria alimentaria y en el sector sanitario de metodologías más rápidas y económicas para el control de calidad. En este sentido, se están desarrollando métodos de respuesta rápida que permitan la detección in-situ, sean fáciles de aplicar y ofrezcan resultados fiables. Los sensores se destacan en este campo, ya que permiten un seguimiento rápido, son económicos, simples y presentan buenas propiedades analíticas.

En este contexto, algunas enzimas como la monoamino oxidasa (MAO) y la tiramina oxidasa (TAO) han permitido el desarrollo de biosensores electroquímicos para la detección rápida, específica y económica de AB, basándose en la oxidación del H₂O₂ producido durante la conversión de la AB a aldehído en presencia de agua y oxígeno [9.10].

Otras metodologías, en cambio, permiten su determinación de forma más directa sin la necesidad de emplear enzimas. Un ejemplo es el desarrollado en este grupo de investigación, por el cual la tiramina reduce al Au(III) dando lugar a la formación de AuNCs [9.14] fluorescentes que pueden emplearse con fines analíticos.

Como se ha comentado al inicio del apartado, la sencillez de esta reacción fue uno de los motivos por los que se eligió como base para el diseño y la optimización de la capacidad de los tectómeros como soporte.

9.2 Inmovilización del Au(III) sobre láminas de PLA y reacción con tiramina

9.2.1 Forma de trabajo

En primer lugar, se desarrolló un ensayo basado en inmovilizar Au(III), con ayuda del tectómero, sobre un plástico de PLA (Au-Tect@PLA). Del mismo modo, se comprobó si, una vez inmovilizado, era capaz de reaccionar con tiramina. Durante la reacción, la tiramina se oxida a su dímero (lo cual se puede comprobar experimentalmente midiendo la fluorescencia de este) y el Au(III) se reduce, lo que estequiométricamente es consistente con la reacción global de la Figura 9.4.

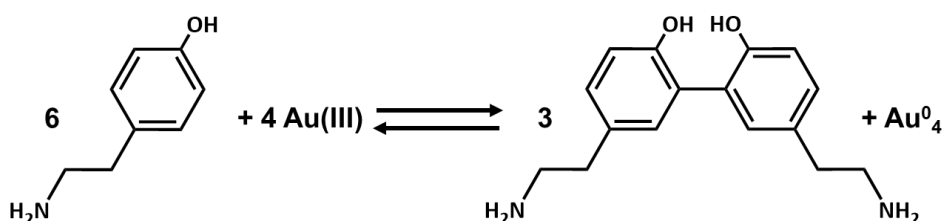


Figura 9.4: Reacción entre la molécula de tiramina y Au(III).

Como procedimiento general, en cada optimización, las láminas se prepararon como se explica en el apartado 3.3.4 y una vez secas y lavadas con agua milli-Q, se dispusieron en una placa de pocillos y en cada una se introdujeron 300 μ L de disoluciones de tiramina en diferentes concentraciones, todas ellas amortiguadas a pH 6, siendo las concentraciones empleadas: 0, $3.00 \cdot 10^{-6}$, $1.00 \cdot 10^{-5}$, $3.00 \cdot 10^{-5}$ y $1.00 \cdot 10^{-4}$ M.

Tras 24 horas, se observa la formación de AuNPs sobre las láminas (Au-Tect@PLA), cuya señal analítica se mide a través de las coordenadas RGB. En este caso, la coordenada que aportaba una mayor sensibilidad era la coordenada R, por lo que fue la empleada durante la optimización. A continuación, se detallan los estudios de optimización realizados.

9.2.2 Efecto de la disolución amortiguadora y del pH empleados en la preparación de las Au-Tect@PLA

Para llevar a cabo este estudio, en primer lugar, se prepararon Au-Tect@PLA empleando diferentes disoluciones amortiguadoras en la premezcla entre el oro y el tectómero. En concreto, se utilizaron disoluciones de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, HAc/Ac^- , $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$ y MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), todas ellas de pH 6. En términos generales, los resultados que se obtuvieron en la preparación fueron los siguientes:

- **Con $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$:** Precipita el tectómero al realizar la premezcla, pero este se vuelve a disolver empleando ultrasonidos. Además, el fosfato ayuda a la formación de las nanopartículas de oro, reduciendo el potencial del metal por formación de complejos con este.
- **Con HAc/Ac^- :** En este caso no precipita el tectómero.
- **Con $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$:** Aparece un precipitado tenue al realizar la premezcla, pero este se puede disolver de forma definitiva introduciendo la mezcla en ultrasonidos. Al preparar las Au-Tect@PLA, estas toman una coloración oscura a medida que se va secando la lámina.
- **Con MES:** Tiene lugar una reacción entre el MES y el oro antes de adicionar el tectómero que da lugar a la aparición de un precipitado de color negro. Esto se debe a una reacción que ocurre entre el oro y el azufre del MES, por lo que no podrán prepararse Au-Tect@PLA empleando disolución amortiguadora de MES.

Una vez se ha descartado el MES, se realizó un estudio de calibración a diferentes valores de pH empleando el resto de disoluciones amortiguadoras. En concreto, se elaboró una calibración para cada uno de los valores de pH que fueron: 2 ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$); 5 (HAc/Ac^-); 6, 7 y 8 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$); 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$) y 12 ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$). Los resultados obtenidos para cada una de las calibraciones

representando la coordenada R frente a la concentración de tiramina empleada se pueden observar en la Figura 9.5.

Como se puede observar, excepto trabajando a pH 5 (debido seguramente al tipo de disolución amortiguadora empleada) para el resto de condiciones se observa que la tiramina es capaz de producir AuNPs en el sensor con mejor o peor sensibilidad. Las Au-Tect@PLA preparadas a pH 6 aportan una mayor sensibilidad que el resto, ya que el rango de la coordenada R en el que aparecen sus valores es de 72, por lo que se escoge este valor como pH óptimo en la preparación de las Au-Tect@PLA.

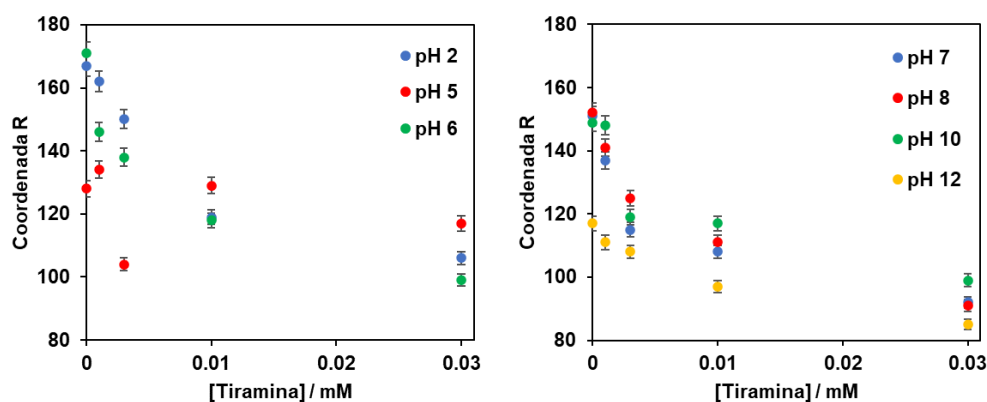


Figura 9.5: Representación de la coordenada R frente a la concentración de tiramina empleada para Au-Tect@PLA preparadas a diferentes valores de pH.

9.2.3 Efecto del pH de la disolución amortiguadora utilizada para disolver la tiramina patrón

En el apartado anterior se ha estudiado el pH de preparación de las Au-Tect@PLA. Ahora, por el contrario, se va a estudiar el efecto del pH de la disolución amortiguadora en la que se encuentra disuelta la tiramina patrón que se hace reaccionar con la Au-Tect@PLA; es decir, el efecto del pH en el cual tiene lugar la reacción de formación de las nanopartículas de oro. Para ello, se preparan 8 láminas con proporción molar oro:tectómero 1:1 y amortiguadas en fosfato a pH 6. Una vez secas, se colocan en los pocillos y sobre ellas se añade disolución de tiramina de concentración $1.00 \cdot 10^{-5}$ M, solo que, sobre cada una de ellas, la disolución de tiramina se encontrará amortiguada a un pH diferente. Los valores de pH empleados en este experimento fueron: 2 ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$); 4 y 5 (HAc/Ac^-

); 6, 7 y 8 ($\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$); 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$) y 12 ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$); todas ellas de concentración 0.1 M. Una vez han reaccionado las Au-Tect@PLA, se mide la coordenada R de todas ellas, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 9.1.

Tabla 9.1: Coordenada R obtenida en la reacción con tiramina disuelta en diferentes disoluciones amortiguadoras ($n=3$).

pH de la reacción	2	4	5	6	7	8	10	12
Coordenada R	163.9± 4.9	128.1± 3.8	128.3± 3.8	116.0± 3.4	118.5± 3.5	162.3± 4.8	168.1± 5.0	174.3± 5.2

Como se aprecia hay un intervalo entre pH 6 y 7 donde el valor de R es mínimo (que indica mayor color, es decir, señal máxima), lo cual concuerda con resultados previos donde se ve que el oro a pH 6 no forma complejos fuertes con el fosfato y mantiene sus propiedades oxidantes. A medida que aumenta el pH se favorece la formación de las AuNPs pero el complejo formado entre el Au y el fosfato es más fuerte. Se escoge finalmente pH 6 para hacerlo coincidir con el pH de preparación de las Au-Tect@PLA.

9.2.4 Efecto de la proporción molar entre el tectómero y el oro en las Au-Tect@PLA

Es de esperar que cuanto más Au(III) haya en la Au-Tect@PLA mejor se formen las AuNPs, pero una elevada concentración puede afectar también a la capacidad del tectómero para estabilizarlas. Para comprobar cuál es la relación oro:tectómero más adecuada para la preparación de las Au-Tect@PLA, se realizó un estudio de calibración empleando diferentes proporciones molares entre el oro y el tectómero, que fueron: 0.5:1, 0.75:1, 1:1 y 1.5:1 (oro:tectómero), siendo la concentración de tectómero empleada $2.73 \cdot 10^{-3}$ M.

Tras tomar medidas de las coordenadas RGB de los resultados, y representando la coordenada R frente a la concentración de tiramina empleada, se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 9.6. De los resultados se puede deducir que la relación molar que mejor resultados ofrece, en cuanto a linealidad y sensibilidad, es la proporción molar 1:1.

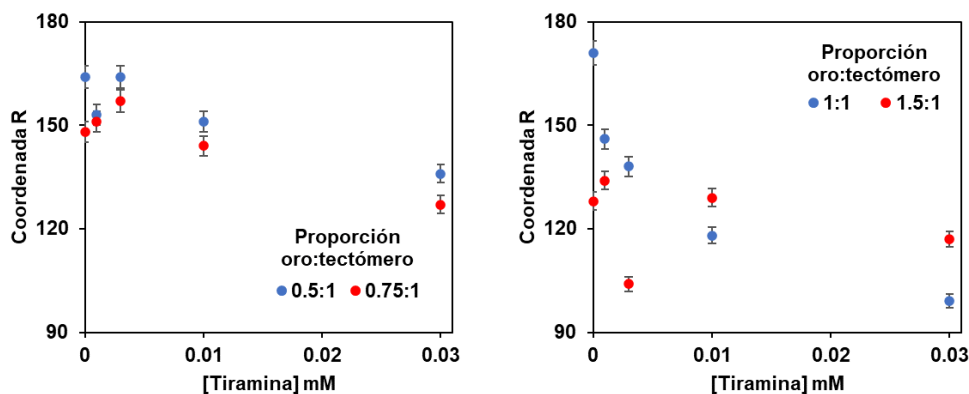


Figura 9.6: Representación de la coordenada R frente a la concentración de tiramina empleada para Au-Tect@PLA preparadas con diferentes proporciones molares entre el oro y el tectómero.

9.3 Estabilidad de las láminas sensoras: necesidad de envejecimiento

Una vez optimizados todos los parámetros de preparación de las láminas y de la reacción de estas con tiramina, se comprobó la estabilidad del Au(III) inmovilizado con el paso del tiempo.

Para ello, es fundamental conocer la cantidad de oro que realmente queda inmovilizada; es decir, la cantidad que, una vez se ha secado la lámina y el tectómero ha formado su estructura en monocapas sobre el PLA, no se desprenda del polímero al sumergirlo en una disolución acuosa. Para cuantificar esto se va a emplear una reacción basada en la formación de un complejo coloreado entre Au(III) y Br^- que permita conocer la cantidad de Au(III) desprendida en el agua milli-Q empleada para el lavado de las láminas tras su secado.

9.3.1 Reacción entre Au(III) y bromuro

El Au(III) forma en presencia de bromuros complejos de color amarillo-naranja, permitiendo cuantificar cantidades de oro contenidas en una disolución mediante la medida de su absorbancia. Cuando el bromuro se encuentra muy en exceso sobre el oro, se ha demostrado que todo el oro se encuentra formando el complejo AuBr_4^- (Figura 9.7), cuyo máximo de absorción se encuentra en 380 nm (con una $\epsilon = 4.4 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [9.15].

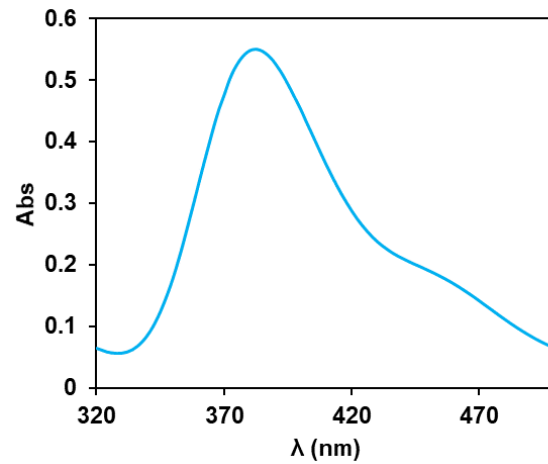


Figura 9.7: Espectro obtenido para una disolución de concentración de Au(III) $1.60 \cdot 10^{-4}$ M y una concentración de bromuro de 0.1 M.

Este complejo persiste en un amplio rango de pHs y temperaturas. No obstante, el tectómero pierde su funcionalidad a valores de pH por debajo de 3.4 [9.3], por lo que se elaboró una recta de calibrado por debajo de este pH (se escogió pH 2), para poder medir concentraciones de oro en presencia de tectómero sin que este interfiera. En cuanto a la temperatura, se escogió 25°C. Los resultados de esta recta de calibrado se muestran en la Figura 9.8.

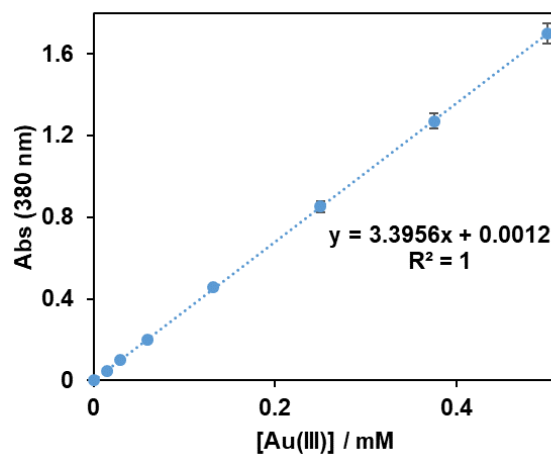


Figura 9.8: Recta de calibrado empleando diferentes concentraciones de Au(III). $[Br^-] = 0.1$ M, pH = 2 ($H_3PO_4/H_2PO_4^-$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ C$.

Las características analíticas obtenidas para este método se muestran en la Tabla 9.2.

Tabla 9.2: Características analíticas obtenidas para el método de determinación de Au(III) por formación de complejos con el Br⁻.

LD	1.38·10 ⁻⁷ M
LC	4.59·10 ⁻⁷ M
Rango Lineal	4.59·10 ⁻⁷ – 5.00·10 ⁻⁴ M
DER (2.50·10⁻⁴ M, n=5)	2.24 %

A pesar de que la bibliografía señala que el tectómero no debería suponer una interferencia en la medida del Au(III) a pH 2 al perder su capacidad de interacción, es necesario validar esta hipótesis mediante un método contrastado. El método escogido para la validación fue la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Las medidas se realizaron en el Servicio Central de Análisis (SCA) de la Universidad de Zaragoza. Previamente se había comprobado, mediante medidas realizadas en el SCA, que el tectómero no interfería en la determinación del Au(III) por esta técnica.

Para comparar ambos procedimientos se prepararon tres disoluciones de medida premezclando el tectómero y el oro. Estas disoluciones estaban amortiguadas a pH 2 y contenían oro y tectómero en proporción molar 1:1 y en diferentes concentraciones para cada disolución. Por último, se añadió bromuro de forma que quedara en concentración 0.1 M en cada una de las disoluciones. Las tres disoluciones fueron analizadas por absorción molecular y, posteriormente, por ICP-MS, tomando este último método como método de referencia. Las concentraciones obtenidas por los dos métodos, en ppm, junto con sus desviaciones estándar, pueden verse en la Tabla 9.3.

Tabla 9.3: Concentraciones obtenidas para las tres disoluciones medidas por absorción molecular y por ICP-MS, en mg/L, junto con sus desviaciones estándar.

Nº Muestra	[Au(III)]_{Abs. Mol.} (mg/L)	[Au(III)]_{ICP-MS} (mg/L)
1	0.835 ± 0.054	1.683 ± 0.103
2	0.792 ± 0.013	1.590 ± 0.023
3	0.479 ± 0.003	0.895 ± 0.037

A pesar de obtener resultados diferentes para ambas metodologías, la representación de las concentraciones obtenidas por ICP-MS frente a las obtenidas por absorción molecular, se obtiene que se ajustan a una recta de pendiente 0.494 ± 0.015 (Figura 9.9).

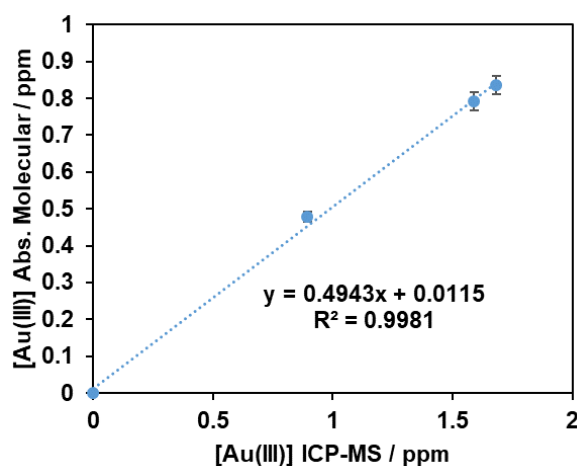


Figura 9.9: Representación de las concentraciones obtenidas por ICP-MS frente a las obtenidas por absorción molecular para tres muestras.

Estos resultados indican que a pesar de encontrarse el tectómero a pH 2 (al cual debería estar inactivo), parte del oro sigue interactuando con éste. Esta fracción del oro no da lugar a la formación del complejo AuBr_4^- , por lo que no llega a detectarse mediante este método.

No obstante, esta interferencia se puede considerar independiente de la cantidad de Au(III), ya que, teniendo en cuenta la pendiente de la recta, el oro que se cuantifica mediante absorción molecular es un 49% del oro total contenido en la muestra.

9.3.2. Cálculo del Au(III) desprendido de las láminas en función del tiempo

A partir de la metodología diseñada en el apartado anterior se estudió si el paso de los días desde la preparación de las Au-Tect@PLA hasta que se sumergían en agua milli-Q para ser lavadas, antes de hacerlas reaccionar con tiramina, afectaba a la cantidad de oro desprendida. Para ello, durante diferentes días se fueron tomando medidas (tres diferentes cada día) de diferentes láminas que habían sido preparadas a la vez.

Para desarrollar este estudio, se prepararon una serie de Au-Tect@PLA de tectómero 2T y oro en proporción molar 1:1. Dos de estas Au-Tect@PLA se introducían en 600 μL de agua milli-Q (las dos juntas, para obtener una cantidad de oro que se pudiera medir) y se mantenían durante media hora. Después, se tomaban 500 μL del agua que había estado en contacto con las Au-Tect@PLA, y se le añadían 200 μL de disolución amortiguadora de pH 2 y 50 μL de disolución de bromuro de potasio para preparar la disolución de medida. De esta manera, se tendrán las mismas condiciones que las de la calibración dada en la Figura 9.8. Esto se hizo por triplicado con diferentes parejas de láminas cada uno de los días.

Tras obtener la media de las tres medidas de absorbancia realizadas cada día, se compararon los resultados obtenidos para cada día observando que la absorbancia disminuía con el paso de los días (Figura 9.10). Estos resultados indican que cuanto más tiempo llevaban las láminas preparadas, más fuertemente quedaba el Au(III) unido al tectómero y, por tanto, menos escapa a la disolución.

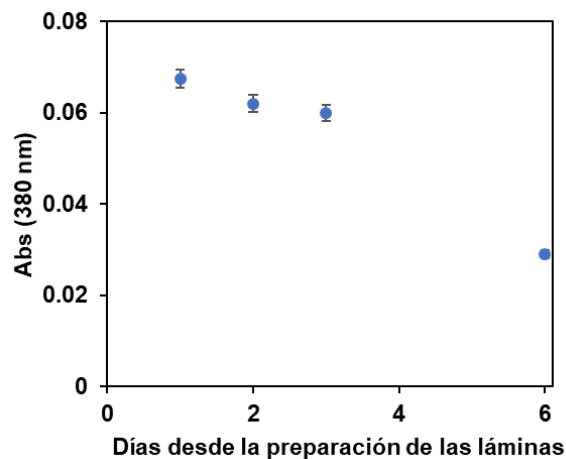


Figura 9.10: Absorbancia obtenida para la medida del oro desprendido de las Au-Tect@PLA frente a los días que han pasado desde la preparación de la Au-Tect@PLA hasta su medida.

Estos resultados fueron comparados estadísticamente por medio de un test t ($t_{\text{calc}} = 6.36$, $t_{\text{tab}} = 4.30$), obteniendo que la disminución de absorbancia era significativa, lo que quiere decir que cuánto más tiempo lleva formada la Au-Tect@PLA mayor será la fijación del oro a esta.

Tomando los valores de absorbancia obtenidos e interpolándolos en la recta de calibrado construida a pH 2, se calculó la concentración de oro en las cubetas de medida (Tabla 9.4).

En cada Au-Tect@PLA se ponen un total de $5.45 \cdot 10^{-8}$ mol de Au(III), o lo que es lo mismo $1.07 \cdot 10^{-2}$ mg de Au(III). Suponiendo que todo el oro se desprendiera de la Au-Tect@PLA y pasara al agua milli-Q con el que se lava ésta, en la cubeta de medida habría una concentración de oro de $6.06 \cdot 10^{-5}$ M o 11.9 mg/L. Comparando esta concentración con las obtenidas por interpolación y teniendo en cuenta que, como se ha demostrado en el apartado 9.2.1, sólo se cuantifica el 49% del Au(III) que se libera, se obtiene que la relación real entre los días que pasan desde la preparación de las Au-Tect@PLA y el porcentaje de oro que se desprende de estas es la mostrada en la Tabla 9.4.

Tabla 9.4: Concentraciones de oro en unidades de molaridad y en ppm obtenidas para las disoluciones medidas y porcentaje de oro desprendido de las láminas de PLA.

Día en que se midió cada muestra tras su preparación	Abs	[Au(III)] / M	[Au(III)] / mg/L	Porcentaje de oro que se desprende (%)
1	0.0674	$1.55 \cdot 10^{-5}$	3.05	52.3
2	0.0620	$1.80 \cdot 10^{-5}$	2.80	48.1
3	0.0599	$1.76 \cdot 10^{-5}$	2.71	46.6
6	0.0290	$1.12 \cdot 10^{-5}$	1.32	22.7

9.4 Caracterización analítica para la cuantificación de tiramina

Una vez realizado todo el estudio de las Au-Tect@PLA y habiendo optimizado sus condiciones, se estudió la respuesta a diferentes concentraciones de tiramina. Esta curva de calibrado se realizó por dos métodos diferentes. En primer lugar, a partir de las coordenadas RGB medidas en las Au-Tect@PLA utilizando un smartphone. En segundo lugar, mediante medidas de reflectancia de las Au-Tect@PLA y, a partir de un tratamiento matemático de sus espectros, se construyó otra curva de calibrado que cubre un mayor rango de concentraciones.

9.4.1 A partir de las coordenadas RGB

A) Modelo matemático

Como ya se ha mencionado, las medidas de las coordenadas RGB se toman con un smartphone, obteniendo dichas coordenadas a través de su cámara. A pesar de que hasta ahora en este Capítulo se ha tenido en cuenta únicamente la medida de la coordenada R por su mayor sensibilidad al color de las nanopartículas de Au, para realizar la curva de calibrado se tendrán en cuenta otros parámetros de color para que ésta sea más reproducible.

Como se ha indicado en el Capítulo 5, la relación entre la medida de cualquier coordenada de color (E) y la concentración de la sustancia absorbente viene dada por la ecuación (9.1) (es la misma que la 5.7 pero se reproduce aquí para mayor comodidad):

$$E = E_0 - V_\lambda E_0 c + W_\lambda E_0 c^2 \quad (9.1)$$

Donde E_0 es la señal obtenida en ausencia de analito (blanco), y V_λ y W_λ son parámetros que depende del coeficiente de dispersión del medio y del paso óptico. Los valores de E se pueden corregir con los observados para el blanco, bien de forma absoluta:

$$\Delta E = E_0 - E \quad (9.2)$$

O bien de la forma relativa:

$$E_r = \frac{E_0 - E}{E_0} \quad (9.3)$$

Como ya se explicó, este modelo justifica que exista una relación polinómica de 2º grado entre cualquiera de las coordenadas (absoluta o relativa) y la concentración de la sustancia absorbente (AuNP en este caso), y no una relación lineal (excepto para un intervalo de concentraciones muy pequeño). Es importante indicar que la relación de 2º grado (9.1) proviene, a su vez, de una simplificación; al ir aumentando la concentración se esperan relaciones polinómicas de orden superior, aunque no se han empleado por su mayor incertidumbre.

B) Curva de calibrado: Parámetros analíticos

Para la calibración, se prepararon cinco Au-Tect@PLA con las condiciones optimizadas en el apartado 9.2, una vez secas y lavadas en agua milli-Q, se hicieron reaccionar en una placa de pocillos con disoluciones de tiramina de diferentes concentraciones. Completada la reacción, se midieron las coordenadas RGB, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 9.5.

Tabla 9.5: Coordenadas y coordenadas relativas obtenidas en la calibración.

[Tir] / M	R	G	B	R _r	G _r	B _r
0	171	161	154	0	0	0
1.00·10 ⁻⁶	158	132	129	0.093	0.180	0.162
3.00·10 ⁻⁶	147	137	109	0.152	0.149	0.292
1.00·10 ⁻⁵	118	128	94	0.310	0.205	0.390
3.00·10 ⁻⁵	99	121	95	0.421	0.248	0.383

Representando los valores de R_r frente a la concentración de tiramina, se obtuvo la curva de calibrado que aparece en la Figura 9.11.

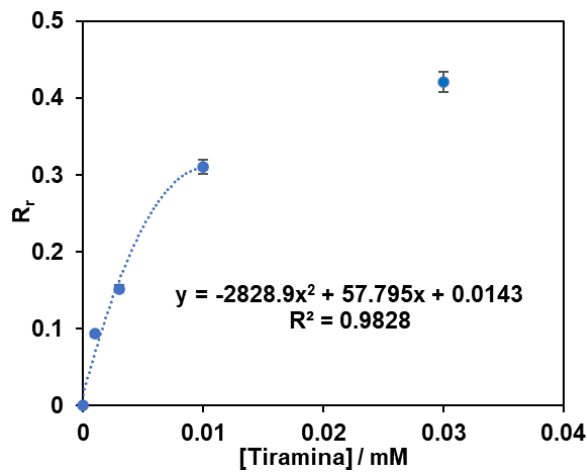


Figura 9.11: Calibración obtenida empleando el parámetro R_r en función de la concentración de tiramina.

Por otra parte, en la Figuras 9.12 se muestran las calibraciones obtenidas con los parámetros análogos a R_r para las componentes G y B del color (G_r y B_r , respectivamente).

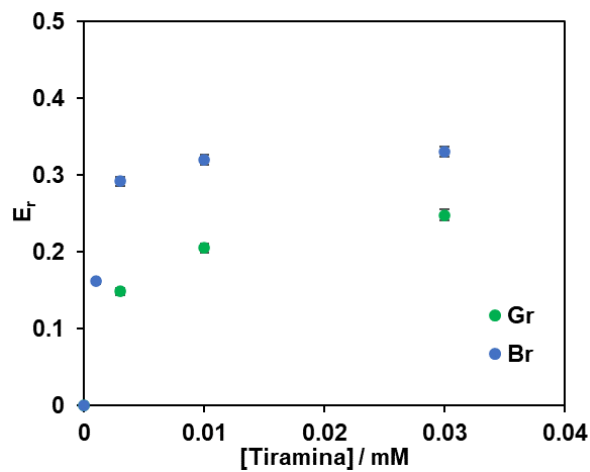


Figura 9.12: Representación de diferentes parámetros frente a la concentración de tiramina empleada en la reacción.

Como se puede apreciar, los parámetros G_r y B_r ofrecen peores ajustes por lo que el parámetro que se empleará para cuantificar tiramina será R_r .

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método basado en R_r se calculan resolviendo la ecuación de ajuste de segundo grado, sustituyendo en y el valor de tres y diez veces la desviación estándar de las señales del blanco, respectivamente. Realizando estas operaciones se obtienen los valores que se muestran en la Tabla 9.6, junto con el resto de las características analíticas.

Tabla 9.6: Características analíticas del método empleando el parámetro R_r .

LD	$2.31 \cdot 10^{-7}$ M
LC	$7.83 \cdot 10^{-7}$ M
Rango Dinámico	$7.83 \cdot 10^{-7} - 1.00 \cdot 10^{-5}$ M
DER ($1.00 \cdot 10^{-5}$ M, n=5)	13.53 %

9.4.2 A partir de medidas de reflectancia

Como se ha podido ver, las calibraciones obtenidas utilizando las coordenadas RGB y el teléfono móvil, dan ajustes discretos. Además, los valores de R, G ó B que se deberían haber obtenido en ausencia de analito deberían ser de 255 (que es el valor teórico que corresponde al blanco); los valores que salen (en torno a 170) corresponderían a un gris y se atribuye a un problema de sombra por la no-óptima iluminación que se consigue en la placa (debida a la distancia de la superficie al fondo). Estos valores tan elevados disminuyen drásticamente el rango de respuesta de medida del método, al afectar directamente sobre la sensibilidad de este, produciendo un aumento de los límites de detección y cuantificación con respecto a señales de blanco menores (más próximas a 255). A pesar de ello, esta metodología permite hacer una determinación semi-cuantitativa rápida.

Para hacer medidas más precisas es más adecuado utilizar dispositivos de reflectancia, como lectores de microplacas. En este caso, las medidas se han hecho como se especifica en el apartado 3.5.3.

Para realizar la calibración, se prepararon trece Au-Tect@PLA con las condiciones optimizadas de los apartados anteriores, y tras su secado y lavado en agua mili-Q, se hicieron reaccionar con tiramina de diferentes concentraciones. Una vez habían reaccionado las Au-Tect@PLA, se obtuvieron los espectros de absorbancia de estas. En los espectros, aparece un pico de absorción con máximo a 550 nm, característico de las AuNPs, que aumenta con la concentración, siempre que no se sobrepase un valor de concentración máximo (Figura 9.13 A)). Sin embargo, a concentraciones altas, ese pico comienza a ensancharse, mientras que disminuye el valor de absorbancia del máximo de 550 nm. Este efecto puede observarse en la Figura 9.13 B).

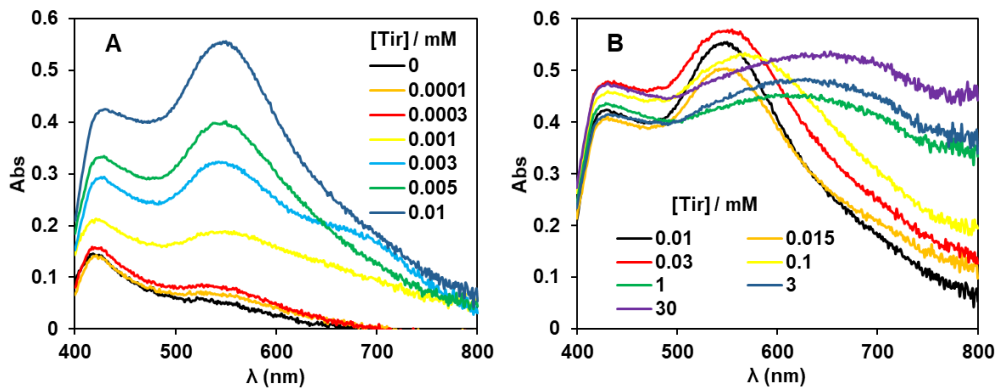


Figura 9.13: Espectros obtenidos en el estudio de calibración. **A)** Concentraciones de tiramina hasta $1.00 \cdot 10^{-5}$ M. **B)** Concentraciones de tiramina por encima de $1.00 \cdot 10^{-5}$ M.

Al observarse este cambio en la forma de los espectros, se probaron diferentes ajustes, separando finalmente la calibración en dos curvas diferentes. Una de las curvas cubre concentraciones hasta $1.00 \cdot 10^{-5}$ M, mientras que la otra se utilizará para concentraciones superiores a $1.00 \cdot 10^{-5}$ M.

Para concentraciones bajas se representó el valor de absorbancia a 550 nm frente a la concentración de tiramina empleada en la reacción, obteniendo la curva de calibrado que puede verse en la Figura 9.14.

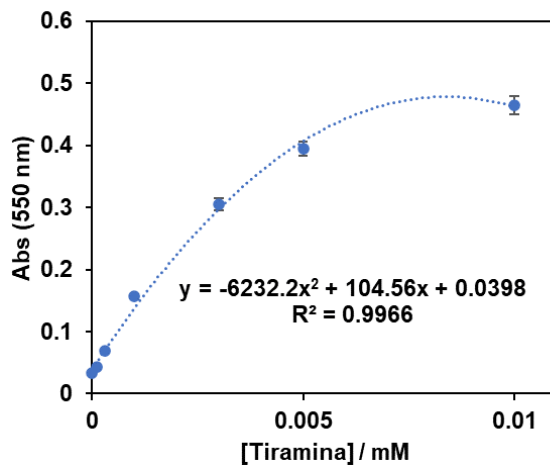


Figura 9.14: Curva de calibrado para concentraciones de tiramina de hasta $1.00 \cdot 10^{-5}$ M, obtenida empleando el máximo de absorción a 550 nm.

A partir de esta curva de calibrado se obtuvieron las características analíticas del método mostradas en la Tabla 9.7.

Tabla 9.7: Características analíticas del método empleando medidas de reflectancia.

LD	$1.43 \cdot 10^{-8}$ M
LC	$4.79 \cdot 10^{-8}$ M
Rango Dinámico	$4.79 \cdot 10^{-8} - 1.00 \cdot 10^{-5}$ M
DER ($5.00 \cdot 10^{-6}$ M, n=3)	3.17 %

Por otra parte, para concentraciones por encima de $1.00 \cdot 10^{-5}$ M, se representó el logaritmo de la absorbancia obtenida a 700 nm frente al logaritmo de la concentración de tiramina. La curva de calibrado obtenida de esta forma puede verse en la Figura 9.15.

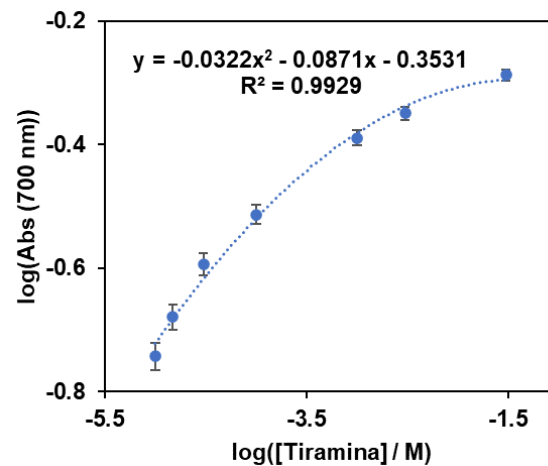


Figura 9.15: Curva de calibrado para concentraciones de tiramina superiores a $1.00 \cdot 10^{-5}$ M, obtenida representando el logaritmo de la absorbancia a 700 nm frente al logaritmo de la concentración.

Para esta curva, se toma como límite de cuantificación (LC) la concentración de $1.00 \cdot 10^{-5}$ M, ya que no se cuantificarán concentraciones inferiores a esta al tener la otra curva de calibrado para esas concentraciones, mientras que el rango dinámico comprende desde $1.00 \cdot 10^{-5}$ M hasta $3.00 \cdot 10^{-2}$ M. Como se puede deducir, este tipo de metodología permite cubrir un rango de concentraciones muy amplio (varios ordenes de magnitud).

9.5 Estudio de interferencias

Además de la tiramina, existen otras aminas biógenas que aparecen frecuentemente en alimentos, como son la histamina, la putrescina y la cadaverina. De este modo, los estudios de interferencias se hicieron en torno a estos compuestos.

Tras hacer reaccionar una serie de Au-Tect@PLA con estas ABs en concentraciones dentro del rango de respuesta obtenido para la tiramina, no se observó la aparición de AuNPs en las láminas, indicando que el Au(III) se reduce específicamente en presencia de tiramina (en comparación con las otras aminas).

No obstante, este estudio de interferencias se hizo también haciendo reaccionar las láminas con tiramina en presencia de las otras AB. En este estudio, la concentración empleada de tiramina en todos los casos fue $1.00 \cdot 10^{-5}$ M (que debe dar un valor de la coordenada R de 118), mientras que el resto de AB fueron añadidas en diferentes proporciones. En este caso, los resultados fueron diferentes para cada una de las aminas.

Por un lado, las reacciones en las que la tiramina se encontraba en presencia de putrescina y cadaverina dieron valores estadísticamente similares a los obtenidos solo con tiramina. Por otra parte, en presencia de histamina, cuando esta se encuentra en una concentración superior a 10 veces la concentración de tiramina, la señal obtenida aumenta significativamente, lo que indica una menor formación de AuNPs (Tabla 9.8). Estos resultados indican que la histamina supone una interferencia al encontrarse en concentraciones 10 veces superiores a la de tiramina. Sin embargo, esta interferencia se puede considerar aceptable teniendo en cuenta que, en las muestras con alto contenido en tiramina, la concentración de histamina es del orden o menor que la del analito, por lo que el método puede aplicarse con seguridad.

Tabla 9.8: Valores de la coordenada R obtenidos en la reacción con tiramina en presencia de histamina.

Proporción Hist:Tir	Coordenada R
0:1	118
2:1	114
5:1	114
10:1	126
15:1	136
20:1	135
30:1	139
40:1	148
50:1	152

9.6 Reacción de las Au-Tect@PLA con NAD(P)H

Una vez comprobada la capacidad de los tectómeros para inmovilizar el Au(III) y formar AuNPs que puedan relacionarse con la concentración de tiramina añadida, se pasó a su implementación en la determinación de alcaloides del tropano. Como se ha dicho, el uso de tectómeros como soportes de sensores puede aportar prestaciones distintas a la inmovilización sobre soportes de celulosa. Con este propósito, se comenzó observando si la reacción entre el Au(III) y el NADPH tenía lugar en el sensor optimizado en los apartados anteriores.

Para ello, se elaboraron dos calibraciones añadiendo diferentes concentraciones de NADPH sobre las Au-Tect@PLA. En una de ellas el NADPH estaba disuelto en pH 6 y en la otra en pH 7 (ambas con disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de concentración 0.1 M). Tras tres horas de reacción a 25°C, se tomaron medidas de las coordenadas RGB, obteniéndose los resultados de la Figura 9.16.

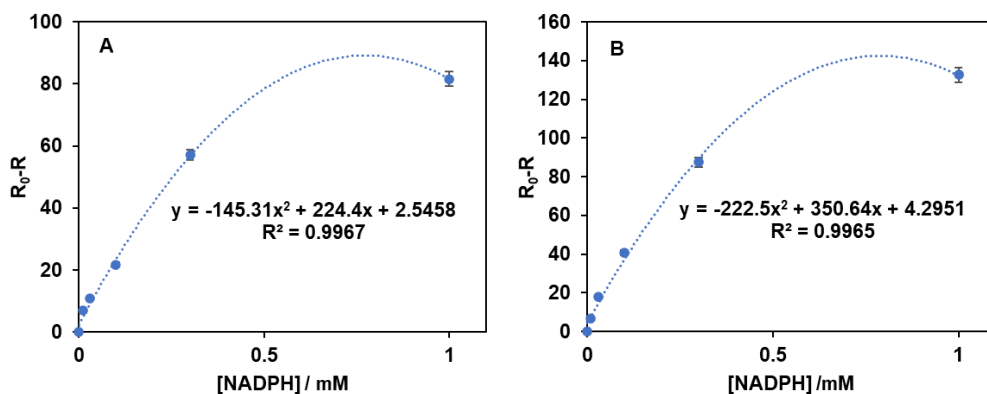


Figura 9.16: Calibraciones obtenidas variando la concentración de NADPH añadida sobre las Au-Tect@PLA. **A)** pH=6 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M). **B)** pH=7 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M).

En estas curvas de calibrado se puede observar que se obtienen buenos resultados a ambos valores de pH, no obstante, la sensibilidad con pH 7 es algo mayor, por lo que fue el pH escogido para los siguientes experimentos, que además coincide con el obtenido como óptimo en la reacción entre el Au(III) y el NADPH en disolución del Capítulo 7. Las características analíticas obtenidas para ambas curvas se muestran en la Tabla 9.9.

Tabla 9.9: Características analíticas obtenidas para las curvas de la Figura 9.16.

pH	6	7
LD	$1.55 \cdot 10^{-5}$ M	$9.87 \cdot 10^{-6}$ M
LC	$5.29 \cdot 10^{-5}$	$3.34 \cdot 10^{-5}$ M
Rango de respuesta	$5.20 \cdot 10^{-5} - 1.00 \cdot 10^{-3}$ M	$3.34 \cdot 10^{-5} - 1.00 \cdot 10^{-3}$ M
DER ($1.00 \cdot 10^{-4}$ M, n=5)	3.63%	2.96%

A la vista de estos resultados, se quiso comprobar si esta misma reacción funcionaba también con NADH. Para ello, la calibración de la Figura 9.16 a pH 7 se repitió empleando como analito NADH. Los resultados obtenidos para esta curva de calibrado se muestran en la Figura 9.17.

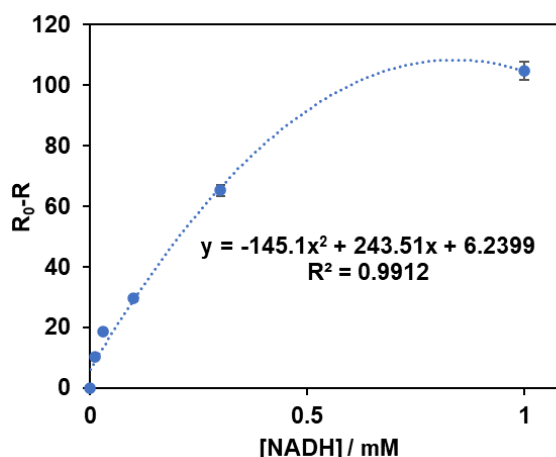


Figura 9.17: Curva de calibrado obtenida por reacción del NADH con las Au-Tect@PLA. pH=7 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M).

Estos resultados muestran que, igual que pasaba en la reacción en disolución entre el Au(III) y el NAD(P)H, la reacción aporta una mayor sensibilidad con NADPH que con NADH, al obtenerse con el primero una pendiente mayor. No obstante, en este caso la reacción con NADH sigue aportando buenos resultados, con unas características analíticas similares a las que proporciona el NADPH (Tabla 9.10).

Tabla 9.10: Comparación entre las características analíticas obtenidas para las curvas con NADH y NADPH a pH 7.

	NADH	NADPH
LD	$1.42 \cdot 10^{-5}$ M	$9.87 \cdot 10^{-6}$ M
LC	$4.85 \cdot 10^{-5}$	$3.34 \cdot 10^{-5}$ M
Rango de respuesta	$4.85 \cdot 10^{-5} - 1.00 \cdot 10^{-3}$ M	$3.34 \cdot 10^{-5} - 1.00 \cdot 10^{-3}$ M
DER ($1.00 \cdot 10^{-4}$ M, n=5)	2.58%	2.96%

Al comparar los resultados obtenidos usando soportes de celulosa con estos obtenidos con tectómeros, prácticamente las características analíticas, en cuanto a rango dinámico, sensibilidad, límite de cuantificación y precisión son muy similares, por lo que el uso de uno u otro vendrá dado por las características de la aplicación que se quiera desarrollar.

9.7 Acoplamiento de la reacción de oxidación de la tropina

Tras comprobar que la reacción entre el NAD(P)H y el Au(III) inmovilizado en el tectómero tiene lugar, se quiso acoplar la reacción previa; es decir, la oxidación de tropina a tropinona por medio de la enzima tropinona reductasa, de forma que el NAD(P)H generado en esta reacción actúe como reductor del Au(III) inmovilizado.

Para esto, en primer lugar, se inmovilizó NAD en el tectómero junto al Au(III). Se hicieron pruebas con dos concentraciones: $1.00 \cdot 10^{-3}$ M y $1.00 \cdot 10^{-4}$ M. Las láminas se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.4, y añadiendo a esta mezcla disolución de NAD de la concentración correspondiente. Una vez secas las AuNAD-Tect@PLA, se hicieron reaccionar con tropina y TRasa probando diferentes concentraciones de ambas, y en diferentes disoluciones amortiguadoras. Se probaron valores de pH 7 y 8 con disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, y pHs 9 y 10 con disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$, todas ellas de concentración 0.1 M.

Tras dejar que reaccionaran durante varias horas, no se observó la formación de AuNPs en ninguna de las láminas. Esto se debe a que, como ocurría en disolución, para cada una de las reacciones del sistema se necesita un pH diferente, lo que hace que el sistema no funcione si se intenta llevar a cabo en una sola etapa.

Simultáneamente, se inmovilizó platino junto con el oro al preparar las Au-Tect@PLA (AuPt-Tect@PLA, en este caso) de modo que el Pt(II) facilite la reacción como sucede en disolución. Sin embargo, se encontró que ambos metales reaccionaban entre ellos durante el secado de las láminas, dando lugar a la formación de un precipitado de color negro que impedía observar una posterior reacción con NAD(P)H.

Al no conseguirse llevar a cabo la reacción en una sola etapa ni la inmovilización del platino, se estudió la posibilidad de oxidar la tropina en un vial a pH 10 junto con TRasa y NAD(P) (a pH 10), para posteriormente llevar la mezcla a pH 7 junto con Pt(II), depositarla sobre el sensor y que el NAD(P)H generado reduzca al Au(III) inmovilizado. Este estudio se hizo variando las concentraciones de NAD, tropina y Pt(II), encontrándose finalmente que la reacción funcionaba empleando

las siguientes condiciones: $[NAD] = 1.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[Tropina] = 1.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[TrpRed] = 0.022 \text{ mg/mL}$ y $[Pt(II)] = 1.20 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ a una temperatura de 25°C .

Partiendo de estas condiciones, se realizó un estudio de calibrado variando la concentración de tropina con el objetivo de comprobar si esta reacción era cuantitativa. Los resultados de esta curva de calibrado se muestran en la Figura 9.18.

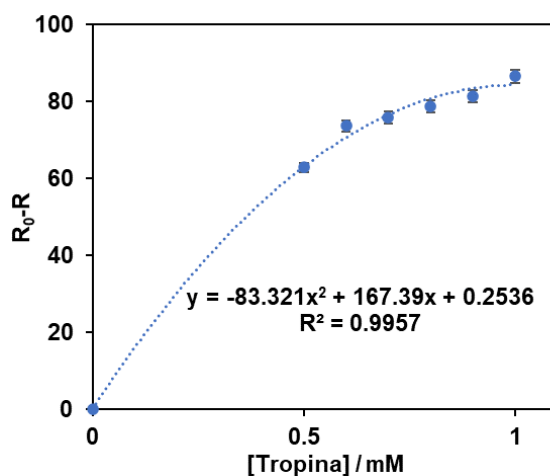


Figura 9.18: Curva de calibrado obtenida al incorporar la reacción de la tropina. $[NAD] = 1.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[TrpRed] = 0.022 \text{ mg/mL}$, $[Pt(II)] = 1.20 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH}=7$ ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M).

Las características analíticas obtenidas para esta curva se muestran en la Tabla 9.11.

Tabla 9.11: Características analíticas obtenidas para la curva de calibrado de la Figura 9.18.

LD	$5.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
LC	$5.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Rango de respuesta	$5.00 \cdot 10^{-4} \text{ M} - 1.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
DER ($1.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, n=5)	3.12%

En este caso, los límites de detección y cuantificación coinciden, ya que para concentraciones inferiores a $5.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ no se obtiene señal. Si bien el rango de respuesta no es muy amplio y la sensibilidad empeora bastante con respecto a la determinación de NAD(P)H, el sensor construido es útil como prueba de cribado

para la detección de tropina y atropina. No obstante, se requiere indagar más en un futuro en la optimización tanto de la preparación como como de la reacción posterior.

9.8 Conclusiones

Se ha comprobado la capacidad del tectómero 2T para la inmovilización de Au(III) sobre PLA y la formación de AuNPs mediante la reacción con el analito. Los primeros estudios se realizaron con tiramina como analito modelo y se ha conseguido una determinación semicuantitativa mediante el uso de la colorimetría digital (coordenada R) y cuantitativa mediante las medidas de reflectancia.

La implementación de la metodología para la determinación de AT, ha permitido comprobar su aplicación para determinar NAD(P)H, producto de la reacción enzimática. No obstante, al intentar inmovilizar todo el sistema de reacciones de la TRasa, los resultados no han sido buenos, al requerirse diferentes valores de pH en cada etapa de la reacción. A pesar de ello, el sensor funciona correctamente para la determinación semicuantitativa de tropina, siempre y cuando la reacción de oxidación del analito se lleve a cabo previamente.

Esta metodología es prometedora para aplicaciones en el control de calidad de alimentos, el envasado inteligente y el diagnóstico médico, ya que la versatilidad que ofrece la ausencia de enzimas puede permitir que esta metodología se extienda a la detección de una amplia gama de analitos. No obstante, se piensa que el problema puede estar, al igual que en el método en disolución, en el efecto de la adenina sobre el Au(III) que impide una reducción limpia y en un rango más amplio de condiciones. Los estudios futuros irán destinados a encontrar miméticos del NAD que, actuando adecuadamente como coenzimas, no afecten tanto a la capacidad oxidante del Au(III).

9.9 Bibliografía

- 9.1. Bovin N V., Tuzikov AB, Chinarev AA (2008) Oligoglycines: Materials with unlimited potential for nanotechnologies. *Nanotechnol Russ* 3:291–302. <https://doi.org/10.1134/s1995078008050042>
- 9.2. Tsygankova S V., Chinarev AA, Tuzikov AB, Zaitsev IS, Severin N, Kalachev AA, Rabe JP, Bovin N V. (2011) Assembly of Oligoglycine Layers on Mica Surface. *J Biomater Nanobiotechnol* 02:91–97. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2011.21012>
- 9.3. Garriga R, Jurewicz I, Romero E, Jarne C, Cebolla VL, Dalton AB, Muñoz E (2016) Two-Dimensional, pH-Responsive Oligoglycine-Based Nanocarriers. *ACS Appl Mater Interfaces* 8:1913–1921. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b10077>
- 9.4. Makrlík E, Toman P, Vanura P, Rathore R (2013) Interaction of protonated tyramine with a hexaarylbenzene-based receptor: Extraction and DFT study. *J Mol Struct* 1047:277–281. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.04.073>
- 9.5. Andersen G, Marcinek P, Sulzinger N, Schieberle P, Krautwurst D (2019) Food sources and biomolecular targets of tyramine. *Nutr Rev* 77:107–115. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy036>
- 9.6. Marcobal A, de las Rivas B, Landete JM, Tabera L, Muñoz R (2012) Tyramine and Phenylethylamine Biosynthesis by Food Bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 52:448–467. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500545>
- 9.7. 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>
- 9.8. Costa MP, Rodrigues BL, Frasao BS, Conte-Junior CA (2018) Biogenic Amines as Food Quality Index and Chemical Risk for Human Consumption. In *Food Quality: Balancing Health and Disease* 13:75–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811442-1.00002-X>

- 9.9. Ladero V, Calles M, Fernández M, Alvarez MA (2010) Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition & Food Science* 6:145–156. <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>
- 9.10. Doeun D, Davaatseren M, Chung MS (2017) Biogenic amines in foods. *Food Sci Biotechnol* 26:1463–1474 <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0239-3>
- 9.11. Romano A, Klebanowski H, La Guerche S, Beneduce L, Spano G, Murat ML, Lucas P (2012) Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/ densitometry. *Food Chem* 135:1392–1396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.022>
- 9.12. Jastrzębska A (2012) A comparative study for determination of biogenic amines in meat samples by capillary isotachopheresis with two electrolyte systems. *European Food Research and Technology* 235:563–572. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1783-y>
- 9.13. Önal A, Tekkeli SEK, Önal C (2013) A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem* 138:509–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.056>
- 9.14. Navarro J, Cepriá G, Camacho-Aguayo J, Martín S, González-Orive A, de Marcos S, Galbán J (2024) Towards new fluorometric methodologies base don the in-situ generation of gold nanoclusters. *Talanta* 266:. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125119>
- 9.15. Kudrev AG (2008) Calculation of equilibrium constants by matrix method for complexes of gold(III). *Talanta* 75:380–384. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.11.034>

SECCIÓN

IV

Capítulo 10: Metodologías para la determinación de precursores de alcaloides del tropano

Capítulo 10:

**Metodologías para la
determinación de precursores de
alcaloides del tropano**

10.1 Introducción

10.1.1 Alcaloides del tropano en alimentos: relación con putrescina y su aldehído

Al indagar en la biosíntesis de los alcaloides del tropano en las plantas explicada brevemente en el Capítulo 1, se observó que siguen una ruta bastante compleja que tiene su inicio en los aminoácidos arginina y glutamina [10.1]. La primera etapa del proceso se muestra en la Figura 10.1, donde se puede apreciar que a partir de ambos aminoácidos se llega a la formación de putrescina.

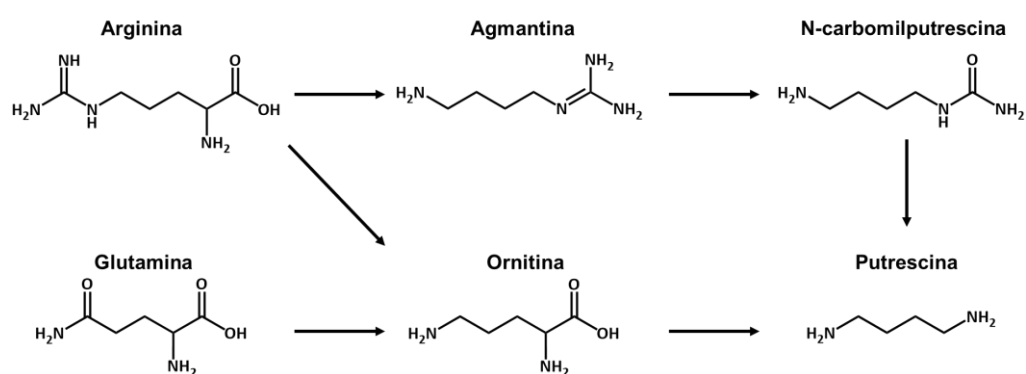


Figura 10.1: Biosíntesis de la molécula de putrescina.

La putrescina es una sustancia clave en todo el proceso, dado que a partir de ella empieza la ruta principal de la síntesis de AT (Figura 10.2), como ya se adelantó en el Capítulo 1. Esta ruta consiste en una serie de reacciones enzimáticas en cascada mediante la cual las plantas consiguen sintetizar tropina, que a su vez da lugar a atropina en primer lugar, y finalmente a escopolamina [10.2]. Dentro de esta ruta es especialmente importante mencionar el aldehído derivado de la putrescina; sustancia que se forma mediante la oxidación de metilputrescina por acción de la enzima Putrescina Oxidasa (PuO) y que tiene un papel importante en la degradación de aminas biógenas.

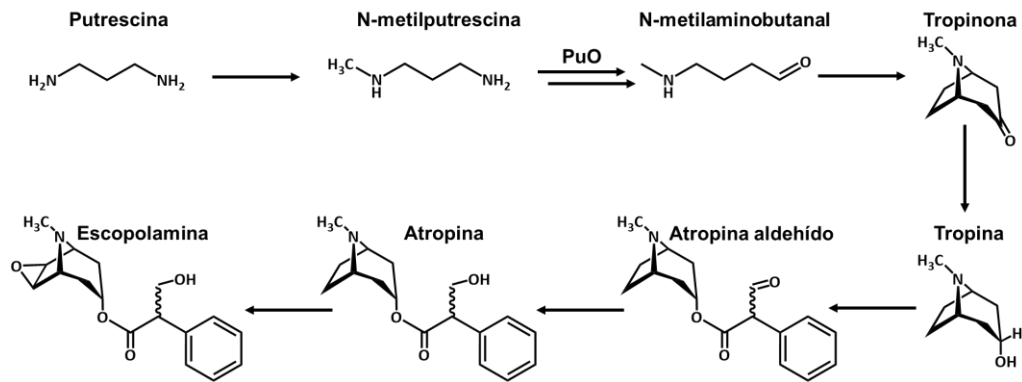


Figura 10.2: Biosíntesis de tropina, atropina y escopolamina a partir de putrescina.

La putrescina a su vez puede participar en otros tres procesos muy importantes para las plantas y animales.

1. Por un lado, es el punto de partida de una de las rutas de biosíntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA) (Figura 10.3). Este compuesto tiene una alta relevancia en la fisiología animal y, especialmente, en la humana porque es un neurotransmisor inhibitor con una participación activa en el estrés, ansiedad o incluso el sueño. Además, tiene también un importante papel en la fisiología vegetal, ayudando a las plantas a adaptarse a situaciones de estrés físico (alta concentración salina, frío, sequía, ...).

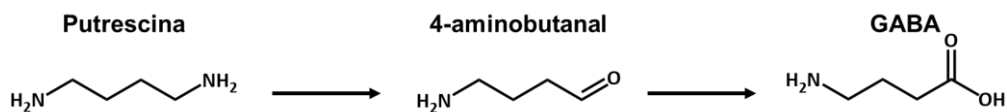


Figura 10.3: Biosíntesis de GABA a partir de putrescina.

2. Aparece como consecuencia de la degradación proteínica de los animales, con especial importancia en aquellos utilizados para la alimentación. Una vez se ha producido el sacrificio del animal para ser consumido, parte de las enzimas de su organismo siguen actuando, manteniendo activos algunos de los procesos biosintéticos, que ahora se convierten en rutas de degradación. Los aminoácidos arginina y glutamina sufren una ruta de degradación similar a la indicada en la Figura 10.1 hasta la aparición de putrescina, que posteriormente, siguiendo la indicada en la Figura 10.3, se degrada hasta la aparición de 4-aminobutanal (Figura 10.4).

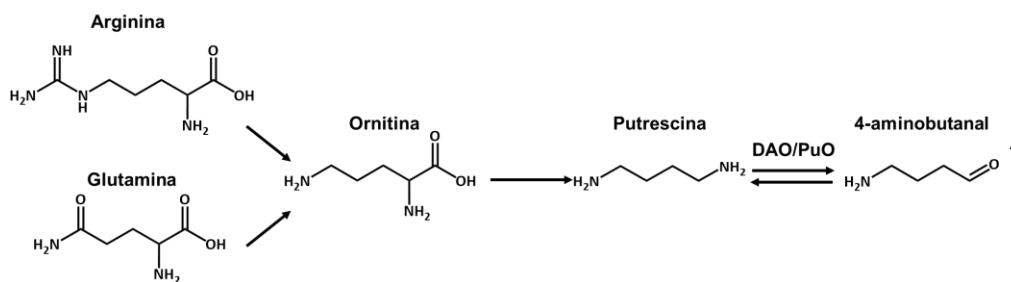


Figura 10.4: Degradación de aminoácidos a través de la formación de putrescina.

A diferencia del proceso biosintético (Figura 10.3), el proceso de degradación (Figura 10.4) termina en el aldehído, dado que este compuesto es muy volátil y acaba desapareciendo, generando el mal olor característico de la materia orgánica en descomposición [10.3].

Este es uno de los procesos que dan lugar a que los alimentos procedentes de animales (carne o pescado) se degraden hasta llegar a un punto en que su consumo resulta no apto o incluso perjudicial para el ser humano.

- Por último, la putrescina es capaz de reaccionar con nitritos para formar nitrosaminas, compuestos con un gran potencial carcinogénico [10.4]. Este proceso aparece tanto en la preparación del alimento para ser consumido (en función del tipo de cocinado) como durante el proceso de su ingestión en el propio organismo humano.

Los principales precursores de los AT junto con los procesos laterales en los que se ven involucrados aparecen resumidos de forma conceptual en la Figura 10.5.

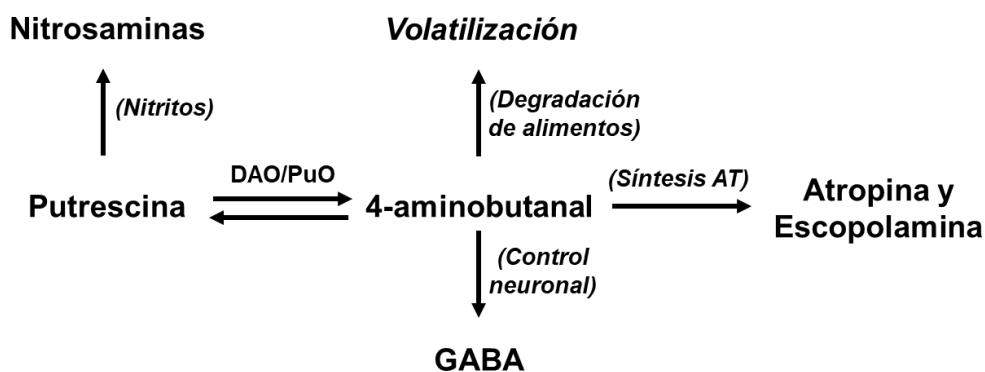


Figura 10.5: Compuestos clave en la síntesis de AT.

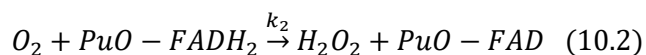
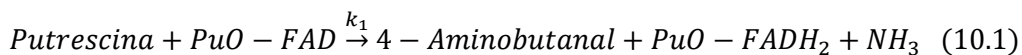
De este esquema se desprende que en la síntesis de AT juegan un papel fundamental dos compuestos: la putrescina y su aldehído. Además, estos compuestos participan en otros procesos; uno de los cuales, la degradación de alimentos, tiene una estrecha relación con los AT. En este sentido, mientras que los niveles de AT y nitrosaminas establecen un límite de peligrosidad en el consumo por contaminación con estos; la putrescina y su aldehído cuentan también con un límite sanitario en su consumo en alimentos, en este caso por su degradación.

10.1.2 Desarrollo de sensores para putrescina y su aldehído: estudios previos

Estudios previos del grupo de investigación [10.5] exploraron la determinación de putrescina en alimentos, acoplado una reacción indicadora con un colorante (3,3',5,5'-tetrametil bencidina, TMB) y la enzima HRP, a su oxidación con O₂ catalizada por la enzima Diamino Oxidasa (DAO). Como se puede ver en las figuras anteriores, la DAO es una de las dos enzimas que participan en la transformación de putrescina en su aldehído.

Partiendo de estos estudios y del contexto comentado anteriormente, esta parte de la Tesis busca poner en marcha el desarrollo de sensores que permitan la determinación rápida y eficaz de putrescina y su aldehído. Esto será de gran utilidad, por un lado, para hacer un estudio más integral de los procesos que dan lugar a la formación de los AT (y, en su caso, disponer de herramientas que permitan predecir su aparición); y, por otro, para la determinación de estos dos compuestos en alimentos en los que aparecen como productos de degradación.

Para este trabajo se sustituyó la DAO por PuO, que es la otra enzima capaz de catalizar la conversión de putrescina en su aldehído y que ofrece una mayor selectividad hacia esta amina biógena [10.6, 10.7]. Ambas enzimas catalizan la misma reacción de oxidación. La diferencia fundamental entre ambas radica en la coenzima de su centro activo. Mientras que la DAO emplea cobre como cofactor enzimático, la PuO es una flavoenzima, por lo que su centro activo es el FAD. La reacción en este caso transcurre de acuerdo con el siguiente esquema general:



En esta reacción, la putrescina reduce el centro activo de FAD a FADH₂, oxidándose para formar el 4-aminobutanal (10.1). Seguidamente, el oxígeno disuelto en el medio regenera el centro activo obteniéndose peróxido de hidrógeno (10.2).

En cuanto a la reacción indicadora usada, se consideraron dos que ya habían sido previamente ensayadas por el grupo de investigación:

1. Reacción indicadora con un colorante. Se trata de una reacción indicadora clásica (Figura 10.6).

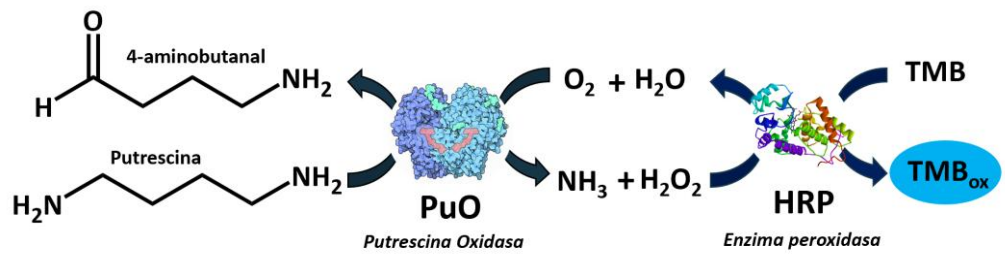


Figura 10.6: Esquema de reacciones empleadas en la determinación colorimétrica de putrescina.

En ella, el H₂O₂ se hace reaccionar con el colorante TMB (incoloro) para dar un producto oxidado azul en una reacción catalizada por la enzima HRP.

2. Reacción indicadora basada en la generación in-situ de AuNPs (Figura 10.7). En este caso, el reactivo cromógeno es el Au(III) que durante la reacción enzimática da lugar a la formación de las AuNPs. El proceso de reducción se lleva a cabo por intervención del aldehído, producto de la reacción.

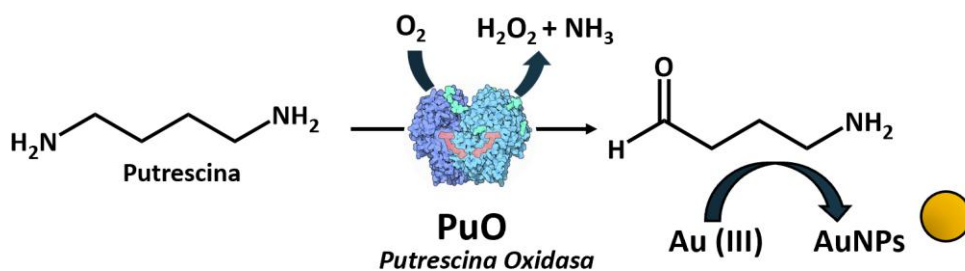


Figura 10.7: Esquema de reacciones empleadas en la determinación de putrescina por formación de AuNPs.

En la Tabla 10.1 se recogen de forma resumida las características analíticas obtenidas por ambas metodologías.

Tabla 10.1: Comparación de las características analíticas de ambos métodos.

Metodología	LD (M)	LC (M)	Rango Lineal (M)	DER (n=5)
HRP/TMB	$1.82 \cdot 10^{-7}$	$6.07 \cdot 10^{-7}$	$6.07 \cdot 10^{-7} - 6.00 \cdot 10^{-5}$	2.41 % ($4.00 \cdot 10^{-5}$ M)
AuNPs	$4.60 \cdot 10^{-5}$	$8.80 \cdot 10^{-5}$	$8.80 \cdot 10^{-5} - 8.00 \cdot 10^{-4}$	3.36 % ($4.00 \cdot 10^{-4}$ M)

Tomando como base estos resultados, el objetivo es desarrollar sensores que permitan la determinación de ambos compuestos, la putrescina por un lado y su aldehído por otro. La señal en estos sensores se obtendrá mediante medidas colorimétricas, realizadas con teléfono móvil y, por tanto, haciendo uso de coordenadas RGB.

10.2 Estudio de la reacción en soporte sólido: Reacción con TMB y HRP

10.2.1 Inmovilización de los reactivos en soportes de celulosa

Partiendo de los resultados previos que se habían obtenido en disolución, se procedió a inmovilizar los reactivos en soportes de celulosa. Utilizando las condiciones óptimas en disolución, se prepararon soportes de celulosa (apartado 3.3.3), inmovilizando TMB, HRP y PuO. Sin embargo, se observó que al

inmovilizar la HRP la reacción no tenía lugar, muy probablemente por la pérdida de su actividad una vez depositada.

La solución a este problema pasó por añadir esta enzima en el momento que se iniciara la reacción, observando una variación de la coordenada R a lo largo del tiempo (Figura 10.8), con la que se obtenía una mayor sensibilidad empleando el parámetro R_0-R , en un tiempo corto. Para las coordenadas G y B, los resultados obtenidos mostraban una peor sensibilidad, por lo que no se tuvieron en cuenta.

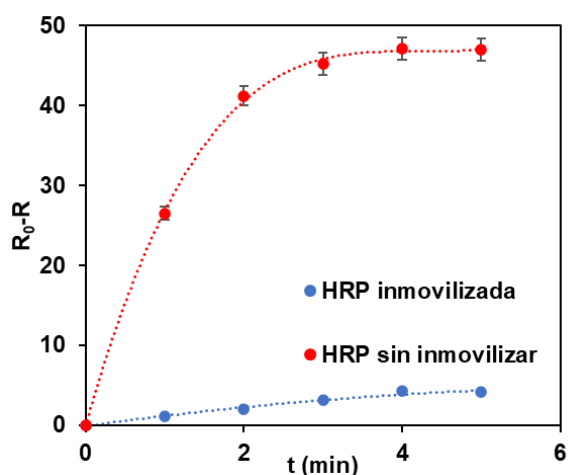


Figura 10.8: Variación del parámetro R_0-R al inmovilizar la HRP y al añadirla después.

10.2.2 Optimización de la concentración de PuO

Al tratarse de una reacción que se lleva a cabo en un soporte sólido es importante estudiar el efecto de la concentración de enzima dado que el medio puede afectar tanto a la cinética como al equilibrio final. Se estudiaron diferentes concentraciones de PuO (10, 15 y 25 μM) manteniendo fija la concentración de TMB ($6.00 \cdot 10^{-4}$ M). Preparados los soportes, se añadió sobre ellos una disolución que contenía putrescina de concentración $1.00 \cdot 10^{-4}$ M y HRP en una concentración de 0.50 U/mL.

Se estudió la cinética de la reacción utilizando las coordenadas RGB durante los primeros 8 minutos, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 10.9.

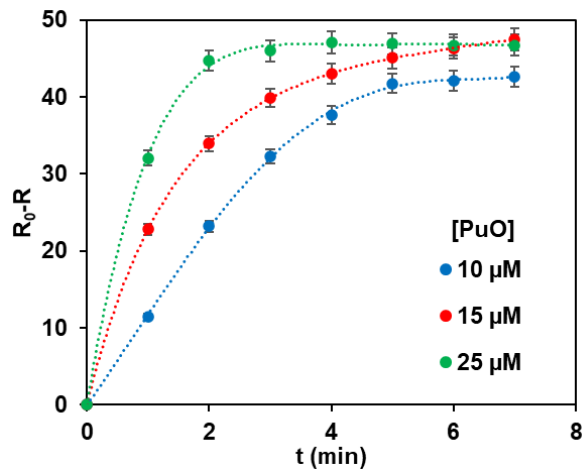


Figura 10.9: Variación del parámetro R_0-R en función del tiempo para las reacciones de los soportes de celulosa con diferentes concentraciones de PuO. $[TMB] = 6.00 \cdot 10^{-4}$ M, $[HRP] = 0.225$ U/mL, $[Putrescina] = 1.00 \cdot 10^{-4}$ M, $pH = 7$ ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ C$.

Como es de esperar, al aumentar la concentración de PuO el proceso es más rápido; sin embargo, para las dos últimas concentraciones la señal final es la misma. Esto indica que aumentando la concentración de enzima se podrían conseguir medidas más rápidas, pero no una mayor conversión, por lo que se considera que un mayor gasto de enzima no supondrá una mejora importante en la determinación, ya que con $25 \mu M$ la reacción se estabiliza en 4 minutos. Esta concentración fue la escogida como óptima.

10.2.3 Características analíticas

Utilizando las condiciones óptimas, para elaborar la recta de calibrado, los soportes se hicieron reaccionar con la concentración requerida de HRP (0.225 U/mL) y diferentes concentraciones de putrescina (0 , $2.00 \cdot 10^{-5}$, $4.00 \cdot 10^{-5}$, $6.00 \cdot 10^{-5}$, $8.00 \cdot 10^{-5}$, $1.00 \cdot 10^{-4}$ y $2.00 \cdot 10^{-4}$ M). De cada una de las concentraciones se elaboraron 3 réplicas (Figura 10.10).

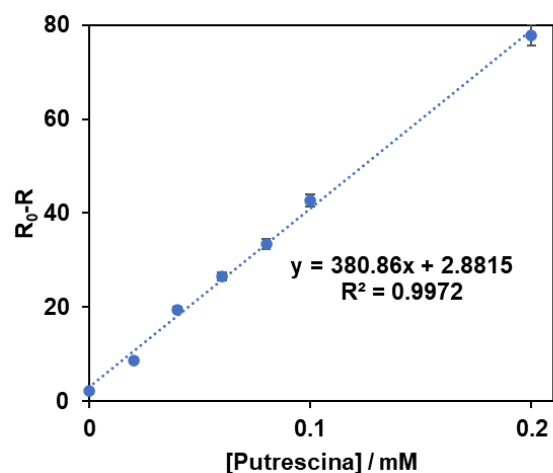


Figura 10.10: Recta de calibrado elaborada empleando diferentes concentraciones de putrescina. $[TMB] = 6.00 \cdot 10^{-4}$ M, $[HRP] = 0.225$ U/mL, $[PuO] = 25$ μ M, pH = 7 ($H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ C$.

Las características analíticas obtenidas para esta recta se muestran en la Tabla 10.2.

Tabla 10.2: Características analíticas obtenidas para la recta de la Figura 10.10.

LD	$5.62 \cdot 10^{-6}$ M
LC	$1.91 \cdot 10^{-5}$ M
Rango Lineal	$1.91 \cdot 10^{-5} - 2.00 \cdot 10^{-4}$ M
DER ($6.00 \cdot 10^{-5}$, n=5)	1.97 %

Estas características analíticas ofrecen grandes posibilidades para el desarrollo de un sensor que permita la determinación de putrescina en diferentes tipos de muestras, tanto de origen animal como de origen vegetal y, por tanto, alcanzar el doble objetivo propuesto.

10.3 Sensor basado en la formación de AuNPs I: Putrescina

10.3.1 Fundamento teórico

Para desarrollar un sensor que permita la determinación del aldehído no es posible usar la reacción enzimática anterior ya que parte de que el aldehído es el

producto formado y no interviene en la reacción indicadora posterior. Sin embargo, según se ha indicado antes, el uso de Au(III) como sistema indicador se basa en la capacidad del aldehído para reducir al ion precursor, esperando que el sistema sea capaz de estabilizar el Au⁰ en forma de nanopartícula. Los estudios realizados previamente en el grupo indican que es la propia enzima de la reacción (PuO) quien puede ejercer esa función estabilizante.

Según este sistema de reacciones, el desarrollo de un sensor para el aldehído se podría basar directamente en la reacción de este con el Au(III), sin una reacción enzimática previa. No obstante, esto plantea dos problemas diferentes. Por un lado, la ausencia de selectividad en la determinación, al carecer de la especificidad que aporta la reacción enzimática; y, por otro, la falta de un agente estabilizador que facilite que el Au(III) reducido a Au⁰ por el aldehído se estabilice en forma de AuNP.

De este modo, el procedimiento del trabajo desarrollado en este apartado se basa en las siguientes hipótesis:

- La selectividad se puede conseguir haciendo uso de la volatilidad del 4-aminobutanol. Si la determinación, en lugar de llevarse a cabo en el medio sólido/líquido en el que este se encuentra, tiene lugar en la fase gaseosa en contacto con ella, se reduce sensiblemente el número de interferencias potenciales.
- Si la reacción entre el Au(III) y el aldehído en fase gas se lleva a cabo en un soporte sólido adecuado, este puede actuar como estabilizador de las AuNPs formadas.

Para estudiar la viabilidad del proceso es necesario disponer de una fuente del compuesto volátil. La mejor manera es precisamente utilizar putrescina como precursora y someterla a la reacción enzimática (10.1). El 4-aminobutanol generado se podría determinar por su posterior reacción con el Au(III). Esto permite a su vez evaluar la posibilidad de usar este sistema para la determinación de putrescina.

10.3.2 Ensayos previos

Se planteó un dispositivo similar al empleado hasta ahora con soportes de celulosa. Se trata de una placa de 96 pocillos que dispone de una tapa para

cerrarla. Es en dicha tapa donde se va a fabricar el sensor. Para ello, en cada uno de los orificios se deposita un pequeño volumen de una disolución que contiene Au(III) en celulosa y se deja secar al aire; las condiciones usadas para esta preparación son las indicadas en el apartado 3.3.2.

Una vez se había preparado la tapa con los soportes de celulosa y estos se habían secado, en sus correspondientes pocillos se añadió una disolución de putrescina $1.00 \cdot 10^{-3}$ M y PuO $5.00 \cdot 10^{-6}$ M, en un volumen total de 50 μ L (inferior al total de cada pocillo, 350 μ L). Tras colocar la tapa sobre la placa de pocillos, se tapa todo el conjunto con Parafilm. La reacción esperada consiste en que la putrescina se oxide al aldehído volátil, este salga de la disolución y alcance la lámina de celulosa, reaccionando con el Au(III) y dando lugar a la formación de AuNPs en ella.

Para observar la señal producida por el blanco de reacción, se repitió el mismo procedimiento en otra placa sustituyendo las disoluciones de putrescina y PuO del pocillo por disolución amortiguadora. La Figura 10.11 muestra los resultados obtenidos tanto para la reacción como para el blanco una vez transcurridas 24 horas. Tras tomar medidas de las coordenadas RGB de estas reacciones, se observó que la que mayor sensibilidad aportaba era la coordenada G, ya que con R y B no se observaba una tendencia ni con el tiempo de reacción, ni con la concentración de analito.

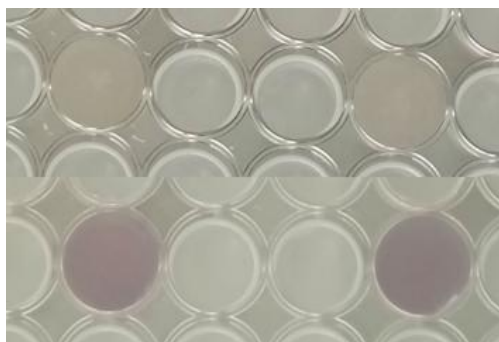


Figura 10.11: Resultados obtenidos para la reacción con putrescina (abajo) y para los blancos de reacción (arriba) tras 24 horas.

Este resultado muestra que la reacción es viable, al obtenerse AuNPs sin que el sensor con el Au(III) esté en contacto con la disolución de putrescina.

10.3.3 Optimización de las condiciones experimentales

En vista de los buenos resultados, se realizó una optimización secuencial de los parámetros de la reacción atendiendo a los siguientes factores:

10.3.3.1 Tiempo de reacción

Para este estudio se prepararon soportes de celulosa del mismo modo que en el apartado anterior que, en grupos de tres, se hicieron reaccionar con cuatro concentraciones diferentes de putrescina: 0, $5.00 \cdot 10^{-4}$, $1.00 \cdot 10^{-3}$ y $5.00 \cdot 10^{-3}$ M. La concentración de PuO añadida en el pocillo junto con la putrescina fue de $5.00 \cdot 10^{-6}$ M.

Para observar la evolución de la reacción, se tomaron medidas de las placas durante 6 horas. En la Figura 10.12, se puede observar la evolución temporal del parámetro G_0-G en cada una. Esta Figura muestra que, a medida que aumenta la concentración de putrescina, la cinética se acelera; pero con el tiempo las señales de todas las concentraciones se terminan igualando, por lo que se elige como tiempo de reacción óptimo 3 horas.

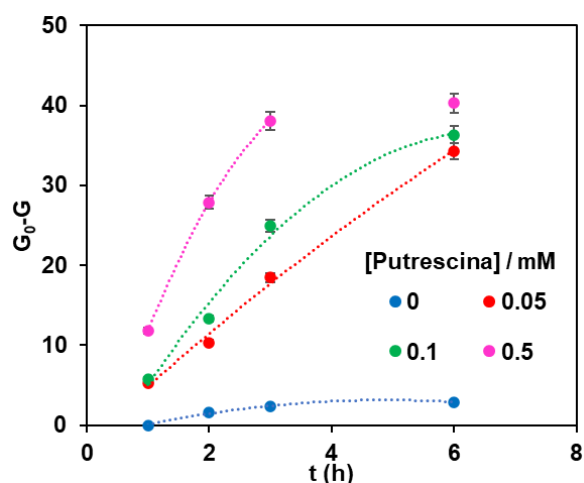


Figura 10.12: Parámetro G_0-G de las AuNPs obtenidas a diferentes tiempos para diferentes concentraciones de putrescina. $[Au(III)] = 1.00 \cdot 10^{-3}$, $[PuO] = 5.00 \cdot 10^{-6}$ M, pH = 8 ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ C$.

10.3.3.2 Concentración de Au(III)

Se estudió el empleo de tres concentraciones de Au(III) ($5.00 \cdot 10^{-4}$, $7.50 \cdot 10^{-4}$ y $1.00 \cdot 10^{-3}$ M), para la preparación de las suspensiones de celulosa. Los soportes preparados con estas concentraciones de Au(III) se hicieron reaccionar con putrescina $1.00 \cdot 10^{-3}$ M y PuO $5.00 \cdot 10^{-6}$ M. La Figura 10.13 muestra una imagen de las reacciones obtenidas transcurridas las tres horas de reacción.

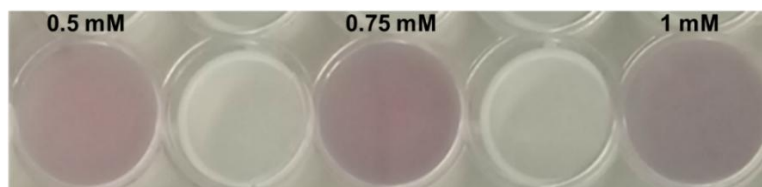


Figura 10.13: AuNPs obtenidas empleando diferentes concentraciones de oro. [Putrescina] = $1.00 \cdot 10^{-3}$ M, [PuO] = $5.00 \cdot 10^{-6}$ M, pH = 8 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M), T^{a} = 25°C .

En la Tabla 10.3 se recogen los valores medios obtenidos para el parámetro G_0 -G de cada concentración de Au(III), obteniéndose una mayor señal a medida que aumenta la concentración de Au(III) inmovilizada. De este modo se escoge como concentración óptima $1.00 \cdot 10^{-3}$.

Tabla 10.3: Resultados de la optimización de la concentración de Au(III). [Putrescina] = $1.00 \cdot 10^{-3}$ M, [PuO] = $25 \mu\text{M}$.

[Au(III)] / M	$5.00 \cdot 10^{-4}$	$7.50 \cdot 10^{-4}$	$1.00 \cdot 10^{-3}$
Media	26.0	26.5	31.7
DER	3.85%	1.98%	6.57%

10.3.3.3 pH y concentración de la disolución amortiguadora empleada para preparar los soportes

En los estudios previos en disolución se había observado que era necesario el empleo de disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ para la estabilización de las AuNPs, por lo que únicamente se estudió su concentración (haciendo pruebas con 0.1 y 0.3 M) y su pH (6, 7 y 8). Tras preparar soportes de celulosa empleando todas las combinaciones posibles entre estos dos parámetros, se hicieron reaccionar con putrescina $1.00 \cdot 10^{-3}$ M y PuO $5.00 \cdot 10^{-6}$ M, obteniendo los

resultados mostrados en la Figura 10.14. En estos resultados se observa un aumento en la formación de nanopartículas según aumenta el pH, mientras que un incremento de la fuerza iónica impide la formación de estas.

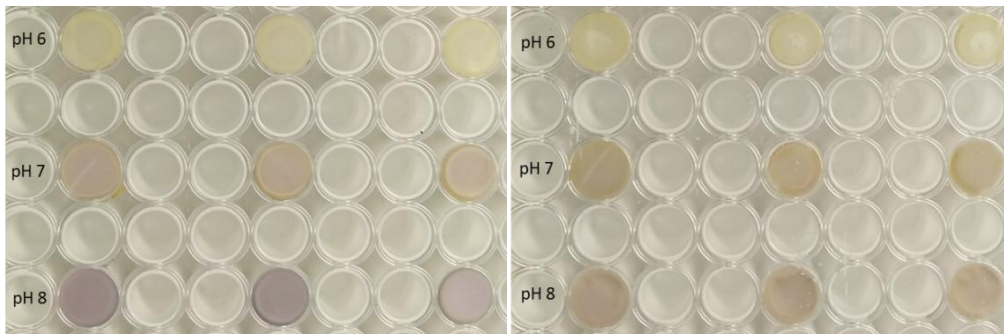


Figura 10.14: Resultados obtenidos en la formación de AuNPs en el soporte empleando diferentes disoluciones amortiguadoras. La imagen de la izquierda muestra los soportes preparados empleando disolución de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M, mientras que en la derecha aparecen los preparados con 0.3 M. $[\text{Putrescina}] = 1.00 \cdot 10^{-3}$ M. $[\text{PuO}] = 5.00 \cdot 10^{-6}$ M, $T^a = 25^\circ\text{C}$.

Tras tomar medidas de las coordenadas RGB de los soportes transcurridas las 3 horas de reacción (Tabla 10.4), se escogieron como valores óptimos los obtenidos para pH 8 y concentración de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M, al ser la combinación que aporta una mayor señal para el parámetro G_0-G . Si bien es cierto que a pHs superiores parece que la reacción podría funcionar mejor, un valor de pH más elevado haría que la celulosa perdiera su estructura, restando estabilidad al soporte.

Tabla 10.4: Promedio del parámetro G_0-G obtenido en la medida de los soportes de la Figura 10.15.

$[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}] / \text{M}$	0.1	0.3
pH 6	0.4	0.5
pH 7	10.5	14.0
pH 8	25.3	18.2

10.3.3.4 Concentración de PuO

Puesto que, en este primer estudio, se está buscando la determinación de putrescina, se hicieron reaccionar soportes de celulosa preparados en las

condiciones optimizadas en el apartado anterior con diferentes concentraciones de enzima, colocando PuO en concentraciones de $2.50 \cdot 10^{-6}$, $5.00 \cdot 10^{-6}$, $6.00 \cdot 10^{-6}$ y $1.00 \cdot 10^{-5}$ M. En cuanto a la putrescina, la concentración empleada fue $1.00 \cdot 10^{-3}$ M. Una vez se hubo completado la reacción, se tomaron medidas de las coordenadas RGB de los soportes (Figura 10.15), obteniendo los resultados de la Tabla 10.5. Estos resultados muestran que la señal obtenida no sufre una variación significativa con la concentración de enzima, lo que indica que tras 3 horas de reacción la limitación no se encuentra en la reacción enzimática, sino en la formación de las AuNP. Para observar cambios en función de la concentración de enzima, sería necesario bajar mucho la concentración, lo cual no es consistente con las concentraciones presentes en muestras reales.

Es por ello, que se escogió $5.00 \cdot 10^{-6}$ M para seguir trabajando en las mismas condiciones que se habían empleado hasta el momento.

Tabla 10.5: Variación de la señal obtenida con distintas concentraciones de PuO.

[PuO] / M	$2.50 \cdot 10^{-6}$	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$6.00 \cdot 10^{-6}$	$1.00 \cdot 10^{-5}$
G₀-G	23.2 ± 1.2	25.9 ± 1.3	21.2 ± 1.1	21.5 ± 1.1

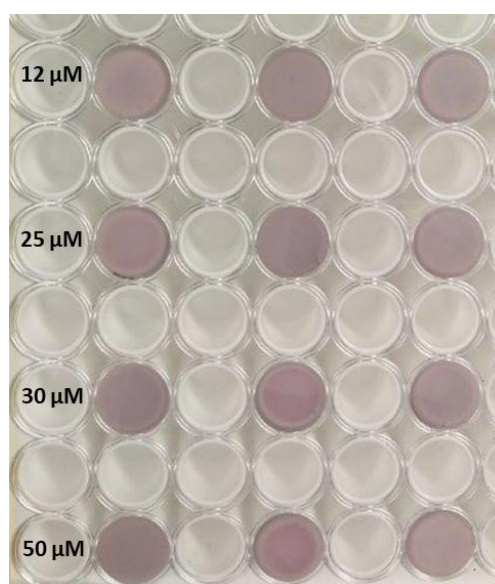


Figura 10.15: Imagen de los soportes empleados en el estudio. [Putrescina] = $1.00 \cdot 10^{-3}$ M, pH = 8 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ\text{C}$.

10.3.4 Características analíticas

Una vez optimizados los soportes y la reacción de estos con putrescina y PuO, se elaboró una curva de calibrado variando la concentración de putrescina, para lo cual se emplearon las siguientes concentraciones: 0, $5.00 \cdot 10^{-4}$, $1.00 \cdot 10^{-3}$, $2.00 \cdot 10^{-3}$, $3.00 \cdot 10^{-3}$, $4.00 \cdot 10^{-3}$ y $5.00 \cdot 10^{-3}$. Tras reaccionar los sensores, se tomaron medidas de las coordenadas RGB obteniendo la curva que se muestra en la Figura 10.16.

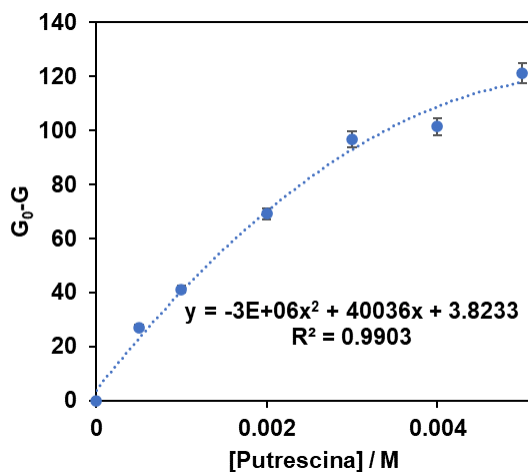


Figura 10.16: Recta de calibrado elaborada empleando diferentes concentraciones de putrescina. $[Au(III)] = 1.00 \cdot 10^{-3}$ M, $[PuO] = 2.50 \cdot 10^{-6}$ M, pH = 8 ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 M), $T^a = 25^\circ C$.

Las características analíticas de este método están recogidas en la Tabla 10.6.

Tabla 10.6: Características analíticas obtenidas para la curva de la Figura 10.17.

LD	$4.00 \cdot 10^{-4}$ M
LC	$1.36 \cdot 10^{-3}$ M
Rango Dinámico	$1.36 \cdot 10^{-3} - 5.00 \cdot 10^{-3}$ M
DER ($2.00 \cdot 10^{-3}$, n=5)	4.26 %

10.4 Sensor basado en la formación de AuNPs II: 4-aminobutanal y envases inteligentes

10.4.1 Consideraciones previas

Los resultados mostrados en el apartado anterior demuestran que es posible la reacción entre el 4-aminobutanal y el Au(III) en soportes de celulosa para dar lugar a la formación de AuNPs. Dichos resultados demuestran que es posible la determinación de putrescina y de 4-aminobutanal con estos dispositivos. Es por ello, que es este apartado se decidió ir un paso más allá.

Se ha indicado que la degradación de los alimentos de origen animal, especialmente la carne, dan lugar a la aparición de putrescina y posteriormente de 4-aminobutanal (Figura 10.4), responsable principal del olor de la carne en mal estado. Es por ello que se ha estudiado si estos sensores basados en soportes de celulosa con Au(III) inmovilizado podrían servir para detectar la presencia de este volátil en alimentos; en particular en carne picada de cerdo envasada, y de este modo, emplearlos como potenciales dispositivos para envases inteligentes.

Si bien esta muestra no es la adecuada para relacionar la concentración de putrescina con la de alcaloides del tropano, debido a que la mayor presencia de estos últimos en alimentos se da en semillas de cereales o legumbres; es un buen punto de partida para aplicaciones posteriores en esa dirección.

10.4.2 Aplicación en envases alimenticios

Para estudiar la aplicación del sensor, en primer lugar, se simuló un envase autoindicador. Para esto, en un envase de plástico con tapa, se colocaron las celulosas con el Au(III) inmovilizado en la parte interior de ésta. El procedimiento seguido consistió en cortar una tapa de un vial Eppendorf, y sobre ella, inmovilizar la suspensión de celulosa (Figura 10.17). Una vez seca la suspensión, la tapa del Eppendorf se pegó con cinta de doble cara transparente sobre la parte superior interna del envase.

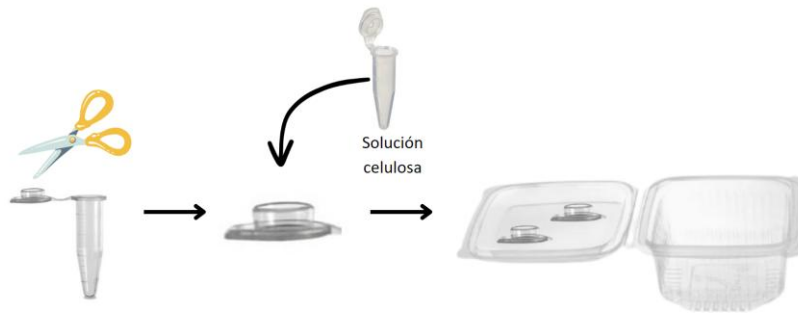


Figura 10.17: Esquema de preparación de los envases con los sensores implementados.

Como primera prueba se comprobó la diferencia de señal obtenida entre envases con carne y vacíos (blanco). Se prepararon 16 soportes sólidos en tapas de viales Eppendorf y se pegaron cuatro de ellos en la tapa de cada uno de los envases empleados. En dos de estos envases se colocaron 30 g de carne (M1 y M2), en otro algodón mojado simulando la humedad de la carne (M3) y el cuarto se dejó vacío (M4). Tras sellarlos y guardarlos en la nevera, se observó su evolución con el paso de los días. La Figura 10.18 muestra el resultado tras una semana.

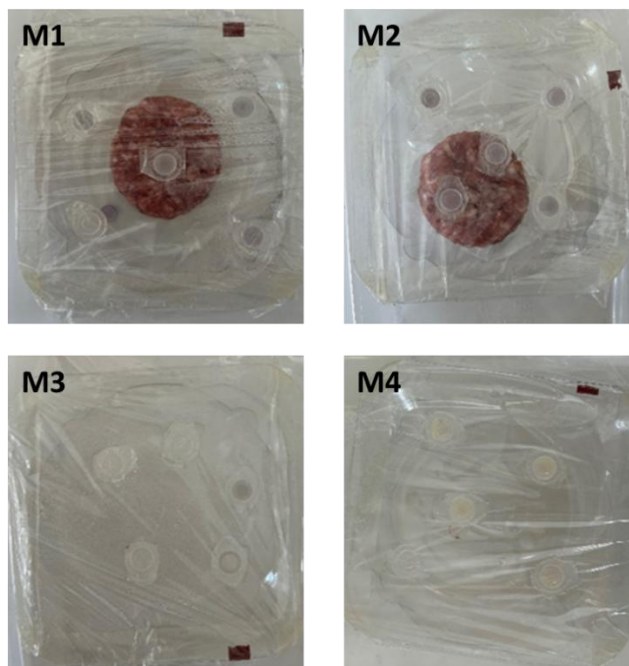


Figura 10.18: Envases con los soportes inmovilizados tras una semana de reacción en la nevera. M1: 30 g de carne, M2: 30 g de carne, M3: algodón húmedo, M4: aire.

En esta figura se puede observar un cambio de coloración indicativo de la formación de AuNPs en los sensores de los envases con muestras de carne. El envase vacío no dio señal. Por otra parte, en el envase que contenía algodón húmedo (M3) se observó un ligero color grisáceo.

No obstante, debido a la humedad de las muestras se formó condensación en el interior de los envases, y al abrirlos se observó que los soportes estaban muy húmedos también, lo que podría afectar a la reacción, ya que en un envase real esta condensación no tiene lugar. Además, algunos de los soportes se cayeron y aparecieron en el fondo del envase.

10.4.3 Reducción de la humedad de los envases

Para solventar el problema de la captación de humedad por parte de los sensores se realizó una prueba con teflón (politetrafluoroetileno, PTFE), cuyas principales características son la permeabilidad a los gases y la hidrofobicidad. La idea es recubrir las láminas de celulosa con una fina lámina de este material con el objetivo de que permitiera pasar al aldehído encargado de la formación de las AuNPs pero no al agua.

Para ello, se prepararon 4 soportes de celulosa como en el apartado 3.3.2 en dos tapas de placas distintas. En una de las placas se añadió únicamente $\text{PuO } 5.00 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ y en la otra una disolución de putrescina $5.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ y $\text{PuO } 5.00 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Antes de cerrar las placas se dispuso sobre ellas una lámina de teflón de forma que este separa los pocillos con las disoluciones de los soportes sensores de celulosa como se muestra en la Figura 10.19.

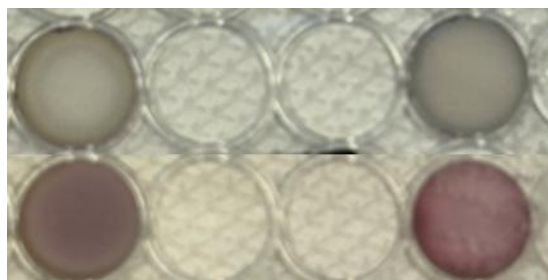


Figura 10.19: Formación de AuNPs en el soporte de celulosa interponiendo una lámina de teflón entre la disolución de putrescina y el soporte. Arriba: Blanco. Abajo: $[\text{Putrescina}] = 5.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

La Figura 10.19 muestra que el aldehído que reacciona con el sensor sí es capaz de sobrepasar la lámina de teflón y, además, la humedad no llega al soporte de celulosa. Con este resultado, se decidió modificar el diseño del sensor para incorporar una lámina de teflón que lo aislara de la humedad. Esto se llevó a cabo añadiendo una capa de cinta de teflón a cada sensor como se muestra en el esquema de la Figura 10.20.

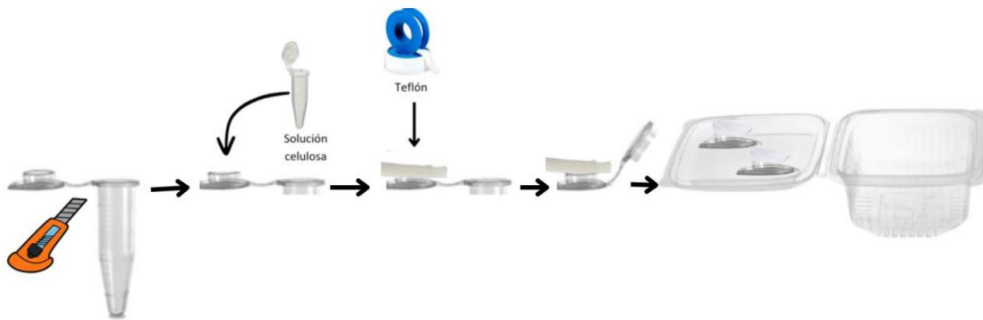


Figura 10.20: Esquema de inmovilización de los soportes en el envase incorporando teflón.

Por otra parte, algunos de los soportes se pegaron a la tapa del envase con cinta aislante negra en lugar de incolora, para observar si la luz tenía algún tipo de efecto sobre la reacción.

Una vez preparados los soportes y, tras inmovilizarlos en dos envases diferentes, en uno de ellos se puso una muestra de 30 g de carne y en el otro algodón mojado que actuó de blanco (Figura 10.21).

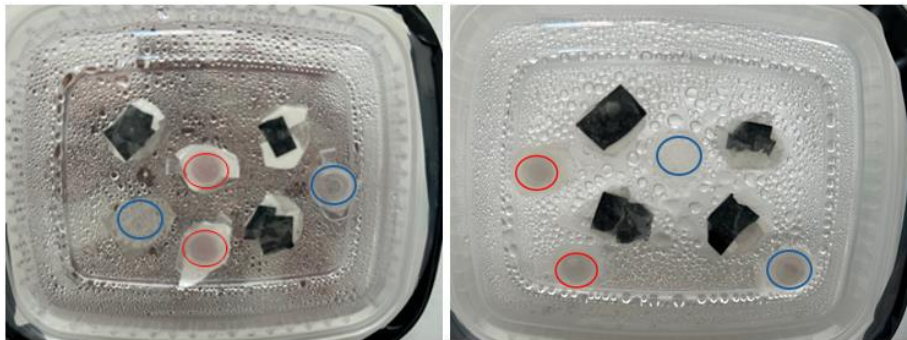


Figura 10.21: Reacción en los soportes con y sin teflón tras una semana en la nevera. Izquierda: 30 g de carne. Derecha: Algodón mojado.

En la Figura 10.21 se puede observar la diferencia entre los soportes con teflón (círculo rojo) y los que no tenían teflón (círculo azul), viéndose que los primeros evitaban la captación de humedad mientras que los segundos no. En cuanto a los blancos, la señal gris observada anteriormente mejoraba (menos señal) al disminuir la humedad. En cuanto a los sensores colocados en ausencia de luz, no se observó ninguna diferencia con respecto al resto, por lo que se descartó esta opción.

Por otra parte, se estudió como evitar la formación de humedad dentro del envase. La condensación ocurre al alcanzar el punto de rocío, temperatura a la cual el aire está saturado en vapor de agua (100% humedad relativa) [10.8]. Para confirmar nuestra hipótesis se midió la temperatura y humedad relativa (HR) del laboratorio con un psicómetro; el resultado fue una temperatura de 25° y una humedad relativa de aproximadamente 50% HR. Los datos obtenidos se llevaron al diagrama psicométrico para obtener una temperatura de punto de rocío de 13.3°C. Esto quiere decir que si almacenamos el envase a una temperatura inferior a 13°C se superará la temperatura del punto de rocío y condensará agua en el interior. Como se ha llevado el envase a una temperatura de 4°C, va a condensar agua en el interior del envase.

Para evitar este problema lo ideal es mantener la cadena de frío durante todo el procesamiento. Este es uno de los motivos por los que en las industrias cárnicas se trabaja siempre a temperatura de refrigeración (4°C) durante todo el proceso de elaboración, producción y distribución.

Debido a la imposibilidad de trabajar en el laboratorio siguiendo la cadena de frío se decidió añadir sales absorbentes de humedad dentro del envase que, si bien no es una opción adecuada para colocar en envases alimentarios, permitieron continuar con el trabajo en unas condiciones similares.



Figura 10.22: Envase tras una semana de reacción con sales absorbentes de humedad.

La Figura 10.22 muestra los resultados obtenidos tras una semana. Durante los 2 primeros días, las sales absorbentes cumplieron su función sin observarse condensación dentro de los envases. Sin embargo, a partir del tercer día comenzaron a formarse pequeñas gotas, seguramente debido a la saturación de las sales. Aun así, la humedad formada dentro del envase fue menor que en los casos anteriores.

Una vez obtenida una señal lo suficientemente clara, se estudió a partir de qué día las muestras dan positivo. Para ello, se prepararon soportes sólidos de celulosa con teflón y se colocaron en la parte superior de los envases. Se construyeron 3 envases con 30 g de carne en cada uno y 2 blancos junto con las sales absorbentes. Tras cerrarlos herméticamente y guardarlos en la nevera, se tomaron fotos de los envases cada día. La Figura 10.22 está tomada 1 semana después de llevar los envases por primera vez a la nevera. En este momento ya se observa una notable formación de nanopartículas de oro, lo que coincide con el tiempo recomendado por el envasador para el consumo de la carne.

10.5 Conclusiones

Estos primeros estudios demuestran que es posible desarrollar sensores que evalúan las concentraciones de putrescina y 4-aminobutanal en muestras de

alimentos, a partir de Au(III) inmovilizado en celulosa (con o sin la reacción previa con la PuO). Aunque, como ya se ha dicho, no se han ensayado sobre la muestra ideal, si es una prueba de concepto interesante que marca el camino por el que deben ir futuros estudios.

Estos dispositivos ayudarán, una vez que estén completamente terminados, a tener un control más profundo sobre la producción de AT en las plantas. Por otra parte, en cuanto al envasado y la reacción con la muestra, se ha comprobado su eficacia como test de *screening* para la detección de 4-aminobutanal en carnes.

A pesar de la falta de estudios para alcanzar el objetivo final, se han optimizado dos sensores diferentes para el análisis de putrescina: uno basado en la oxidación de un colorante y el otro en la generación de AuNPs. Estos dos sensores ofrecen diferentes posibilidades en el tratamiento de muestra, en las características analíticas y en el tipo de reacción (por reacción directa o por reacción con compuestos volátiles).

10.6 Bibliografía

- 10.1. Zhang L, Yang B, Lu B, Kai G, Wang Z, Xia Y, Ding R, Zhang H, Sun X, Chen W (2007) Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing Putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Planta* 225:887–896. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0402-1>
- 10.2. Kohnen-Johannsen KL, Kayser O (2019) Tropane alkaloids: chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules* 24:796. <https://doi.org/10.3390/molecules24040796>
- 10.3. Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Hogstrand C, Hoogenboom L, Leblanc JC, Nebbia CS, Nielsen E, Ntzani E, Petersen A, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Wallace H, Romualdo B, Cristina F, Stephen H, Iammarino M, Mosbach-Schulz O, Riolo F, Christodoulidou A, Grasl-Kraupp B (2023) Risk assessment of N-nitrosamines in food. *EFSA Journal* 21:. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7884>

- 10.4. Herrmann SS, Duedahl-Olesen L, Granby K (2015) Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. *Food Control* 48:163–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.030>
- 10.5. Navarro J (2021) 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. Tesis Doctoral
- 10.6. Navarro J, Sanz-Vicente I, Lozano R, de Marcos S, Galbán J (2020) Analytical possibilities of Putrescine and Cadaverine enzymatic colorimetric determination in tuna based on diamine oxidase: A critical study of the use of ABTS. *Talanta* 208:. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120392>
- 10.7. Sanz-Vicente I, López-Molinero Á, de Marcos S, Navarro J, Cebrián P, Arruego C, Visiedo V, Galbán J (2020) Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in food. *Anal Bioanal Chem* 412:4261–4271. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02677-7>
- 10.8. Fellows P (1994) Tecnología del procesado de los alimentos. Editorial Acribia

SECCIÓN

V

Conclusiones

Artículos publicados

Conclusiones:

A lo largo de los diferentes capítulos experimentales se han ido extrayendo una serie de conclusiones específicas que tratan de destacar las aportaciones que se consideran más novedosas. En este apartado se hará una valoración global de lo que se considera que esta Tesis Doctoral aporta:

1. La enzima TRasa ha demostrado su gran capacidad para proporcionar métodos analíticos enzimáticos para la determinación de atropina y escopolamina, dos AT de amplio impacto social debido a sus efectos tóxicos en alimentos.
2. Se ha demostrado que a partir de la TRasa se pueden desarrollar métodos colorimétricos de análisis, **validados con muestras** que contienen estos AT, para ambos AT basados tanto en:
 - A) **Las propiedades indicadoras del NAD(P)H**. Con él se generan métodos menos sensibles y es más propenso a interferencias espectrales, pero a cambio permite determinar simultáneamente la concentración de ambos AT en mezclas.
 - B) Su acoplamiento con una **reacción indicadora enzimática** clásica (Diaforasa/INT). Este método indicador no permite diferenciar ambos AT, pero aporta **límites de cuantificación más bajos** y se puede implementar en soportes de celulosa para la construcción de **biosensores monouso** (desechables). Estos últimos se pueden combinar con el uso de medidas de color (espacio RGB) mediante un smartphone, lo que le da una mayor flexibilidad analítica y facilidad de aplicación.
3. La **formación in-situ** y **sin semillas previas de nanoestructuras metálicas** por reacción directa de los iones metálicos precursores (Pt(II) y/o Au(III)) con NAD(P)H es factible y supone una alternativa con potencial para la determinación tanto de NADH como de NADPH, **permitiendo incluso su diferenciación**.
4. El acoplamiento de la reacción NAD(P)H/Au(III)-Pt(II) descrita en el punto anterior con la reacción enzimática de la TRasa descrita en el 2A permite el desarrollo de **nuevos métodos de determinación colorimétrica de atropina y escopolamina** en muestras reales basados en la generación in-situ de nanopartículas metálicas, con unos **límites de**

cuantificación comparables a los obtenidos con indicadores colorimétricos clásicos (punto 2B).

5. El uso de soportes sólidos basados en **tectómeros** proporciona una alternativa más eficaz para el desarrollo de **biosensores monouso** (desechables) para AT basados en la metodología TRasa/NAD(P)H/Au(III)-Pt(II). No obstante, es necesario resolver algunos problemas para un uso real más eficaz.
6. La concentración de los AT presentes en diferentes muestras está altamente relacionada con la de putrescina (amina biógena) y la de 4-aminobutanol (producto de degradación de esta). En esta tesis se han presentado los primeros resultados en el desarrollo de **sensores colorimétricos múltiples** que permiten hacer este seguimiento integral.

Artículos publicados:

Tectomer-Mediated Optical Nanosensors for Tyramine Determination

Mario Domínguez¹, Sofía Oliver¹, Rosa Garriga² , Edgar Muñoz³ , Vicente L. Cebolla³ , Susana de Marcos^{1,*} 
and Javier Galbán¹ 

¹ Nanosensors and Bioanalytical Systems (N&SB), Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA University of Zaragoza-CSIC), 50009 Zaragoza, Spain

² Departamento de Química-Física, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

³ Instituto de Carboquímica ICB-CSIC, 50018 Zaragoza, Spain

* Correspondence: smarcos@unizar.es

Abstract: The development of optical sensors for in situ testing has become of great interest in the rapid diagnostics industry. We report here the development of simple, low-cost optical nanosensors for the semi-quantitative detection or naked-eye detection of tyramine (a biogenic amine whose production is commonly associated with food spoilage) when coupled to Au(III)/tectomer films deposited on polylactic acid (PLA) supports. Tectomers are two-dimensional oligoglycine self-assemblies, whose terminal amino groups enable both the immobilization of Au(III) and its adhesion to PLA. Upon exposure to tyramine, a non-enzymatic redox reaction takes place in which Au(III) in the tectomer matrix is reduced by tyramine to gold nanoparticles, whose reddish-purple color depends on the tyramine concentration and can be identified by measuring the RGB coordinates (Red–Green–Blue coordinates) using a smartphone color recognition app. Moreover, a more accurate quantification of tyramine in the range from 0.048 to 10 μM could be performed by measuring the reflectance of the sensing layers and the absorbance of the characteristic 550 nm plasmon band of the gold nanoparticles. The relative standard deviation (RSD) of the method was 4.2% ($n = 5$) with a limit of detection (LOD) of 0.014 μM . A remarkable selectivity was achieved for tyramine detection in the presence of other biogenic amines, especially histamine. This methodology, based on the optical properties of Au(III)/tectomer hybrid coatings, is promising for its application in food quality control and smart food packaging.



Citation: Domínguez, M.; Oliver, S.; Garriga, R.; Muñoz, E.; Cebolla, V.L.; de Marcos, S.; Galbán, J. Tectomer-Mediated Optical Nanosensors for Tyramine Determination. *Sensors* **2023**, *23*, 2524. <https://doi.org/10.3390/s23052524>

Academic Editor: Eduard Llobet

Received: 14 January 2023

Revised: 21 February 2023

Accepted: 22 February 2023

Published: 24 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: tyramine; biogenic amines; gold nanoparticles; RGB coordinates; optical sensors; food quality control; colorimetric sensors; tectomers

1. Introduction

The development of new sensors for the fast and cost-effective detection of toxic compounds is of great interest to the food industry [1–5]. In this sense, optical sensors for in situ diagnostics have become an alternative to instrumental separation techniques such as high-resolution thin-layer chromatography [6], capillary electrophoresis [7], and especially high performance liquid chromatography (HPLC) [8], which provide accurate and reliable results but are time-consuming and require more specialized personal. The remarkable optical properties of nanomaterials such as nanoparticles [9] or nanoclusters [10] of noble (Au or Pt) or semi-noble (Ag or Cu) metals, quantum dots [11], or nanoparticles with upconversion properties [12] are particularly attractive for the design of these novel sensors. Some of these zero-dimensional (0D) nanomaterials can even replace organic chromophores and fluorophores [13] due to their larger Stokes displacements, longer fluorescence lifetimes, narrower fluorescence spectra, and higher photostability. Furthermore, the analytical performance of these 0D material-based optical nanosensors can be significantly enhanced if the measured optical signal is related to the formation of nanoparticles during specific chemical reactions [14].

Amino-terminated oligoglycine peptides consist of two to four antennae of typically four to seven glycine units connected by alkyl linkers (Figure 1). These oligopeptides self-assemble through polyglycine II cooperative hydrogen bonding, resulting in the formation of two-dimensional (2D) structures denoted as tectomers [15,16], hundreds of nanometers to several micrometers in size, and a few nanometers thick (~5.6 nm and 4.5 nm for biantennary $[\text{Gly}_4\text{-NH-CH}_2]_2 \text{C}_8\text{H}_{16}$ and tetraantennary $[\text{Gly}_7\text{-NH-CH}_2]_4\text{C}$ tectomer platelets, respectively, [17,18]). The 2D structure and surface amino groups of tectomers allow them to interact with a range of molecules and nanomaterials including metal nanoparticles as well as to different types of substrates. These adhesive properties of tectomer platelets are attractive for applications in functional coatings and sensing devices [18–20].

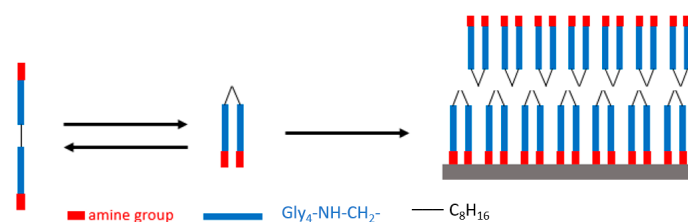


Figure 1. Assembly of biantennary oligoglycine into 2D structures, denoted as tectomers, stabilized by an extended hydrogen bonding network between amine groups.

Tyramine is a biogenic amine (BA) formed by the decarboxylation of the amino acid tyrosine. Tyramine acts in the human body as a neuromodulator, affecting both the cardiovascular and immune systems [21,22]. Tyramine production is also associated with aged or spoiled foods. Symptoms of tyramine poisoning include nausea, migraines, hypertension, and respiratory problems [23]. Oxidative deamination to the corresponding aldehyde catalyzed by tyramine oxidase (TAO) is the physiological detoxification mechanism for tyramine. However, there are individuals who are intolerant to tyramine and other BAs, either because their bodies are unable to produce the corresponding amine oxidases, or because of enzyme inhibition due to drug ingestion. Therefore, there is a need for the rapid detection of BA in the food industry and for medical diagnosis and treatment [24,25]. Tyramine concentrations in representative foods considered to be risky for the above-mentioned individuals are listed in Table 1.

Table 1. Tyramine concentration in different foods.

Food Product	Portion Size	Tyramine (mg)	Tyramine (μmol)
Canadian cheddar	28 g	43	314
Camembert	28 g	38	277
Bleu/Blue chesses	28 g	28	204
Gorgonzola	28 g	1.6	11
Cottage chesses, fresh	112 g	0	0
Tap beer	355 mL	38	277
Chicken livers, aged	28 g	60	438
Sauerkraut	112 g	3.5–14	25–102
Soy sauce	5 mL	0.05–4.7	3.6–34
Thai fish sauce	5 mL	0–3.7	27

Previous work has reported on tyramine colorimetric sensors based on the redox oxidative deamination catalyzed by TAO and simultaneous determination by the reduction of Au(III) to Au^0 in the form of gold nanoclusters (reddish-purple gold nanoparticles (AuNPs)) [14] or the HRP/TMB indicating reaction [26]. We here report on the development of novel non-enzymatic colorimetric nanosensors for tyramine detection based on Au(III) /tectomer sensing layers. Tectomer coatings on polylactic acid (PLA) supports act as matrices for tetrachloroauric (III) acid immobilization, enabling the non-enzymatic

reduction of Au(III) to Au⁰, and hence gold clustering and subsequent gold nanoparticle (AuNP) formation upon the exposure to tyramine, resulting in a change of color in the Au(III)/tectomer layer as a function of tyramine concentration. Selectivity toward other interfering biogenic amines was achieved. The tectomer-mediated optical nanosensors presented here are promising for smart food packaging and biomedical applications. This new methodology allows for the formation of the nanomaterial in a single step and has many other advantages such as avoiding the use of dyes and not requiring the use of enzymes.

In this work, we combine the use of tectomers to immobilize optical biosensors and the in situ generation of nanoparticles to develop a simple method for the determination of tyramine (p-hydroxyphenethylamine).

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Solutions

All chemicals were used without further purification: Na₂HPO₄ ≥ 99% (Panreac (Barcelona, Spain) 131679.1211), Na₂CO₃ ≥ 99.5% (Sigma (Saint Louis, MO, USA) EC 207-838-8), CH₃-COONa ~ 100% (VWR Chemicals (Darmstadt, Germany) 27648.294), TCA (Scharlab (Spain) NS15390100), tetrachloroauric (III) acid hydrate 99.995% (HAuCl₄·3H₂O, Stream Chemicals (Newburyport, MA, USA) 79-0500), tyramine hydrochloride ≥ 98% (Sigma (MO, USA) T2879), cadaverine dihydrochloride ~98% (Sigma (MO, USA) C85619), putrescine dihydrochloride ≥ 98% (Sigma (MO, USA) P7505), histamine dihydrochloride ≥ 99.0% (Sigma (MO, USA) 53300), biantennary oligoglycine [Gly₄-NHCH₂]₂ C₈H₁₆·2HCl 95% (PlasmaChem GmbH (Berlin, Germany), Cat. No.: PL-TEC-2).

2.2. Equipment

Spectroscopic measurements were performed using an Agilent 8453A photodiode UV-Vis spectrophotometer, a SPECORD^R 210 Plus UV-Vis molecular absorption spectrophotometer, and a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)) equipped with a 96-well microplate reader accessory. RGB measurements were carried out with a Huawei P30 mobile phone camera and the ColorGrabTM v. 3.6.1 color recognition app (Loomatix©).

2.3. Sensing Layer Fabrication

Au(III)/tectomer sensing layers were prepared from 20 μL of a premix of tetrachloroauric(III) acid and biantennary oligoglycine 3.0×10^{-3} M solutions that were drop-cast at room temperature on PLA supports (Biopack), 250 μm thick and 10 mm in diameter (Figure 2). The optimal experimental conditions were fixed at a Au(III)/tectomer 1:1 molar ratio and pH 6.0 phosphate buffer, as described below. After letting the films dry for one day, the films were immersed in 600 μL of Milli-Q water for 30 min to remove non-tightly assembled tectomer platelets.

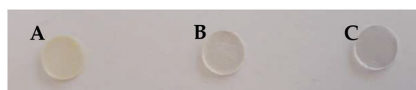


Figure 2. Au(III)/tectomer sensing layers on PLA supports prepared using a solution containing 3.0×10^{-3} M oligoglycine and different Au(III) concentrations: 3.0×10^{-3} M (A), 1.5×10^{-3} M (B), and without Au(III) (C) at pH 6.0.

To assess the ability of the tectomer to immobilize Au(III), the Au(III)/tectomer layers fabricated on PLA supports were placed inside a well-plate and 300 μL of pH 2.0 buffer solution was added, providing an acidic environment that triggers tectomer disassembly [17]. After 180 min, the resulting supernatant was analyzed using a method based on AuBr₄[−] complex formation and UV-Vis spectra measurements [27] as well as a standard ICP-OES (Thermo Scientific iCAP PRO XP Duo) method (see Supplementary Materials Section S1).

2.4. Colorimetric Determination of Tyramine from RGB Coordinates

The smartphone was placed in a fixed position with a laboratory stand at 30 cm above the Au(III)/tectomer sensing layer on the PLA support and placed inside a well-plate, under constant lighting conditions. The distance between the smartphone and the sensing layers was optimized in the previous work of the research group [28]. Then, 300 μ L of the tyramine solutions in pH 6.0 phosphate buffer was added. After 180 min, the RGB coordinates of the sheet were recorded with the ColorGrab™ app on the smartphone.

From these coordinates, R offers the higher sensitivity when measuring the reddish-purple color of the sheets, which was obtained upon the addition of tyramine due to the formation of AuNPs. However, in order to obtain measurements independent of the smartphone and the lighting conditions, the parameter used for the calibration curve was R_r :

$$R_r = \frac{(R_0 - R)}{R_0} \quad (1)$$

R_0 is the value of the coordinate R corresponding to the blank (pH 6.0 phosphate buffer), that is, in the absence of the analyte, and R is the value of the coordinate upon the addition of tyramine in pH 6.0 phosphate buffer solution after 180 min.

2.5. Colorimetric Determination of Tyramine from Absorbance Measurements

Tyramine quantification can more accurately be measured from the reflectance measurements collected using the fluorescence spectrophotometer. Au(III)/tectomer sensing layers on PLA supports were placed in the microplate reader and the fluorescence intensity was acquired with the “synchronous scanning” function (which consists of exciting the sample at the same wavelength at which the emitted light is acquired) in the 400–800 nm range; the spectrum obtained corresponded to the $I_{0,\lambda}$ value of each wavelength. After the addition of 300 μ L of the corresponding tyramine solution, the fluorescence synchronous scanning was performed again and the spectrum obtained corresponded to $I_{t,\lambda}$. The complete absorption spectrum was then calculated as:

$$Abs_{\lambda} = -\log \frac{I_{t,\lambda}}{I_{0,\lambda}} \quad (2)$$

3. Results and Discussion

3.1. Tectomer-Mediated Au(III) Immobilization on PLA Supports

Au(III) was effectively immobilized by means of a tectomer on PLA supports, as discussed in Supplementary Materials Section S1. The adhesion of the sensing layers on the PLA supports was favored by the hydrogen bond formation between the surface amino groups of the tectomers and the carboxyl groups of PLA.

3.2. Sensing Based on RGB Measurements

The reducing properties of tyramine leads to a non-enzymatic redox reaction in which Au(III) reduction occurs in the tectomer matrix, resulting in the formation of AuNPs. Thus, Au(III)/tectomer coatings on the PLA supports were placed inside a well-plate and exposed to different tyramine solutions (0, 3, 10, 30, and 100 μ M). After a reaction time of 180 min, the color of the sensing layers changed as a function of the tyramine concentration, as shown in Figure 3. The color of the sensor layer changed from reddish to purple as the tyramine concentration increased due to the increasing size of the resulting AuNPs.

The RGB coordinates were measured to quantify the effect of tyramine oxidation leading to AuNP formation; specifically, the R coordinate was plotted as a function of the tyramine concentration due to its higher sensitivity to the color of the AuNPs. The optimal experimental conditions for sensor fabrication were found by premixing Au(III) and biantennary oligoglycine solutions in a molar ratio of 1:1 in pH 6.0 phosphate buffer (see Supplementary Materials Section S2).

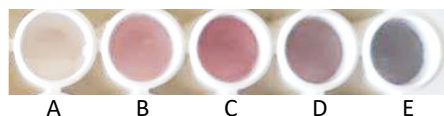


Figure 3. Au(III)/tectomer sensing layers on the PLA supports after exposure to different tyramine concentrations at pH 6.0: (A) 0 μM ; (B) 3.0 μM ; (C) 10 μM ; (D) 30 μM ; (E) 100 μM .

The analytical characterization of the proposed sensor pursued two goals, namely, to define an in situ screening method for tyramine from the RGB coordinates and to define a quantitative determination procedure from the reflectance measurements collected with a fluorimeter. With regard to the in situ screening of tyramine, our research group developed a mathematical model [26] for the measurement of RGB coordinates in solid supports in order to obtain more reproducible data and to compare them with those measured using other smartphones. According to this model, the following equation relates the R coordinate to the molar concentration of the absorbing species in the sensing layer:

$$R = A(E_{0,R} - E_{1,R}c + E_{2,R}c^2) \quad (3)$$

where A is a constant that considers parameters such as camera design, measurement angle, light-to-voltage conversion, and analog-to-digital conversion. On the other hand, R is the coordinate of the color that is measured, and $E_{0,R}$, $E_{1,R}$ and $E_{2,R}$ are given by the following equations:

$$E_{0,R} = \sum_{\lambda} \left[I_{\lambda} P_{R,\lambda} \left(\frac{s_{\lambda} L}{1 + s_{\lambda} L} \right) \right] \quad (4)$$

$$E_{1,R} = 2.3 \sum_{\lambda} \left[I_{\lambda} P_{R,\lambda} \varepsilon_{\lambda} \left(\frac{s_{\lambda} L}{1 + s_{\lambda} L} \right)^2 \left(\frac{3 + 2s_{\lambda} L}{3s_{\lambda} L} \right) \right] \quad (5)$$

$$E_{2,R} = 5.3 \sum_{\lambda} \left[I_{\lambda} P_{R,\lambda} \varepsilon_{\lambda}^2 \left(\frac{s_{\lambda} L}{1 + s_{\lambda} L} \right)^3 \left(\frac{30 + 45s_{\lambda} L + 24(s_{\lambda} L)^2 + 4(s_{\lambda} L)^3}{45s_{\lambda}^2} \right) \right] \quad (6)$$

In these equations, I_{λ} and $P_{R,\lambda}$ are the spectral power of the illumination source and the spectral sensitivity of the camera (defined as the product of the sensitivity of the CCD and the transmittance of the Bayer filter for the corresponding wavelength), respectively. ε_{λ} is the molar absorptivity ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) of the Au(III), and s_{λ} and L are the dispersion coefficient (cm^{-1}) and the thickness of the solid support, respectively.

If the concentration of the absorbing species is zero (namely, before the reaction), Equation (3) can be written as follows:

$$R_0 = AE_{0,R} \quad (7)$$

To avoid the effect of constant A on the analytical signal, the parameter R_r (1) is defined as:

$$R_r = \frac{(R_0 - R)}{R_0} = \frac{E_{1,R}}{R_0} c - \frac{E_{2,R}}{R_0} c^2 \quad (8)$$

For parameters G and B, similar equations can be deduced.

Figure 4 shows a second-degree polynomial correlation between R_r and tyramine concentration (R_r changes lineally for low tyramine concentrations).

The limit of detection (LOD) was calculated by substituting in Equation (6) the signal corresponding to three times the standard deviation of the blank, resulting in a LOD value of 0.23 μM . The reproducibility for a tyramine concentration of 30 μM ($n = 5$) for each RGB coordinate is summarized in Table 2.

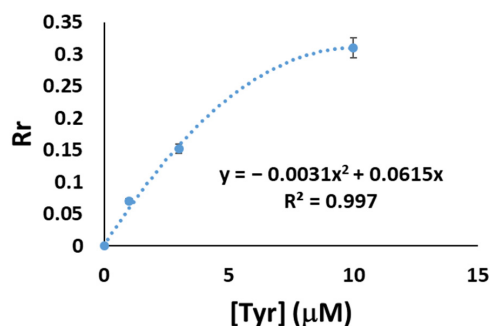


Figure 4. Calibration plot for the Au(III)/tectomer sensor layers fabricated in a 1:1 molar ratio in pH 6.0 phosphate buffer for tyramine detection.

Table 2. The RSD of the colorimetric determination of the 30 μM tyramine concentration from the RGB coordinates.

Coordinate	RSD ($n = 5$)
R_r	23.81
G_r	25.75
B_r	31.17

Table 2 shows the RSD of the measured RGB coordinates, indicating that the method produces semi-quantitative results or naked-eye detection capability. It is important to realize that these measurements were performed using a smartphone without a lighting box (see Section 2.4). This procedure resembles in situ measurements carried out in food packaging, indicating that semi-quantitative tyramine is affordable using this type of sensor.

One of the most interesting features of the tested sensing layers is the remarkable selectivity for tyramine detection in the presence of other BAs. Thus, the response of the Au(III)/tectomer optical nanosensors to histamine (2-(4-Imidazolyl)ethylamine), putrescine (1,4-Diaminobutane), and cadaverine (1,5-Diaminopentane) was studied as follows:

- Single BA tests: Au(III)/tectomer sensor layers were exposed to solutions of each of the tested BAs in the absence of tyramine. The formation of AuNPs was not observed in any case. This result is in good agreement with previous work reporting no AuNP generation during the enzymatic oxidation of these interfering Bas [14].
- Double BA tests: Au(III)/tectomer sensing layers were exposed to tyramine in the presence of each of the other BAs at different molar ratios. In all cases, the tyramine concentration was set at 10 μM . Table 3 shows the achieved R_r values ($n = 5$).

Table 3. Response (R_r values) of the Au(III)/tectomer sensing layers to tyramine in the presence of putrescine, cadaverine, or histamine at different molar ratios.

BA: Tyramine Ratio	Putrescine	Cadaverine	Histamine
0:1	0.310 \pm 0.043	0.310 \pm 0.043	0.310 \pm 0.043
1:1	0.263 \pm 0.037	0.316 \pm 0.044	0.287 \pm 0.040
2:1	0.310 \pm 0.043	0.298 \pm 0.042	0.298 \pm 0.041
5:1	0.246 \pm 0.034	0.316 \pm 0.044	0.333 \pm 0.047
10:1	0.269 \pm 0.038	0.322 \pm 0.045	0.263 \pm 0.037
15:1	0.316 \pm 0.044	0.322 \pm 0.045	0.205 \pm 0.029

In enzymatic colorimetric methods for tyramine determination, histamine is usually a very strong interference, which usually affects the tyramine signal for histamine/tyramine ratios of 1:1 and even lower [14]. However, as shown in Table 4, our method provided high tyramine selectivity against histamine.

Table 4. The response (R_r values) of the Au(III)/tectomer sensing layers to the histamine/tyramine mixtures of high histamine:tyramine molar ratios.

Histamine:Tyramine Ratio	Histamine
0:1	0.310 ± 0.043
15:1	0.255 ± 0.029
20:1	0.211 ± 0.029
30:1	0.187 ± 0.026
40:1	0.135 ± 0.018
50:1	0.111 ± 0.016

3.3. Sensing Based in Reflectance Measurements

Alternatively, more accurate and precise responses for tyramine detection can be achieved from reflectance measurements. Thus, we alternatively propose here a sensing procedure by which reflectance measurements were collected by synchronous scanning, where the amount of light transmitted by the sample is collected by the fluorimeter at the same wavelengths at which the sample is excited (see Section 2.5).

The absorbance spectra obtained using this method showed a maximum at 550 nm; this corresponded to the AuNP plasmon band (Figure 5a).

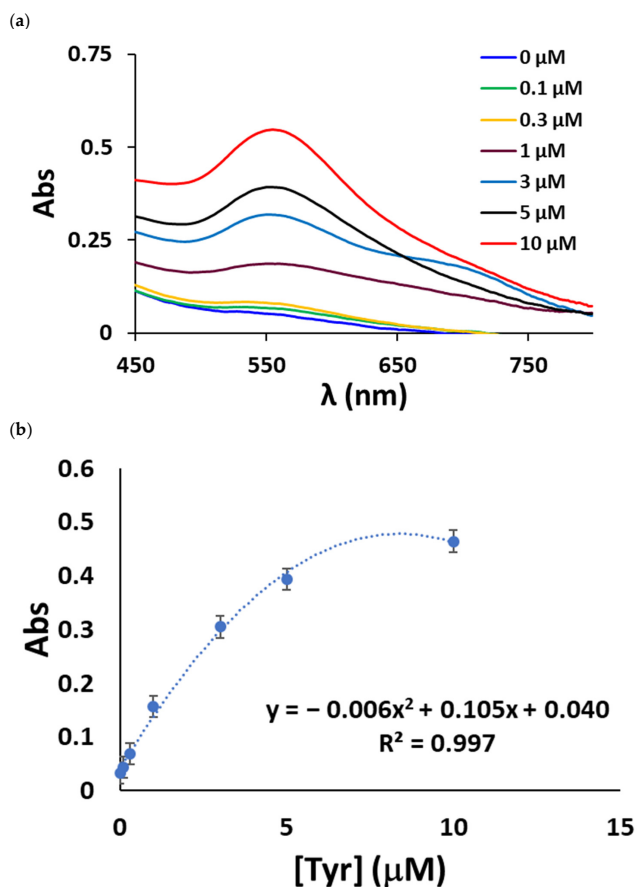


Figure 5. (a) Absorption spectra of the AuNPs collected from the reflectance measurements; (b) AuNP absorbance at 550 nm as a function of the tyramine concentration.

The absorbance value at 550 nm was plotted as a function of tyramine concentration, resulting in the calibration curve for tyramine concentrations ranging from 0.048 to 10 μM , as shown in Figure 5b, which is typical of absorbance measurements performed in solid supports. LOD and RSD values as low as 0.048 μM and 4.2%, respectively, were achieved by this method.

At high tyramine concentrations ($>10 \mu\text{M}$) the 550 nm AuNP plasmon band was upshifted (Figure 6a), indicating that the AuNP size significantly increases when the sensor layer is exposed to high tyramine concentrations, which is in good agreement with the RGB results shown above. By plotting the logarithm of the absorbance at 700 nm versus the tyramine concentration, a second-degree polynomial correlation was obtained between 10 μM and $3.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ of tyramine.

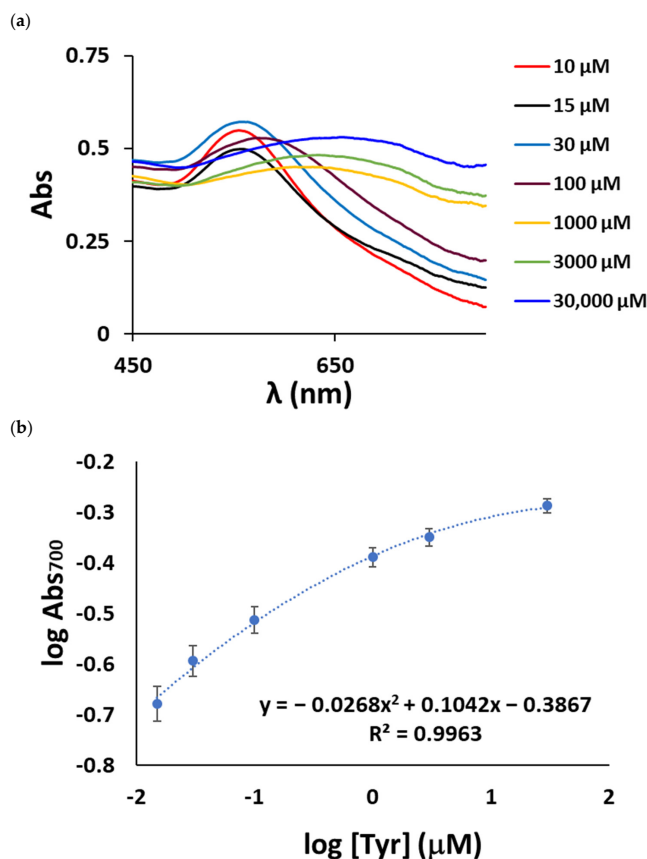


Figure 6. (a) The AuNP absorption spectra collected by reflectance measurements at high tyramine concentrations; (b) $\log \text{Abs}_{700\text{nm}}$ as a function of tyramine concentration.

3.4. Recovery Assay

Finally, this methodology was tested for tyramine determination in a cheese sample. A Gouda sample was purchased from a local supermarket and submitted to the tyramine extraction following a procedure described in the Supplementary Materials (Section S3). No tyramine was found in this sample. A recovery study was then carried out. To do so, the cheese extract was spiked with a $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ tyramine solution, which was analyzed by the reflectance method. Five replicate determinations were performed and a $4.7 \times 10^{-5} \text{ M}$ (RSD = 2.4%) average value was obtained, corresponding to a 94% recovery. This result validates the capability of the real application of this method for real samples.

3.5. Comparison with Other Colorimetric Methods

Table 5 summarizes the most recently published methods for the determination of tyramine. As can be seen, the sensitivity of the proposed method was similar to these. In addition, it has other advantages such as not requiring the use of enzymes, avoids the use of dyes, and easy oxidation is usually found with these compounds; more importantly, the formation of nanomaterials occurs in a single step unlike other more complicated methods that require multiple and complicated steps. This method is therefore useful for the determination of tyramine in food, allowing for the prevention of food health problems.

Table 5. An overview on the recently reported optical methods for tyramine determination.

Composition of Sensor	Response Time	Analyte	Detected Signal	Anal. Range	LOD	Ref.
AgNPs (preliminary HPTLC separation of the analyte)	-	Tyramine	Raman ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$)	30–80 mg/kg	-	[29]
pH indicator dye and Remazol Brilliant blue immobilized on cellulose microplates	1.5 h	Total Biogenic Amines	CIE lab color space	0.3–30 mg/kg	-	[5]
Luminescence readout cellulose acetate nanofibers embedded with Py-1	20 min	Tyramine	Fluorescence with RGB/digital camera	1.37–13.7 mg/kg	0.4 mg/kg	[30]
Microliter plate with sensor film based on Py-1 embedded in Hypan HN80	10 min	Total Biogenic Amines	Fluorescence	0.5–70.0 mg/kg	0.165 mg/kg	[31]
Gra-QDs@MIPs	50 min	Tyramine	Fluorescence	0.07–12 mg/kg	0.02 mg/kg	[32]
Melanin-UCNPs NaGdF ₄ :Yb/Er@NaYF ₄	45 min	Tyramine	Fluorescence	0.02–4.57 mg/kg	0.004 mg/kg	[33]
Fluorescent organic nanoparticles (FONs) with tetrapodal receptor	-	Tyramine	Fluorescence	27.4–219.5 mg/kg	0.05 mg/kg	[34]
AuNPs formation	≈30 min	Tyramine	Color generation	3.4–45.3 mg/kg	0.46 mg/kg	[14]
This work (RGB)	3 h	Tyramine	RGB with smartphone camera	0.107–1.37 mg/kg	0.0315 mg/kg	
This work (reflectance)	3 h	Tyramine	Reflectance measurements	6.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ –1.37 mg/kg	1.97 $\mu\text{g}/\text{kg}$	

4. Conclusions

Novel Au(III)/tectomer-based optical nanosensors for tyramine detection were successfully demonstrated. Tectomer coatings on PLA act as an efficient matrix for Au(III) immobilization, enabling non-enzymatic Au(III) reduction and AuNP formation. Au(III)/tectomer sensor layers were used for the semi-quantitative determination (or naked-eye selective identification) of tyramine in the presence of other BAs, particularly histamine, by obtaining the RGB coordinates of the resulting colored AuNPs via a smartphone. Alternatively, tyramine quantification can be achieved by measuring the absorbance value of the sensor layer, leading to a LOD of 0.014 μM . This methodology, based on the optical properties of Au(III)/tectomer layers, shows promise for applications in food quality control, smart food packaging, and medical diagnostics. The versatile chemical functionalization capabilities of tectomer surface amino groups may potentially allow this methodology to be extended to the detection of a wide range of analytes.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/s23052524/s1>. Section S1: Quantification of Au(III) immobilized in tectomer by means of AuBr_4^- complex formation. (Table S1: Effect of the pH on AuBr_4^- complex formation. Figure S1: (a) Absorption spectra of AuBr_4^- ; (b) Absorption spectra upon addition of KBr to a solution containing Au(III)/tectomer complex at pH 6.0 and 7.0; (c) Plot representing Au(III) concentration in the supernatant resulting from the addition of KBr in pH 2.0 buffer to Au(III)/tectomer layers on PLA supports. Table S2: Au(III) concentration in the supernatant resulting from the addition of KBr in pH 2.0 buffer to the Au(III)/tectomer layers on PLA supports. Table S3: Percentage of Au(III) released from the tectomer into the solution at pH 2.0.). Section S2: Optimization

of experimental parameters for tyramine detection using Au(III)/tectomer sensor layers. (Figure S2: R coordinate as a function of the tyramine concentration for Au(III)/tectomer layers prepared using different pH buffers. Figure S3: R coordinate as a function of tyramine concentration for different Au(III)/tectomer molar ratios. Figure S4: Au(III)/tectomer sensing layer response to several tyramine concentrations at different pH values. Figure S5: R coordinate as a function of the pH of the buffers used to dissolve tyramine. [Tyramine] = 10 μ M in all cases.). Section S3: Extraction method for the cheese samples.

Author Contributions: Conceptualization, E.M., R.G., V.L.C. and J.G.; Methodology, E.M., R.G. and J.G.; Investigation, M.D. and S.O.; Data curation, M.D. and J.G.; Writing—original draft preparation, M.D.; Writing—review and editing, S.d.M., E.M. and R.G.; Supervision, S.d.M. and J.G.; Project administration, S.d.M.; Funding acquisition J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is part of the I+D+i project PID2019-105408GB-I00 supported by projects MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and PDC2021-121224-100, and the funding to research groups of the DGA, Spain (E25_20R).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge the Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) of the Universidad de Zaragoza for its technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Choi, J.R.; Yong, K.W.; Choi, J.Y.; Cowie, A.C. Emerging Point-of-Care Technologies for Food Safety Analysis. *Sensors* **2019**, *19*, 817. [[CrossRef](#)]
2. Givanoudi, S.; Heyndrickx, M.; Depuydt, T.; Khorshid, M.; Robbens, J.; Wagner, P. A Review on Bio- and Chemosensors for the Detection of Biogenic Amines in Food Safety Applications: The Status in 2022. *Sensors* **2023**, *23*, 613. [[CrossRef](#)]
3. Narsaiah, K.; Jha, S.N.; Bhardwaj, R.; Sharma, R.; Kumar, R. Optical Biosensors for Food Quality and Safety Assurance—a Review. *J. Food Sci. Technol.* **2012**, *49*, 383–406. [[CrossRef](#)]
4. Abo Dena, A.S.; Khalid, S.A.; Ghanem, A.F.; Shehata, A.I.; El-Sherbiny, I.M. User-Friendly Lab-on-Paper Optical Sensor for the Rapid Detection of Bacterial Spoilage in Packaged Meat Products. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 35165–35173. [[CrossRef](#)]
5. Schaude, C.; Meindl, C.; Fröhlich, E.; Attard, J.; Mohr, G.J. Developing a Sensor Layer for the Optical Detection of Amines during Food Spoilage. *Talanta* **2017**, *170*, 481–487. [[CrossRef](#)]
6. Romano, A.; Klebanowski, H.; La Guerche, S.; Beneduce, L.; Spano, G.; Murat, M.-L.; Lucas, P. Determination of Biogenic Amines in Wine by Thin-Layer Chromatography/Densitometry. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1392–1396. [[CrossRef](#)]
7. Jastrzębska, A. A Comparative Study for Determination of Biogenic Amines in Meat Samples by Capillary Isotachopheresis with Two Electrolyte Systems. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *235*, 563–572. [[CrossRef](#)]
8. Önal, A.; Tekkeli, S.E.K.; Önal, C. A Review of the Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Biogenic Amines in Foods. *Food Chem.* **2013**, *138*, 509–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Liu, G.; Lu, M.; Huang, X.; Li, T.; Xu, D. Application of Gold-Nanoparticle Colorimetric Sensing to Rapid Food Safety Screening. *Sensors* **2018**, *18*, 4166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Chen, L.Y.; Wang, C.W.; Yuan, Z.; Chang, H.T. Fluorescent Gold Nanoclusters: Recent Advances in Sensing and Imaging. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 216–229. [[CrossRef](#)]
11. Lesiak, A.; Drzozga, K.; Cabaj, J.; Bański, M.; Malecha, K.; Podhorodecki, A. Optical Sensors Based on II-VI Quantum Dots. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 192. [[CrossRef](#)]
12. Mahata, M.K.; Bae, H.; Lee, K.T. Upconversion Luminescence Sensitized PH-Nanoprobes. *Molecules* **2017**, *22*, 2064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Quantum Dots versus Organic Dyes as Fluorescent Labels. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763–775. [[CrossRef](#)]
14. Navarro, J.; de Marcos, S.; Galbán, J. Colorimetric-Enzymatic Determination of Tyramine by Generation of Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2020**, *187*, 174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bovin, N.V.; Tuzikov, A.B.; Chinarev, A.A. Oligoglycines: Materials with Unlimited Potential for Nanotechnologies. *Nanotechnol. Russ.* **2008**, *3*, 291–302. [[CrossRef](#)]
16. Tsygankova, S.V.; Chinarev, A.A.; Tuzikov, A.B.; Zaitsev, I.S.; Severin, N.; Kalachev, A.A.; Rabe, J.P.; Bovin, N.V. Assembly of Oligoglycine Layers on Mica Surface. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2011**, *2*, 91–97. [[CrossRef](#)]

17. Garriga, R.; Jurewicz, I.; Romero, E.; Jarne, C.; Cebolla, V.L.; Dalton, A.B.; Muñoz, E. Two-Dimensional, PH-Responsive Oligoglycine-Based Nanocarriers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 1913–1921. [[CrossRef](#)]
18. Garriga, R.; Jurewicz, I.; Seyedin, S.; Bardi, N.; Totti, S.; Matta-Domjan, B.; Velliou, E.G.; Alkhorayef, M.A.; Cebolla, V.L.; Razal, J.M.; et al. Multifunctional, Biocompatible and PH-Responsive Carbon Nanotube- and Graphene Oxide/Tectomer Hybrid Composites and Coatings. *Nanoscale* **2017**, *9*, 7791–7804. [[CrossRef](#)]
19. Garriga, R.; Jurewicz, I.; Seyedin, S.; Tripathi, M.; Pearson, J.R.; Cebolla, V.L.; Dalton, A.B.; Razal, J.M.; Muñoz, E. Two-Dimensional Oligoglycine Tectomer Adhesives for Graphene Oxide Fiber Functionalization. *Carbon* **2019**, *147*, 460–475. [[CrossRef](#)]
20. Tripathi, M.; Garriga, R.; Lee, F.; Ogilvie, S.P.; Graf, A.A.; Large, M.J.; Lynch, P.J.; Papagelis, K.; Parthenios, J.; Cebolla, V.L.; et al. Probing the Interaction between 2D Materials and Oligoglycine Tectomers. *2D Mater.* **2022**, *9*, 045033. [[CrossRef](#)]
21. Makrlík, E.; Toman, P.; Vanura, P.; Rathore, R. Interaction of Protonated Tyramine with a Hexaarylbenzene-Based Receptor: Extraction and DFT Study. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1047*, 277–281. [[CrossRef](#)]
22. Andersen, G.; Marcinek, P.; Sulzinger, N.; Schieberle, P.; Krautwurst, D. Food Sources and Biomolecular Targets of Tyramine. *Nutr. Rev.* **2019**, *77*, 107–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ladero, V.; Calles-Enriquez, M.; Fernandez, M.; Alvarez, M.A. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 145–156. [[CrossRef](#)]
24. El-Nour, K.M.A.; Salam, E.T.A.; Soliman, H.M.; Orabi, A.S. Gold Nanoparticles as a Direct and Rapid Sensor for Sensitive Analytical Detection of Biogenic Amines. *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, *12*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bi, J.; Tian, C.; Zhang, G.L.; Hao, H.; Hou, H.M. Detection of Histamine Based on Gold Nanoparticles with Dual Sensor System of Colorimetric and Fluorescence. *Foods* **2020**, *9*, 316. [[CrossRef](#)]
26. Oliver, S.; de Marcos, S.; Sanz-Vicente, I.; Cebolla, V.; Galbán, J. Direct Minimally Invasive Enzymatic Determination of Tyramine in Cheese Using Digital Imaging. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1164*, 338489. [[CrossRef](#)]
27. Kudrev, A.G. Calculation of Equilibrium Constants by Matrix Method for Complexes of Gold(III). *Talanta* **2008**, *75*, 380–384. [[CrossRef](#)]
28. Sanz-Vicente, I.; López-Molinero, Á.; de Marcos, S.; Navarro, J.; Cebrián, P.; Arruego, C.; Visiedo, V.; Galbán, J. Smartphone-Interrogated Test Supports for the Enzymatic Determination of Putrescine and Cadaverine in Food. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 4261–4271. [[CrossRef](#)]
29. Wang, L.; Xu, X.M.; Chen, Y.S.; Ren, J.; Liu, Y.T. HPTLC-FLD-SERS as a Facile and Reliable Screening Tool: Exemplarily Shown with Tyramine in Cheese. *J. Food Drug Anal.* **2018**, *26*, 688–695. [[CrossRef](#)]
30. Yurova, N.S.; Danchuk, A.; Mobarez, S.N.; Wongkaew, N.; Rusanova, T.; Baeumner, A.J.; Duerkop, A. Functional Electrospun Nanofibers for Multimodal Sensitive Detection of Biogenic Amines in Food via a Simple Dipstick Assay. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 1111–1121. [[CrossRef](#)]
31. Khairy, G.M.; Azab, H.A.; El-Korashy, S.A.; Steiner, M.S.; Duerkop, A. Validation of a Fluorescence Sensor Microtiterplate for Biogenic Amines in Meat and Cheese. *J. Fluoresc.* **2016**, *26*, 1905–1916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wang, Q.; Zhang, D. A Novel Fluorescence Sensing Method Based on Quantum Dot-Graphene and a Molecular Imprinting Technique for the Detection of Tyramine in Rice Wine. *Anal. Methods* **2018**, *10*, 3884–3889. [[CrossRef](#)]
33. Wang, H.; Lu, Y.; Wang, L.; Chen, H. Detection of Tyramine and Tyrosinase Activity Using Red Region Emission NaGdF₄:Yb, Er@NaYF₄ Upconversion Nanoparticles. *Talanta* **2019**, *197*, 558–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kaur, N.; Kaur, M.; Chopra, S.; Singh, J.; Kuwar, A.; Singh, N. Fe(III) Conjugated Fluorescent Organic Nanoparticles for Ratiometric Detection of Tyramine in Aqueous Medium: A Novel Method to Determine Food Quality. *Food Chem.* **2018**, *245*, 1257–1261. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Colorimetric enzymatic rapid test for the determination of atropine in baby food using a smartphone

M. Domínguez^{1,2} · D. Moraru¹ · S. Lasso¹ · I. Sanz-Vicente^{1,2} · S. de Marcos^{1,2}  · J. Galbán^{1,2}

Received: 30 April 2024 / Revised: 7 June 2024 / Accepted: 11 June 2024 / Published online: 3 July 2024
© The Author(s) 2024

Abstract

A method for the enzymatic determination of atropine has been developed, which is based on a sequence of reactions involving (1) the hydrolysis of atropine to give tropine; (2) the enzymatic oxidation of tropine with NAD (catalysed by tropinone reductase); and (3) an indicator reaction, in which the NADH previously formed reduces the dye iodinitrotetrazolium chloride (INT) to a reddish species, the reaction catalysed by diaphorase. The method was first developed in solution (linear response range from 2.4×10^{-6} M to 1.0×10^{-4} M). It was then implemented in cellulose platforms to develop a rapid test where the determination is made by measuring the RGB coordinates of the platforms using a smartphone-based device. The device is based on the integrating sphere concept and contains a light source to avoid external illumination effects. The smartphone is controlled by an app that allows a calibration line to be generated and the atropine concentration to be quantified; moreover, since the app normalizes the CCD response of the smartphone, the results and calibrations obtained with different smartphones are similar and can be shared. Using the G coordinate, the results were shown to have a linear response with the concentration of atropine ranging from 1.2×10^{-5} M to 3.0×10^{-4} M with an RSD of 1.4% ($n=5$). The method has been applied to the determination of atropine in baby food and buckwheat samples with good results.

Keywords RGB · Tropine · Tropinone reductase · Diaphorase · NADH · Buckwheat

Introduction

Tropane alkaloids (TA) are compounds found in a wide variety of foods and cereals. The most studied of these compounds are atropine (APe) and scopolamine (SPe) [1], due to their applications in the pharmaceutical industry (they act as non-selective inhibitors of muscarinic acetylcholine receptors). Atropine is a pre-anaesthetic, while scopolamine, in the form of butyl-scopolamine, is used to relieve discomfort associated with spasms of the gastrointestinal tract. They are

currently extracted from plants, usually genetically modified for their production. However, these compounds can be highly toxic if the established dose is exceeded [1]. Due to adverse health effects, APe and SPe are considered undesirable substances in food and feed (especially for infants), and the European Food Safety Authority (EFSA) has established an acute reference dose of 0.016 mg/kg-day expressed as the sum of APe and SPe [2, 3].

The analytical methods currently used for the determination of TA are based on the use of techniques such as gas chromatography, high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, capillary electrophoresis techniques and immunoassay techniques [4–6]. The use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry has been shown to be a highly sensitive technique for the identification of these metabolites, achieving detection limits below 5 ng/ml [5]. While these techniques provide optimal results, they are slow procedures for quality control so the design and development of rapid methods that require sample treatment is a challenge that needs to be addressed. In this regard, although the development of chemical sensors is increasing in importance, most of

Published in the topical collection *Optical Biosensors and Biomimetic Sensors for Chemical Analysis* with guest editors Elena Benito-Peña and Guillermo Orellana.

In honour of Professor María Cruz Moreno Bondi.

✉ S. de Marcos
smarcos@unizar.es

¹ Analytical Chemistry Department, University of Zaragoza, 50009 Saragossa, Spain

² Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), CSIC-Universidad de Zaragoza, 50009 Saragossa, Spain

those that have been developed so far for the determination of atropine are based on electrochemical [7] or fluorescence quantum dots [8] sensors and lack enough specificity to be applied to real samples.

This lack of specificity could be overcome with the use of immunoassays for AT that give reliable results. However, to develop more accessible and simpler methods for APE that can provide an initial assessment of food toxicity, it would be necessary to focus on enzymatic methods (because of their specificity) and colorimetric methods (because of their accessibility). To the best of our knowledge, no enzymatic methods have yet been proposed for these compounds, probably due to the lack of commercially available suitable enzymes.

The possible routes existing for enzymatic reactions involving APE were reviewed. The first step is hydrolysis, which is catalysed by tropine esterase (TEase) (Fig. 1A) [9]. After that, two degradation pathways with highly specific enzymes can then be followed, either via tropic acid or tropine. Via tropic acid, only a complex reaction involving ATP and CoA (catalysed by L-firefly luciferin-CoA ligase) [10] has been found in the literature; this reaction does not allow the coupling of affordable indicator mechanisms. A simpler scheme can be found via tropine; this involves the use of the tropinone reductase (TRase), which catalyses the oxidation of the –OH group using NAD as a cofactor (Fig. 1B). This reaction can be monitored by measuring the molecular absorption/fluorescence properties of NADH (340 nm) [9].

However, better analytical figures of merit can be obtained by submitting the NADH to a further reaction involving the oxidation of tetrazolium salts (such as iodinitrotetrazolium chloride (INT)) to the reddish garnet formazan compound, catalysed by diaphorase (dihydroli-poyl-dehydrogenase). Tetrazolium salts are widely used for both the determination of NADH in cell viability studies [11] and the determination of diaphorase.

The implementation of detectors in low-cost equipment such as cameras, mobile phones, webcams, or digital scanners constitutes a new analytical methodology with characteristics of fast radiation reading and direct signal processing at a moderate cost [12]. Nowadays, this type of analytical platform is experiencing a huge increase, competing against determinations through molecular spectrophotometry, fluorescence and derived sensors, due to the implementation of an analytical methodology based on the use of colour spaces [13]. This implementation is aimed at areas which demand a large amount of analysis and the rapid obtaining of analytical information, such as clinical diagnosis or “in situ” control of food [14].

This paper describes a reliable colorimetric enzymatic method for the determination of APE based on the scheme described in Fig. 1. This method is further implemented on solid supports where the RGB coordinates are acquired by a mobile phone uploaded with a Apk developed in the research group [15]. The Apk includes a correction method that standardizes each measurement making it comparable between different days and phones.

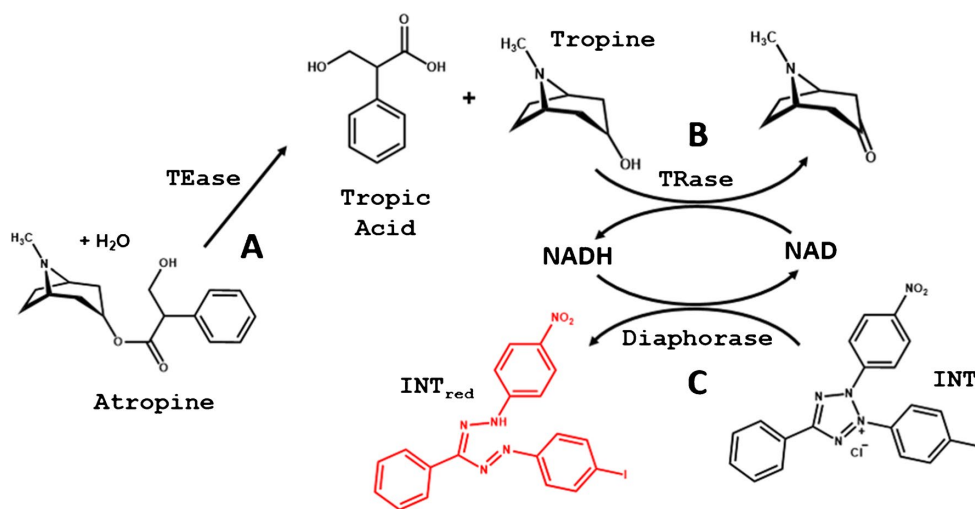


Fig. 1 Scheme of the reactions of enzymatic degradation of atropine. **A** Desterification of APE using TEase. **B** Oxidation of tropine using TRase and NAD as a cofactor. **C** Reduction of the dye using the enzyme diaphorase

Table 2 Results of the measurements obtained for each APe concentration in solution (all samples were analysed in triplicate)

[APe] added mol/l	% Recovery (Method in solution)	% Recovery (Cellulose test method)
$1 \cdot 10^{-5}$	111 (± 6) %	—
$6 \cdot 10^{-5}$	93 (± 2) %	88 (± 3) %
$1 \cdot 10^{-4}$	97 (± 2) %	108 (± 4) %

Materials and methods

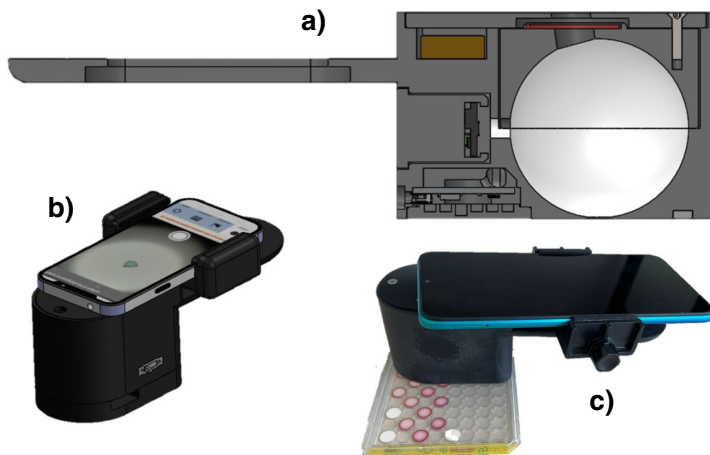
Reagents and solutions

Diaphorase (Sigma-Aldrich D5540-300U), iodionitro-tetrazolium chloride, INT (Sigma-Aldrich I8377), tropine (Sigma-Aldrich 93,550), tropinone reductase (TRase) (Gecco Biotech, EC 1.1.1.206), tropine esterase (TEase) (Gecco Biotech, EC 3.1.1.10), β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate NAD (Sigma-Aldrich N1511), atropine sulphate monohydrate (Sigma-Aldrich A0257) and micro-crystal cellulose in powder 20 μm (Sigma-Aldrich 310,697) were used. All other reagents were of analytical grade and used without further purification.

Equipment

A PerkinElmer Lambda 465 UV–vis spectrophotometer (diode-array) and SPECORD 210 Plus UV–vis molecular absorption spectrophotometer were used for UV–vis absorbance measurements. The RGB measurements were performed using with a Xiaomi Mi A2 smartphone with the application ColorGrab™ v. 3.9.2 (Loomatix ©) and the Apk AppColorimetryV1.

Fig. 2 **a** Scheme of the lighting box; **b** lighting box coupled to a smartphone, **b** measures in the solid support with the smartphone-lighting box device



Measurement procedure

Method in batch (UV–vis spectrophotometer)

Absorbance measurements were carried out in a UV–vis molecular absorption spectrophotometer. For this purpose, PMMA cuvettes of 1 cm path length were used where the final volume was 2 ml. Measurements were made in spectral scan mode measuring the spectrum from 290 to 690 nm, taking measurements every 10 s.

Twenty microliters of the corresponding atropine solution was mixed with 20 μl of NaOH 2 M in the PMMA cuvettes, and the hydrolysis was allowed to proceed for 5 min. Then, 1615 μl of carbonate buffer pH 10, 40 μl of NAD 5×10^{-2} M (in aqueous solution), 5 μl of TRase 8.8 mg/ml (in buffer pH 7.5), 200 μl of dye (INT) 2×10^{-3} M (in aqueous solution) and 100 μl of diaphorase 11.2 U/ml were added, and the absorbance at 500 nm was monitored.

Method with solid supports

Cellulose support synthesis A 5% (w/V) cellulose suspension was prepared by weighing 50 mg of 20 μm cellulose in a vial, adding the reagents (3.3×10^{-3} M NAD, 3.9×10^{-4} M INT and $0.67 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ diaphorase final concentrations) and making up to 1 ml final volume. Seventy-five microliters was added to each well of the well-plate and incubated at 35 °C to dryness (about 2 h).

Use of the RGB coordinates.

The values obtained in the RGB coordinates ($E_{(R,G,B)}$) are given by [16]:

Table 1 Analytical figures of merit of the method for APe in solution

Sensitivity	Limit of detection (LOD, mol/l)	Limit of quantification (LOQ, mol/l)	Lineal response range (mol/l)	RSD ($n=5$) [APe] = $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l)
$11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$7.1 \cdot 10^{-7}$	$2.4 \cdot 10^{-6}$	$2.4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	3.8%

$$E_{(R,G,B)} = A \sum_{\lambda} I_{\lambda} P_{\lambda} R_{\lambda} \quad (1)$$

In this equation, A is a parameter that includes factors related to the device (camera design, solid angle, light-to-voltage conversion and analogue-to-digital), I_{λ} is the spectral power of the light source which is usually known, and P_{λ} is the spectral sensitivity of the detector (camera). R_{λ} is the reflectance of the solid cellulose support containing the enzymatic reaction; it depends on the analyte concentration according to a second-order mathematical equation derived from the Kubelka–Munk approach. Finally, to avoid both the stray light and the constant A effect in the analytical signal, the following quantitative parameters are finally used, where ($E_{0,(R,G,B)}$) is the blank signal [17]:

$$\Delta E_{(R,G,B)} = E_{0,(R,G,B)} - E_{(R,G,B)} \quad (2)$$

$$\Delta E_{(R,G,B),f} = \frac{E_{0,(R,G,B)} - E_{(R,G,B)}}{E_{0,(R,G,B)}} \quad (3)$$

Colour measurements of the cellulose support A light box with a universal holder for any mobile phone was developed in our laboratory [18] (Fig. 2). The Xiaomi Mi A2 mobile used in this work was loaded with the application (*AppColorimetryVI*) developed in our laboratory. This application can be downloaded for free and works with the Android operating system (download link: https://drive.google.com/drive/folders/1Hub0fYkR0tabdXlaZeWeYzVLDwll5KzC?usp=drive_link).

The *AppColorimetryVI* features a correction method that standardizes each measurement to a common and well-defined RGB system which significantly reduces measurement errors and variance between different mobile phones, making measurements comparable [13]. The application also allows calibration lines to be performed. The G coordinate is chosen because it provides better results, and G_0 -G (G_0 and G being the blank and sample signals, respectively) is used as the analytical parameter.

Three replicates of both blank and samples were made in each study. Measurements were taken after 30 min of reaction.

Sample treatment: lixiviation from the buckwheat sample

1.5 g of buckwheat is weighed, lixiviated with 30 ml of Milli-Q water in a beaker and left to leach for half an hour. The sample was then centrifuged for 20 min at room temperature at 6000 rpm. The solution was then separated, neutralized to basic pH by the addition of NaOH, and centrifuged again for 20 min (6000 rpm). Finally, the filtered solution was separated, neutralized with HCl, and filtered (by gravity). The filtered solution was washed, and the washing waters were mixed with the solution and bringing to 50 ml in a volumetric flask with Milli-Q water [19].

Results

Enzymatic method for the determination of atropine in solution

As shown in Fig. 1, the proposed method consists of three steps: de-esterification of atropine to tropine, oxidation of tropine catalysed by TRase and a colorimetric reaction.

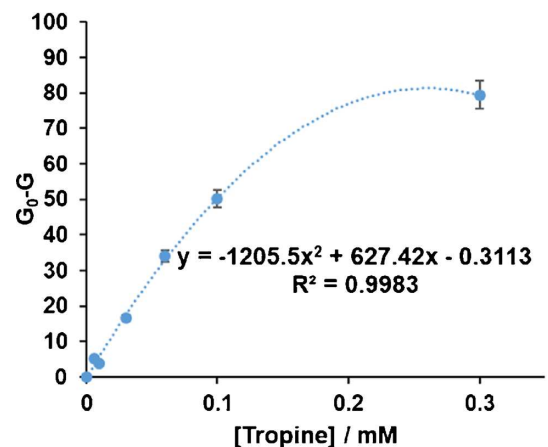


Fig. 3 Calibration curve obtained for different tropine concentrations. Experimental conditions as indicated in 2.3.2.1

Table 3 Analytical figures of merit of the method in cellulose platforms

Linear range (mol/l)	LOD (mol/l)	LOQ (mol/l)	RSD ($n=3$)	
			[APe] = $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l	[APe] = $3 \cdot 10^{-4}$ mol/l
$1.2 \cdot 10^{-5}$ – $3 \cdot 10^{-4}$	$4.1 \cdot 10^{-6}$	$1.2 \cdot 10^{-5}$	2.6%	0.7%

The de-esterification step was first studied using TEase. This enzyme (as well as TRase) was produced specifically for our laboratory by Gecco Biotech B.V., and although the formation of tropine was observed, the transformation was not quantitative enough even though several experimental conditions were tested. The best results were obtained when the hydrolysis was carried out at basic pH (without the use of the enzyme) with NaOH; ESM 1 shows the results of the hydrolysis optimization.

The oxidation reaction of tropine by TRase was then studied by measuring the absorbance at 340 nm (NADH). The experimental results obtained during the optimization study of this reaction, involving TRase concentration, pH and temperature, are detailed in the supplementary material section (ESM2). Finally, the colorimetric reactions involving the oxidation of NADH by INT and the formation of the reddish INT_{red} were studied. ESM3 summarizes the results obtained during the optimization study, which included diaphorase and INT concentrations and pH. Under the optimal conditions found (see the “[Method in batch \(UV–vis spectrophotometer\)](#)” section), the analytical figures of merit obtained are summarized in Table 1 (Fig. S3d shows the UV–vis spectra of INT with increasing concentrations of APe and inside the colour of these solutions). Taking into account that the molar absorptivity of the reduced form of INT is $19.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [20], the enzymatic method gives an atropine conversion of 58%.

The method has been applied to the determination of ATe in baby food. These samples were provided by the Laboratorio de Salud Publica (Government of Aragón-Spain). They had previously analysed the extract (according to UNE EN: 15,662:2019) using a validated HPLC–MS/MS method [21], and the atropine concentrations found were below their detection limit. We then spiked these samples with known concentrations of ATe. The results of the recovery study are shown in Table 2, which validate the ability of this method to analyse real samples.

Fig. 4 Colour obtained for the different APe concentrations used during the calibration curve. Each concentration in duplicate. Experimental conditions as indicated in 2.3.2.2

Cellulose test platforms

Measurement system: G coordinate

The ultimate aim of this study is to provide a quick and easy test for the determination of atropine in food. With that objective, this methodology has been implemented in cellulose test platforms, where the concentration of APe could be determined by measuring the RGB coordinates using a smartphone-based device system developed in our laboratory. The main improvements of this system compared to others previously proposed are as follows:

- The light box is based on the integrating sphere concept, which allows more light to be collected and is more reproducible, so that lower RGB values can be taken with better precision.
- It is fixed to the smartphone with a universal support (compatible with most of the smartphones on the market).
- The colour measurement is carried out by means of an application (AppColorimetryV1) developed in our laboratory which can be freely loaded on the mobile. This app allows (1) correcting the differences between mobiles by means of a correction matrix (calculated specifically for each mobile) that normalizes the RGB values obtained and makes them comparable between mobiles, (2) performing second-order calibration lines from the RGB values measured for the standards and (3) determining the concentration of atropine from the image taken from the samples.

The maximum absorbance of INT_{red} occurs at 500 nm. This wavelength corresponds to the green light of the visible spectra, so it is expected that the G coordinate will give the best sensitivity. The experimental results agree with this hypothesis (ESM4, Table S4a), and this coordinate gave about 3 times higher sensitivity than B or R.

Optimization

Cellulose was used as a solid substrate for the preparation of the platforms. A suspension containing the appropriate concentration of cellulose and reagents (see 2.2.3) was prepared. Previous studies carried out by our research group with this material have shown that the best results are obtained with dispersions containing 3% (w/w) or 5% (w/w) cellulose [22]; a lower % gives weak supports and higher concentrations do not allow reproducible preparation. In this reaction, both cellulose concentrations gave similar sensitivity (G_0 -G values of 133 and 138 for 3% and 5%, respectively), but the uncertainty expressed as RSD was worse for 3% cellulose (RSD=9%), compared with RSD=0.5% for 5% cellulose ($n=5$ in both cases).

Different concentrations of INT, diaphorase and NAD were tested by addition to the 5% cellulose suspensions. These concentrations were tested at two levels of atropine concentration in order to make an initial assessment of the sensitivity they could give. The results obtained are shown in ESM4 (Tables S4b and S4d) which allow the optimal concentrations to be derived.

Although it was possible to immobilize TRase simultaneously with the rest of the reagents, it was better to add TRase to the previously synthesized cellulose platforms. There are two main reasons for this: (1) some activity of this enzyme is lost during entrapment, and (2) during drying in the presence of the enzyme, the supports acquire a very high surface tension, and this prevents a homogenous impregnation of the cellulose by the analyte.

Cellulose test stability

The stability of the sensor was checked over time. To do this, several groups of three sensors (for testing 0 M, 3.3×10^{-5} M and 3.3×10^{-4} M atropine concentrations) were prepared and subjected to the reaction during 4 consecutive days; no significant differences were observed between these measurements (Table S4f). These results show that the cellulose supports were preserved for at least 5 days after their preparation.

Effect of ionic strengths

The effect of ionic strength was studied by adding different concentrations of NaCl during the preparation of the cellulose suspensions. As done in the “[Optimization](#)” section, each concentration of NaCl was tested for two levels of atropine concentration to check how it affects the sensitivity. The results obtained are shown in ESM4 (Table S4g). These results show that the ionic strength does not cause any changes in the sensor signal for concentrations within

the linear range, while a loss of signal is observed at higher concentrations.

Analytical figures of merit

Figure 3 (and ESM 5, Table S5a) shows the results obtained during the calibration study; each measurement is the average of three different values. From these values, the LOD and LOQ were obtained. An example of the colours obtained is shown in Fig. 4. Table 3 compiles the complete analytical figures of merit of this method.

Application of the method to real samples

The method was first applied to the determination of APE in the spiked samples previously indicated (Table 2) demonstrating the ability of these platforms to determine atropine in real samples.

The method was then applied to a sample of buckwheat that had previously been subjected to extraction as described in the “[Sample treatment: lixiviation from the buckwheat sample](#)” section. The cellulose test platforms were prepared as described above, and, after drying, the buckwheat extract was submitted to the standard addition method; this determination was carried out in triplicate. The result obtained was a concentration in buckwheat of 0.0612 ± 0.0016 g/kg, in agreement with normal values reported by the EFSA (2).

Conclusions

A novel rapid test for the enzymatic determination of APE has been successfully developed. It has been demonstrated, for the first time, that APE can be determined by coupling the enzymatic reaction with TRase to an indicator reaction. This methodology can be successfully implemented in cellulose platforms to determine APE concentrations in foods using the G coordinate proving to be a rapid and reliable method.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05401-x>.

Author contribution Conceptualization: SdM and JG. Methodology: IS and JG. Investigation: MD, SL, and DM. Data curation: SdM and IS. Writing—original draft preparation: MD. Writing—review and editing: SdM and JG. Funding acquisition: SdM and JG. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This work is part of the projects PID2019-105408 GB-I00 and PID2022-139235OB-I00 supported by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ and by FEDER “Una manera de

hacer Europa” and by the funding for Research Groups by the Government of Aragón, Spain (E-25_23R).

Declarations

Competing interests The authors declare no competing interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Mateus ARS, Crisafulli C, Vilhena M, Barros SC, Pena A, Sanches Silva A. The bright and dark sides of herbal infusions: assessment of antioxidant capacity and determination of tropane alkaloids. *Toxins* (Basel). 2023;15(4):245. <https://doi.org/10.3390/toxins15040245>.
- Mulder PPJ, de Nijs M, Castellari M, Hortos M, MacDonald S, Crews C, et al. Occurrence of tropane alkaloids in food. *EFSA Support Publ*. 2016;13(12):EN-1140, 200. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1140>.
- de Nijs M, Crews C, Dorgelo F, MacDonald S, Mulder PPJ. Emerging issues on tropane alkaloid contamination of food in Europe. *Toxins* (Basel). 2023;15(2):1–32.
- Dräger B. Analysis of tropane and related alkaloids. *J Chromatogr A*. 2002;978(1–2):1–35.
- Chen HX, Chen Y, Du P, Han FM. LC-MS for identification and elucidation of the structure of in-vivo and in-vitro metabolites of atropine. *Chromatographia*. 2007;65(7–8):413–8.
- Weston A, Brodmann P, Widmer M, Bartel J, Kübler E. Development of a DNA-based assay to detect and quantify tropane alkaloids producing thornapple contaminations in processed food. *Chimia* (Aarau). 2019;73(5):422–5.
- Crapnell RD, Banks CE. Electroanalytical overview: the detection of the molecule of murder atropine. *Talanta Open*. 2021;4:100073. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100073>.
- Khataee A, Hassanzadeh J, Kohan E. Specific quantification of atropine using molecularly imprinted polymer on graphene quantum dots. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2018;205:614–21.
- Page C. Enzymology and regulation of the atropine metabolism in *Pseudomonas putida*. (Doctoral dissertation, Rijksuniversiteit Leiden). 1969.
- Kato DI, Teruya K, Yoshida H, Takeo M, Negoro S, Ohta H. New application of firefly luciferase - it can catalyze the enantioselective thioester formation of 2-arylpropanoic acid. *FEBS J*. 2007;274(15):3877–85.
- Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem* [Internet]. 2018;120(3):159–67. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>.
- Scheeline A. Teaching, learning, and using spectroscopy with commercial, off-the-shelf technology. *Appl Spectrosc*. 2010;64(9):256A–68A. <https://doi.org/10.1366/000370210792434378>.
- Capitán-Vallvey LF, Palma AJ. Recent developments in handheld and portable optosensing-a review. *Anal Chim Acta*. 2011;696(1–2):27–46.
- Sun W, Li H, Wang H, Xiao S, Wang J, Feng L. Sensitivity enhancement of pH indicator and its application in the evaluation of fish freshness. *Talanta* [Internet]. 2015;143:127–31. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.021>.
- Cebrián P, Pérez-Sienes L, Sanz-Vicente I, López-Molinero Á, de Marcos S, Galbán J. Solving color reproducibility between digital devices: a robust approach of smartphones color management for chemical (bio)sensors. *Biosensors*. 2022;12(5):341. <https://doi.org/10.3390/bios12050341>.
- Connah D, Westland S, Thomson MGA. Recovering spectral information using digital camera systems. *Color Technol*. 2001;117(6):309–12.
- Sanz-Vicente I, López-Molinero Á, de Marcos S, Navarro J, Cebrián P, Arruego C, et al. Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in food. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(18):4261–71.
- Apparatus and system for colorimetry, fluorimetry and chemiluminescence techniques. Patent Reference: 2305011-EPP0; Application number: EP23383338.3.
- Domínguez M, Oliver S, Garriga R, Muñoz E, Cebolla VL, de Marcos S, et al. Tectomer-mediated optical nanosensors for tyramine determination. *Sensors*. 2023;23(5):2524. <https://doi.org/10.3390/s23052524>.
- Babson AL, Babson SR. Kinetic colorimetric measurement of serum lactate dehydrogenase activity. *Clin Chem*. 1973;19(7):766–9. <https://doi.org/10.1093/clinchem/19.7.766>.
- Laboratorio de Salud Pública. Government of Aragón. ITE-FQ/096 (UNE EN 15662: 2019): https://www.aragon.es/documentos/d/guest/cartera_servicios_laboratorio_dgsp_2024.pdf.
- Sanz-Vicente I, Rivero I, Marcuello L, Montano MP, de Marcos S, Galbán J. Portable colorimetric enzymatic disposable biosensor for histamine and simultaneous histamine/tyramine determination using a smartphone. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2023;415(9):1777–86. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04583-0>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



NADPH-mediated seedless in situ formation of gold or gold-platinum nanoparticles for the enzymatic determination of atropine

Mario Domínguez^{1,2} · Susana de Marcos^{1,2} · Javier Galbán^{1,2}

Received: 29 October 2024 / Accepted: 8 January 2025
© The Author(s) 2025

Abstract

The without-seeds in situ formation of gold nanoparticles from NADPH and its application to the colorimetric determination of atropine (a tropane alkaloid) in cereals is reported. The method is based on a chemical hydrolysis, followed by an enzymatic oxidation by NADP catalyzed by tropinone reductase in the presence of Au(III) or Au(III)/Pt(II). During this reaction, the formed NADPH reduces the metal ion precursor to AuNPs (or AuPtNPs) and the absorption due to the plasmon band (550 nm or 575 nm) is measured. The method (AuPtNPs) allows the determination of the analyte in the concentration range 0.025 to 0.09 mM with an RSD of 3% ($n=5$) and is applied to its determination in spiked buckwheat samples using the standard addition method, with $96.9 \pm 2.0\%$ recovery. It is also demonstrated that NAD(P)H and NADH have different kinetics for AuNP generation, which could be used to discriminate between these two cofactors.

Keywords Gold nanoparticles · Gold-platinum nanoparticles · Tropinone reductase · Tropane alkaloid · NADH

Introduction

Atropine is, along with scopolamine, the most important and abundant tropane alkaloid (TA). It has an anticholinergic effect, so in controlled doses it has pharmacological properties (i.e. anti-sickness, anti-shock or bronchodilator) [1] and is also used as an eye dilator for medical examinations, but in medium/high doses it has devastating effects on human health. The problem is that atropine can be found in significant amounts in foods such as tea, aniseed and especially in products made from various types of cereal. This is because atropine is a secondary metabolite produced in plants of several families (such as *Brassicaceae*, *Solanaceae*, and some others) whose seeds contaminate other plants such as linseed, soya, sorghum, millet or sunflower [2, 3].

There seems to be no agreement between [4] on the lethal dose of atropine in the human organism but, although this varies among different studies, it can be said to be around 100 mg for adults and 10 mg (or less) for children. This

low lethal dose has encouraged various organizations to establish a maximum allowable concentration of atropine in some foods. In 2016, the European Union (EU) set a maximum concentration of 1 mg/kg of atropine in cereals for children [5]. Later, in 2021, the EU will set a limit for other foods such as tea (25 mg/kg), aniseed (50 mg/kg) or non-transformed cereals (between 5 and 25 mg/kg) [6]. To have accurate information on these concentrations, the European Food Safety Authority (EFSA) has sponsored several studies to identify the levels of atropine and other TAs in different foods in Europe [7]. As a result, many samples revealed concentrations up to 400 mg/kg, other studies have also reported high concentrations compared to the recommended limits [3, 8] and even extremely high concentrations have been found in some samples (more than 3000 mg/kg and even a sample containing 25,000 mg/kg has been reported [9]).

The analytical methods used in laboratories for measuring atropine (and other TAs) usually involve chromatographic techniques [10], especially HPLC, with the complexity of sample handling depending on the detector used. A very commonly reported setup is HPLC–MS/MS [7], in which most of the sample treatment involves a first step of extraction with polar solvents and different additional operations such as filtration through a 30KD column [11, 12] or a more recent method based on QuEChERS using SPE [13]. These methods have given satisfactory results and are used in

✉ Susana de Marcos
smarcos@unizar.es

¹ Analytical Chemistry Department, University of Zaragoza, 50009 Saragossa, Spain

² Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), CSIC-Universidad de Zaragoza, 50009 Saragossa, Spain

laboratories. For rapid, continuous and even in situ control, ELISA assays have been developed [14, 15] and commercialized [16]. These methods give good results in terms of sensitivity and selectivity, but as they are irreversible and very expensive, they are not universally used for rapid and frequent control of food samples.

The enzymatic routes of degradation of atropine are known. From an analytical point of view, one of the most interesting consists in coupling the deesterification (enzymatic [17] or chemical) and later oxidation with tropinone reductase [18, 19] (Fig. 1, reaction A and B). To the best of our knowledge, only one previous paper [20] has reported a study involving the coupling of both reactions with an indicating enzymatic reaction based on an organic dye (Diaphorase/INT) has been reported for the colorimetric enzymatic determination of this analyte.

New indicating methods based on the optical properties of nanomaterials are currently emerging. These materials are expected to compete with, or even replace, organic chromophores and fluorophores in the development of in-solution methods, optical sensors [monitoring or disposable systems] and fluorescence imaging [21, 22]. The weakness of nanomaterials is that their optical signal lacks sufficient selectivity for the determination of substances in real samples. The combination of enzymes with nanomaterials is then a response to these limitations, acting through different mechanisms (etching, quenching...) most of which require prior synthesis of the nanomaterial [21–23]. Research in this field is opening up new possibilities for optical enzymatic methods of analysis. This paper aims to make a step forward in this direction. It is based

on the in situ generation of metallic nanomaterials during NADPH-dependent enzymatic reactions. Previous work of the research group has shown that oxidase-type enzymes are able to reduce the metallic ion to stable nanomaterials whose optical properties (absorption, fluorescence) can be related to the concentration of the corresponding analyte [24, 25].

The first studies exploring the possibility of using the redox properties of NADH to reduce Au(III) as a basis for analytical methods were carried out by Willner's group [26]. They found that NADH, through its nicotinamide group, can reduce Au (III) in a two-step process:



where the second step is catalyzed by the previously added seeds of AuNPs (13 nm). Following this idea, it was possible to couple the previous reaction as an indicator method for the enzymatic reaction of lactate with the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), but with a short response range (3–6 mM). Later they improved the sensitivity of the method replacing Au(III) with Cu(II) and regrowing AuNPs with Cu⁰ [27]. This methodology of regrowing seed AuNPs by NAD(P)H reaction with ion metals has been used by other authors [28, 29]. Later, the possibility of generating AuNP for the direct reaction between Au(III) and NAD(P)H without seeds [30] was demonstrated, but as far as we know this has not been implemented as an indicating reaction in analytical methods (enzymatic or not).

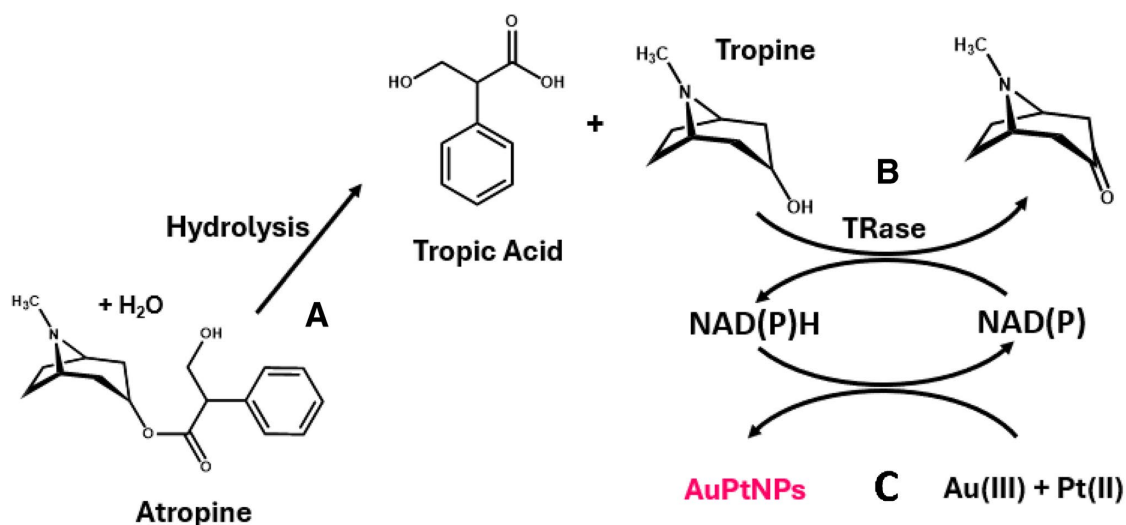


Fig. 1 Scheme of the reactions studied in this work

In this work, the possibility of using NADPH (and NADH) for the in situ generation of AuNPs in the absence of seeds was investigated, as this cofactor can also act as a stabilising agent. The method was coupled to the enzymatic determination of atropine by combining the enzymatic reactions of atropine (Fig. 1A and B) with reactions (1 and 2) as shown in Fig. 1C. This new method does not reach the limits of detection reported by ELISA but is in line with the advantages of enzymatic methods over immunological ones, as described below, and allows matrix interferences to be suppressed efficiently. Interestingly, the generation of nanomaterial makes it possible to discriminate between NADH and NADPH.

Materials and methods

Reagents and solutions

All chemicals were used without further purification: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \geq 99\%$ (Panreac 131,679.1211), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \geq 99.5\%$ (Sigma)(EC 207–838-8), $\text{CH}_3\text{-COONa} \sim 100\%$ (VWR Chemicals 27,648.294), tetrachloroauric (III) acid hydrate 99.995% ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, EC 240–948-4), potassium tetrachloroplatinate (II) 98% (Sigma-Aldrich), β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide hydrate NAD (Sigma-Aldrich N1511), Tropine (Sigma-Aldrich 93,550), Tropinone Reductase (TRase) (Gecco Biotech, EC 1.1.1.206).

Equipment

A Tecnai F30H-7650 microscope (scanning and transmission mode, STEM and high-resolution mode, HRTEM) (FEI, The Netherlands, <https://www.fei.com>) was used to characterize the gold nanoparticles. Spectroscopic measurements were performed using an Agilent 8453A photodiode UV–vis spectrophotometer, a SPECORD® 210 Plus UV–vis molecular absorption spectrophotometer (one cm cuvettes were used), and a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)) equipped with a 96-well microplate reader accessory. The Millipore MiliQ H_2O system was used for water purification. The temperature of the reactions was controlled by a thermostatic bath connected to the cuvette compartment.

Deesterification of atropine

A previous study [20] showed that atropine is better deesterified to tropine by hydrolysis in alkaline medium. To do that 20 μL of atropine of the proper concentration was mixed with 20 μL of NaOH 2 M and let to react for 5 min.

Absorbance measurements in cuvette

Absorbance measurements were carried out in a UV–vis molecular absorption spectrophotometer. PMMA cuvettes with a path length of 1 cm and a final volume of 2 mL were used. Measurements were performed in spectral scan mode, measuring the spectrum from 300 to 800 nm, with measurements taken every 30 s.

For the determination of NADPH, 20 μL of the corresponding NADPH solution was mixed with 1940 μL phosphate buffer pH 7, 20 μL Pt(II) and 20 μL Au(III), the concentration of the metals being the appropriate one for each experiment, and the absorbance was monitored. If the determination was carried out with gold only, the 20 μL of Pt(II) was replaced by 20 μL of phosphate buffer solution.

For the determination of atropine, 20 μL of the corresponding deesterified atropine solution was mixed with 200 μL carbonate buffer pH 10, 40 μL $\text{NADP } 5 \times 10^{-3}$ M (in aqueous solution), 5 μL TRase 8.8 mg/ml (in buffer pH 7.5) and allowed to react for 5 min. Then, 1675 μL of phosphate buffer pH 7, 48 μL Pt(II) 5×10^{-2} M and 12 μL Au(III) 5×10^{-2} M were added and the absorbance was monitored.

Absorbance measurements in 96-well plates by reflectance

When many measurements are required (mainly for systematic optimisation), it is more convenient to use a well plate reader to obtain all the measurements simultaneously. As we do not have access to a specific instrument, the measurements were carried out with a spectrofluorometer according to the following procedure: 1) the fluorescence intensity was acquired with the synchronous scanning function (maintaining $\text{Dl} = 0$ nm between the two monochromators) in the 400–800 nm range; the spectrum obtained for a blank solution corresponded to the $I_{0,\lambda}$ value of each wavelength; 2) after the addition of the corresponding solution, the synchronous scanning was performed ($\text{Dl} = 0$ nm) again; the spectrum obtained corresponded to $I_{t,\lambda}$; 3) the complete absorption spectrum was then calculated as:

$$\text{Abs}_{\lambda} = -\log\left(\frac{I_{t,\lambda}}{I_{0,\lambda}}\right) \quad (3)$$

For the determination of NAD(P)H, 240 μL of phosphate buffer solution pH 7 was mixed with 30 μL of NAD(P)H at the appropriate concentration (in aqueous solution) and 30 μL of a mixture of gold and platinum at the appropriate concentration (in aqueous solution).

Treatment of the sample: lixiviation from the buckwheat sample

The method developed by Adamse was applied [11]. Four grams of buckwheat is weighed, crushed, and lixiviated in a beaker with 40 mL of a mixture of methanol/water/formic acid in a ratio of 60/40/0.4 (V/V/V). After washing for half an hour, a 4-mL aliquot of the supernatant is filtered by centrifugation through a 10-kDa ultrafilter. The measurement procedure described in 2.4 for atropine was applied to these samples, with 20 μL of atropine solution replaced by 20 μL of sample solution.

Results

NADPH determination by nanomaterials generation

Our results confirm that NADPH can generate AuNP without seeds with a maximum absorbance at 540 nm. Figure 2 shows the molecular absorption spectra (A) and the absorbance at the maximum (Abs_{max}) versus time profile ($\text{Abs} = f(t)$) (B) obtained along the reaction (measurement in cuvette). An S-shaped line is obtained during the first few minutes, which is later distorted to give an increasing signal. Figure 3A shows that spherical and reproducible

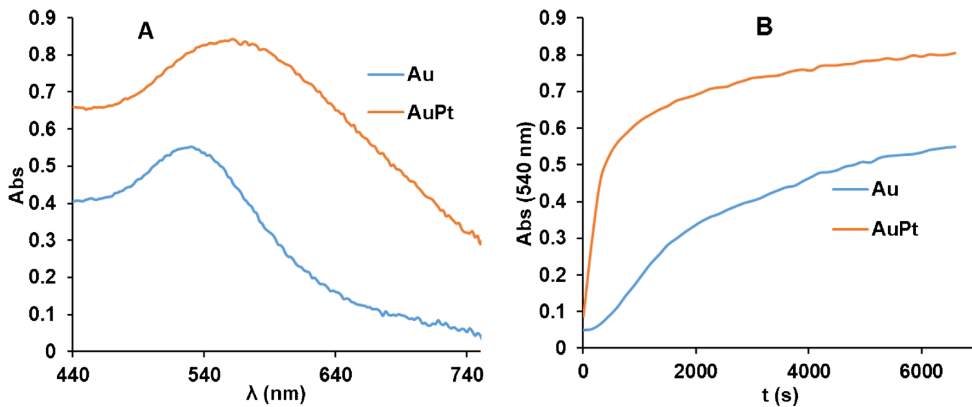


Fig. 2 A) Molecular absorption spectra of AuNPs and AuPtNPs synthesised in the presence of NADPH and Au(III) or Au(III)/Pt(II), respectively. B) Variation with time at $\text{Abs}_{540 \text{ nm}}$ of the corresponding nanoparticles. In both cases, a concentration of NADPH of 1×10^{-4} M was used

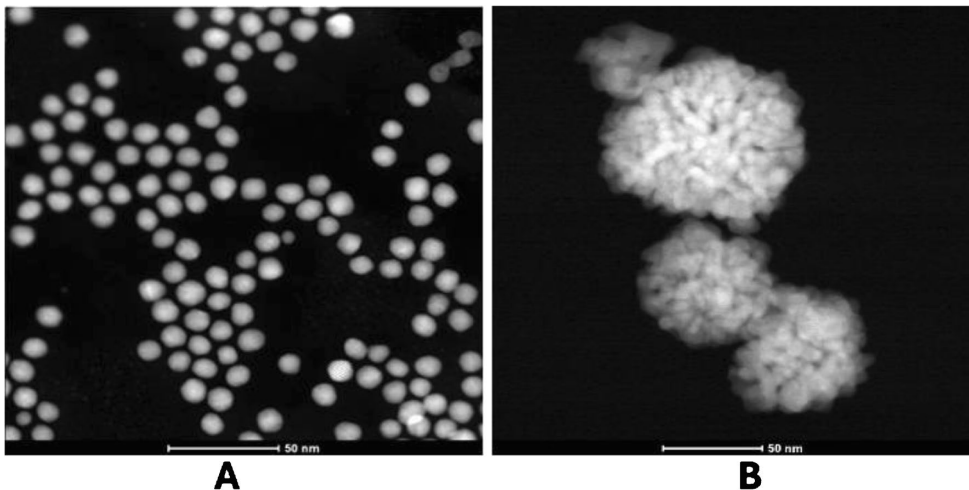


Fig. 3 A) TEM image of the AuNPs. B) TEM image of the AuPtNPs

AuNPs are formed, with a slight tendency to aggregate. During the optimisation study it was observed that the formation of AuNPs from Au (III) and NADPH is highly dependent on the nature of the buffer, the pH, the ionic strength of the medium and the Au(III) concentration.

The effect of pH is important in all reactions involving NADPH, including enzymatic reactions, and has therefore been studied in detail (Figure S1A). There are two opposing effects. On the one hand, NADPH can degrade over time [31] (following a mechanism explained by Alivisatos [32]), such that the lower the pH of the solution, the faster the degradation [33]. This was confirmed in Figure S1B which shows that the kinetics of NADPH degradation at pH=5, both in acetic/acetate buffer and in phosphate solution medium, follow a first-order kinetics with constants of the order of $0.1 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. These results agree with those obtained by We [33]. On the other hand, the normal reduction potential of NADPH increases with increasing pH, so that its reducing power decreases. The optimum pH range found in this work is between 5 and 7. At higher pH, nanoparticles are formed, but more slowly and in smaller proportions.

The buffer concentration is also important. As the buffer concentration increases, so does the degradation effect increase (see the value of the apparent constant, Figure S1B), and also the ionic strength, which has a very important effect on nanoparticle formation (the higher the ionic strength, the higher the absorbance). However, at buffer concentrations above 0.1 M, a second maximum appears at 700 nm (see Figure S1C) with a decrease in absorbance at 540 nm, which may be due to AuNP aggregation reducing the sensitivity at 560 nm. Integrated absorbance over the entire spectral range could be used, but this does not improve sensitivity.

The effect was studied of Au(III) concentration on the analytical figures of merit was studied at the optimum pH and buffer concentration. Figure S2A shows the results obtained. As can be seen, there is a sigmoidal relationship between absorbance and NADPH concentration. Since the lower the Au(III) concentration, the higher the sensitivity and the shorter the response range, the Au(III) concentration can be chosen appropriately depending on the NADPH concentration range to be investigated. Balancing both aspects, a concentration of $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ Au(III) was found to be optimal; using this concentration (Figure S2C), the NADPH response range goes from 8.0×10^{-5} to $1.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ (see Figure S2B for $\text{Abs} = f(t)$ profiles). Both the S-shaped calibration line and the short range have also been obtained by other authors using AuNP seeds [16]. In addition to the response range, the analytical figures of merit of this method are a limit of detection (LoD) of $2.4 \times 10^{-5} \text{ M}$, a limit of quantification (LoQ) of $8.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ and a relative standard deviation of 3.4%

($1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ NADPH, $n=5$). From an analytical point of view, a linear relationship leads to less uncertainty (due to calibration) than an S-shape. Figure S2D shows how Figure S2C can be linearized if desired.

The analytical figures of merit obtained for the in situ generation of nanoparticles from Au(III) during enzymatic reactions can be improved by using Au(III)/Pt(II) mixtures as ion metal precursors [24]. There are two main reasons for this: 1) Pt(II) is able to reduce Au(III) to Au(I); 2) the molar absorptivity of AuPtNP is higher [24, 34], probably due to its nanodendritic shape. This was also tested in this case (Fig. 3B shows the TEM image of the obtained AuPtNPs). First, the Pt(II)/Au(III) ratio was optimized, with the best results obtained at platinum concentrations four times higher than those of gold (Figure S3A). In this case, the addition of Pt(II) together with Au(III) resulted in a color change and a broader absorption spectrum, apart from a different $\text{Abs} = f(t)$ representation (Fig. 2). Furthermore, the addition of platinum to the reaction allows the determination of smaller amounts of NADPH as well as having a longer response range. As in the previous section, and also using 0.1 M phosphate buffer solution at pH=7, with a concentration of Au(III) = $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ together with Pt(II) = $4 \times 10^{-4} \text{ M}$, a representation of the absorbance obtained at the absorption maximum (550 nm in this case) was made (Fig. 4A). This representation covers a range of concentrations from $2.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ to $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($\text{Abs} = f(t)$ are shown in Figure S3B). In addition to the response range, the analytical figures of merit of this method were calculated, being $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ LoD, $2.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ LoQ and a relative standard deviation of 3.7% ($8.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ NADPH, $n=5$). This S-shaped curve can also be linearized (Fig. 4B) according to Eq. (4). Abs_∞ and Abs_0 are the maximum and minimum absorbances, respectively, $C_{1/2}$ is the concentration at half height (inflection point) and B is a dimensionless parameter called the shape factor, which is related to the curvature.

$$\log \left(\frac{\text{Abs} - \text{Abs}_0}{\text{Abs}_\infty - \text{Abs}} \right) = B \log C - B \log C_{1/2} \quad (4)$$

As can be seen, the use of AuPtNP allows both the determination of lower NADPH concentrations and a wider response range.

The reason why NADPH leads to a higher formation rate of AuPtNP than AuNP was investigated using a mathematical model previously developed by our group based on a classical three-step kinetic model of nanomaterial formation (nucleation, growth and aggregation). This is described in detail in section S2 of the Supplementary Material. Broadly speaking, the nucleation process from Au(III) is slower than the growth process, whereas in the case of starting from Au(III)/Pt(II) both processes are fast and occur simultaneously. Furthermore, in this section S2, it can be observed that the application of the model to the results allows us to

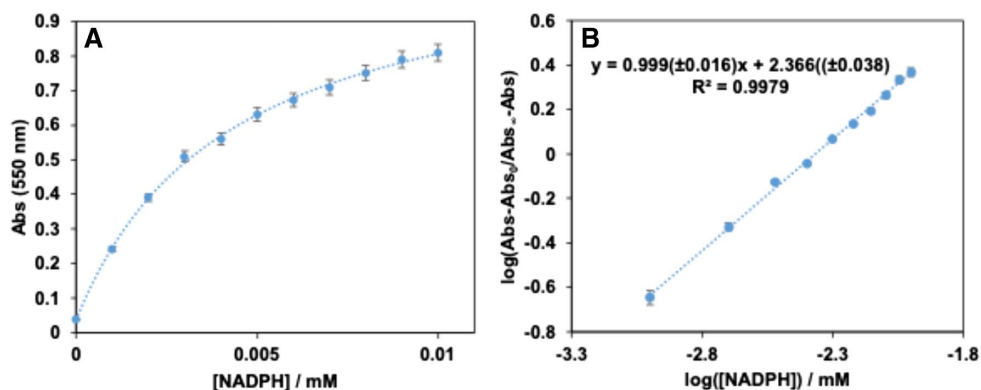


Fig. 4 Calibration curve for the reaction using the following concentrations of metals: $[\text{Au(III)}]=1 \times 10^{-4}$ M; $[\text{Pt(II)}]=4 \times 10^{-4}$ M. **A)** $\text{Abs}=f([\text{NADH}]$ representation; **B)** fitting to Eq. (4)

obtain the values of the rate constants of each process and shows that the molar absorptivity of AuPtNP is of the order of about 35 times higher than that of AuNP, which justifies the higher sensitivity.

Differences between NADH and NADPH

It is well-known that the cofactor of NAD-dependent enzymes can be either NADP or NAD. Many enzymatic reactions can use both, but some others require the specific use of one or the other. For example, glucose-6-phosphate dehydrogenases prefer NADP but others prefer NAD [35, 36]. In addition, the two compounds have different signaling applications in the organism. It may therefore be of interest to distinguish between them. To test this, the generation of AuNPs or AuPtNP from NADP or NAD was investigated. The results are shown in

Fig. 5. As can be seen, Au(III) is able to discriminate between the two compounds, since in the same time interval NADH gives practically no AuNP, whereas NADPH does so. However, when Au(III)/Pt(II) is used, both compounds give the same signal (spectra are shown in Figure S5A).

To explain the behavior with Au(III), it is important to consider that NAD and NADP (and their reduced forms) can adopt different conformational structures, namely folded (the most stable in solution) or extended (the most stable when bound to enzymes) (see Figure S5B) [37, 38] and depending on this, the ability to bind to metal ions can change. Published studies have shown that although there are six possible binding sites for metal ion coordination to these dinucleotides, the phosphate and the ribose groups are preferred. However, the final results are not in complete agreement as to which of the two sites is most likely.

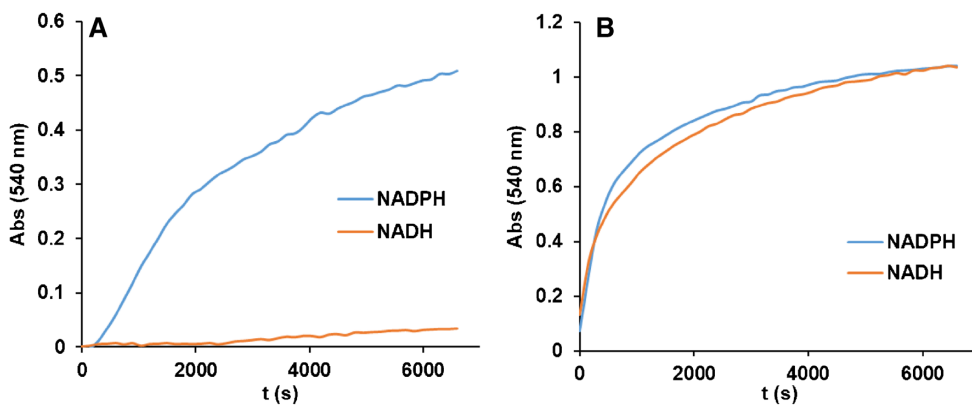


Fig. 5 Comparison of the kinetics of the reaction between NADPH and NADH (1.5×10^{-4} M for both compounds in A; 1.5×10^{-5} M for both compounds in B). **A)** $[\text{Au(III)}]=1 \times 10^{-4}$ M.; **B)** $[\text{Au(III)}]=1 \times 10^{-4}$ M. $[\text{Pt(II)}]=4 \times 10^{-4}$ M

For NAD, studies carried out by Hoffman et al. [37] with Cu(II) showed that the complex responds to a 2:1 NAD:Cu(II) stoichiometry, with the Cu(II) coordinating to the ribose of the adenosine group of each NAD (Figure S5C). However, Herrero et al. [39] suggest coordination via the phosphate group involving adenosine. For NADP, the results obtained by Green et al. [40] with Mn(II) and Mondelli et al. [41] with Mg(II) and Cr(III) indicate that the metal ion is bound to the three phosphates (Figure S5D). Recent studies by Kruszynski et al. [42] with NADPH and LiCoO₂ confirm this and show that binding to the phosphate-ribose moiety is essential for the metal ion reduction. Furthermore, externally added phosphate (i.e., as a buffer) inhibits the interaction of the ribose with the metal ion [42]. It can therefore be concluded that the different behavior of NAD and NADP with Au(III) is due to the different way in which the metal ion coordinates the dinucleotide.

Pt(II) is able to reduce Au(III) to Au(I), so the complexes are formed on this species. There are not many studies on monovalent metal ions. Those published for Li(I) with NAD (by X-ray crystallography) [43] show that it is bound to two NAD molecules. If Au(I) follows this behavior, the same bond is formed whether it is a molecule of NADH or NADPH and no differences are observed between them.

These results show and justify that these reactions can be used both for the joint determination of NADH and NADPH and for the differentiation of the two molecules. For a joint determination, the total concentration (NADH + NADPH) would first be determined using the reaction in the presence of platinum, since both analytes have the same sensitivity in their linear range. The concentration of NADPH would then be determined using the reaction without platinum, as NADH does not react in this case.

Coupling to the tropinone reductase reaction: application to real samples

As mentioned above, the aim of the work was to couple the formation of AuNPs to the enzymatic reaction of atropine with tropinone reductase (TRase). During sample preparation, atropine has already been hydrolysed to tropine, so the analysis is actually performed on tropine, skipping the previous step. The optimum conditions for tropine oxidation using reaction of Fig. 1B have already been studied and are pH = 10 (carbonate buffer) and 0.022 mg/mL TRase concentration. Comparing these experimental conditions with those obtained for the generation of nanomaterials from NADPH, the pH must be changed between tropine oxidation (pH = 10) and nanoparticle formation (pH = 7), since it is not possible to find a compromise pH for carrying out both reactions simultaneously.

Therefore, the oxidation reaction is first carried out in low volume at pH 10, using the optimised NADP concentration (1×10^{-4} M), and then brought to pH 7 with the addition of Au(III) or Au(III)/Pt(II). Very small signals due to nanoparticles were observed with Au(III) alone, but large signals were observed with Au(III)/Pt(II) (Fig S6A).

The main parameters to be optimised were the concentrations of Au(III) and Pt(II). Always maintaining a ratio of 1:4 (Au:Pt) between them, tests were carried out with different gold concentrations (Figures S6B, S6C), finally selecting 4×10^{-4} M of Au(III) (and, respectively, $1 \times 6 \cdot 10^{-3}$ M of Pt(II)) as the optimum concentration.

From the analytical point of view, the most important difference between AuPtNP generation when NADPH is added directly or generated during the TRase reaction with tropine is the nature of the Abs = f(t) profiles obtained. As can be seen in Figure S7, the kinetics of AuPtNP generation depends on the atropine concentration used, but all the profiles tend to the same final absorbance. In this case the analytical parameter that can be related to the atropine concentration could be either the absorbance obtained at a given time or the area of the Abs = f(t) profile at a chosen time. Both parameters give good results, but better precision was obtained using the area.

Figure 6A shows the integrated area of Abs = f(t) profiles obtained at 540 nm for each atropine concentration from 0 to 2000s. An S-shaped curve is obtained which, after applying the transformation given by (4), again gives a linear relationship (Fig. 6B). Each measurement is the average of three different values. The relative standard deviation obtained was 3% ($8 \times 0 \cdot 10^{-5}$ atropine, $n = 5$), and the LoD and LoQ were 0.0204 mM and 0.0253 mM, respectively. The LoD and LoQ were calculated using the calibration curve where the area to be interpolated would be the value obtained by calculating: $\text{Area}_b = 3s_b + \text{Area}_{\min}$ and $\text{Area}_b = 10s_b + \text{Area}_{\min}$, respectively. The linear range goes from 0.025 to 0.09 mM.

The sensitivity obtained is slightly lower than that of enzymatic methods based on the classical colorimetric or fluorometric properties of a dye. Nonetheless, it has several advantages, for example: additional enzymes are not required, many of the lateral reactions that HRP can suffer (such as the reaction with phenols) or the oxidized form of the dye are avoided, the oxidation of the dye is prevented, and interferences caused by H₂O₂ reactive species are also suppressed.

The method was then applied to the determination of atropine in buckwheat samples. A commercial buckwheat was first subjected to the sample treatment described in Sect. 2.5. As the sample gave an atropine concentration below the limit of quantification of the method, it was fortified with a constant atropine concentration (6×10^{-5} M). Different volumes of matrix were subjected to the described procedure, but recoveries lower than 100% were obtained (Table S1), revealing proportional interferences.

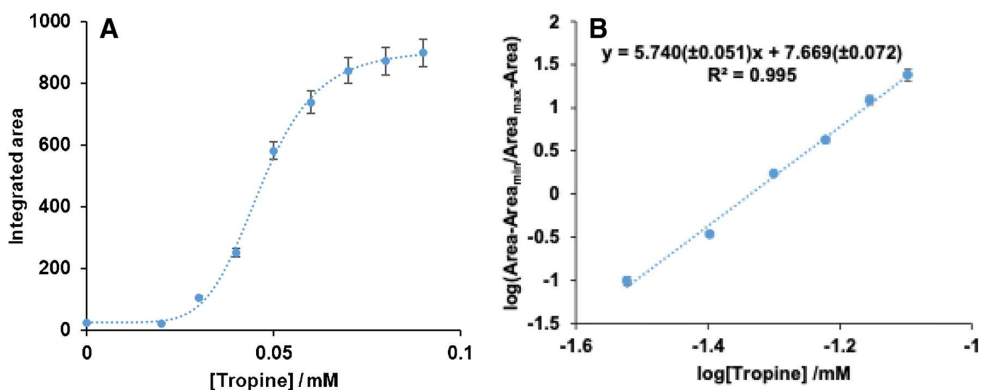


Fig. 6 Calibration lines obtained for atropine determination with TRase, Au(III) and Pt(II). **A**) Calibration line; **B**) logistic curve for the reaction using the following concentrations of metals: [Au(III)] = 4×10^{-4} M; Pt(II) = $1 \times 6 \cdot 10^{-3}$ M

Although the calibration line obtained fits a 4-parameter logistic curve, the standard addition method can still be applied. The method developed is described in the Supplementary Material (Annex 1); most importantly, the $C_{1/2}$ and B values are not affected by matrix interferences. The procedure is as follows:

- 1) Prepare a sample solution and another sample solution with a high concentration of the spiked analyte (such that its concentration corresponds to the upper flat zone of Fig. 6A). The absorbance values of both solutions are measured (Abs_s and $Abs_{\infty,s}$, respectively).
- 2) The $Abs_{\infty,s}$ is divided by the Abs_{∞} value of the calibration line to obtain a correction factor (P). The Abs_0 value is then multiplied by P to obtain $Abs_{0,s}$. The value of P depends on the sample to be analysed and on the sample preparation procedure (sample weight, sample volume, solvent volume, and volume taken for the determination).
- 3) The values of Abs_s , $Abs_{\infty,s}$, and $Abs_{0,s}$ are substituted in the equation of the calibration line and the concentration value is obtained.

To test this procedure, the sample was spiked with four different concentrations of atropine. The results obtained (Table S2) showed an average recovery of $96.9 \pm 2.0\%$ ($n=4$).

Conclusions

This paper demonstrates that the formation of gold nanostructures by reaction with NADPH formed after enzymatic reactions involving dehydrogenase enzymes

is feasible, does not require nanoparticle seeds and can be applied to the determination of atropine in buckwheat samples. This method avoids the use of indicator reactions involving chemical dyes and peroxidase. Although a reasonably good sensitivity is obtained, it is slightly lower than the dyes/peroxidase systems, and improvements need to be made, probably involving the in situ generation of other nanomaterials. In addition, the application of this method to other substrates and other dehydrogenase-type enzymes needs to be investigated. Furthermore, the generation of AuNP from Au(III) allows us to differentiate between NADH and NADPH, opening up new opportunities for simultaneous enzymatic determinations or selective studies of these dinucleotides.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00604-025-06964-x>.

Author contributions Conceptualization, SdM. and J.G.; methodology, SdM. and J.G.; investigation, MD; data curation, MD; writing—original draft preparation, MD; writing—review and editing, SdM and J.G.; funding acquisition SdM and J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This work is part of the projects PID2019-105408 GB-I00 and PID2022-139235OB-I00 supported by MCIN/ AEI /<https://doi.org/10.13039/501100011033/> and by FEDER “Una manera de hacer Europa” and by the funding for Research Groups by the Government of Aragón, Spain (E-25_23R).

Data availability No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Ethical approval Not applicable.

Competing interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Aldossary SA (2022) Review on pharmacology of atropine, clinical use and toxicity. *Biomed Pharmacol J* 15:691–197. <https://doi.org/10.13005/bpj/2408>
- Kohnen-Johannsen KL, Kayser O (2019) Tropane alkaloids: Chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules* 24:796. <https://doi.org/10.3390/molecules24040796>
- Ren Z, Zhang H, Wang Z, Chen X, Yang L, Jiang H (2022) Progress in Immunoassays of Toxic Alkaloids in plant-derived medicines: A Review. *Toxins* <https://doi.org/10.3390/toxins14030165>
- Adamse P, van Egmond HP, Noordam MY, Mulder PPJ, De Nijs M (2014) Tropane alkaloids in food: poisoning incidents. *Qual Assur Saf Crop Foods* 6:15–24. <https://doi.org/10.3920/QAS2013.0314>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2013) Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA J* 11:3386. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3386>
- Commission Regulation (EU) 2021/1408 (2021) amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of tropane alkaloids in certain foodstuffs L304/1 <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2021/1408/oj>. Accessed 15 Dec 2024
- Mulder PPJ, de Nijs M, Castellari M, Hortos M, MacDonald S, Crews C et al (2016) Occurrence of tropane alkaloids in food. *EFSA Support Pbl* 13:1140E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1140>
- Caprai E, Prizio I, Peloso M, Minkoumba Sonfack G, Bonan S, Benini N et al (2024) Case reports of tropane alkaloid contamination in spinach from Italy and its potential implications for consumer health. *Food Control* 160:110334. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110334>
- Perharič L, Koželj G, Družina B, Stanovnik L (2013) Risk assessment of buckwheat flour contaminated by thorn-apple (*Datura stramonium* L.) alkaloids: A case study from Slovenia. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 30:321–330. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.743189>
- Casado N, Gañan J, Morante-Zarcaro S, Sierra I (2024) Recent food alerts and analytical advances related to the contamination of tropane and pyrrolizidine alkaloids in food. *Front Chem Biol* 3:1360027. <https://doi.org/10.3389/fchbi.2024.1360027>
- Adamse P, van Egmond H (2010) Tropane alkaloids in food. *RIKILT Report* 2010.011. <https://doi.org/10.4236/crcm.2023.126026>
- EURL-MP-method_004 v1 (2020) Determination of tropane alkaloids in processed cereal-based foods for infants and young children by LC-MS/MS. EURL mycotoxins and plant toxins, WFSR Wageningen University & Research
- Chen H, Marín-Sáez J, Romero-González R, Garrido Frenich A (2017) Simultaneous determination of atropine and scopolamine in buckwheat and related products using modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem* 218:173–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.075>
- Wang Z, Zheng P, Wang J, He S, Ren Z, Zhang Y et al (2021) Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a broad-spectrum monoclonal antibody for tropane alkaloids detection in pig urine, pork and cereal flours. *Food Chem* 337:127617. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127613>
- Virtanen R, Kanto J, Iisalo E (1980) Radioimmunoassay for Atropine and l-Hyoscyamine. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 47:208–212. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1980.tb01561.x>
- Neogen. Ipratropium/Atropine Forensic ELISA Kit: <https://www.neogen.com/es/categories/toxicology/ipratropium-atropine-forensic-elisa-kit/>. Accessed 15 Dec 2024
- Harrison PK, Tattersall JEH, Gosden E (2006) The presence of atropinesterase activity in animal plasma. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 373:230–236. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0054-5>
- Bartholomew BA, Smith MJ, Long MT, Darcy PJ, Trudgill PW, Hopper DJ (1995) Tropine dehydrogenase: purification, some properties and an evaluation of its role in the bacterial metabolism of tropine. *Biochem J* 307:603–608. <https://doi.org/10.1042/bj3070603>
- Dräger B (2006) Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* 67:327–337. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.12.001>
- Domínguez M, Moraru D, Lasso S, Sanz-Vicente I, de Marcos S, Galbán J (2024) Colorimetric enzymatic rapid test for the determination of atropine in baby food using a smartphone. *Anal Bioanal Chem* 416:7317–7323. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05401-x>
- Steinegger A, Wolfbeis OS, Borisov SM (2020) Optical sensing and imaging of pH values: Spectroscopies, materials, and applications. *Chem Rev* 120:12357–12489. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00451>
- Wolfbeis OS (2015) An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem Soc Revs* 44: 4743–4768. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cs/c4cs00392f>. Accessed 15 Dec 2024
- Fang C, Dharmarajan R, Megharaj M, Naidu R (2017) Gold nanoparticle-based optical sensors. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.10.008>
- Camacho-Aguayo J, de Marcos S, Felices C, Galbán J (2023) In situ enzymatic generation of Au/Pt nanoparticles as an analytical photometric system: proof of concept determination of tyramine. *Microchim Acta* 190:114. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05698-y>
- Camacho-Aguayo J, de Marcos S, Mora-Sanz V, Galbán J (2022) Selective generation of gold nanostructures mediated by flavoenzymes to develop optical biosensors. *Biosens Bioelectron* 215:114579. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114579>
- Xiao Y, Pavlov V, Levine S, Niazov T, Markovitch G, Willner I (2004) Catalytic growth of Au nanoparticles by NAD(P)H cofactors: Optical sensors for NAD(P)+-dependent biocatalyzed transformations. *Angew Chem Int Ed* 43:4519–4522. <https://doi.org/10.1002/anie.200460608>
- Shlyahovsky B, Katz E, Xiao Y, Pavlov V, Willner I (2005) Optical and electrochemical detection of NADH and of NAD+-dependent biocatalyzed processes by the catalytic deposition of copper on gold nanoparticles. *Small* 1:213–216. <https://doi.org/10.1002/sml.200400057>
- Peng T, Qin W, Wang K, Shi J, Fan C, Li D (2015) Nanoplasmonic imaging of latent fingerprints with explosive RDX residues. *Anal Chem* 87:9403–9407. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02248>

29. Wang Z, Chen Q, Zhong Y, Yu X, Wu Y, Fu FF (2020) A multi-color immunosensor for sensitive visual detection of breast cancer biomarker based on sensitive nadh-ascorbic-acid-mediated growth of gold nanobipyramids. *Anal Chem* 92:1534–1540. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04828>
30. Baymiller M, Huang F, Rogelj S (2017) Rapid one-step synthesis of gold nanoparticles using the ubiquitous coenzyme NADH. *Matters (Zur)* <https://doi.org/10.19185/matters.201705000007>
31. Wong CH, Whitesides GM (1981) Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD (P) H cofactor regeneration by using glucose-6-phosphate and the glucose-5-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Am Chem Soc* 103:4890–4899. <https://doi.org/10.1021/ja00406a037>
32. Alivisatos S, Ungar F, Abraham G (1964) Non-enzymatic interactions of reduced coenzyme I with inorganic phosphate and certain other anions. *Nature* 203:973–975. <https://doi.org/10.1038/203973a0>
33. Wu JT, Wu LH, Knight JA (1986) Stability of NADPH: Effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clin Chem* 32:314–319. <https://doi.org/10.1093/clinchem/32.2.314>
34. Maye MM, Han L, Kariuki NN, Ly NK, Ben CW, Luo J et al (2003) Gold and alloy nanoparticles in solution and thin film assembly: Spectrophotometric determination of molar absorptivity. *Anal Chim Acta* 496:17–27. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00986-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00986-3)
35. Perozich J, Kuo I, Wang BC, Boesch JS, Lindahl R, Hempel J (2000) Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *Eur J Biochem* 267:6197–6203. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01697.x>
36. Levy HR, Daouk GH (1979) Simultaneous analysis of NAD- and NADP-linked activities of dual nucleotide-specific dehydrogenases. Application to *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 254:4843–4847. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30089-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30089-3)
37. Hoffmann SK, Goslar J, Lijewski S, Basiński K, Gąsowska A, Łomozik L (2012) EPR and potentiometric studies of copper(II) binding to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in water solution. *J Inorg Biochem* 111:18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.02.028>
38. Seo PW, Kim GJ, Kim JS (2024) A short guide on blue fluorescent proteins: limits and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 108:208. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13012-w>
39. Herrero LA, Cerro-Garrido JC, Apella MC, Terrón-Homar A (2002) Interactions in solution of cobalt(II) and nickel(II) with nicotinamide adenine dinucleotide: A potentiometric and calorimetric study. *J Biol Inorg Chem* 7:313–317. <https://doi.org/10.1007/s00775-001-0300-8>
40. Green MK, Kotowycz G (1979) The nature of the NADP complex with manganese(II) ions as studied by proton and phosphorus magnetic resonance. *Can J Chem* 57:2434–2443. <https://doi.org/10.1139/v79-389>
41. Mazzini S, Mondelli R, Ragg E, Scaglioni L (1995) Interaction between metal ions and NAD(P) coenzymes. ¹H, ³¹P, ¹³C and ⁵⁹Co NMR spectroscopy and conformational analysis. *J Chem Soc Perkin Trans 2*:285–294. <https://doi.org/10.1039/P29950000285>
42. Earl CEK, Henke AH, Laudadio ED, Hamers RJ (2024) Understanding the reaction mechanisms of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) with lithium cobalt oxide and other metal oxide nanomaterials. *Environ Sci Nano* 11:518–528. <https://doi.org/10.1039/D3EN00351E>
43. Saenger W, Reddy BS, Mühlegger K, Weimann G (1977) X-ray study of the lithium complex of NAD⁺. *Nature* 267:225–229. <https://doi.org/10.1038/267225a0>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Kinetic and analytical characterization of a new tropinone reductase enzyme and its application to the simultaneous determination of the tropane alkaloids atropine and scopolamine

Journal:	<i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Type of Paper:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Domínguez, Mario; University of Zaragoza Faculty of Science, Analytical Chemistry de Marcos, Susana; University of Zaragoza Institute of Nanoscience of Aragon, Analytical Chemistry Galban, Javier; University of Zaragoza, Analytical Chemistry
Keywords:	atropine, scopolamine, NADH, simultaneous, chia

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Kinetic and analytical characterization of a new tropinone reductase enzyme and its application to the simultaneous determination of the tropane alkaloids atropine and scopolamine

Mario Domínguez, Susana de Marcos, Javier Galbán*

Analytical Chemistry Department, University of Zaragoza and Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), CSIC-Universidad de Zaragoza. Zaragoza 50009, Spain

* Corresponding author: jgalban@unizar.es

Abstract

A spectrophotometric enzymatic method for the determination of atropine (Atp) and scopolamine (Scp), two tropane alkaloids (TAs), has been developed. The method is based on a previous basic hydrolysis to tropine (Trp) and scopine (Sci) respectively, and a subsequent enzymatic oxidation catalyzed by a tropinone reductase 1 (TRase) using NAD as oxidant; the absorbance of NADH (340 nm) is monitored during the reaction. First, the enzyme kinetics of both substrates are studied; it is concluded that both TAs follow a compulsory order ternary complex mechanism and the Michalis-Menten constant are calculated. Then, an enzymatic method was optimized for Atp, allowing the determination of this substrate in the range from $3.5 \cdot 10^{-6}$ M to $1.2 \cdot 10^{-5}$ M ($LoD=1.1 \cdot 10^{-6}$ M); it was applied to the determination of Atp in a spiked chia sample (96±6 % recovery). Interestingly, the equilibrium constant of the reaction decreased with temperature and increased with enzyme concentration; both effects were satisfactorily explained. A similar analytical study was carried out with Scp (linear range from $1.2 \cdot 10^{-5}$ M to $3.0 \cdot 10^{-4}$ M, $LoD=3.6 \cdot 10^{-6}$ M); the method was also applied to Scp in a spiked chia sample (94±2% recovery). Finally, since the kinetics of Scp is slower than that of Atp, the simultaneous quantitative determination of both compounds was successfully developed by measuring the absorbance at two reaction times (70 s and 300 s). This method was applied to the simultaneous determination of both TAs first in a synthetic sample and later in a spiked chia sample, with recoveries around 98% for both compounds.

Although the sensitivity of the method is lower than that of the immunoassays for Atp, it has advantages such as the simultaneous determination of Atp and Scp, and even the possible determination of Trp (another TA).

Keywords: atropine, scopolamine, NADH, simultaneous, chia

1.- Introduction

Tropane alkaloids (TA) are organic compounds with a nortropane structure (Figure 1). These compounds are secondary metabolites synthesised by several plant families, especially the Solanaceae family (such as belladonna, henbane or stramonium), to defend them against pathogens and predators [1,2]. More than 200 tropane alkaloids are known to occur in plants [3], but the most common is atropine (Atp) followed by scopolamine (Scp) (Figure 1) [4,5].

They have been extensively studied because of their use in the pharmaceutical industry, where they act as non-selective inhibitors of muscarinic acetylcholine receptors [6]. However, they can be highly toxic if the established dose is exceeded, causing various disorders in the human organism; hence Scp is also known as burundanga as it is used illegally as a psychoactive drug. Because of the adverse health effects, the European Food Safety Authority (EFSA) has established an acute reference dose for Atp and Scp, or the EU has set maximum limits for Atp in several foods [7,8]. The problem is that some types of food, especially cereals such as flax, soy, sorghum, millet and sunflower, can contain high levels of TA due to seeds from the Solanaceae family of plants can contaminate them [9].

The analytical methods currently used for the determination of TA are based on the use of instrumental separation [10–12] and immunoassay techniques [13]. The use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS2) has proven to be a highly sensitive technique for the identification of these metabolites, achieving detection limits below 5 ng/mL. Although these techniques provide optimal results, they have certain drawbacks that limit their use to the laboratory. For rapid screening and faster determination, there is a need to develop rapid (more than chromatography-based) and inexpensive (more than immunoassay-based) methods that allow an initial assessment of the toxicity of potentially harmful foods. Enzymatic methods are very well positioned. However, as far as we know only colorimetric methods have been proposed so far [14] which is probably due to the lack of suitable enzymes.

To find suitable enzymatic reactions, we have set our sights on the synthetic routes of these compounds in plants [15,16]. The complete biosynthetic pathway has not yet been clarified at all. It starts with the aminoacids ornithine or arginine, and after several steps, tropinone is formed. This compound is enzymatically reduced by NAD(P)H, mediated by tropinone reductase I (TRase), to tropine (Trp); which then undergoes further enzymatic reactions to give Atp and finally Scp.

We have exploited the reversibility of the TRase reaction to develop analytical methods for Atp determination based on its previous chemical desterification (Figure 1, step 1). In these methods, a new recombinant TRase is used, and the formed NAD(P)H is determined by in-situ

formation of gold nanoparticles [17] or by coupling the classical formazan/diaphorase colorimetric method [18].

In this paper we present a detailed study of the kinetics of this new TRase in relation to Atp and Scp by measuring the absorbance of NADH formed at 340 nm. The mechanism of the enzymatic reaction is elucidated; the Michaelis-Menten constants and the turnover number for both ATs are measured. Finally, these results have allowed us to develop an analytical method for the simultaneous determination of Atp and Scp.

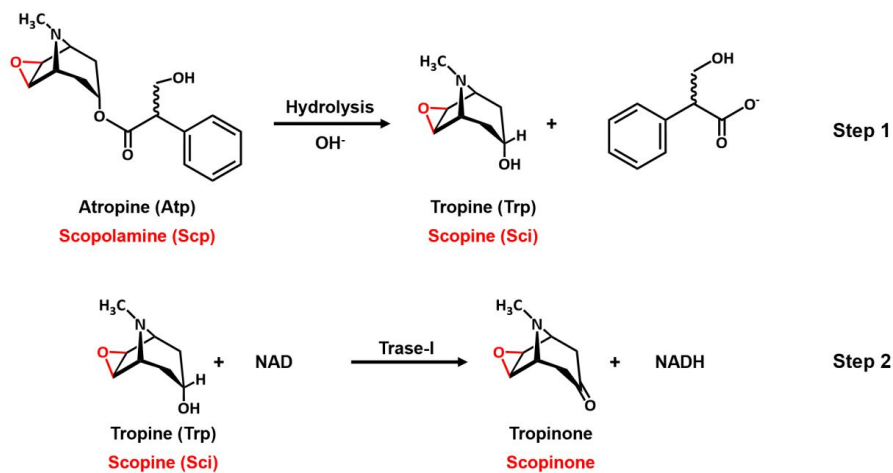


Figure 1.- Schematic representation of the proposed analytical methodology.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Solution

The following chemicals were used throughout the work: β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD, Sigma-Aldrich N1511), atropine sulphate monohydrate (Sigma-Aldrich A0257), scopolamine hydrobromide (Sigma-Aldrich S0929), tropine (Sigma-Aldrich 93550), scopine (Medchem Express HY-B0459A), recombinant tropinone reductase 1 (TRase; Gecco Biotech, EC 1.1.1.206), recombinant tropine esterase (TEase; Gecco Biotech, EC 3.1.1.10). All other reagents (such as buffer solutions) were of analytical grade and used without further purification.

2.2. Apparatus

Agilent 8453A photodiode UV-vis spectrophotometer, SPECORD^R 210 Plus UV-vis molecular absorption spectrophotometer and Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Agilent Technologies). The Millipore MiliQ H₂O system was used for water purification. The temperature of the reactions was controlled by a thermostatic bath connected to the cuvette compartment. Quartz, glass and PMMA cells (1 cm pathlength) were used.

2.3. Measurement procedure

Procedure for measuring tropine (Trp) and Scopine (Sci). Place 1935 μL 0.1M $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ buffer (pH 10) in the spectrophotometer cell, then add 40 μL 0.05 M NAD and 5 μL 8.8 mg/mL TRase. Finally add 20 μL of the analyte (sample or standard solution) and start recording the absorbance at 340 nm. The initial reaction rate and the absorbance at equilibrium were used as the analytical parameters.

Procedure for the determination atropine (Atp) and scopolamine (Scp). First, hydrolysis was performed by placing in the cell 20 μL of the analyte solution (standard or sample) and 20 μL of 2 M NaOH solution and allowing to react for 5 min. Then 1915 μL of 0.1 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ buffer (pH 10), 40 μL 0.05 M NAD and 5 μL 8.8 mg/mL (200 μM) TRase were added (in the same cell) and the absorbance at 340 nm was monitored. The initial reaction rate and the absorbance at equilibrium were used as the analytical parameters.

For the determination of Atp and Scp in Chia sample, the solid was first spiked with both TA. After drying, the sample was treated according to the method proposed by Adamse [19]. Briefly, 4 g of sample was lixiviated with 40 mL methanol/water/formic acid (60/40/0.4, V/V) for 30 min. The suspension was then centrifugated and the supernatant subjected to the previously described procedure.

3. Results and discussion

3.1. Kinetic characterization of tropinone reductase

The TRase used in this paper was a recombinant enzyme (the gene was obtained from *Whitaria somnifera*). Prior to the development of the analytical method based on figure 1, the recombinant TRase used in this study was kinetically characterized for both hydrolysis products: tropine (Trp) and scopine (Sci).

Dehydrogenase enzymes normally follow a compulsory order ternary complex (COTC) kinetic mechanism (where NAD is the first substrate to be bound) [20] rather than a double-displacement (ping-pong) one. As this enzyme was developed for this study, the ping-pong mechanism was also considered. In both cases, the method based on the initial reaction rate was used.

First, the Trp kinetics were studied. For this purpose, a matrix of 36 experiments was prepared, using 6 concentration levels for NAD ranging from $5.0 \cdot 10^{-5}$ M to $2.0 \cdot 10^{-3}$ M and another 6

concentration levels for Trp ranging from $1.0 \cdot 10^{-5}$ M to $6.0 \cdot 10^{-4}$ M. The same concentration of TRase was added in all the experiments (0.50 mM), the temperature was kept at 25 ± 1 °C and the changes in the absorbance at 340 nm (maximum of the NADH absorption) were monitored. The detailed kinetic calculations are shown in supplementary material (Section S1). Table S1 shows the initial rates of the Abs=f(t) plots obtained for each of the 36 experiments, after discarding statistically anomalous data. The results were first fitted to the Lineweaver-Burk model to deduce whether the COTC (1) or ping-pong (2) mechanism was followed and to obtain a first estimate of the kinetic constants.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_{m,Trp}}{k_{cat}[TRase]_0} + \frac{K_{i,NAD}K_{m,Trp}}{k_{cat}[TRase]_0[NAD]_0} \right) \frac{1}{[Trp]_0} + \left(\frac{1}{k_{cat}[TRase]_0} + \frac{K_{m,NAD}}{k_{cat}[TRase]_0[NAD]_0} \right) \quad (1)$$

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_{m,Trp}}{k_{cat}[TRase]_0} \right) \frac{1}{[Trp]_0} + \left(\frac{K_{m,NAD}}{k_{cat}[TRase]_0[NAD]_0} + \frac{1}{k_{cat}[TRase]_0} \right) \quad (2)$$

In these equation, $K_{m,Trp}$ and $K_{m,NAD}$ are the Michaelis-Menten constants for Trp and NAD, $K_{i,NAD}$ is the inhibition constant for NAD, and k_{cat} is the corresponding catalytic constant for both models. According to these results (Figure S1 and table S2), the COTC mechanism was followed. The kinetic constants were then obtained more precisely using the conventional Michaelis-Menten equation for this type of mechanism (3) and the Solver™ routine of an Excel™ worksheet. The constants are given in Table 1 and the detailed calculation is explained in Section S1.3.

$$V_0 = \frac{k_{cat}[TRase]_0[NAD]}{K_a[NAD] + K_b[Trp] + [Trp][NAD] + K_{iA}K_b} \quad (3)$$

A similar scheme was used to investigate the kinetic mechanism of Sci. The detailed calculation is described in the supplementary material (Section S2). Briefly, a new matrix of 36 experiments was prepared and the initial rate was measured using the same procedure as for Trp, except that the working temperature was changed to 15 ± 1 °C (see below). From the results obtained, the COTC model was also followed, and a first estimate of the kinetic constants was made; these were then calculated more precisely (see Table 1).

Table 1.- Kinetic constants corresponding to the COTC mechanism for Trp and Sci.

	$K_{m,NAD}$, M	$K_{m,Trp}$ or $K_{m,Scp}$, M	$K_{i,NAD}$, M	k_{cat} , s^{-1}
Tropine	$1.6262(\pm 0.0004) \cdot 10^{-3}$	$5.0(\pm 0.3) \cdot 10^{-4}$	$4.7(\pm 0.6) \cdot 10^{-4}$	$6.229 (\pm 0.005) \cdot 10^5$
Scopine	$8.6(\pm 0.1) \cdot 10^{-5}$	$5 (\pm 1) \cdot 10^{-5}$	$3.3 (\pm 0.8) \cdot 10^{-3}$	$1.3913 (\pm 0.002) \cdot 10^4$

Although the two series of constants were not calculated at the same temperature, the difference was not very great, and a certain type of comparison can be made. On the one hand, it is clear that the k_{cat} for Trp is about 45 times higher than that of Sci; this is very interesting

from an analytical point of view as it allows the kinetic differentiation between the two compounds and the simultaneous determination of both analytes. On the other hand, it seems that Sci appears to have a greater affinity for TRase than Trp, but both K_m are statistically similar, so it can be concluded that the affinity of the enzyme for both substrates is similar.

3.2. Development of a method for Atropine (Atp) determination

3.2.1. Tropine (Trp) determination with Tropinone Reductase (TRase)

The optimal conditions for the determination of Atp were studied. Considering that the method involves a hydrolysis of Atp to Trp and a later Trp oxidation, both steps were optimized separately. For the reaction of Trp with TRase the optimum NAD concentration was considered $1.0 \cdot 10^{-3}$ M (see previous section); pH and buffer nature, reaction temperature and enzyme concentration were studied. The $Abs=f(t)$ recorder at 340 nm was obtained in all cases and the absorbance at the equilibrium (Abs_{eq}) was used as the analytical parameter for a better sensitivity.

As shown figure S3, pH=10 carbonate buffer gave the maximum absorbance and the faster reaction rate. Figure 2A shows the T° effect on the reaction between 10 and 45°C. As can be seen, the highest the temperature, the lowest the sensitivity. Different hypotheses were considered to explain these results: 1) NADH decomposition with temperature (but, according to bibliography [21] this requires longer reaction times), 2) enzyme degradation (that was not visually observed) and 3) the K_{eq} of the reaction inversely increases with temperature which indicates that the enzymatic reaction is exothermic. This last was tested. In the experimental conditions tested it can be deduced that:

$$K_{eq} = \frac{Abs_{eq}^2}{([NAD]_0 \varepsilon_{NADH} - Abs_{eq})([Trp]_0 \varepsilon_{NADH} - Abs_{eq})} = \left(\frac{Abs_{eq}}{6.3 - Abs_{eq}} \right)^2 \quad (4)$$

ε_{NADH} being the NADH molar absorptivity at 340 nm ($6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, experimentally obtained) and $[NAD]_0$ and $[Trp]_0$ the initial concentrations used for the experiments. Figure 2B, shows the fitting of the results to the Van't Hoff equation (5):

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (5)$$

From these results the ΔH^0 ($-565 \pm 34 \text{ KJ/mol}$) and ΔS^0 ($= -1.82 \pm 0.10 \text{ KJ/mol K}$) values were obtained. These results agree with the exothermicity of the reaction and, more important, allows to predict the K_{eq} to other working temperatures.

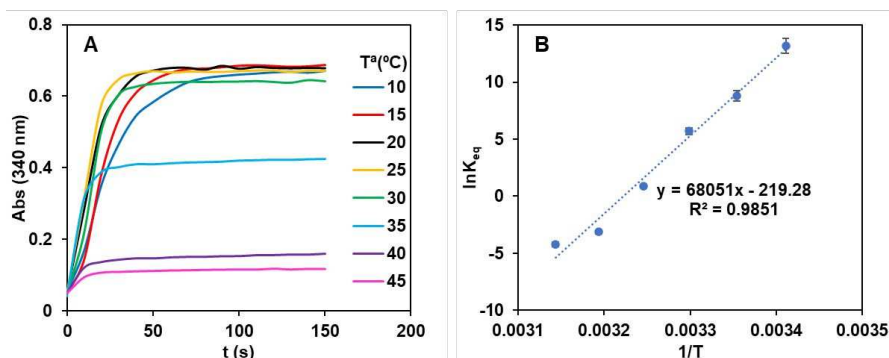


Figure 2.- A) Abs=f(t) recordings obtained at different working temperatures. [NAD] = $1 \cdot 10^{-3}$ M, [Trp] = $1 \cdot 10^{-3}$ M, [TRase] = $0.5 \mu\text{M}$, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M), $\lambda=340$ nm; B) Variation of the $\ln K_{\text{eq}}=f(1/T)$ derived from values of figure A.

Interesting results were also obtained during enzyme concentration optimization. As expected, as the enzyme concentration decreases, the reaction slows down, but unexpectedly, the equilibrium constant becomes higher (Figure 3). This effect on the K_{eq} has been previously observed in other dehydrogenase reactions by authors such as Theorell (with alcohol dehydrogenase) [22] or Alberty (with lactate dehydrogenase) [23]. The explanation is due to the NAD/NADH-enzyme complex formation. They difference between the observed or apparent K_{eq} ($K_{\text{eq,ap}}$) and the real K_{eq} ($K_{\text{eq,real}}$), both are related by:

$$\frac{K_{\text{app}}}{K_{\text{real}}} = \frac{K_{E-NAD}([E]_0 + K_{E-NADH})}{K_{E-NADH}([E]_0 + K_{E-NAD})} \quad (6)$$

K_{E-NAD} and K_{E-NADH} being the Enzyme-NAD and Enzyme-NADH dissociation constants. When the enzyme concentration ($[E]_0$) is high, equation (6) trends to:

$$\frac{K_{\text{app}}}{K_{\text{real}}} = \frac{K_{E-NAD}}{K_{E-NADH}} \quad (7)$$

and $K_{\text{eq,ap}}$ is independent of the enzyme concentration (as observed in Figure 3).

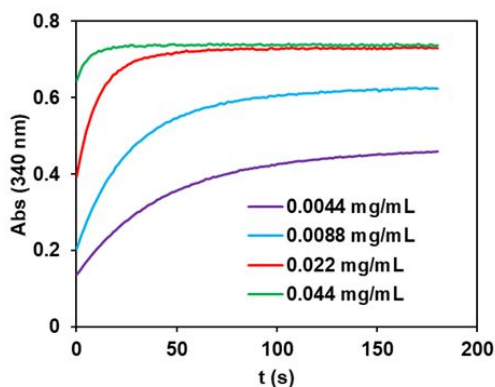


Figure 3.- Abs=f(t) recordings obtained at different concentrations of the enzyme. [NAD] = $1 \cdot 10^{-3}$ M, [Trp] = $1 \cdot 10^{-4}$ M, 25°C, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M), $\lambda=340$ nm.

Trp is also a tropane alkaloid, which is able to produce similar problems to that of Atp in human bodies, albeit less seriously. This compound appears in several food samples so its determination can also be of interest. For this reason, the analytical figures of merit for Trp were obtained. Figure S4 shows the calibration line which justifies a linear relationship from $9.0 \cdot 10^{-6}$ (limit of quantification) to $1.0 \cdot 10^{-4}$ M, the equation of the calibration line being ($[\text{Trp}]_0$ in M):

$$\text{Abs}_{340} = 6151(\pm 115) \cdot [\text{Trp}]_0 + 0.050(\pm 0.003) \quad R^2 = 0.999 \quad (8)$$

The limit of detection (from $3s_{bl}$) is $2.8 \cdot 10^{-6}$ M and a 2.2% RSD for $6.0 \cdot 10^{-5}$ M ($n=5$) was measured. Considering the stoichiometry of the reaction, if 100% of Trp reacts during the process, the slope of the calibration should be the ϵ_{NADPH} , i.e. $6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Compared to the value obtained (8), the conversion is $98 \pm 2\%$, indicating that all the Trp is converted to product during the enzymatic reaction under the experimental conditions found.

3.2.2. Development of a method for Atropine (Atp) determination

The second step involves the Atp hydrolysis. Two procedures were tested: enzymatic hydrolysis, using Tropine Esterase (TEase) and chemical hydrolysis in basic media. Inadequate yield was obtained with TEase so chemical hydrolysis was optimized. 2M NaOH was used, and different hydrolysis times were assayed. Figure S5 shows that times larger from 5 minutes did not improve the hydrolysis yield.

Using a hydrolysis time of 5 min and the previously optimised TRase conditions, the analytical figures of merit obtained for the determination of Atp were as follows: i) The calibration plot (figure S6) was linear from $3.5 \cdot 10^{-6}$ M (limit of quantification) to $1.2 \cdot 10^{-5}$ M, the equation of the line being:

$$\text{Abs}_{340} = 5080(\pm 77) \cdot [\text{Trp}]_0 + 0.050(\pm 0.009) \quad R^2 = 0.999 \quad (9)$$

ii) A detection limit of $1.2 \cdot 10^{-6}$ M and an RSD of 3.0% for $6.0 \cdot 10^{-5}$ M (n=5) was obtained.

Again, the comparison of the slope of the calibration line with the molar absorptivity of NADH ($6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) allows the ATP conversion during the reaction to be determined, which in this case is $81 \pm 1\%$, which means that the yield is reasonably high.

It is very well known that NADH also present fluorescence (460 nm) under excitation at 340 nm. A complementary study was carried using this fluorescence for Atp determination. pH and buffer nature (Figure S7), and enzyme concentration (Figure S8) were studied, obtaining optimum conditions very similar to those of absorbance. In these conditions the analytical figures of merit were also obtained. A linear response range from $1.6 \cdot 10^{-7}$ M (limit of quantification) to, at least, $3 \cdot 10^{-6}$ M was found (Figure S9), with a limit of detection of $4.7 \cdot 10^{-8}$ M (which is very close to those given using immunoassay). As can be seen, this fluorescence allows to improve more than one order of magnitude the limit of quantification. The most important problem with fluorescence is the inner filter effect interference, which usually occurs in real samples.

Finally, the method was applied to the determination of atropine in a Chia seed sample. After submitting the sample to the procedure described section 2, Atp concentration under the limit of detection were found both using the absorption and the fluorescence method. A doped sample was then prepared containing 0.87 mg/g of Atp. The determination was carried using molecular absorption (a high matrix effect was observed using fluorescence). A 0.84 ± 0.05 mg/g (n=3) was obtained, indicating that a satisfactory recovery of $96.3 \pm 6.0 \%$.

3.3. Scopolamine determination with tropinone reductase

Figure 4 compares the $\text{Abs}=f(t)$ profile obtained for Atp and Scopolamine (Scp) in the experimental conditions optimized for Atp. As can be seen, the kinetics of the reaction for Scp is slower than that for Atp. Using the same experimental conditions optimized for Atp, a calibration study was carried out for Scp (Figure S10A). Not only was the time required to reach the equilibrium much longer than for Atp, but the slope of the calibration line was more than three times lower, indicating a 25% conversion of Scp to products under these conditions.

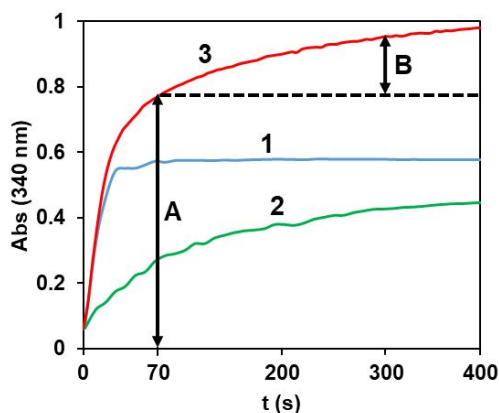


Figure 4: $Abs_{340nm}=f(t)$ representations obtained at $\lambda=340$ nm corresponding to: 1) Atp ($1 \cdot 10^{-4}$ M); 2) Scp ($1 \cdot 10^{-4}$ M); 3) Atp ($1 \cdot 10^{-4}$ M) +Scp($1 \cdot 10^{-4}$ M). In curve 3, line A shows the Abs_{70} (absorbance at 70 s) and line B shows the $Abs_{300} - Abs_{70}$ (absorbance difference between $t=300$ s and $t=70$ s). Experimental conditions: $[NAD]=1 \cdot 10^{-3}$ M, $25^{\circ}C$, $pH = 10$ (HCO_3^-/CO_3^{2-} 0.1 M).

Additional studies were carried out to improve sensitivity and kinetics for Scp. No improvements were observed by changing pH or enzyme concentration. The most significant results observed were those obtained when temperature was studied. As with Atp, Figure 5A shows that the higher the temperature the lower the Abs_{eq} but the faster the reaction. However, the effect of the temperature was more pronounced than for Atp. As was shown (Figure 2A) temperatures below than $25^{\circ}C$ did not modify the K_{eq} of the reaction for Atp, but in the case of Scp lower temperatures still increased the K_{eq} of the reaction. The results in Figure 5A were again treated with equations (4) and (5) (Figure 5B). From these results the values ΔH^0 (-713 ± 34 K J/mol) and ΔS^0 (-0.364 ± 0.10 KJ/mol K) were obtained, which again agree with the exothermicity of the reaction and the higher effect of temperature in K_{eq} .

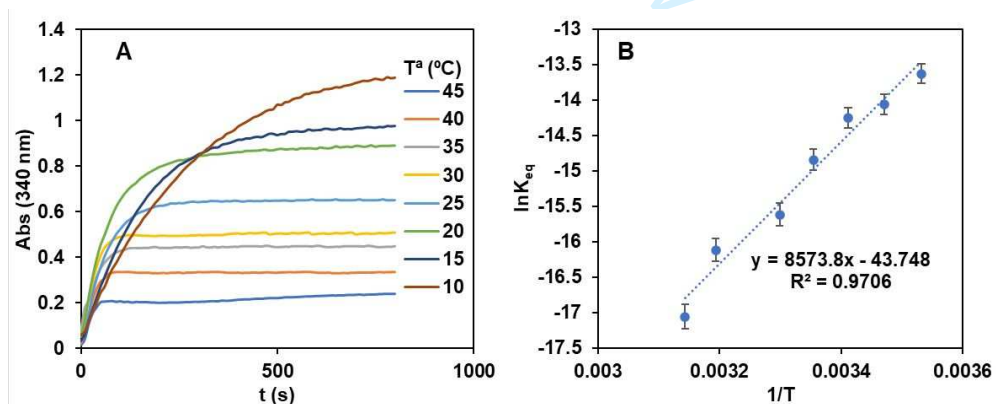


Figure 5.- A) $Abs_{340nm}=f(t)$ recordings obtained at different working temperatures. $[NAD]=1.0 \cdot 10^{-3}$ M, $[Scp]=3.0 \cdot 10^{-4}$ M, $[TRase]=0.5$ μ M, $pH = 10$ (HCO_3^-/CO_3^{2-} 0.1 M); **B)** Variation of the $\ln K_{eq}=f(1/T)$ derived from values of figure A.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Then, using 15°C as the optimum temperature the analytical figures of merit for Scp were
4 obtained (Figure S10B). The calibration line was linear from $1.2 \cdot 10^{-5}$ (limit of quantification) to
5 $3.0 \cdot 10^{-4}$ M, the limit of detection was $3.6 \cdot 10^{-6}$ M, the slope of the calibration line was 4912 ± 80
6 (78 ± 1 % transformation) and a RSD of 3.2% for $6.0 \cdot 10^{-4}$ M (n=5). These figures of merit are very
7 similar those of Atp, indicating that this method is suitable for the determination of Scp. This
8 method was also applied to the determination of Scp in the same sampled of Chia seeds spiked
9 with 3.03 mg/g Scp. A 2.86 ± 0.07 mg/g (n=3) was obtained, indicating that a similar recovery (94.3
10 ± 2.2 %) as for the determination of Atp.

11 Unlike Trp, Sci is not a compound of analytical interest. However, a calibration line of Sci was
12 run at the optimum conditions for Scp (i.e. 15°C) to obtain the hydrolysis yield. Figure S11 shows
13 that the slope of the calibration line was 5090 indicating that the oxidation yield of Sci is 81 ± 2 %.
14 Comparing this slope with that of the Scp calibration line (4912 ± 80) shows that a good Scp yield
15 is approximately 97 ± 2 %.

26 3.4. Simultaneous determination of Scp and Atp

27 Given the results described above, it is possible to determine Atp and Scp simultaneously in a
28 sample. Two alternative procedures were considered.

29 Firstly, the optimum working temperature for both compounds is different and the temperature
30 effect of T in the K_{eq} is also different. It is therefore possible to measure mixtures at two different
31 temperatures. According to this procedure, calibration lines of Scp and Atp were carried out at
32 35°C and 15°C and then mixtures were measured at these two temperatures. Inconsistent results
33 were obtained, so this methodology was discarded.

34 Secondly, according to Figure 4, Atp oxidation is faster than Scp at 25°C. Measurements at two
35 (or more) times would then make it possibility to distinguish between these two compounds.
36 This method gave better results and was use throughout.

37 When measuring Atp, the time required to obtain the Abs_{eq} (t_{eq}) depends on the Atp
38 concentration: the higher the concentration the higher the t_{eq} ; the maximum value is 60 s,
39 corresponding to the maximum At concentration of the calibration line. If the enzymatic
40 reaction is carried out in a mixture containing Atp+Scp, the NADH formed at reaction times
41 greater than 60 s should be due to Scp only, so that any variation in absorbance from this time
42 should allow the determination of Scp without interference from Atp. The absorbance at 300 s
43 ($Abs_{m,300}$) and 70s ($Abs_{m,70}$) of a mixture is then measured, and $Abs_{m,300} - Abs_{m,70}$ was used to
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

determine Scp (Figure S12). Then, the absorbance at 300 s due to Scp ($Abs_{s,300}$) is calculated from the corresponding calibration line, and $Abs_{m,300}-Abs_{s,300}$ is used for Atp determination.

To test the validity of this procedure, three synthetic samples containing Atp and Scp were prepared, and the contents of these samples were measured. Error standards (RE) of 5.6% for Atp and 7.0% for Scp calculated according to (10) were obtained (see table S7).

$$RE = 100 \sqrt{\frac{\sum_i (C_m - C_r)^2}{\sum_i (C_r)^2}} \quad (10)$$

Finally, the aforementioned sample of chia seeds previously was spiked with Atp (0.29% w/w) and Scp (0.30% w/w) and subjected to the previously described method. The results obtained (n=3) were $0.27 \pm 0.01\%$ (recovery $92 \pm 3\%$) for Atp, and $0.28 \pm 0.01\%$ (recovery $94 \pm 2\%$) for Scp. These results indicate that a quantitative determination of both compounds is possible using this method.

4. Conclusions

This paper demonstrates that the enzymatic determination of atropine (Atp) can be carried out using tropinone reductase (TRase) by measuring the NADH absorbance at 340 nm. The analytical figures of merit of this method for Atp are slightly worse than those reported using commercial immunoassays (IA), but the method also allows the determination of Trp (without interference from Atp) when the hydrolysis step is not applied, and the semi-quantitative simultaneous determination of Atp and Scp by using the kinetic difference of the enzymatic reaction of both analytes; in this sense, more accurate results could be obtained using multivariate calibration (more than two reaction times). The kinetics of the TRase has also been characterized with respect to Trp and Sci. Important effects of temperature and enzyme have been successfully explained.

Author Contributions

Conceptualization, JG; methodology, JG and SdM; investigation, MD; data curation, MD; writing—original draft preparation, MD; writing—review and editing, SdM and JG.; funding acquisition SdM and J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work is part of the project PID2022-139235OB-I00 supported by MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ and by FEDER “Una manera de hacer Europa” and by the funding for Research Groups by the Government of Aragón, Spain (E-25_23R).

Declarations

Competing Interests: The authors declare no competing interest.

Ethical Approval: not applicable.

Availability of data and materials: all data and materials are included in the manuscript and in the supplementary material.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- [1] I.M. De-la-Cruz, A. Hallab, U. Olivares-Pinto, R. Tapia-López, S. Velázquez-Márquez, D. Piñero, K. Oyama, B. Usadel, J. Núñez-Farfán, Genomic signatures of the evolution of defence against its natural enemies in the poisonous and medicinal plant *Datura stramonium* (Solanaceae), *Sci Rep* 11 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79194-1>.
- [2] Q. Liu, C. Zhang, H. Fang, L. Yi, M. Li, Indispensable biomolecules for plant defense against pathogens: NBS-LRR and “nitrogen pool” alkaloids, *Plant Science* 334 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111752>.
- [3] M. Lounasmaa, T. Tamminen, The tropane alkaloids, *Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* 44 (1993). [https://doi.org/10.1016/S0099-9598\(08\)60143-1](https://doi.org/10.1016/S0099-9598(08)60143-1).
- [4] S. Jakabová, L. Vincze, Á. Farkas, F. Kilár, B. Boros, A. Felinger, Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plant organs of *Datura* species, *J Chromatogr A* 1232 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.036>.
- [5] M. Sharma, I. Dhaliwal, K. Rana, A.K. Delta, P. Kaushik, Phytochemistry, pharmacology, and toxicology of *datura* species—a review, *Antioxidants* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/antiox10081291>.
- [6] K.H. Shim, M.J. Kang, N. Sharma, S.S.A. An, Beauty of the beast: anticholinergic tropane alkaloids in therapeutics, *Nat Prod Bioprospect* 12 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00357-w>.
- [7] European Parliament, Commission regulation (EU) 2016/239, Official Journal of the European Union (2016).
- [8] European Commission, COMMISSION REGULATION (EU) 2021/1408 of 27 August 2021 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of tropane alkaloids in certain foodstuffs, Official Journal of the European Union 304 (2021).
- [9] I.I. Koleva, T.A. van Beek, A.E.M.F. Soffers, B. Dusemund, I.M.C.M. Rietjens, Alkaloids in the human food chain - natural occurrence and possible adverse effects, *Mol Nutr Food Res* 56 (2012). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100165>.
- [10] L. González-Gómez, S. Morante-Zarcelero, D. Pérez-Quintanilla, I. Sierra, Occurrence and Chemistry of Tropane Alkaloids in Foods, with a Focus on Sample Analysis Methods: A Review on Recent Trends and Technological Advances, *Foods* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11030407>.
- [11] H. Chen, J. Marín-Sáez, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, Simultaneous determination of atropine and scopolamine in buckwheat and related products using modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Chem* 218 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.075>.

- 1
2
3 [12] C.O. Gonçalves, E. Cubero-Leon, V. Tamosiunas, C. Miske, S. Bratinova, J. Stroka,
4 Determination of tropane alkaloids in cereal products for infants and young children
5 Report on the 2016 Proficiency Test of the European Union Reference Laboratory for
6 Mycotoxins for the Network of National Reference Laboratories 2017 EUR 28663 EN,
7 (2017). <https://doi.org/10.2760/801317>.
8
9
10 [13] Z. Ren, H. Zhang, Z. Wang, X. Chen, L. Yang, H. Jiang, Progress in Immunoassays of Toxic
11 Alkaloids in Plant-Derived Medicines: A Review, *Toxins (Basel)* 14 (2022).
12 <https://doi.org/10.3390/toxins14030165>.
13
14 [14] N. Jornet-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Scopolamine analysis in
15 beverages: Bicolorimetric device vs portable nano liquid chromatography, *Talanta* 232
16 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122406>.
17
18 [15] X. Hu, W. Liu, Y. Yan, H. Deng, Y. Cai, Tropinone reductase: A comprehensive review on
19 its role as the key enzyme in tropane alkaloids biosynthesis, *Int J Biol Macromol* 253
20 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127377>.
21
22 [16] B. Dräger, Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid
23 metabolism, *Phytochemistry* 67 (2006).
24 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.12.001>.
25
26 [17] M. Domínguez, S. de Marcos, J. Galbán, NADPH-mediated seedless in situ formation of
27 gold or gold-platinum nanoparticles for the enzymatic determination of atropine,
28 *Microchimica Acta* 192 (2025) 132. <https://doi.org/10.1007/s00604-025-06964-x>.
29
30 [18] M. Domínguez, D. Moraru, S. Lasso, I. Sanz-Vicente, S. de Marcos, J. Galbán, Colorimetric
31 enzymatic rapid test for the determination of atropine in baby food using a smartphone,
32 *Microchimica Acta* 416 (2024) 7317–7323. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05401-x>
33
34 [19] P. Adamse, H.P. van Egmond, M.Y. Noordam, P.P.J. Mulder, M. De Nijs, Tropane alkaloids
35 in food: Poisoning incidents, *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 6 (2014).
36 <https://doi.org/10.3920/QAS2013.0314>.
37
38 [20] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of enzyme kinetics*, 3rd ed., Portland Press, London,
39 2004.
40
41 [21] D. Hofmann, A. Wirtz, B. Santiago-Schübel, U. Disko, M. Pohl, Structure elucidation of the
42 thermal degradation products of the nucleotide cofactors NADH and NADPH by nano-
43 ESI-FTICR-MS and HPLC-MS, *Anal Bioanal Chem* 398 (2010).
44 <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4111-z>.
45
46 [22] H. Theorell, B. Chance, Studies on liver alcohol dehydrogenase, *Acta Chem Scand* 5
47 (1951).
48
49 [23] R.A. Alberty, The Effect of Enzyme Concentration on the Apparent Equilibrium Constant
50 for an Enzyme-catalyzed Reaction, *J Am Chem Soc* 75 (1953).
51 <https://doi.org/10.1021/ja01104a044>.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Captions

Figure 1.- Schematic representation of the proposed analytical methodology.

Figure 2.- A) Abs=f(t) recordings obtained at different working temperatures. [NAD] = $1 \cdot 10^{-3}$ M, [Trp] = $1 \cdot 10^{-3}$ M, [TRase] = 0.5 mM, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M), l=340 nm

B) Variation of the $\ln_{K_{eq}}=f(1/T)$ derived from values of figure A.

Figure 3.- Abs=f(t) recordings obtained at different concentrations of the enzyme. [NAD] = $1 \cdot 10^{-3}$ M, [Trp] = $1 \cdot 10^{-4}$ M, 25°C, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M), l=340 nm

Figure 4: Abs_{340nm}=f(t) representations obtained at $\lambda=340$ nm corresponding to: 1) Atp ($1 \cdot 10^{-4}$ M); 2) Scp ($1 \cdot 10^{-4}$ M); 3) Atp ($1 \cdot 10^{-4}$ M) +Scp($1 \cdot 10^{-4}$ M). In curve 3, line A shows the Abs₇₀ (absorbance at 70 s) and line B shows the Abs₃₀₀ – Abs₇₀ (absorbance difference between t=300 s and t=70 s). Experimental conditions: [NAD] = $1 \cdot 10^{-3}$ M, 25°C, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

Figure 5.- A) Abs_{340nm}=f(t) recordings obtained at different working temperatures. [NAD] = $1 \cdot 10^{-3}$ M, [Scp] = $3 \cdot 10^{-4}$ M, [TRase] = 0.5 mM, pH = 10 ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M).

B) Variation of the $\ln_{K_{eq}}=f(1/T)$ derived from values of figure A.

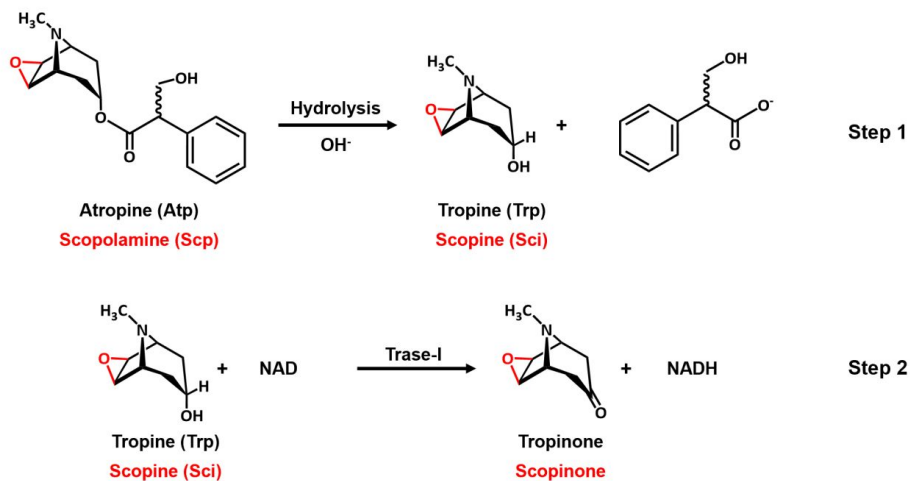
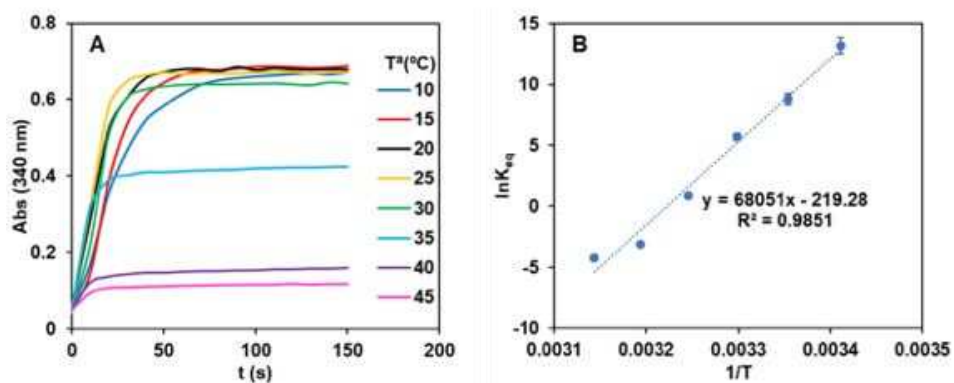
Figure 1

Figure 2



Or Peer Review

Figure 3

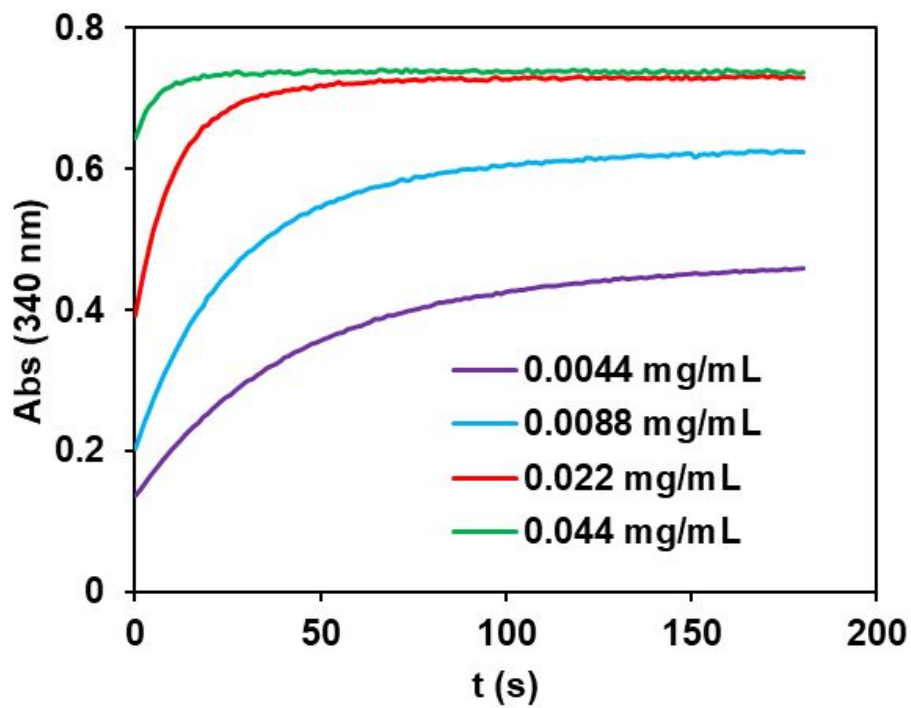


Figure 4

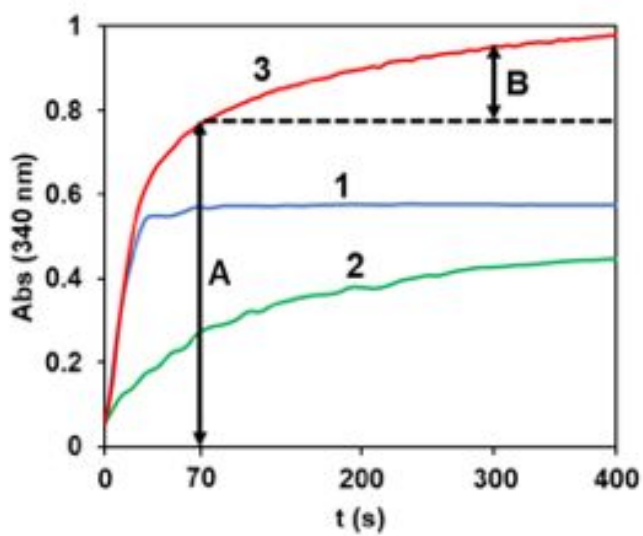
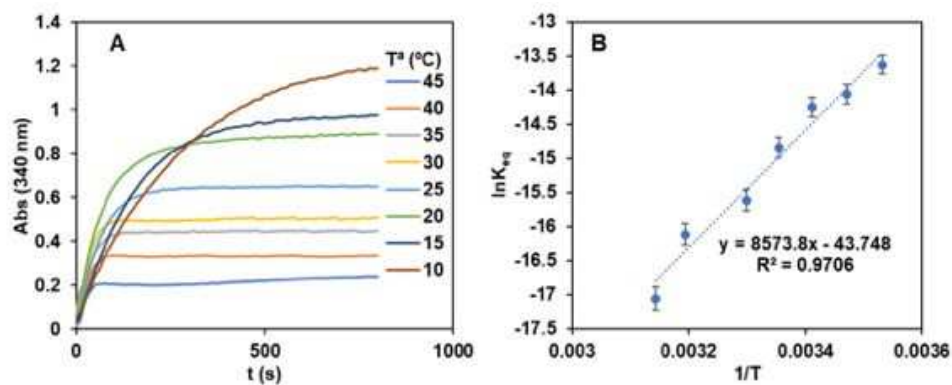


Figure 5



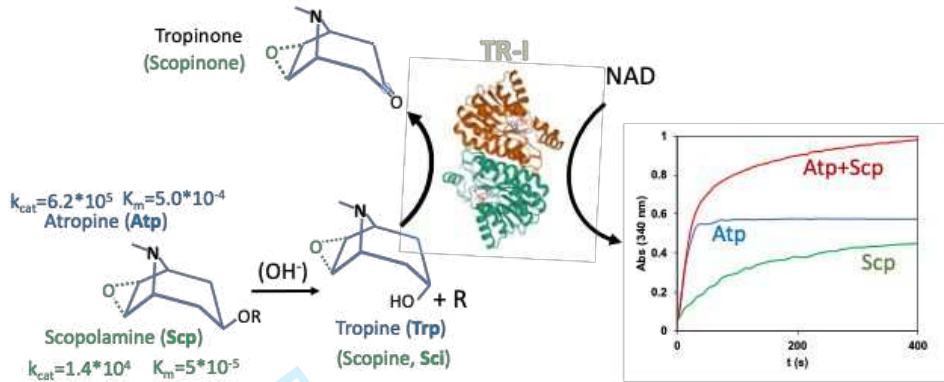
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1.- Kinetic constants corresponding to the COTC mechanism for Trp and Sci.

	$K_{m,NAD}, M$	$K_{m,Trp}$ or $K_{m,Scp}, M$	$K_{i,NAD}, M$	k_{cat}, S^{-1}
Tropine	$1.6262(\pm 0.0004) \cdot 10^{-3}$	$5.0(\pm 0.3) \cdot 10^{-4}$	$4.7(\pm 0.6) \cdot 10^{-4}$	$6.229 (\pm 0.005) \cdot 10^5$
Scopine	$8.6(\pm 0.1) \cdot 10^{-5}$	$5 (\pm 1) \cdot 10^{-5}$	$3.3 (\pm 0.8) \cdot 10^{-3}$	$1.3913 (\pm 0.002) \cdot 10^4$

For Peer Review

Graphical Abstract



Supplementary Material

Kinetic and analytical characterization of a new tropinone oxidase enzyme and its application to the simultaneous determination of the tropane alkaloids atropine and scopolamine

Mario Domínguez, Susana de Marcos, Javier Galbán*

Analytical Chemistry Department, University of Zaragoza and Instituto de Nanociencia y
Materiales de Aragón (INMA), CSIC-Universidad de Zaragoza. Zaragoza 50009, Spain

* Corresponding author: jgalban@unizar.es

Index

Section S1. Kinetic mechanism for tropine (Trp).....	2
S1.1. Elucidation of the kinetic mechanism	2
Table S1.....	2
Figure S1	2
Table S2.....	3
S1.2. Approximate calculation of the kinetic constants	3
S1.3. Precise calculation of the kinetic constants	3
Table S3	4
Section S2. Kinetic mechanism for scopolamine (Sci).....	4
S2.1. Elucidation of the kinetic mechanism	4
Table S4.....	4
Figure S2	5
Table S5	5
S2.2. Approximate calculation of the kinetic constants	5
S2.3. Precise calculation of the kinetic constants	5
Table S6	6
Section S3. Optimization of the analytical method.....	7
Figure S3	7
Figure S4	7
Figure S5	7
Figure S6	8
Figure S7	8
Figure S8	8
Figure S9	9
Figure S10	9
Figure S11	9
Figure S12	10
Table S7	10

Section S1. Kinetic mechanism for Tropine (Trp)

S1.1. Elucidation of the kinetic mechanism

Firstly, for the sake of clarity, equations (1), (2) and (3) of the main manuscript will be reproduced here as (S1), (S2) and (S3) respectively. Note that (S1) and (S3) refer to the COTC mechanism and (S2) to the ping-pong mechanism.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_{m,Trp}}{k_{cat}[TRase]_0} + \frac{K_{i,NAD}K_{m,Trp}}{k_{cat}[TRase]_0[NAD]_0} \right) \frac{1}{[Trp]_0} + \left(\frac{1}{k_{cat}[TRase]_0} + \frac{K_{m,NAD}}{k_{cat}[TRase]_0[NAD]_0} \right) \quad (S1)$$

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_{m,Trp}}{k_{cat}[TRase]_0} \right) \frac{1}{[Trp]_0} + \left(\frac{K_{m,NAD}}{k_{cat}[TRase]_0[NAD]_0} + \frac{1}{k_{cat}[TRase]_0} \right) \quad (S2)$$

$$V_0 = \frac{k_{cat}[TRase]_0[NAD]}{K_a[NAD] + K_b[Trp] + [Trp][NAD] + K_{iA}K_b} \quad (S3)$$

Table S1 shows the initial velocities (s^{-1}) obtained using six different NAD concentrations ($5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $3 \cdot 10^{-4}$, $6 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} and $2 \cdot 10^{-3}$) and six different tropine concentrations (10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $3 \cdot 10^{-4}$ and $6 \cdot 10^{-4}$). The experimental conditions were: $\lambda=340$ nm, $[TRase]=0.50$ μ M, $pH=10$ (carbonate buffer) and $25^\circ C$.

Table S1: initial rates of the Trp/TRase reaction

NAD, M \rightarrow Trp, M \downarrow	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$5.08 \cdot 10^{-4}$	$6.22 \cdot 10^{-4}$	$2.16 \cdot 10^{-3}$	$4.40 \cdot 10^{-3}$	$6.76 \cdot 10^{-3}$	$5.24 \cdot 10^{-3}$
$3 \cdot 10^{-5}$	$7.29 \cdot 10^{-4}$	$2.61 \cdot 10^{-3}$	$7.11 \cdot 10^{-3}$	$1.51 \cdot 10^{-2}$	$1.70 \cdot 10^{-2}$	
$6 \cdot 10^{-5}$	$2.06 \cdot 10^{-3}$	$7.61 \cdot 10^{-3}$	$1.29 \cdot 10^{-2}$	$2.38 \cdot 10^{-2}$	$2.73 \cdot 10^{-2}$	$3.04 \cdot 10^{-2}$
$1 \cdot 10^{-4}$	$3.26 \cdot 10^{-3}$	$1.07 \cdot 10^{-2}$	$2.34 \cdot 10^{-2}$	$4.05 \cdot 10^{-2}$	$4.34 \cdot 10^{-2}$	$4.65 \cdot 10^{-2}$
$3 \cdot 10^{-4}$	$5.32 \cdot 10^{-3}$	$2.25 \cdot 10^{-2}$	$3.83 \cdot 10^{-2}$	$7.28 \cdot 10^{-2}$	$7.93 \cdot 10^{-2}$	$1.05 \cdot 10^{-1}$
$6 \cdot 10^{-4}$	$1.12 \cdot 10^{-2}$	$2.06 \cdot 10^{-2}$	$4.85 \cdot 10^{-2}$	$8.47 \cdot 10^{-2}$	$1.08 \cdot 10^{-1}$	$1.26 \cdot 10^{-1}$

From these results, the inverse of the initial velocities ($1/V_0$) was calculated, and the representation $1/V_0=f([Trp])$ was obtained for each $[NAD]$ concentration (Lineweaver-Burk formalism). The results are shown in Figure S1. The slope and the intercept of each plot were obtained; values are given in Table S2.

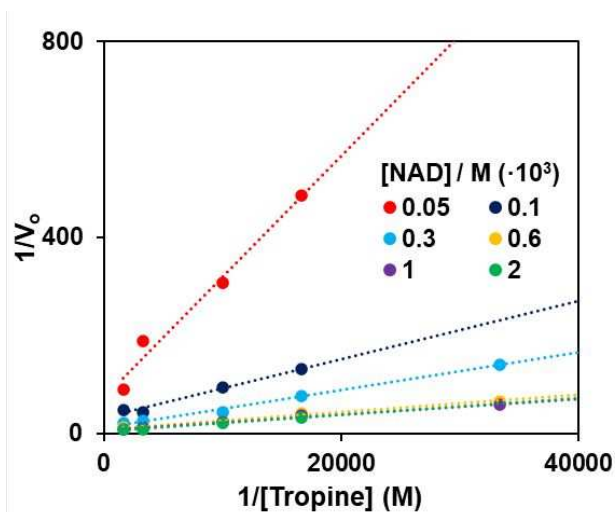


Figure S1. $1/V_0=f(1/[Trp]_0)$ for 6 different concentrations of NAD.

Table S2. Slope and intercept for each concentration of NAD

[NAD], M	b_1 =slope	b_0 =intercept
$5.0 \cdot 10^{-5}$	$2.4683 \cdot 10^{-2}$	72.280
$1.0 \cdot 10^{-4}$	$5.9422 \cdot 10^{-3}$	32.347
$3.0 \cdot 10^{-4}$	$3.8545 \cdot 10^{-3}$	11.494
$6.0 \cdot 10^{-4}$	$1.7626 \cdot 10^{-3}$	8.764
$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.5712 \cdot 10^{-3}$	7.625
$2.0 \cdot 10^{-3}$	$1.6972 \cdot 10^{-3}$	4.521

When the slopes (b_1) and intercepts (b_0) given in Tables S2 are plotted as a function of $1/[NAD]_0$, a linear (least squares) relationship are obtained according to the following equations:

$$b_0 = 0.0034 \frac{1}{[NAD]_0} + 2.119 \quad R^2 = 0.992 \quad (S4)$$

$$b_1 = 4.72 \cdot 10^{-7} \frac{1}{[NAD]_0} + 1.19 \cdot 10^{-3} \quad R^2 = 0.991 \quad (S5)$$

Equation (S1) justifies that if the kinetic follows the COTC, the intercepts (b_0) will linearly depend on the [NAD] concentration used. Conversely, if the kinetic follows the ping-pong mechanism (S2), b_0 should be independent of [NAD]₀ concentration. As shown in (S4), the kinetic follows the COTC mechanism.

S1.2. Approximation of kinetic constants

The next step will be the approximate calculation of the constants that appear in equation (S2). According to it:

$$b_0 = \frac{K_{m,NAD}}{k_{cat}[TRase]_0[NAD]_0} + \frac{1}{k_{cat}[TRase]_0} = \left(\frac{K_{m,NAD}}{V_0} \right) \frac{1}{[NAD]_0} + \frac{1}{k_{cat}[TRase]_0} \quad (S6)$$

Comparing (S4) and (S5) allows to calculate $K_{m,NAD}$ and k_{cat} (bear in mind that the $[TRase]=0.50\ \mu\text{M}$).

$$k_{cat} = 9.42 \cdot 10^5\ \text{s}^{-1} \quad K_{m,NAD} = 1.6043 \cdot 10^{-3}\ \text{M} \quad (\text{S7})$$

Considering again (S2):

$$b_1 = \frac{K_{m,Trp}}{k_{cat}[TR1]_0} + \left(\frac{K_{i,NAD}K_{m,Trp}}{k_{cat}[TR1]_0} \right) \frac{1}{[NAD]_0} \quad (\text{S8})$$

And comparing (S5) with (S8) and taking into account (S7):

$$K_{m,Trp} = 5.6094 \cdot 10^{-4}\ \text{M} \quad K_{i,NAD} = 1.3889 \cdot 10^{-4}\ \text{M} \quad (\text{S9})$$

S1.3. Precise calculation of the kinetic constants

In this case, the calculation of these constants using the Lineweaver-Burk gives more weight to the smaller V_0 values which are less precise spectrophotometrically. For this reason, a more precise calculation of these constants has been made using equation (S3). This equation can be rewritten as:

$$v = \frac{\alpha[Trp]}{\beta[Trp] + \gamma} \quad (\text{S10})$$

Where:

$$\alpha = k_{cat}[TR1]_0[NAD] \quad \beta = K_{m,Trp} + [NAD] \quad \gamma = K_{m,NAD}[NAD] + K_{i,NAD}K_{m,Trp} \quad (\text{S11})$$

Using the values previously obtained (S(7) and S(9)), the approximate values of α , β and γ were calculated for each concentration of NAD. These values feed the Solver™ routine of an Excel™ spreadsheet, which allows these values to be calculated more precisely (table S3).

Table S3. α , β , and γ values obtained for each concentration of NAD using the Solver™ routine

[NAD], M	α	β	γ
$5.0 \cdot 10^{-5}$	$2.1958 \cdot 10^{-5}$	$1.7151 \cdot 10^{-3}$	$4.5696 \cdot 10^{-7}$
$1.0 \cdot 10^{-4}$	$4.7185 \cdot 10^{-5}$	$1.7043 \cdot 10^{-3}$	$2.4406 \cdot 10^{-7}$
$3.0 \cdot 10^{-4}$	$1.4156 \cdot 10^{-4}$	$1.9043 \cdot 10^{-3}$	$3.9111 \cdot 10^{-7}$
$6.0 \cdot 10^{-4}$	$2.8311 \cdot 10^{-4}$	$2.2043 \cdot 10^{-3}$	$5.4678 \cdot 10^{-7}$
$1.0 \cdot 10^{-3}$	$4.7185 \cdot 10^{-4}$	$2.6043 \cdot 10^{-3}$	$7.8377 \cdot 10^{-7}$
$2.0 \cdot 10^{-3}$	$7.8418 \cdot 10^{-4}$	$3.9683 \cdot 10^{-3}$	$1.2075 \cdot 10^{-6}$

With these parameters optimized, the constants are recalculated by fitting α , β and γ to the NAD concentration using the least squares method. The following final values are obtained:

$$k_{cat} = 6.2295(\pm 0.0050) \cdot 10^5\ \text{s}^{-1} \quad K_{m,NAD} = 1.62624(\pm 0.00038) \cdot 10^{-3}\ \text{M}. \quad (\text{S12})$$

$$K_{m,Trp} = 5.01(\pm 0.27) \cdot 10^{-4}\ \text{M} \quad K_{i,NAD} = 4.67(\pm 0.61) \cdot 10^{-4}\ \text{M} \quad (\text{S13})$$

Section S2. Kinetic mechanism for Scopine (Sci)

S2.1. Elucidation of the kinetic mechanism

Table S4 shows the Initial velocities (s^{-1}) obtained using six different NAD concentrations and six different scopine concentrations. The experimental conditions were: $\lambda=340$ nm, $[TR1]=0.5$ μ M, pH=10 (carbonate buffer) and 15°C.

Table S4: initial rates of the TSci/TRase reaction

NAD, M \rightarrow Sci, M \downarrow	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
$3.0 \cdot 10^{-5}$	—	$3.971 \cdot 10^{-5}$	$3.114 \cdot 10^{-4}$	$8.462 \cdot 10^{-4}$	$1.510 \cdot 10^{-3}$	$1.801 \cdot 10^{-3}$
$6.0 \cdot 10^{-5}$	$5.181 \cdot 10^{-5}$	$9.161 \cdot 10^{-5}$	$5.354 \cdot 10^{-4}$	$1.129 \cdot 10^{-3}$	$2.036 \cdot 10^{-3}$	$2.667 \cdot 10^{-3}$
$1.0 \cdot 10^{-4}$	$2.705 \cdot 10^{-4}$	$1.807 \cdot 10^{-4}$	$9.893 \cdot 10^{-4}$	$2.221 \cdot 10^{-3}$	$3.475 \cdot 10^{-3}$	$3.533 \cdot 10^{-3}$
$3.0 \cdot 10^{-4}$	$6.888 \cdot 10^{-4}$	$1.163 \cdot 10^{-3}$	$3.876 \cdot 10^{-3}$	$4.366 \cdot 10^{-3}$	$6.528 \cdot 10^{-3}$	$6.055 \cdot 10^{-3}$
$6.0 \cdot 10^{-4}$	$1.176 \cdot 10^{-3}$	$1.876 \cdot 10^{-3}$	$5.140 \cdot 10^{-3}$	$5.838 \cdot 10^{-3}$	$6.867 \cdot 10^{-3}$	$7.847 \cdot 10^{-3}$
$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.698 \cdot 10^{-3}$	$3.013 \cdot 10^{-3}$	$5.885 \cdot 10^{-3}$	$6.253 \cdot 10^{-3}$	$7.363 \cdot 10^{-3}$	$8.415 \cdot 10^{-3}$

Figure S2 shows the $1/V_0=f([Sci])$ representation for each $[NAD]_0$ concentration. The slope and intercept of each representation were obtained and the values are given in table S5.

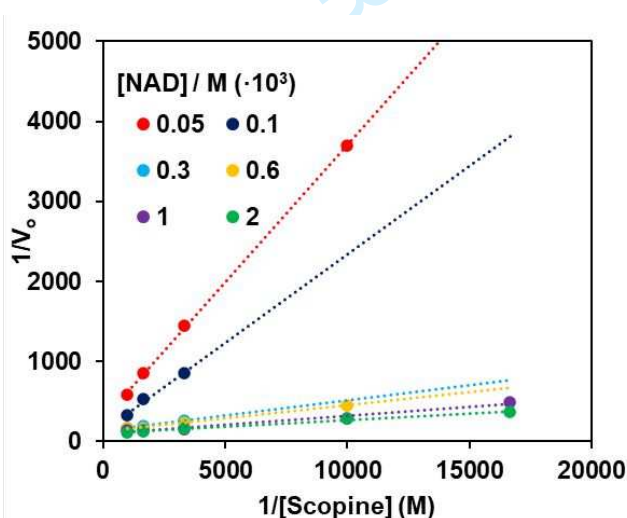


Figure S2. $1/V_0=f(1/[Sci]_0)$ for 6 different concentrations of NAD.

Table S5. Slope and intercept for each concentration of NAD

[NAD], M	$b_1=slope$	$b_0=intercept$
$5.0 \cdot 10^{-5}$	$3.4316 \cdot 10^{-1}$	274.42

$1.0 \cdot 10^{-4}$	$2.2038 \cdot 10^{-1}$	134.06
$3.0 \cdot 10^{-4}$	$3.7813 \cdot 10^{-2}$	131.87
$6.0 \cdot 10^{-4}$	$3.2804 \cdot 10^{-2}$	121.41
$1.0 \cdot 10^{-3}$	$2.2445 \cdot 10^{-2}$	96.047
$2.0 \cdot 10^{-3}$	$1.6596 \cdot 10^{-2}$	105.46

These results lead to the following equations for the slopes (b_1) and intercepts (b_0), which demonstrate the fulfilment of the COTC mechanism.

$$b_0 = 0.0081 \frac{1}{[NAD]_0} + 94.7 \quad R^2 = 0.89 \quad (S14)$$

$$b_1 = 1.76 \cdot 10^{-5} \frac{1}{[NAD]_0} + 4.62 \cdot 10^{-3} \quad R^2 = 0.97 \quad (S15)$$

S2.2. Approximation of kinetic constants

Following the same procedure as in Trp the following constants were obtained:

$$k_{cat} = 2.11 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \quad K_{m,NAD} = 8.55 \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad (S16)$$

$$K_{m,Sci} = 5.67 \cdot 10^{-5} \quad K_{i,NAD} = 3.83 \cdot 10^{-4} \quad (S17)$$

S2.3. Precise calculation of the kinetic constants

Using the Solver™ routine, the more reliable values were obtained (Table S6), and the kinetics constant calculated.

Table S6. α , β , and γ values obtained for each concentration of NAD using the Solver™ routine

[NAD], M	α	β	γ
$5.0 \cdot 10^{-5}$	$5.2784 \cdot 10^{-7}$	$1.3551 \cdot 10^{-4}$	$1.8913 \cdot 10^{-7}$
$1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0557 \cdot 10^{-6}$	$1.8551 \cdot 10^{-4}$	$1.9156 \cdot 10^{-7}$
$3.0 \cdot 10^{-4}$	$3.1648 \cdot 10^{-6}$	$3.8551 \cdot 10^{-4}$	$1.5773 \cdot 10^{-7}$
$6.0 \cdot 10^{-4}$	$6.3341 \cdot 10^{-6}$	$6.8551 \cdot 10^{-4}$	$2.1596 \cdot 10^{-7}$
$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0557 \cdot 10^{-5}$	$1.0855 \cdot 10^{-3}$	$2.1420 \cdot 10^{-7}$
$2.0 \cdot 10^{-3}$	$2.1114 \cdot 10^{-5}$	$2.0855 \cdot 10^{-3}$	$2.8426 \cdot 10^{-7}$

$$k_{cat} = 1.391(\pm 0.002) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \quad K_{m,NAD} = 8.6(\pm 0.1) \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad (S18)$$

$$K_{m,Sci} = 5(\pm 1) \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad K_{i,NAD} = 3.3(\pm 0.8) \cdot 10^{-3} \text{ M} \quad (S19)$$

Section S3.- Optimization of the analytical method

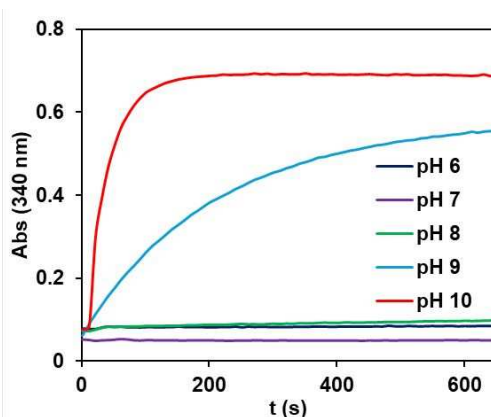


Figure S3: Optimization of the pH and buffer for the determination of Trp. Abs=f(t) at 340 nm obtained for different pH and buffers. The experimental conditions used were [NAD] = $1.0 \cdot 10^{-3}$ M, [Trp] = $1.0 \cdot 10^{-4}$ M, [TRase] = $0.5 \mu\text{M}$, $T^a = 30^\circ\text{C}$. $0.1\text{M NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer was used for pH 6, 7 and 8; $0.1\text{ NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ buffer was used for pH 10 and 11.

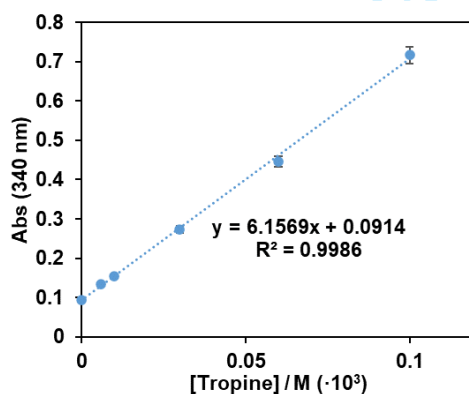


Figure S4: Calibration line obtained for Trp. [NAD] = $1.0 \cdot 10^{-3}$ M [TRase] = $0.5 \mu\text{M}$, $T^a = 25^\circ\text{C}$, pH = 10 $0.1\text{M NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$. $\lambda=340$ nm.

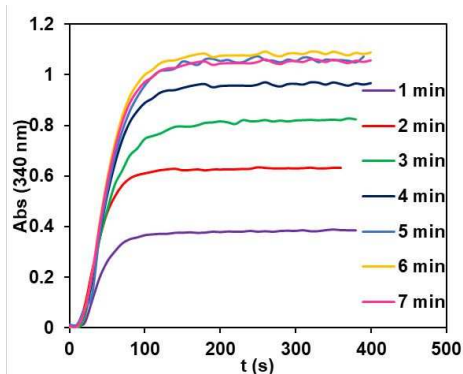


Figure S5: Optimization of the hydrolysis time of Atp. Abs=f(t) recorder (340 nm) obtained with different hydrolysis time (2M NaOH). [NAD] = $1.0 \cdot 10^{-3}$ M, [Atp] = $2.0 \cdot 10^{-4}$ M, [TRase] = $0.5 \mu\text{M}$, $T^a = 25^\circ\text{C}$, pH = 10 0.1M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$.

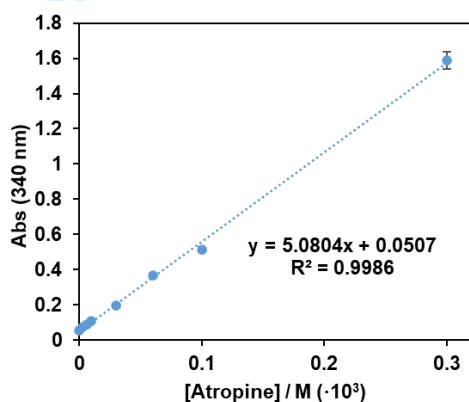


Figure S6: Calibration line obtained for Atp. 5 min. hydrolysis 2M NaOH. [NAD] = $1.0 \cdot 10^{-3}$ M [TRase] = $0.5 \mu\text{M}$, $T^a = 25^\circ\text{C}$, pH = 10 0.1M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$. $\lambda=340$ nm.

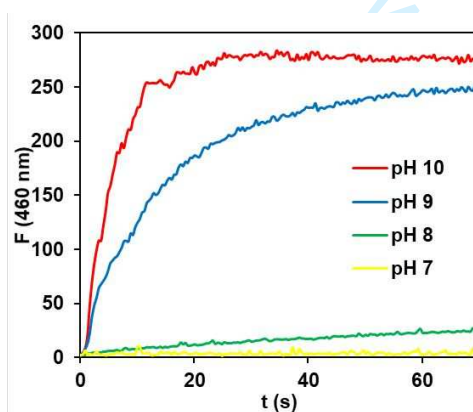


Figure S7: Fluorescence=f(t) ($\lambda_{\text{ex}}=340$ nm and $\lambda_{\text{em}}= 460$ nm) obtained for different pH and buffers. The experimental conditions used were [NAD] = $1.0 \cdot 10^{-3}$ M, [Atp] = $1.0 \cdot 10^{-4}$ M, [TRase] = $0.5 \mu\text{M}$, $T^a = 30^\circ\text{C}$. 0.1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer was used for pH 7 and 8; 0.1 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ buffer was used for pH 10 and 11.

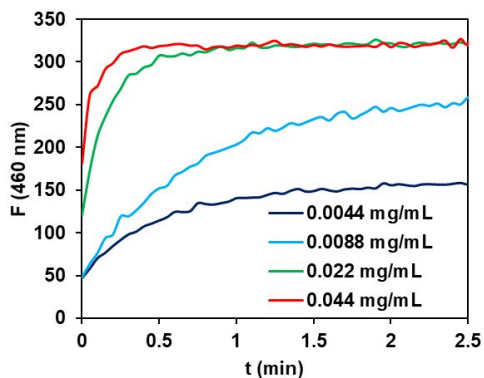


Figure S8: Fluorescence= $f(t)$ ($\lambda_{\text{ex}}=340$ nm and $\lambda_{\text{em}}=460$ nm) obtained for different [TRase]. The experimental conditions used were: [NAD] = $1.0 \cdot 10^{-3}$ M, [Atp] = $1.0 \cdot 10^{-4}$ M, [TRase] = $0.5 \mu\text{M}$, T^{a} = 25°C and pH=10 0.1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer.

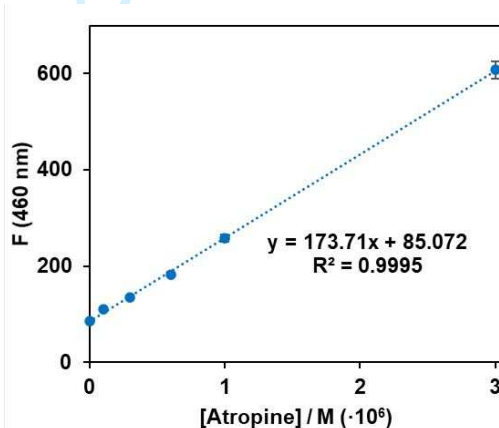


Figure S9: Calibration line obtained for Atp from fluorescence measurements ($\lambda_{\text{exc}}=340$ nm, $\lambda_{\text{em}}=460$ nm). 5 min hydrolysis 2M NaOH, [NAD] = $1.0 \cdot 10^{-3}$ M, [TRase] = $0.5 \mu\text{M}$, T^{a} = 25°C , pH = 10 0.1M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$.

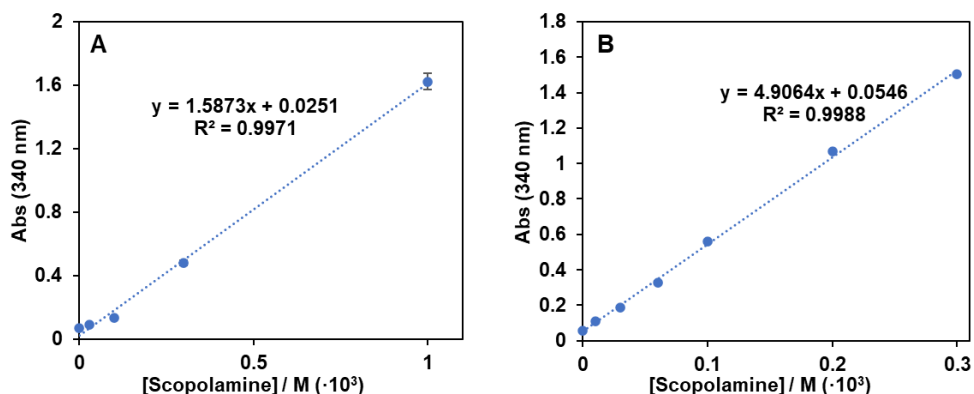


Figure S10: Calibration lines obtained for Scp at two different temperatures: **A)** $T^a = 25^\circ\text{C}$; **B)** $T^a = 15^\circ\text{C}$. In both cases: 5 min hydrolysis 2M NaOH, $[\text{NAD}] = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{TRase}] = 0.5 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 10$ 0.1M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$.

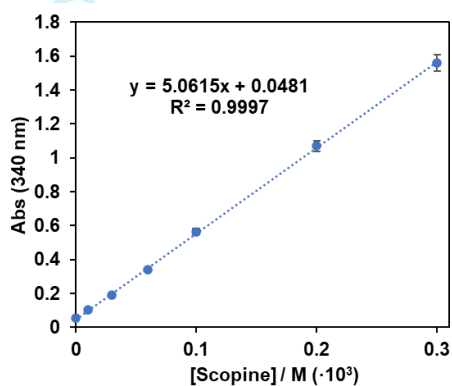


Figure S11: Calibration lines obtained for Sci. $[\text{NAD}] = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ $[\text{TRase}] = 0.5 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 10$ 0.1M, $T^a = 15^\circ\text{C}$, $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$. $\lambda = 340 \text{ nm}$.

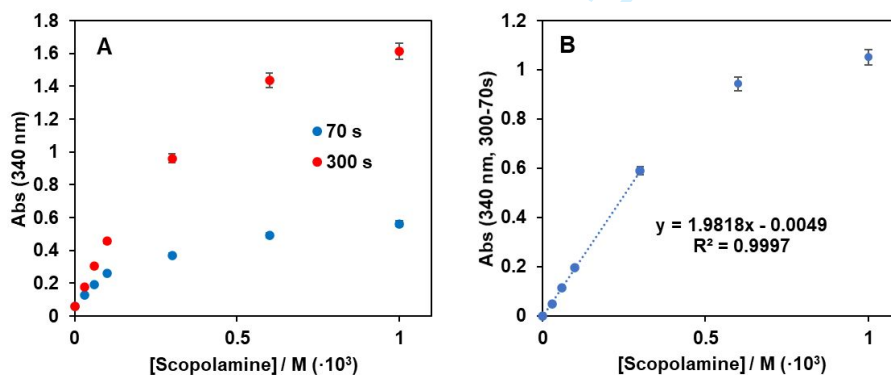


Figure S.12: Calibration lines obtained for Scp. **A)** at two reaction times: 300s and 70s. **B)** Difference between $\text{Abs}_{300} - \text{Abs}_{70}$. In both cases: 5 min. hydrolysis 2M NaOH. $[\text{NAD}] = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ $[\text{TRase}] = 0.5 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 10$ 0.1M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$. $T^a = 25^\circ\text{C}$. $\lambda = 340 \text{ nm}$.

Table S7. Application of the method to the simultaneous determination of Atp and Scp in synthetic sample

Sample	Atp, mM		Scp, mM	
	Added	Found	Added	Found
1	0.030	0.026	0.100	0.090
2	0.100	0.097	0.100	0.093
3	0.100	0.106	0.300	0.320

For Peer Review