



# **Desarrollo de un Biosensor Óptico Enzimático para la Determinación de Colesterol en Muestras Biológicas**

---

Trabajo Fin de Grado en Química  
**Roberto Ignacio Domínguez Álvarez**



Departamento de Química Analítica  
Grupo de Biosensores Analíticos (GBA)  
Director: Javier Galbán

## Índice

1.- Introducción.	
1.1.- El Analito: Colesterol.....	1
1.2.- La Enzima: Colesterol Oxidasa.....	1
1.3.- La reacción enzimática.....	2
1.4.- Métodos de determinación de Colesterol.....	3
2.- Objetivos.....	4
3.- Reactivos y material.....	5
4.- Procedimientos de medida.....	6
5.-Resultados y discusiones.....	8
5.1.- Propiedades de la Colesterol Oxidasa.....	8
5.2.- Triton X-100 reduced.....	9
5.3.- Lipoproteína HDL/LDL.....	10
5.4.- Disolventes orgánicos.....	12
5.4.1.- Colesterol libre en Hexano.....	12
5.4.2.- Colesterol libre en Cloroformo.....	13
5.4.3.- Colesterol libre en Etanol Absoluto.....	14
5.4.4.- Colesterol libre en Acetona.....	14
5.5. Optimización.....	19
5.5.1.- Elección de pH y [COD].....	19
5.5.2.- Elección de tampon.....	21
5.5.3.- Dispersión.....	23
6.- Instrumentos.....	24
7.- Conclusiones.....	25
8.- Anexos.....	26

## 1.- Introducción:

### 1.1-El Analito: Colesterol:

El colesterol es un lípido esteroide, un triterpenoide, formado a partir de seis unidades de isopreno con la pérdida de tres átomos de carbono (Fig.1) [1]. Se puede sustituir en 4 posiciones diferentes pero la que interesa en este estudio es el grupo hidroxilo o cabeza polar; si es como la como la Fig.1 se denomina Colesterol libre y si es un grupo éster se denomina Colesterol esterificado y tiene muchos tipos ya que puede ser diversas cadenas alifáticas diferentes.

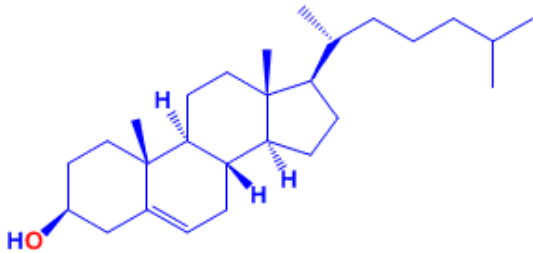


Fig.1 Estructura del Colesterol libre.

El Colesterol libre tiene una masa molecular de 386,65 gr/mol y en el Colesterol esterificado esta masa molecular aumenta. A temperatura ambiente se presenta como un sólido blanco y pegajoso. Es soluble con diversos disolventes orgánicos como la Acetona, Hexano, Cloroformo, Metanol, Etanol, Benceno y Mirisato de Isopropilo. También se puede disolver en fase acuosa con tensioactivos siendo el Triton X-100 el más usado en este campo.

**Es Insoluble en agua** con una máxima solubilidad de 0,095 mg/L.

El Colesterol tiene origen biológico y se encuentra en diversos alimentos como huevos o lácteos y en el cuerpo humano, donde principalmente se sintetiza en el hígado a partir del acetato por un proceso complejo [2] hasta 1 gramo al día si éste no es ingerido y es esencial para su perfecto funcionamiento en los estándares establecidos.

Pero si el Colesterol en todos sus estados es insoluble en agua. ¿Cómo puede transportarse por el torrente sanguíneo?. La respuesta es a través de las lipoproteínas. Dos de las lipoproteínas más importantes son las de baja y alta densidad (LDL y HDL, respectivamente). Ambas lipoproteínas transportan el colesterol desde el hígado a las células, lo que se diferencian entre ellas es en el porcentaje de Colesterol libre y esterificado que cargan. [2]. Con unos niveles altos de colesterol, más de 200 mg/dl a día de hoy (240 mg/dl en los años 70) se puede correr el riesgo de acumularse en las paredes arteriales y sufrir enfermedades cardiacas [2]. Con unos niveles bajos de Colesterol (por debajo de 60 mg/dl) los órganos internos pueden fallar siendo el más común el fallo renal.

### 1.2.- La Enzima: Colesterol Oxidasa.

La enzima Colesterol Oxidasa (COD) se produce desde la incubación de bacterias y cada una de ellas tiene unas propiedades diferentes una vez separadas de ellas. Hay muchas bacterias que producen esta enzima que se pueden separar en dos grandes grupos: Tipo I y Tipo II; las de Tipo I son muy estables en fase acuosa e inestables en fase orgánica mientras que las de Tipo II es al revés, son estables en fase orgánica e inestables en fase acuosa.

Dos ejemplos de Tipo I son: COD de *Brevibacterium Sterolicum* (Fig.1.2) y COD de *Streptomyces Hygroscopicus* [3] pero hay muchas más [4] y un ejemplo de las de Tipo II es *Chromobacterium sp. DS-1* [5]. La relación de precios entre una y otra es muy elevada (mucho más caras las de Tipo II).

El centro activo de la enzima COD es de tipo FAD (Flavin Adenín Dinucleótido), y es complementario con las de tipo NAD (Nicotin Adenin Dinucleótido). Tiene fluorescencia y es propiedad clave e imprescindible para el desarrollo del método analítico para la determinación de Colesterol.

La función principal de la enzima COD es oxidar el grupo hidroxilo del colesterol libre convirtiéndolo en un grupo cetónico dando como producto Cholest-5-en-3-ona isomerizando a Cholest-4-en-3-ona en la disolución.

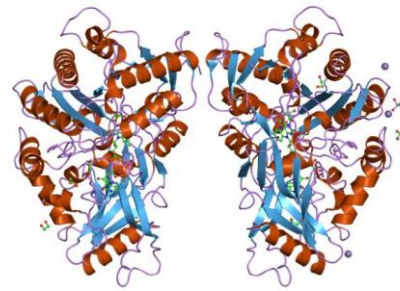


Fig 1.2 COD de *Brevibacterium Sterolicum*

En este estudio la enzima COD utilizada procede de la bacteria *Streptomyces* sp. y pertenece a las de Tipo I. Aunque su nombre sea muy parecido a *Streptomyces Hygroscopicus* sus propiedades pueden ser totalmente diferentes como ya se verá más adelante [5].

### 1.3.- La reacción enzimática.

Ya descritos a los protagonistas ahora toca saber qué pasa con ellos cuando se juntan en la misma disolución. La reacción enzimática difiere ligeramente si se usa la COD de una bacteria u otra (Anexo1) distinguiendo dos tipos: De tipo “Ping Pong” o de tipo Ternario pero tienen una reacción global común. La estequiometría de la de reacción es que por cada molécula de Colesterol, se gasta una molécula de  $O_2$  y produce una molécula de producto Cholest-5-en-3-ona y otra de  $H_2O_2$ ; la enzima, como es obvio, vuelve a su estado inicial. Ya se sabe qué le pasa al colesterol con la función de la enzima COD pero ¿Qué le pasa la enzima COD durante la reacción?.

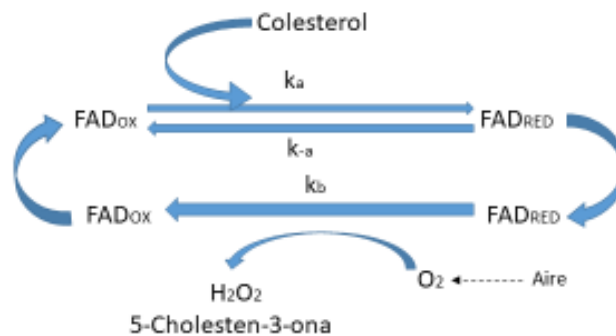
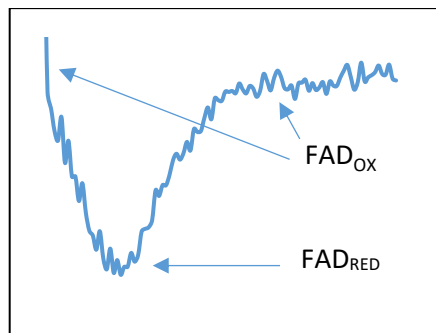


Fig1.3 Reacción enzimática general del Colesterol con Colesterol Oxidasa

De todas las reacciones (Anexo1) [6] se pueden simplificar en dos principales (Fig 1.3). Como ya se ha dicho en la secc. 1.2 el centro activo de la enzima COD es de tipo FAD y antes de que se produzca la reacción enzimática esta en un estado denominado “oxidado” o normal ( $FAD$  o  $FAD_{ox}$ ) y una vez formado el complejo Enzima-Sustrato mediante  $k_a$  el FAD cambia a otro estado denominado “reducido” ( $FADH_2$  o  $FAD_{red}$ ), es un proceso oxidación-reducción convencional. Acto seguido se produce el gasto energético mediante  $k_b$  volviendo a su estado inicial normal completando el ciclo.

¿Y por qué es importante los dos tipos de estado del centro activo FAD? Porque en el estado  $FAD_{ox}$  el centro activo tiene fluorescencia pero en su estado  $FAD_{red}$  la disminuye y entonces tenemos una señal que se puede distinguir durante la reacción (Fig 1.4).

En la Fig 1.4 se representa cómo cambia la intensidad de fluorescencia durante la reacción. Cuando se añade el colesterol la señal disminuye muy rápido ( $FAD_{RED}$ ) aumentando poco a poco hasta su estado inicial  $FAD_{OX}$ . Con señal de fluorescencia constante indicará que la reacción ya se ha producido y está en equilibrio. El área formada es proporcional a la concentración de Colesterol (secc.4). Cabe destacar que la concentración de  $O_2$  en el agua es limitada con un valor de  $2,2 \cdot 10^{-4}$  M (también se aporta en parte por el aire del entorno) y mientras ésta vaya disminuyendo la COD tardará más en recuperarse volviendo a  $FAD_{OX}$  y la señal de fluorescencia subirá más lentamente.



**Fig.1.4 Perfil Señal de fluorescencia durante la reacción enzimática**

En el estudio se verá que no todas las señales serán como la Fig1.4 pero se puede saber cualitativamente si ha habido reacción usando tiras reactivas comerciales para la detección de peróxido. Si ésta es positiva se tornará en un color azul con distintos tonos siendo el azul oscuro el mayor valor.

#### **1.4 Métodos de determinación de Colesterol.**

La determinación de Colesterol interesa mucho en el análisis clínico, sobre todo en la determinación de HDL, LDL y VLDL. Este análisis se apoya en la reacción de la COD pero requiere de pasos adicionales.

El método que se va a desarrollar en esta memoria no es el que se utiliza para la determinación de Colesterol, es uno alternativo a los ya existentes. A continuación se citan algunos métodos analíticos con uso más frecuente.

Un método es mediante la formación de  $H_2O_2$  por absorción molecular. Como ya se sabe uno de los productos asociados a la reacción (Fig 1.3) es el  $H_2O_2$  y gracias a un reactivo llamado Amplex Red [7], un colorante que reacciona con el  $H_2O_2$  y catalizada por la HRP que hace que la disolución se vaya volviendo de color rosa. Aprovechando ese color se puede medir a  $\lambda = 571$  nm, y como la reacción es 1:1 en proporción, con la diferencia de absorbancia se puede saber cuánto Colesterol ha reaccionado. Se puede medir tanto el Colesterol libre y total usando Colesterol Esterasa como segunda reacción y saber el porcentaje de cada uno de ellos con este método [8]. Da unos resultados muy fiables y con %RSD muy bajos de reproducibilidad pero las alícuotas son de un solo uso, a la larga se hace caro.

Otro método es mediante la formación de producto final en disolución, Cholest-4-en-3-ona por Absorción molecular. El producto tiene un máximo a  $\lambda = 240$  nm y con la diferencia de absorbancia se puede saber la cantidad de Colesterol de la muestra biológica. Este método es muy sensible y da buenos resultados si se maneja con cuidado (señal muy interferida) y la enzima se puede recuperar con un procedimiento simple y la alícuota se puede volver a utilizar [8].

Por último también se puede determinar el Colesterol con otro método por fluorescencia con enzima COD derivatizada con Fluoresceína (COD-FS). La técnica utilizada es por Quenching aprovechando las propiedades del centro activo FAD de la COD. Cuando la COD-FS está en estado  $FAD_{RED}$  el Quenching es mayor aumentando la señal de fluorescencia hasta un máximo y disminuyendo hasta su señal inicial una vez finalizada la reacción [9]. El registro es complementario a la de la Fig 1.4.

## **2.- Objetivos:**

### **Objetivos formativos:**

- 1.- Familiarizarse con el uso de los diferentes instrumentos tanto de Fluorescencia como de Absorción molecular.
- 2.- Profundizar en la identificación e interpretación de las señales en los espectros de fluorescencia y absorción tanto si son espectros de emisión y excitación, como de señales cinéticas, es decir, medidas en continuo con longitudes de onda de emisión y excitación fijas.
- 3.- Practicar el tratamiento de las señales de fluorescencia y de los datos analíticos con distintos programas, Microsoft Excel y OriginPro 8.
- 4.- Manejo de Bibliografía relacionada con enzimas y reacciones enzimáticas.

### **Objetivos científicos:**

- 5.- El objetivo principal de este trabajo es el estudio y desarrollo de un método analítico enzimático para la determinación de Colesterol libre. Este método está basado en el cambio de fluorescencia que produce el centro activo de la enzima Colesterol Oxidasa durante la reacción enzimática. Los estudios servirán, en un futuro, para el desarrollo de un biosensor óptico enzimático para el Colesterol libre. Este objetivo general puede abordar una serie de problemas adicionales durante el transcurso del mismo
- 6.- Realización de muestras patrón de colesterol libre desde un estado sólido a disoluciones acuosas con tensioactivos.
- 7.- Estudiar las diferentes propiedades de la Enzima COD en fluorescencia y Absorción y su comportamiento con distintas condiciones experimentales.
- 8.- Implementar el método en un biosensor.

### **3.- Reactivos y Material:**

**Cholesterol SIGMA ≥ 99%** C8667-1G MW= 386,65 gr/mol

**Cholesterol Oxidase from Streptomyces sp SIGMA.** C8649-100U 21 U/mg solid ; 36 U/mg Protein ; 4,8 mg.

**Cholesterol Oxidase from Pseudomonas Fluorescens SIGMA:** C7149-100UN ; 4,2 U/mg solid ; 46 U/mg Protein.

**HDL/LDL Calibrator ByoSystem:** 1x1mL 58,5 mg/dL HDL ; 99,3 mg/dL LDL.

Procedente de suero humano. Se usa en el estudio de reproducibilidad y calibración con concentraciones de Colesterol libre y esterificado perfectamente conocidas.

**Triton™ X-100 reduced SIGMA:** Tensioactivo líquido. 282103-5G MW= 564,8 gr/mol.

Es un derivado del tensioactivo Triton™ X-100 que se le ha sometido a un proceso de reducción para reducir la fluorescencia del compuesto sin que pierda sus propiedades.

#### **Disoluciones Amortiguadoras:**

**Tampon fosfato 100mM pH=7:** Pesar aproximadamente 1,41 gr de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por cada 100 mL de Agua miliQ. Después llevar la disolución a pH=7 con HCl 1M.

**Tampon fosfato 50mM pH= 5, 6, 7, 8.** Pesar aproximadamente 0,7 gr de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por cada 100 mL de Agua MiliQ. Después llevar al pH deseado con HCl 1M.

**Tampon Tris-HCl 50mM pH=7, 8, 9.** Pesar aproximadamente 0,76 gr de Tris-HCl por cada 100 mL de Agua MiliQ. Después llevar la disolución a pH deseado con HCl 1M.

Agua MiliQ

#### **Disolventes Orgánicos:**

Hexano HPLC ; Cloroformo HPLC ; Acetona >99% ; Etanol Absoluto (UV-IR-HPLC)

#### **Material:**

##### **Micropipetas Eppendorf Research Plus:**

**100-1000 µL:** Incertidumbre: 100 µL ± 3,0 µL ; 500 µL ± 5,0 µL ; 1.000 µL ± 6,0 µL

**30-300 µL:** Incertidumbre: 30 µL ± 0,75 µL ; 150 µL ± 1,5 µL ; 300 µL ± 1,8 µL

**10-100 µL:** Incertidumbre: 10 µL ± 0,3 µL ; 50 µL ± 0,5 µL ; 100 µL ± 0,8 µL

**Cubeta Cuarzo Hellma Analytics:** 10mm con tapón.

Columna Exclusión Molecular Sephadex G-50 preparada antes de ser usada.

#### **4.- Procedimientos de medida:**

##### **Alícuotas con Enzima Colesterol Oxidasa:**

Se añade la enzima sobre un eppendorf de 2 mL de volumen pesando una cierta cantidad en la balanza analítica de precisión. Después se le añade 2 mL de tampón con micropipeta de 1000 µL. Como la muestra tiene una concentración inicial de 21 U/mg de enzima COD en estado sólido, pesando 0,9 mg, el cálculo para saber la concentración de enzima será:

$$21 \text{ U/mg} * 0,9 \text{ mg} = 18,7 \text{ U} \quad ; \quad 18,7 \text{ U} / 2\text{mL} = 9,35 \text{ U/mL} \quad (1)$$

Esta alícuota cuando no se use se tiene que guardar en frigorífico para que se conserve por más tiempo; incluso en un periodo de un mes se verificó que la enzima funcionaba perfectamente.

La alícuota concentrada se lleva a la concentración deseada diluyéndola en una cubeta de cuarzo de 1 cm de ancho a un volumen total de 2 mL con su tampón correspondiente. Se quiere llevar a una [COD] de 3 U/mL. Los cálculos de diluciones se han realizado de la forma:

$$3 \text{ U / mL} * 2000 \text{ µL} = 9,35 \text{ U /mL} * X \quad X = 642 \text{ µL} \quad (2)$$

##### **Calibrador HDL/LDL:**

Esta liofilizado y la preparación de muestra es muy simple; se le añade 1 mL de tampón al calibrador y se espera 30 minutos para su manejo posterior. Evitar que se formen burbujas.

##### **Disoluciones Patrón de Colesterol Libre:**

###### **Tensioactivo Triton X-100 reduced:**

Se añade la cantidad de Colesterol libre sobre un eppendorf de 2 mL en la balanza analítica, a ella se le añaden 1,8 mL de Agua MiliQ y 0,2 mL de Triton X-100 reduced teniéndola en una proporción 10% v/v. Esta disolución se lleva a 70 °C en un baño de agua durante 10 minutos y luego se deja enfriar en el ultrasonido para optimizar su homogeneidad. Como resultado queda una disolución transparente y homogénea.

Si se pesan 12 mg de Colesterol libre la disolución resultante tendrá una concentración de:

$$12 \text{ mg} / 2 \text{ mL} = 6 \text{ mg/mL} \quad 6 \text{ mg/mL} * 1000 \text{ ml/L} = 6.000 \text{ mg/L} = 6.000 \text{ ppm} \quad (3)$$

Con la disolución 10 % v/v puede aguantar hasta una concentración aproximada de 14 gr/L, a partir de ahí aumenta la turbidez.

Con la disolución concentrada, para diluirla con Agua MiliQ hasta la concentración deseada con volumen total de 2 mL, por ejemplo 1.200 ppm

$$6000 \text{ ppm} * X = 1.200 \text{ ppm} * 2000 \text{ µL} \quad X = 400 \text{ µL} \quad (4)$$

También se opera la misma ecuación pero con el % de Triton X-100 reduced en las disoluciones de blanco.



### Disolventes orgánicos:

Al ser soluble el colesterol libre en los disolventes orgánicos, las disoluciones patrón se hacen de manera sencilla.

Se pesa la cantidad de Colesterol libre en un eppendorf de 2 mL y se calcula la concentración mediante (3). Si se hace concentrada para diluirla se usa la ecuación (4).

### Condiciones de medida: El estudio de la cinética de reacción:

Las condiciones en las cinéticas de reacción se cogen los máximos de intensidad de señal en los espectros de emisión y excitación en sus las longitudes de onda correspondientes. Se mide la señal en continuo y la anchura de rendija se elige dependiendo de las características de cada medida

### Condiciones de medida: Adiciones de Blanco y Reproducibilidad:

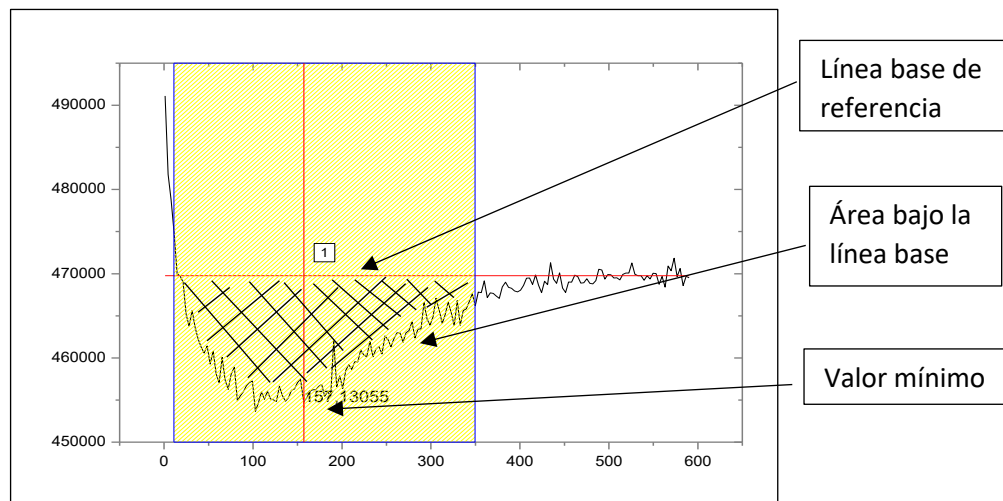
Los cálculos de las adiciones, tanto de blanco como de patrón se hacen con la ecuación (3) diluyendo el colesterol libre a la concentración deseada en la alícuota con la COD. Si se quiere hacer una adición de 5 ppm de Colesterol libre desde una disolución patrón inicial de 1200 ppm:

$$5 \text{ mg/L} * 2000 \text{ } \mu\text{L} = 1200 \text{ mg/L} * X \quad X = 8,3 \text{ } \mu\text{L} \approx 8 \mu\text{L}$$

Lo mismo ocurre aquí en las siguientes adiciones, pero el dato de 2000  $\mu\text{L}$  cambia. El dato real será 2000 + X y así sucesivamente.

### Tratamiento de datos: Valor de Áreas en los registros cinéticos:

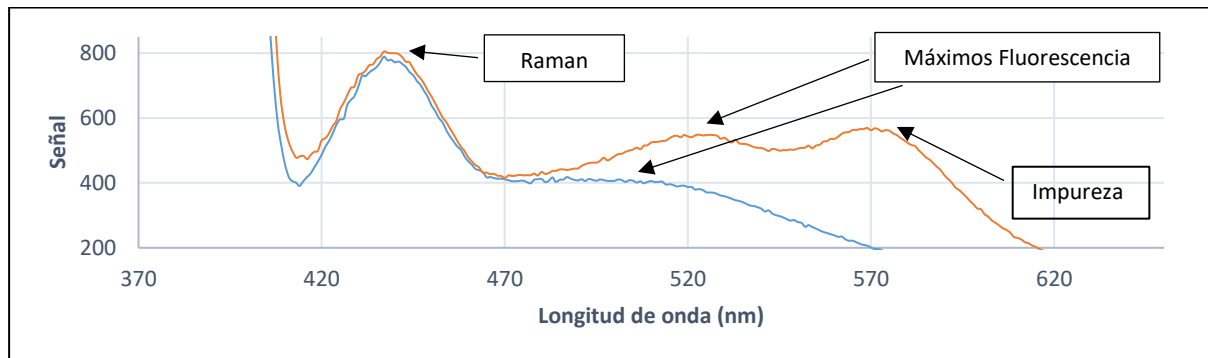
Se registra los perfiles de señal en base tiempo cero (una vez adicionado el Colesterol) y señal de equilibrio cero (con intensidad de señal constante) (Fig 1.4). Con el programa OriginPro 8 se hace el siguiente cálculo estadístico de cálculo de áreas. El tipo de cálculo es mediante integración. El resultado del área bajo la línea base de referencia tiene valor negativo pero se pondrá con valor positivo en las gráficas.



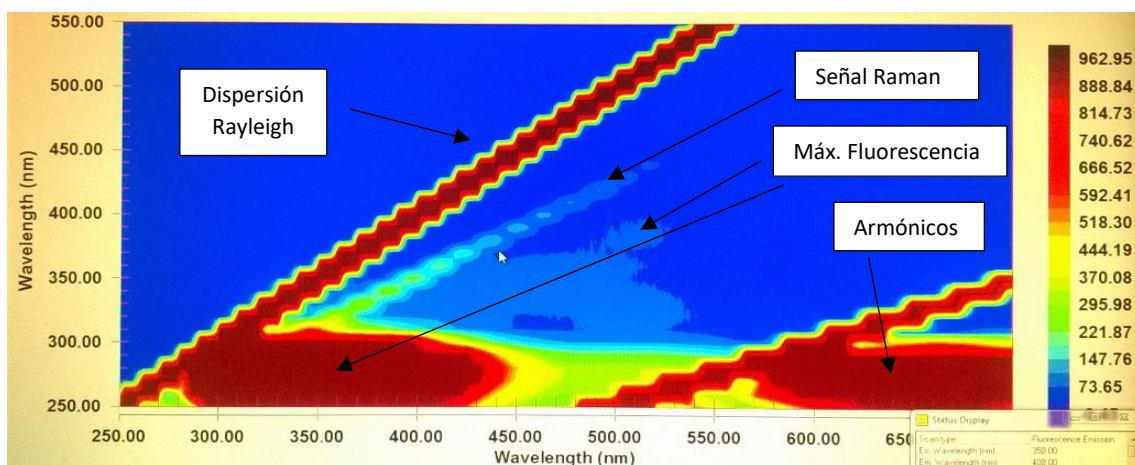
## 5.- Resultados y discusiones:

### 5.1.- Señales analíticas de Colesterol Oxidasa en Fluorescencia y Absorción molecular:

Con una alícuota de COD (3 U/mL) se procede a realizar el espectro de emisión con una longitud de onda fija de excitación (Fig 5.1) y una vez identificado el o los máximos, se realiza a la inversa, un espectro de excitación con una longitud de onda de emisión fija y se identifican los máximos de señal. En el espectro 3D con rango de emisión desde los 250 hasta los 700 nm realizando espectros de emisión cada 10 nm.



**Fig 5.1** Espectros de emisión a  $\lambda_{exc}=380$  nm de COD *Pseudomonas Fluorescens* (Azul) y *Streptomyces* sp. (Naranja) presentando distintos máximos de fluorescencia a 500 y 525 nm respectivamente. El máximo a 580 nm de *Streptomyces* sp. es una señal de impureza de una alícuota anterior de Au (III). Máximo 440 nm es señal Raman. Anchura de rendija 20

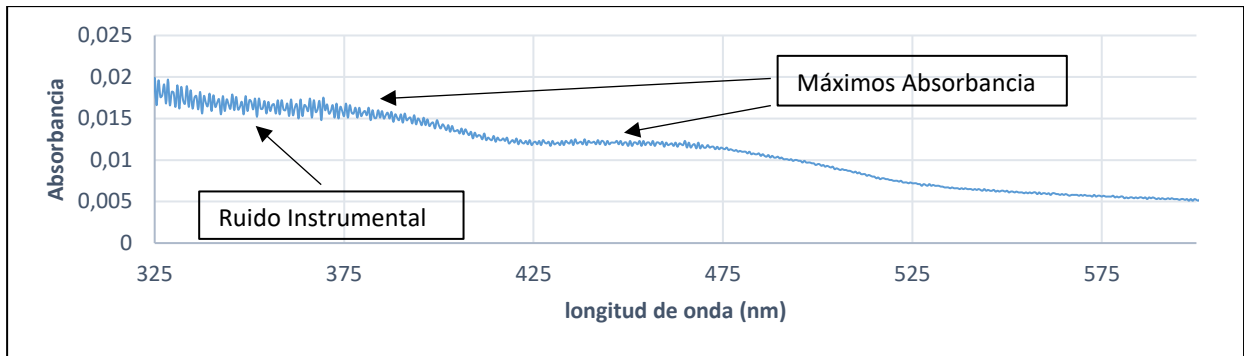


**Fig 5.2** Espectro 3D de COD *Streptomyces* sp 3 U/mL. Anchura rendija 10.

Al hacer el espectro de Absorción molecular se tiene que realizar el blanco de la disolución, en este caso el tampon y posteriormente la muestra en todo el rango de longitudes de onda (Fig 5.3).

La Fig 5.3 los máximos de absorbancia son a 380 y a 450 nm y a pesar de tener una concentración alta de COD su absorbancia es muy pequeña, al igual que en fluorescencia ya que, para que se puedan distinguir los máximos se ha tenido que trabajar con la máxima sensibilidad del instrumento (Fig 5.1).

A partir de este apartado se va a estudiar el seguimiento de la reacción enzimática con el colesterol con la técnica de la fluorescencia.

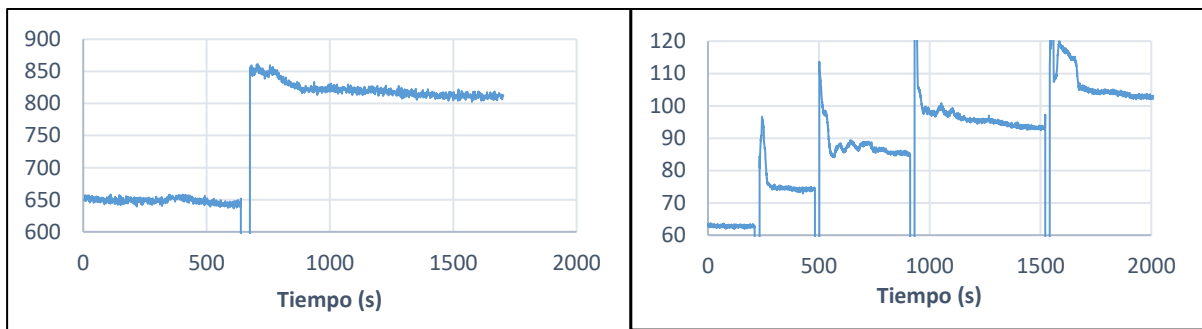


**Fig 5.3: Espectro de Absorción molecular de Streptomyces sp. [COD] 3 U/mL**

### **5.2.- Disolvente Acuoso: Tensioactivo Triton X-100 reduced:**

Como ya se sabe, el principal inconveniente es que el Colesterol es insoluble en agua y como las condiciones óptimas de reacción es que tanto la alícuota de COD como el Colesterol libre deben de estar en la misma fase, en este caso acuosa. La única forma que se puede tener el Colesterol libre en fase acuosa es con tensioactivos.

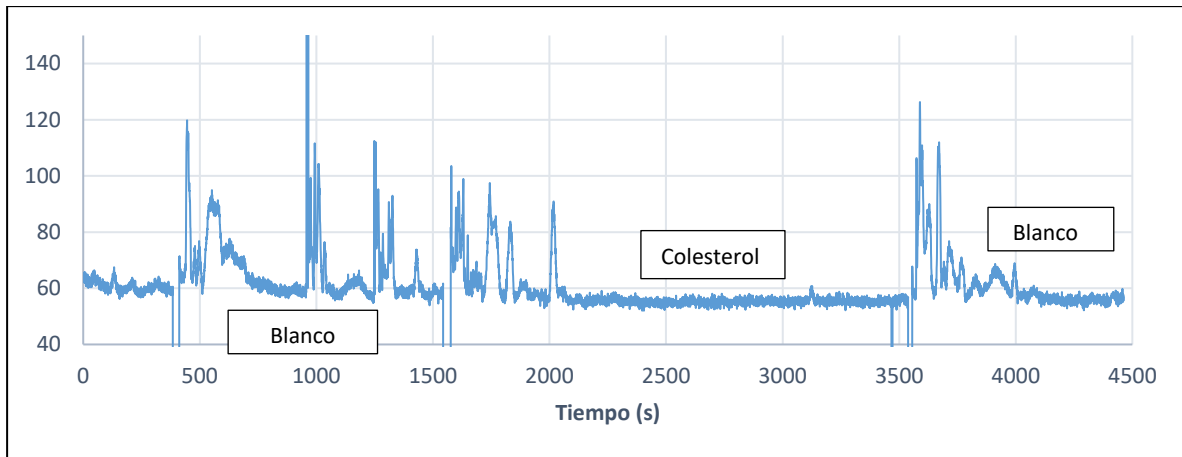
Se adiciona el blanco (sin analito) equivalente a una de ensayo de 5 ppm de Colesterol (Fig 5.4a).



**Fig 5.4a Adición blanco (5ppm) Triton X-100 reduced. Fig 5.4b Registro reproducibilidad de blanco (5 ppm)**

El perfil de la Fig 5.4 es la misma tanto en 380 nm como a 450 nm de excitación. Después de la primera adición de blanco se ve que la señal aumenta bruscamente aun sin haber Colesterol libre, debe de ser por el Triton X-100 reduced o la propia dispersión provocada por la homogeneización de la mezcla. Como en la siguiente adición se podría salir de la escala, se disminuye la anchura de rendija a 10 y se sigue procediendo con la cinética (Fig 5.4b). Todas las adiciones son de blanco. Sigue aumentando la línea base y aparte tarda más en equilibrarse. Es debido a que en cada adición, el % de Triton X-100 reduced en la alícuota aumenta. En las 2 últimas adiciones es de 1,7 y 2,1 % de Triton X-100 reduced respectivamente.

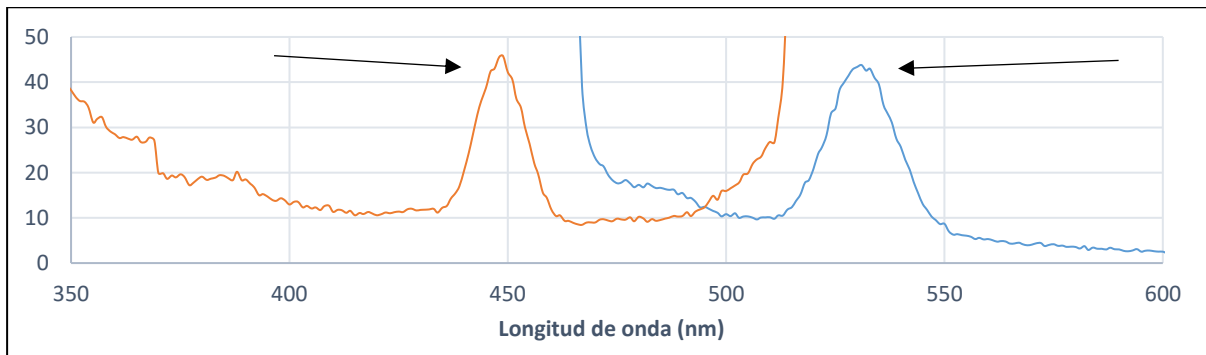
Para poder ver con claridad la señal que produce en la COD el Colesterol libre, se quiere evitar esa subida de señal de línea base en las adiciones de blanco así que en la siguiente alícuota de COD (3 U/mL) se pondrá el mismo % de Triton X-100 reduced que en la muestra patrón de Colesterol libre y se procede a realizar un estudio de reproducibilidad. En la reproducibilidad se adiciona la misma cantidad de Colesterol libre en la alícuota varias veces para saber si da el mismo tipo de señal (Fig 1.4) y poder cuantificarlo. Alternando adiciones de blanco y 5 ppm de Colesterol libre se podrá saber qué tipo de señal tendrá cada una e identificarla (Fig 5.5).



**Fig 5.5 Estudio de reproducibilidad de blanco y Colesterol con % Triton X-100 cte. Anchura de rendija 10**

Se ha mejorado en cuanto a la línea base ya que no cambia en toda la cinética pero la reproducibilidad es insatisfactoria, en la adición de Colesterol libre no tenemos el mínimo de señal que se espera y aparte hay mucho ruido instrumental, del orden del casi 100%, incluso con agitación en la cubeta de cuarzo. Después del estudio de reproducibilidad se verifica si ha habido reacción con una tira reactiva de  $H_2O_2$  y es positiva.

La culpa de no poder observar la señal debida al Colesterol libre se debe al tensioactivo ya que tiene una señal de Raman de la misma intensidad y muy ancha e interfiere en todo rango del espectro de emisión del FAD a 450 nm (Fig 5.6). Esto hace que la reproducibilidad y posterior cuantificación de Colesterol libre no sea posible.



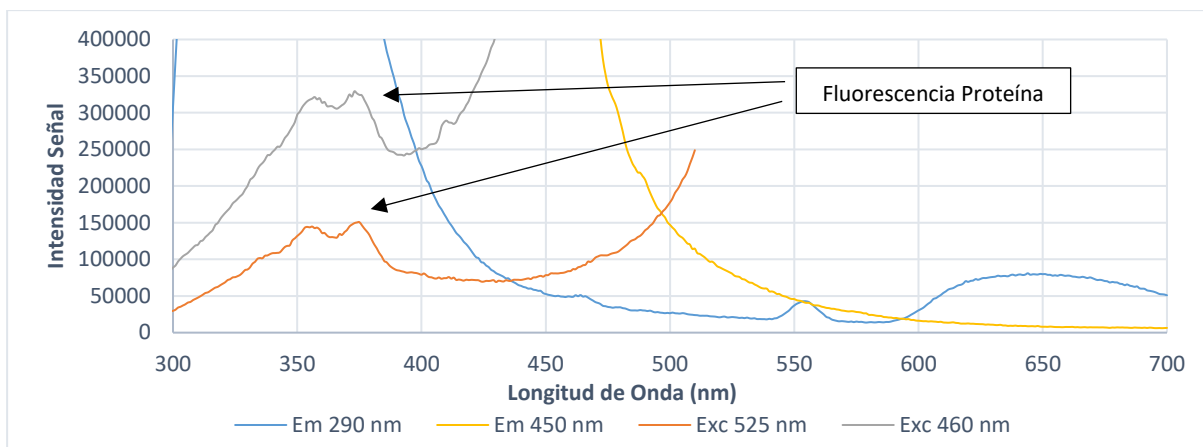
**Fig 5.6 Espectro de emisión y excitación de Triton X-100 reduced 0'7% v/v. Anchura de rendija 10.**

Se probó también con el tensioactivo Dodecilsulfato de sodio (SDS) pero ya en la preparación de la disolución patrón de Colesterol libre presentaba turbidez incluso a concentraciones de colesterol libre bajas del orden de 1 gr/L así que se desechó desde el principio.

### **5.3.- Disolvente acuoso: Calibrador HDL/LDL:**

Al no poder utilizar tensioactivo para disolver el Colesterol, se decidió usar otro tipo de patrón del analito. El Calibrador es una disolución acuosa que contiene el Colesterol libre en lipoproteínas, en la misma fase en la que se va a encontrar en la muestra. De esta forma se consigue tener el Colesterol libre solubilizado en agua y en un entorno similar al que se encuentra en la muestra de sangre.

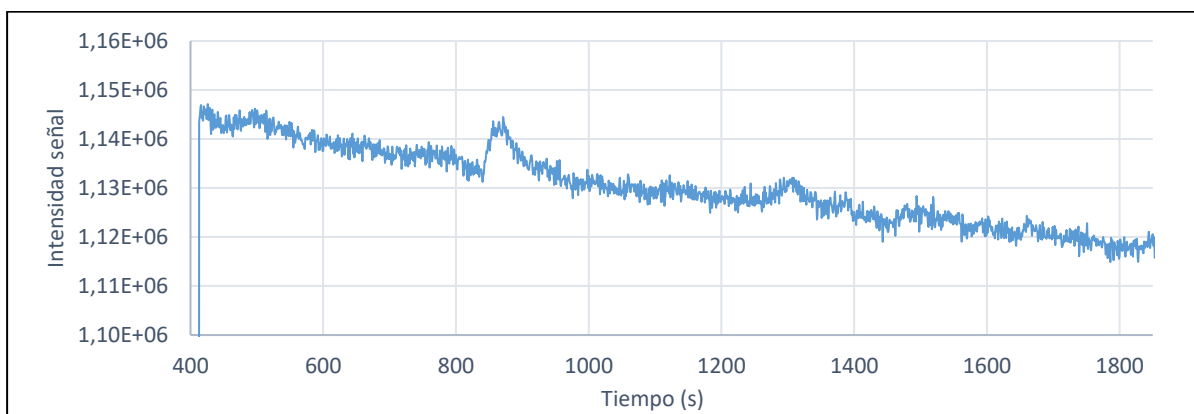
Se realiza los espectros de emisión y excitación para hallar los máximos y comprobar si la proteína del calibrador no interferirá en la cinética (Fig 5.7).



**Fig 5.7 Espectros de emisión y excitación del calibrador HDL/LDL. Anchura de rendija 5.**

Las condiciones de los espectros se hicieron con anchura de rendija 5 y, con los parámetros del instrumento en las mismas condiciones que en Fig 5.1 nos daría una lectura 16 veces mayor. La línea base subirá mucho una vez haya una adición de calibrador en la alícuota. En la zona UV se puede distinguir muy bien la fluorescencia del Triptófano del contenido proteínico del calibrador con máximos a 350 y 370 nm.

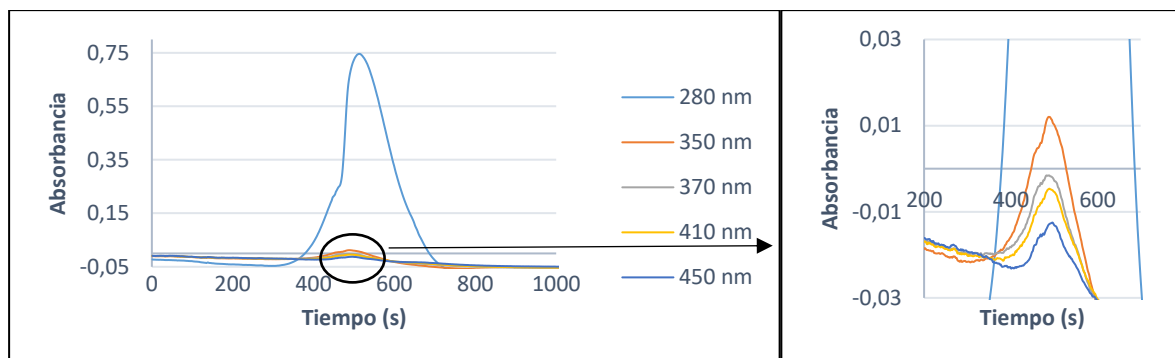
Aun así, acto seguido se adiciona 10 ppm de Colesterol libre del calibrador (Fig 5.8).



**Fig 5.8 Espectro cinético de adición de 10 ppm de Colesterol libre Calibrador HDL/LDL. [COD]=1'5 U/mL**

Otra vez es insatisfactorio ya que lo que se ve en Fig 5.8 es la fotodegeneración de la proteína, por tanto, no se puede seguir. Se piensa en la solución de separar la proteína mediante la técnica de separación en columna de exclusión molecular con Sephadex G-50 con seguimiento por absorción molecular con los 4 máximos obtenidos (Fig 5.9).

Salen todos los componentes al mismo tiempo, es decir, no se pueden separar. Se desecha el desarrollo del método analítico con el calibrador HDL/LDL.



**Fig 5.9 Registro separación por exclusión molecular lipoproteína HDL/LDL. Sephadex G-50 2 mL/min.**

#### **5.4 Disolventes orgánicos:**

Las opciones de trabajar con la misma fase para la enzima y el Colesterol se han acabado y se tuvo que optar de cambiar de fase, esta vez usando una fase orgánica aprovechando la solubilidad del colesterol en ella. En esta parte se usan varios disolventes orgánicos y se va a exponer los resultados uno a uno.

Todas las disoluciones patrón de Colesterol libre realizadas con disolventes orgánicos fueron de concentración 1200 ppm.

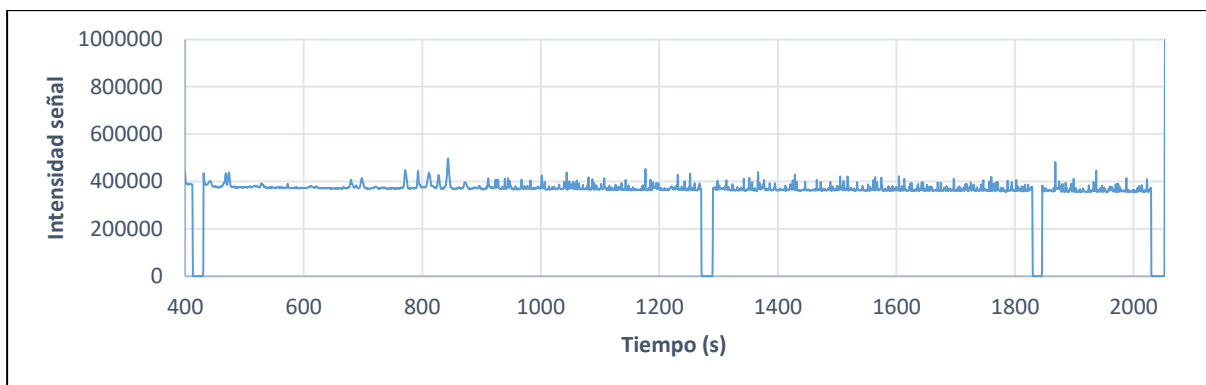
La cubeta de cuarzo utilizada viene provista de un tapón para prevenir que los disolventes orgánicos se volatilicen durante los estudios cinéticos.

##### **5.4.1 Colesterol libre en Hexano:**

El Hexano tiene una densidad menor que la disolución de la alícuota (1,5 U/mL) y además es insoluble, así que se formará dos fases líquidas separadas quedando el Hexano con el Colesterol libre en la parte superior. Es muy recomendable que justo después de las adiciones de Colesterol en Hexano a la alícuota, ésta se agite vigorosamente durante unos segundos fuera del instrumento y regular el agitador magnético incorporado dentro del luminómetro a altas revoluciones para que la agitación continúe durante la reacción.

Se realiza primero el blanco para asegurarse de que no cambia la línea base y luego el estudio de reproducibilidad, esta vez con adiciones de 10 ppm de Colesterol libre en Hexano (Fig 5.10).

Tanto como la señal de blanco y la de adición de Colesterol, la intensidad de señal es constante. Hay que decir que la reacción es muy lenta (con el seguimiento de tiras reactivas de  $H_2O_2$ ) ya que el Colesterol libre se encuentra en una fase separada a la enzima y aparte, en la zona superior, la agitación no es óptima. Otra razón es que la reacción se produce fuera del del haz de radiación y no se percibe el  $FAD_{RED}$  de la COD en la lectura y por tanto la señal permanece constante.



**Fig 5.10. Registro de estudio de reproducibilidad de 10 ppm de Colesterol de Hexano. [COD]= 1,5 U/mL. Anchura de Rendija 15.**

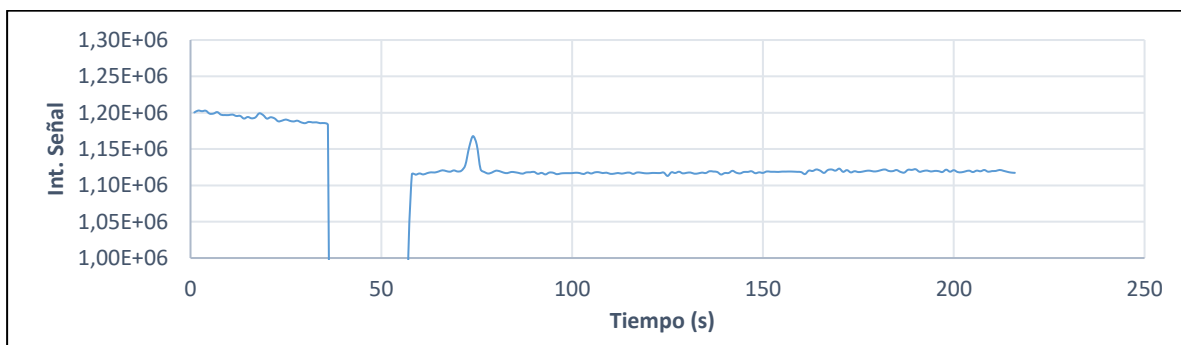
Otra vez más se desecha el estudio pero hay un punto positivo, tanto el Colesterol libre como el 4-Cholesten-3-ona son solubles en Hexano y la fase acuosa al finalizar el estudio de reproducibilidad se encuentra como al principio, transparente y homogénea y se puede volver a utilizar.

#### **5.4.2 Colesterol libre en Cloroformo:**

Para optimizar la agitación durante la cinética ahora se opta con un disolvente orgánico más denso que la fase acuosa y esta vez es el Cloroformo.

En las dos fases separadas, ahora el Cloroformo quedará en la parte de abajo de la cubeta de cuarzo y como tenemos ahí el agitador magnético, el movimiento entre fases será más rápida y continua.

Se procede de igual manera. Cinética de blanco y estudio de reproducibilidad con adiciones de 10 ppm de Colesterol en Cloroformo (Fig 5.11).

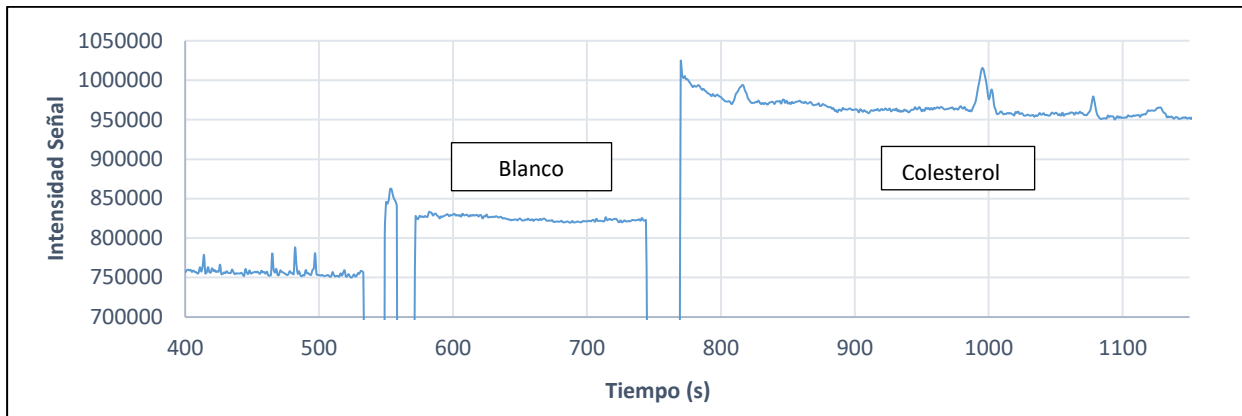


**Fig 5.11. Adición de 10 ppm de Colesterol en Cloroformo. [COD]= 1,5 U/mL. Anchura de rendija 20.**

Después de varias pruebas, las cinéticas son exactamente iguales con una intensidad de señal constante. Tanto como las de blanco y las del estudio de reproducibilidad y las tiras reactivas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> han dado negativo así que se puede concluir que este método es totalmente nulo.

### 5.4.3.- Colesterol libre en Etanol Absoluto:

Ahora se opta mezclar la fase acuosa con la fase orgánica y se empieza con el Etanol Absoluto. Ya se sabe que la solubilidad del Etanol Absoluto con el agua es prácticamente total y por tanto se hace una prueba a ver qué es lo que pasa. Se sigue haciendo el estudio de reproducibilidad de blanco y 10 ppm de Colesterol libre en Etanol Absoluto (Fig 5.12).

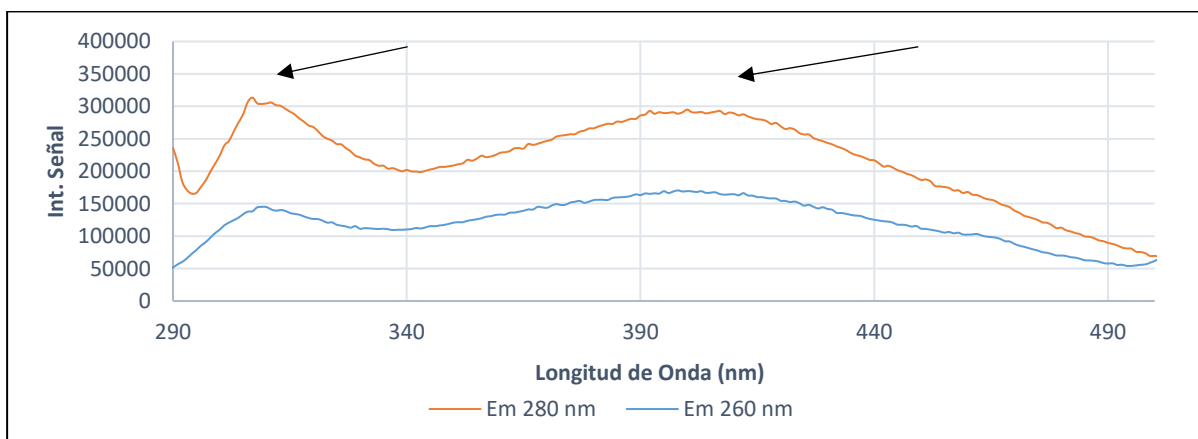


**Fig 5.12. Registro de reproducibilidad de blanco y 10 ppm de Colesterol en Et Absoluto. [COD]= 1,5 U/mL. Anchura de Rendija 15.**

Esta vez el registro es diferente, da una ligera subida de línea base en la adición de blanco debido a la mezcla de fases y en la de 10 ppm de Colesterol libre la subida de línea base es mayor que la del blanco. Es debido a la dispersión tanto como del reactivo como del producto y el añadido de la mezcla de fases. La tira reactiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dio positivo en todos los estudios de reproducibilidad en un corto periodo de tiempo.

### 5.4.4.- Colesterol libre en Acetona:

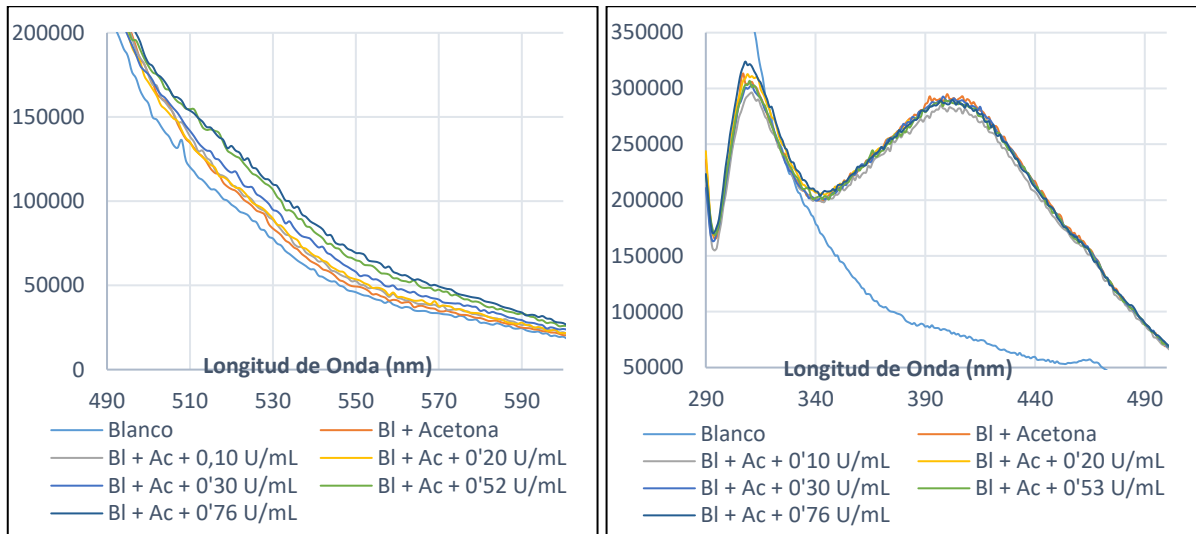
Después del Etanol Absoluto se prueba con otra mezcla de fases, esta vez con Acetona. Hay que decir que se quería evitar a toda costa el uso de Acetona debido a que usan estabilizadores y éstos pueden presentar fluorescencia así que primero se realiza los respectivos espectros de blanco de Acetona (Fig 5.13).



**Fig 5.13 Espectros de emisión de blanco de Acetona. Anchura de rendija 10.**



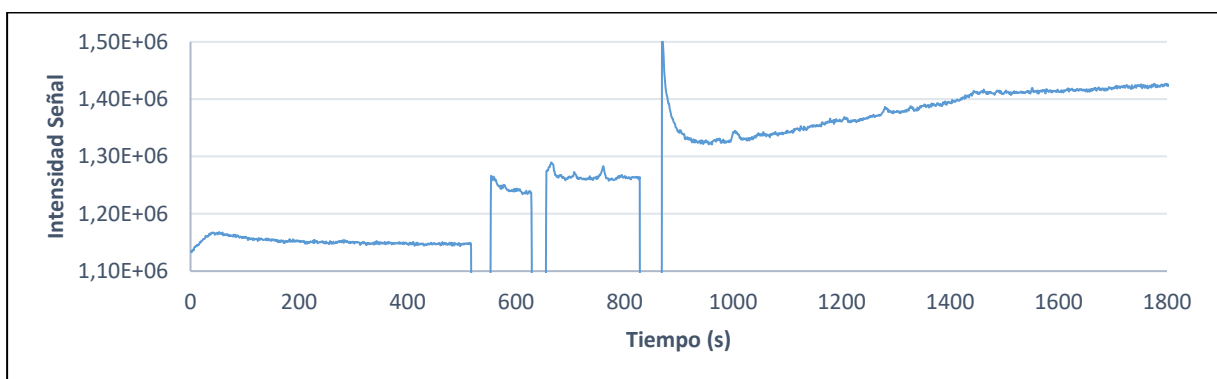
Como se puede ver en los espectros de emisión en la zona de UV a 280 y 260 nm presentan 2 máximos a 310 y 410 nm y en el espectro de emisión a 450 nm no presenta ningún máximo y se puede asegurar que no interferirá en la cinética de reacción. Para cerciorarse se realizan varias adiciones de COD haciendo espectros de emisión a 450 nm a ver como varia la intensidad de la señal (Fig 5.14).



**Fig 5.14 (Izq) Espectros de emisión a 450 nm con adiciones acumulativas de COD. (Dcha) Espectros de emisión a 280 nm con adiciones acumulativas de COD. Anchura de rendija 10.**

La Fig 5.14 (Izq) muestra que cuanto más se añade COD aumenta la señal. Esto es esperanzador ya que se puede asegurar que a esa longitud de onda La acetona no interfiere en la cinética. La Fig 5.14 (Izq) se le compara con la Fig 5.14 (Dcha). Es la misma adición acumulativa de COD pero en la zona de UV donde la acetona presenta fluorescencia y también el contenido proteínico de la COD no sacando nada en claro ya que la señal no varía en absoluto.

Se procede entonces a la realización del estudio de reproducibilidad con otra alícuota (0,76 U/mL) con adición de 60  $\mu$ L de blanco y adiciones de 10 ppm de Colesterol libre en Acetona (Fig 5.15).



**Fig 5.15 Registro reproducibilidad de 3 Adiciones de 10 ppm de Colesterol en Acetona. Anchura de rendija 15.**

En la Fig 5.15 nos enseña una pequeña curiosidad que nunca había salido en las reproducibilidades anteriores. A partir de la tercera adición de 10 ppm de Colesterol libre en Acetona, con un total de 30 ppm inyectados anteriormente, ya se puede ver lo que requiere este estudio, una bajada de intensidad de la señal hasta un mínimo y su correspondiente subida hasta el equilibrio.

Se sigue con la reproducibilidad dando los siguientes resultados:

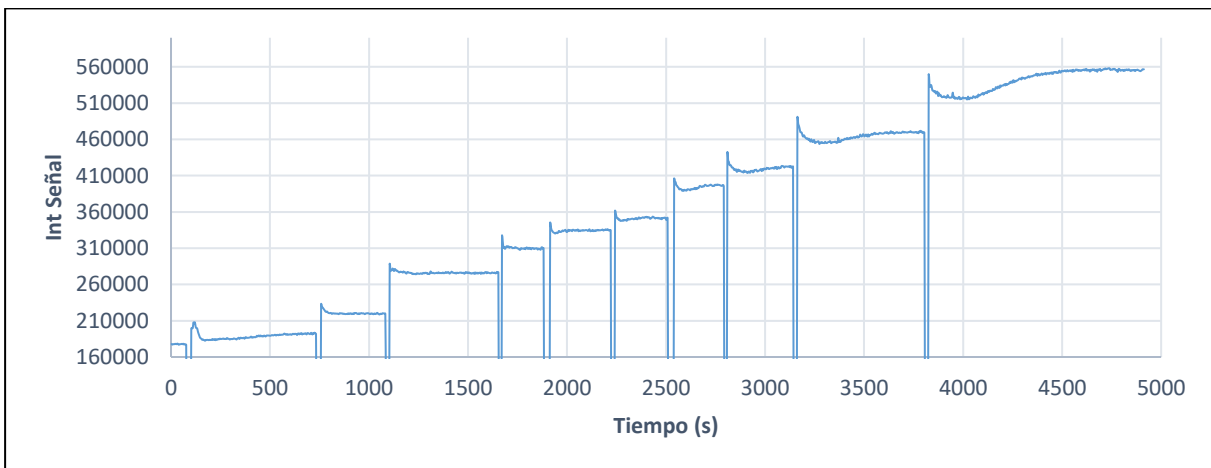
Áreas 10ppm		Promedio	DSR	%DSR
33102300		30900733,3	2230647,54	7,21875277
28642100				
30957800				

Los resultados son bastante buenos si se quiere comparar con todos los anteriores. Vuelve a tener ese problema de subida de línea base en las adiciones por la dispersión como pasaba con el Etanol Absoluto, pero con ese perfil de señal, es un grandísimo avance si se compara con las experiencias anteriores y tiene una explicación.

La bajada de señal inicial no es visible hasta 30 ppm de Colesterol libre inyectados es debido a que la constante  $k_b$  de la reacción (Fig 1.3) inicialmente es muy alta, por eso se ve el perfil de señal como constante y no se puede distinguir en el tiempo el  $FAD_{RED}$ .  $k'$  "siendo  $k' = k_b[O_2]$ " es muy dependiente de la  $[O_2]$  en la alícuota y cuando ésta disminuye hasta su tercera parte (debido a lo consumido por el Colesterol libre ya añadido) ya tiene un valor que hace que se pueda distinguir en el tiempo el  $FAD_{RED}$  haciendo que la fluorescencia baje y suba hasta señal de equilibrio  $FAD_{OX}$ .

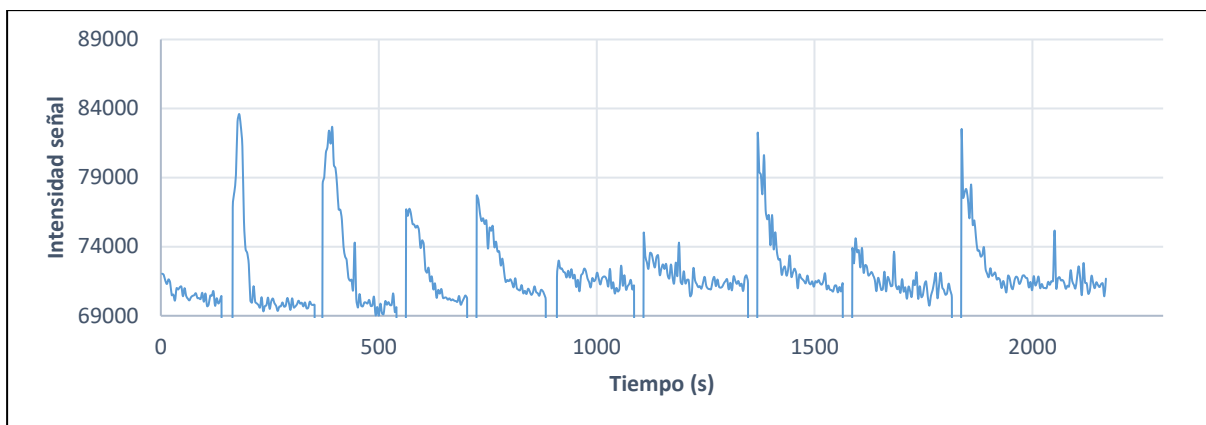
Como en la reproducibilidad se hizo primero un blanco de 60  $\mu$ L de Acetona, se siguió con el mismo procedimiento pero con un primer estudio de calibración con [Col] crecientes en ppm en Acetona para comprobar las posibilidades del método. El procedimiento es el siguiente en todas las experiencias:

Alícuota inicial [COD] U/mL + 60  $\mu$ L Blanco + 3 adiciones de 10 ppm + 2,5 , 5 , 7,5 , 10 y 20 ppm de Colesterol libre en Acetona (Fig 5.16). No se puede realizar más adiciones porque se superaría la  $[O_2]$  en la alícuota que es  $2,2 \cdot 10^{-4}$  M por tanto la enzima no se recupera y la señal no volvería a subir.



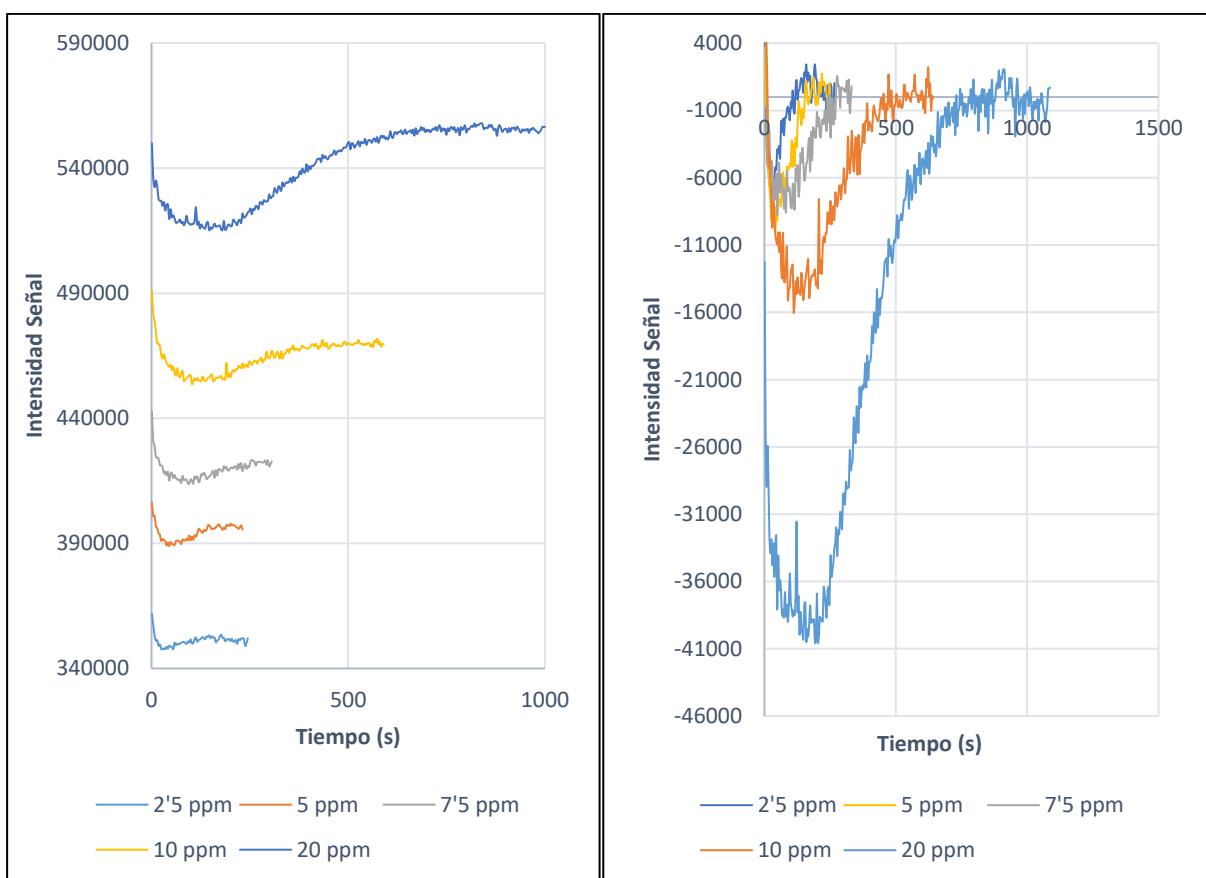
**Fig 5.16 Ejemplo registro cinético de calibración con [Col] creciente tras 30 ppm de Colesterol libre inyectados. [COD]= 0'76 U/mL. Tampon fosfato 50 mM pH=7. Anchura de rendija 10.**

También se procede a realizar el mismo método pero sin Colesterol libre, solo blanco, para tomar el área de blanco medio (Fig 5.17). Se ve que con adiciones mayores o menores la señal es distinta en cuanto a homogeneización y máximo de altura al inicio, así que se toma un área de blanco medio y se le resta a las áreas haciendo ésta más reproducible (Anexo 2).



**Fig 5.17. Registro del método con blanco. [COD] 0'76 U/mL. Anchura de rendija 10.**

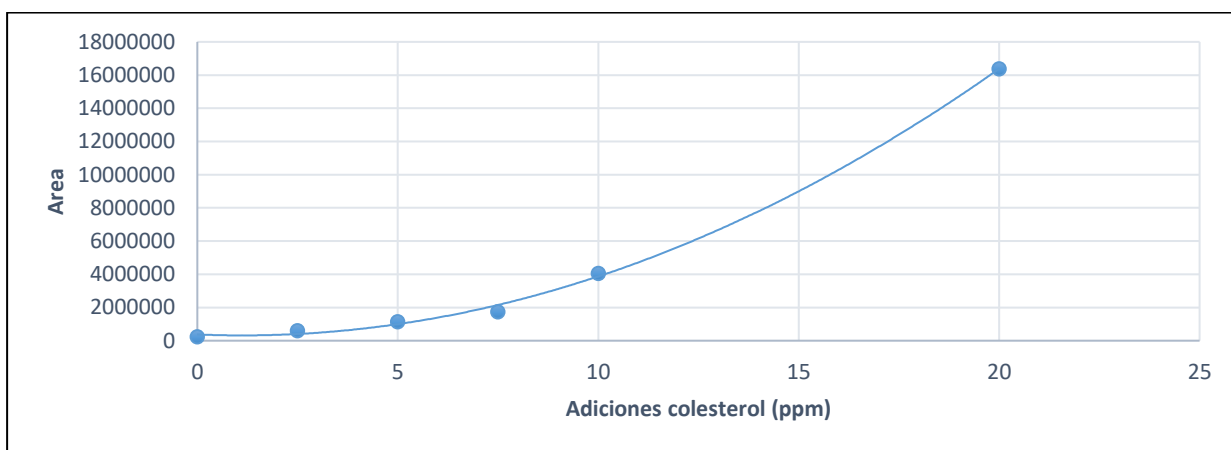
Para poder separar el efecto de aumento de la señal provocada por la dispersión debida a la reacción del Colesterol libre, tras cada experiencia se toma por separado las señales obtenidas tras las distintas adiciones con base de tiempo cero (En el momento de la adición del Colesterol libre) (Fig 5.18 (Izq)) y como base de tiempo y señal de equilibrio cero (Señal obtenida cuando se llega al equilibrio) (Fig 5.18 (Dcha)) dando las siguientes áreas. Se puede ver que sin base de equilibrio cero la señal es creciente debido a la dispersión.



**Fig 5.18 Áreas distintas adiciones de [Col] con tiempo base cero (Izq) y con tiempos y señal de equilibrio con base cero (Dcha). [COD] = 0'76 U/mL Tampon Fosfato 50 mM pH=7. Anchura de Rendija 10.**

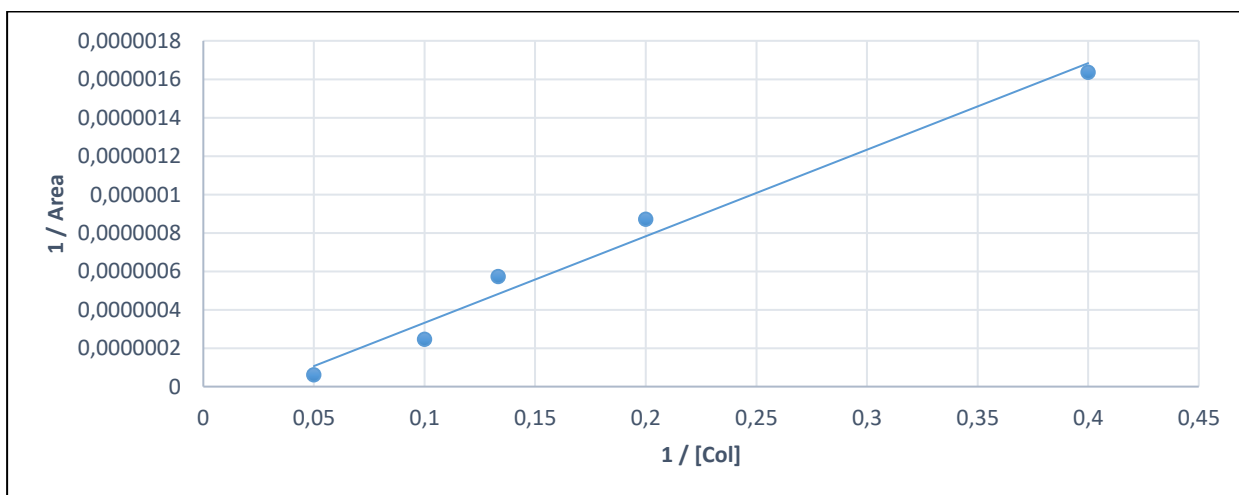
Se calcula las áreas gracias al programa OriginPro 8 de todas y cada una dando los siguientes datos:

[Col] (ppm)	Área	Área Blanco	Área Conjunta	1/[Col]	1/A
0	0	246599,5427	246599,543		
2,5	362395,375	246599,5427	611012,275	0,4	1,6366E-06
5	711270,927	246599,5427	1147990	0,2	8,7109E-07
7,5	1238730	246599,5427	1748210	0,13333333	5,7201E-07
10	3327430	246599,5427	4050110	0,1	2,4691E-07
20	13694100	246599,5427	16381400	0,05	6,1045E-08



Ajuste de curva: Polinomio de segundo orden:

$$y = 45052x^2 - 100724x + 374978 \quad R^2 = 0,9986$$



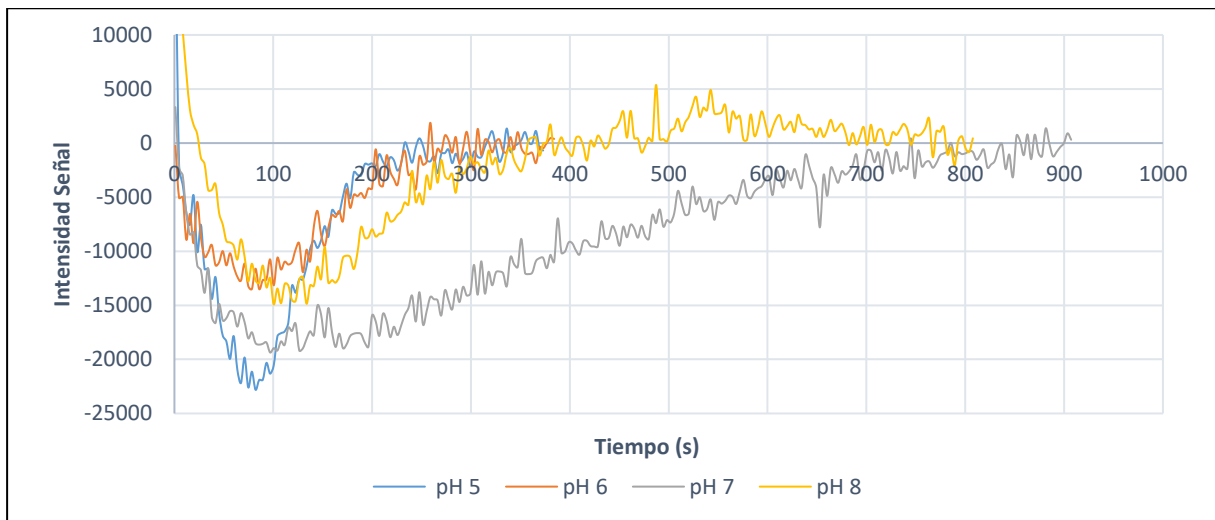
$$\text{Recta de Ajuste: } y = 5E-06x - 1E-07 \quad R^2 = 0,9821$$

Como se puede ver se ajusta muy bien a una curva polinómica de orden 2 y se ajusta a una recta con sus inversas [10].

## 5.5.- Optimización:

### 5.5.1.- Elección de pH y [COD]:

A continuación se hizo un estudio de optimización del método analítico. Es el mismo procedimiento inicial tras 40 ppm de Colesterol libre inyectados pero a distintos pH (Fig 5.19). Observando los parámetros de tiempo y área, se decanta por el pH=7 expuesto en Fig 5.18. En otro registro de pH=7, se pudo distinguir un parámetro más que interfiere en menor medida y es la de la dispersión. La señal no sube drásticamente después del mínimo, sino que lo hace poco a poco y con pendiente constante cuando en teoría no debería (Anexo 3).

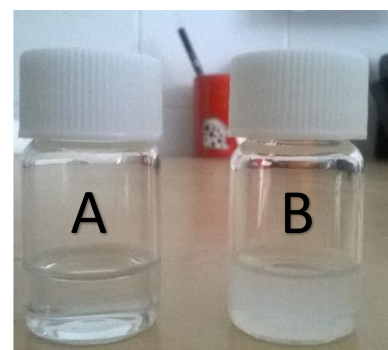


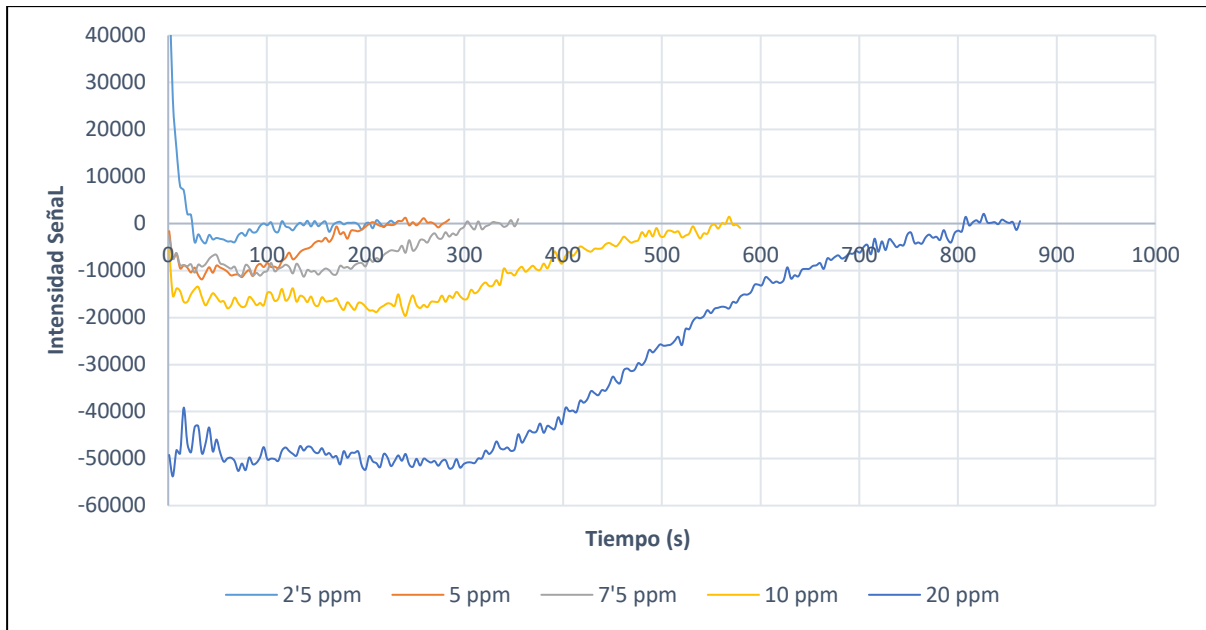
**Fig 5.19 Adiciones de 10 ppm de Colesterol en Acetona a distintos pH tras 30 ppm inyectados. [COD]=0'76 U/mL. Anchura de rendija 10.**

Después se realiza un estudio de optimización con distintas concentraciones de COD a la mitad y al doble en la alícuota inicial (0,38 y 1,5 U/mL respectivamente). La prueba a 0,38 U/mL es muy lenta y a 1,5 U/mL es muy rápida, dejando los registros de las adiciones de 2,5 y 5 ppm casi imperceptibles (Anexo 4). Mejor opción, la inicial con 0,76 U/ml de COD (Anexo 5a, 5b).

### 5.5.2.- Elección de Tampon:

Al ver que la dispersión fue demasiado alta en el segundo intento de realización de método a pH=7, se desechó. Se investigó cuál era la causa del segundo intento y fue, que aparte de la dispersión creciente que presentaba tanto el colesterol y 4-cholest-3-ona, también lo hacía el tampón fosfato 50 mM (B) una vez se mezclaba con la acetona. Se eligió otro tampón, esta vez Tris HCl 50 mM a pH=7 y cuando se mezclaba con la acetona esta presentaba una disolución transparente (A) incluso con mezclas mucho más drásticas de 90:10 Acetona:Tampón así que se hizo el mismo procedimiento [COD]= 0,76 U/mL en disolución Tris-HCl 50mM pH=7 (Fig 5.20).



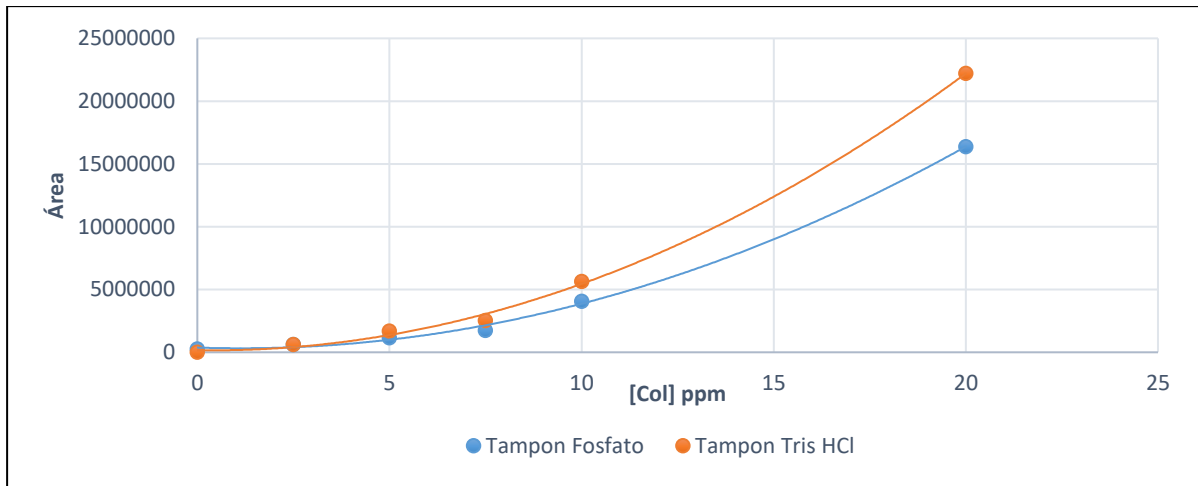


**Fig 5.20. Áreas con tiempos y señales de eq. en base cero. [COD]= 0,76 U/mL. Anchura de rendija 10**

La Fig 5.20 indica un parámetro a mejorar, en el registro del perfil de señal durante la cinética de reacción, se mantiene por más tiempo en el mínimo de fluorescencia. Indica que la segunda reacción  $k'$  actúa como etapa limitante quedándose la COD en  $FAD_{RED}$  más tiempo y a medida que se va gastando el  $O_2$  en la disolución (se muestra tanto como en las adiciones de 10 y 20 ppm de Colesterol libre) la  $[O_2]$  se encuentra al límite. La turbidez de la alícuota al finalizar el método es menor. Los datos de áreas y las representaciones se comparan con los obtenido con el tampón fosfato pH=7.

[Col] ppm	Área Conjunta Fosfato	1/A Fosfato	Área Conjunta Tris HCl	1/A Tris HCl	1/[Col]
0	246599,5427		0		
2,5	611012,275	2,75942E-06	619478,7255	1,6143E-06	0,4
5	1147990	1,40593E-06	1679841,15	5,9529E-07	0,2
7,5	1748210	8,07278E-07	2522491,15	3,9643E-07	0,133333333
10	4050110	3,00532E-07	5631881,15	1,7756E-07	0,1
20	16381400	7,30241E-08	22209471,15	4,5026E-08	0,05

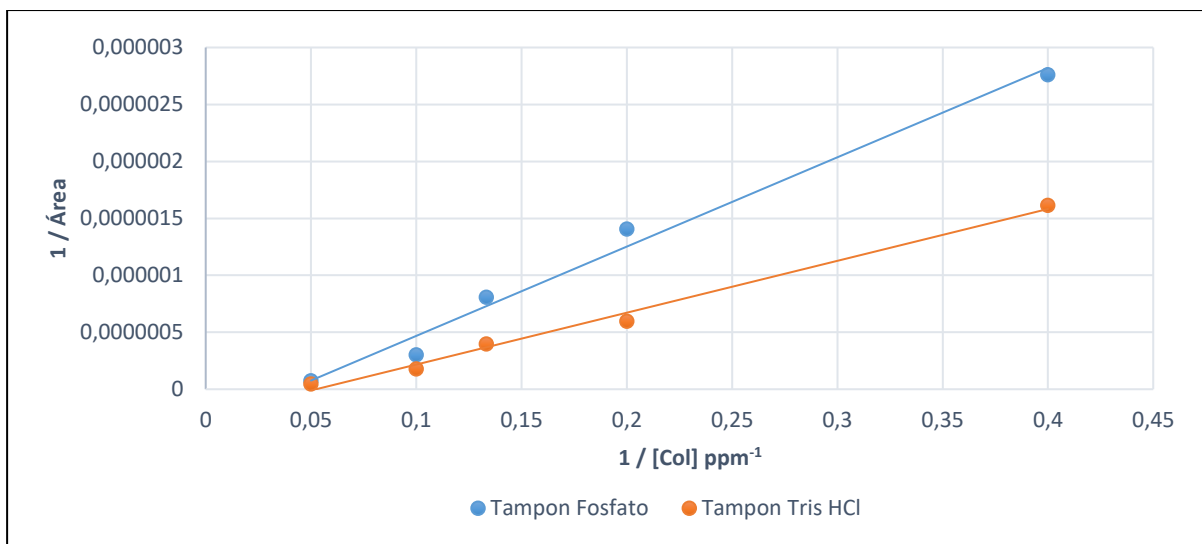
Como se muestra en la tabla anterior, los datos de área con tampón Tris-HCL son mayores. Puede ser debido a que esa disminución de dispersión en la alícuota ayuda en gran medida en la resolución de datos tras la reacción enzimática.



Ajuste curva: Polinomio de orden 2

Tampon Fosfato 50mM pH=7:  $y = 45052x^2 - 100724x + 374978$   $R^2 = 0,9986$

Tampon Tris-HCl 50 mM pH=7:  $y = 57331x^2 - 44840x + 166537$   $R^2 = 0,9987$



Recta Ajuste Tampon Fosfato 50 mM pH=7:  $y = 5E-06x - 1E-07$   $R^2 = 0,9821$

Recta Ajuste Tampon Tris-HCl 50 mM pH=7:  $y = 5E-06x - 2E-07$   $R^2 = 0,992$

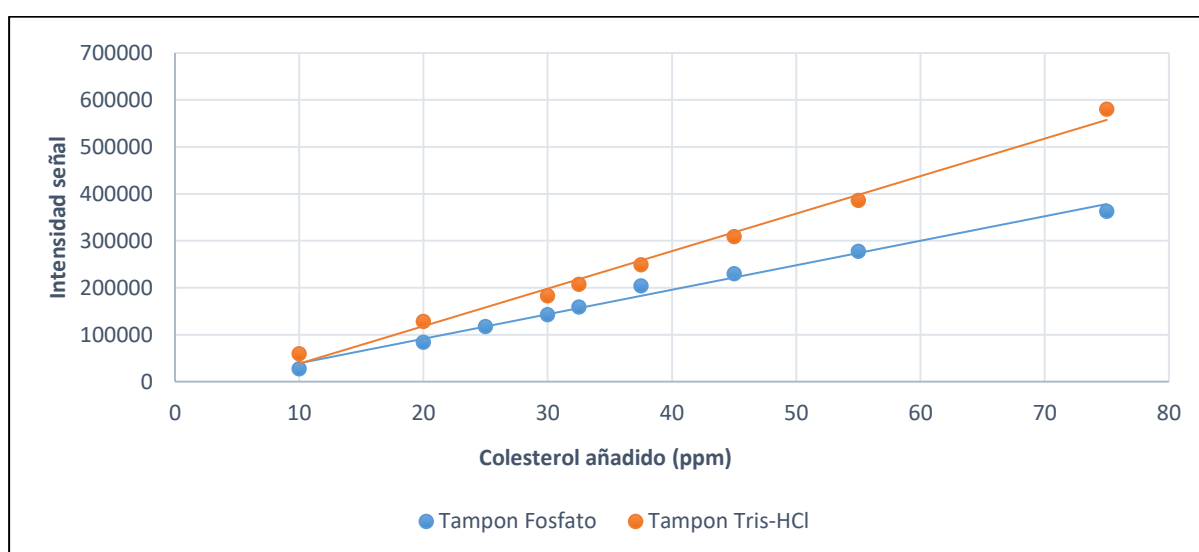
Con esta comparación mejora los resultados de ajuste con respecto a tampón fosfato.

### 5.5.3.- Dispersión:

Como último parámetro de optimización, se compara las señales de las dispersiones (subida de señal línea base de equilibrio) de los mejores resultados tanto con Tampon fosfato como con tampón Tris HCl a pH=7. Lo único que se puede diferenciar con los otros resultados es que el Colesterol libre añadido es creciente.

A continuación se muestran los resultados tras el método analítico.

Col ppm añadidos Fosfato	Señal equilibrio Fosfato	Col ppm añadidos Tris-HCl	Señal equilibrio Tris-HCl
10	27549,38095	10	59631,89048
20	83897,52381	20	128458,319
25	117309,1667	30	183171,6048
30	142770,8333	32,5	207455,6048
32,5	158866,2381	37,5	249248,2
37,5	204000,8333	45	309294,3667
45	229887,5238	55	386362,2
55	277728,8095	75	580468,2833
75	363034,8889		



Recta Ajuste Tampon Fosfato 50 mM pH=7:  $y = 5217,5x - 12968$   $R^2 = 0,9886$

Recta Ajuste Tampon Tris-HCl 50 mM pH=7:  $y = 7986,1x - 41459$   $R^2 = 0,9909$

La recta de ajuste del tampón Tris HCl tiene mayor pendiente y tiene mejor coeficiente de regresión y con el tampón Fosfato presenta menos dispersión total tras el método con el mismo Colesterol libre añadido final, pero con lo visto con la turbidez de la mezcla, la dispersión del tampón Tris HCl se puede saber con certeza que toda esa dispersión se debe al Colesterol libre y 4-Cholesten-3-ona y con el Tampon fosfato no, por tanto se elige el Tampon Tris HCL como más idóneo.

Con todos los parámetros estudiados se eligen como condiciones óptimas para la determinación de Colesterol libre por este método las siguientes:

**Tampon Tris-HCl 50 mM pH=7 ; [COD]= 0'76 U/mL.**



## **6.- Instrumentos:**

### **Agilent Technologies Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer.**

Lámpara: Xenón pulsante

Rango de emisión: 190-1100 nm Resolución= 1nm.

Detector: Fotomultiplicador

Anchura de rendija: 5, 10, 20

Factor respuesta: 12,5 ms.



### **Photo Technology International.**

Lámpara: Xenón

Rango de emisión: 190-900 nm. Resolución= 1nm.

Detector: Multimode.

Anchura de rendija: Regulable 5-25 (de 5 en 5)



### **Agilent 8453 Molecular Absorbance Spectrophotometer:**

Lámpara: Deuterio

Rango de emisión: 190-900 nm

Detector: Fotodiodos en Fila (Diode-Array)

Anchura de rendija: Constante de 1 nm



### **Balanza analítica AND GR-202:**

Máximo: 210 gr.

Mínimo: 1mg.

Precisión: Hasta quinta decimal en gramo.

Hasta segunda decimal en mg.

d: 0.01/0,1 mg



## **7.- Conclusiones:**

- 1- Se ha profundizado en la aplicación de la técnica de fluorescencia molecular, así como en el uso de todos los instrumentos tanto de fluorescencia como de absorción molecular del laboratorio como su software correspondiente.
- 2- Se ha identificado y caracterizado las distintas propiedades de las 2 enzimas estudiadas en el estudio por ambas técnicas.
- 3- Se ha optimizado la disolución patrón de Colesterol libre con tensioactivo siendo éste insoluble en disolvente acuoso.
- 4- Se ha intentado por todos los medios realizar la determinación de colesterol libre por el método de áreas en medio acuoso como con el tensioactivo y con el Calibrador HDL/LDL.
- 5- Se ha estudiado y optimizado las disoluciones patrón de Colesterol libre con todos los disolventes orgánicos disponibles.
- 6- Se ha realizado la reproducibilidad con posterior calibración de Colesterol libre en Acetona con mezcla de fase acuosa y orgánica a diferentes pH y concentraciones de COD.
- 7- Se ha aprendido con el programa OriginPro 8 el tratamiento de datos por medio de áreas de los registros de señal en las cinéticas.
- 8- La reproducibilidad del método analítico tiene una %DSR del 7,22%
- 9- El rango de concentraciones de colesterol varía dependiendo de la [COD] en la alícuota.
- 10- Se ha identificado la peculiaridad de la constante  $k_b$  en la cinética de la enzima *Streptomyces* sp. para el método analítico.
- 11.- Se ha desentrañado las distintas señales de fluorescencia debidas a la reacción enzimática con las de dispersión durante los registros cinéticos.
- 12- Se ha optimizado las condiciones experimentales para la determinación de Colesterol libre a través de la fluorescencia intrínseca de la COD.
- 13- De acuerdo con los datos obtenidos, se podría aplicar este método analítico para el desarrollo de un biosensor óptico enzimático de Colesterol libre.

## **8.- Bibliografía:**

- [1] Wade Jr. L. G. Química Orgánica Vol 2, 7ª ed, pág 595.
- [2] Lehninger, Principios de Bioquímica, 4ª edición, págs. 831, 835-838.
- [3] Giovanni GADDA, Gaby WELS, Loredano POLLEGIONI, Silvia ZUCHELLI, Dorothea AMBROSIUS, Mirella S. PILONE and Sandro GHISLA. Characterization of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*. Eur. J. Biochem. 250, 3692376 (1997).
- [4] J. MacLachlan, A.T.L. Wotherspoon, R.O. Ansella, C.J.W. Brooks. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical Applications. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 72 (2000) 169-195.
- [5] Sagermann M, Ohtaki A, Newton K, Doukyu N. Structural characterization of the organic solvent-stable cholesterol oxidase from *Chromobacterium* sp. DS-1. J Struct Biol. 2010 Apr;170(1):32-40.
- [6] Alice Vrieling and Sandro Ghisla. Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features. FEBS Journal 276 (2009) 6826–6843.
- [7] Amplex<sup>®</sup> Red Cholesterol Assay Kit (A12216).
- [8] Loredano Pollegioni, Gaby Wels, Mirella S. Pilone, and Sandro Ghisla. Kinetic mechanisms of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*. European Journal of Biochemistry 264 (1999), 1, pp. 140-151.
- [9] JAVIER GALBÁN, JOSÉ F. SIERRA, JOSÉ M. LÓPEZ SEBASTIÁN, SUSANA DE MARCOS, and JUAN R. CASTILLO. Direct Fluorometric Determination of Total Cholesterol in Serum Using Derivatized Cholesterol Oxidase. APPLIED SPECTROSCOPY Volume 54, Number 8, 2000 1157-1162.
- [10] Javier Galbán, Isabel Sanz-Vicente, Jesús Navarro and Susana de Marcos. The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review. Methods Appl. Fluoresc. 4 (2016) 042005.