

BIOSENSORES ENZIMÁTICOS BASADOS EN LA GENERACIÓN IN-SITU DE NANOMATERIALES DE ORO: UNA ALTERNATIVA A LOS MÉTODOS ENZIMÁTICOS ÓPTICOS CLÁSICOS

Susana de Marcos, Isabel Sanz-Vicente, Ángel López-Molinero, Javier Camacho-Aguayo, Mario Domínguez, Pablo Cebrián, Jesús Navarro, Alba Martín-Barreiro y Javier Galbán*

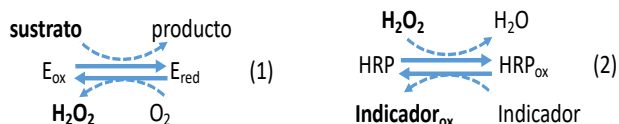
Grupo de Biosensores Analíticos, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), Universidad de Zaragoza

*jgalban@unizar.es

(Website del grupo: <http://gba.unizar.es>)

1.- Nanomateriales en métodos enzimáticos ópticos

Los métodos de análisis enzimáticos colorimétricos (y fluorimétricos) tienen una enorme aplicación analítica real, particularmente para el análisis de moléculas orgánicas de bajo molecular de interés en alimentación, análisis clínico o medio-ambiental. Muchos de los métodos implementados en analizadores automáticos (continuos o discontinuos), tiras reactivas desechables o kits se fundamentan en estas reacciones. Dentro de ellos destacan los basados en enzimas del tipo oxidasa. Estas enzimas (E) catalizan reacciones de oxidación de sustratos (analito) por el O₂ según el mecanismo simplificado que se indica en la reacción 1. Dado que en la mayoría de estas reacciones ninguna de las especies (excepto la enzima [1]) tienen propiedades ópticas, el sustrato se suele determinar finalmente sometiendo al H₂O₂ a una reacción posterior (reacción 2) que involucra a un cromóforo o fluoróforo indicador, en muchos casos catalizada por la enzima peroxidasa (HRP).



Aunque hay una gran variedad de indicadores comerciales, en métodos colorimétricos son especialmente útiles aquellos en los que solo la forma oxidada es coloreada. Ejemplos muy representativos son el ABTS o la tetrametil-bencidina (TMB), cuyas formas oxidadas son azul-verdoso y azul respectivamente. Es importante indicar que la reacción 2 trasciende a los métodos clásicos enzimáticos para análisis de sustratos ya que tiene una gran aplicación también en métodos de enzima-inmunoensayo en los que se usa HRP como enzima.

A pesar de su gran uso, estos reactivos no están exentos de problemas analíticos. Por ejemplo, en el caso del ABTS (también del TMB), los que hemos detectado como más importantes son [2]:

* Dismutación del ABTS_{ox}, que conduce a una pérdida gradual del color azul-verdoso del ABTS_{ox}.

* La HRP (al igual que otras proteínas) es capaz de reducir al ABTS_{ox} haciendo incluso que su color no aparezca.

* El sustrato de la reacción puede interactuar con la HRP_{ox} impidiendo la formación de la especie coloreada.

* Incluso el ABTS_{ox} puede reaccionar con el producto de la reacción para regenerar el ABTS.

En el grupo de investigación estamos estudiando métodos indicadores alternativos que eviten la reacción 2 mediante el uso de las propiedades ópticas de nanomateriales metálicos (NM), en particular de NM de Au, tanto nanopartículas (AuNP) como nanoclusters (AuNC). Como se sabe, la diferencia entre ambos tipos de materiales radica en su tamaño (los AuNC tienen un diámetro máximo de unos pocos nm), que a su vez condiciona su estructura energética y, en consecuencia, sus propiedades ópticas. Las AuNP presentan una estructura de bandas (similar a la de un sólido), que da lugar a la aparición de una banda de absorción en el visible (banda de plasmón de superficie) cuya longitud de onda depende del tamaño y forma de las mismas [3]. Los AuNC presentan una estructura de niveles energéticos más similar a una molécula, que impide la existencia de la banda de plasmón, pero da lugar a fluorescencia cuyas características (rendimiento cuántico, tiempo de vida, desplazamiento Stokes) depende de los niveles energéticos involucrados [4,5].

Hasta la fecha se han propuesto diferentes maneras de usar las propiedades ópticas de los NM en métodos enzimáticos como sustitutos de la reacción indicadora 2. En Absorción molecular, el mecanismo más frecuente es que el reactivo o el producto de la reacción enzimática actúen como aglutinantes de un NM, aumentando su tamaño y/o forma, en consecuencia, produzca un desplazamiento en la λ de la banda del plasmón. En Fluorescencia molecular, la mayoría de los métodos se basan en provocar la desactivación de la fluorescencia de los AuNC, que puede llevarse a cabo mediante diversos mecanismos (filtro interno, transferencia de carga o energía o descomposición de la esfera externa del AuNC) [6].

2.- Generación in-situ de nanopartículas

En los casos anteriores, es necesario utilizar un NM como reactivo y observar el cambio de sus propiedades ópticas asociado a la reacción enzimática. Una aproximación diferente consiste en que sea la propia reacción enzimática la que genere el NM a partir de los

correspondientes iones [7]. Nuestro grupo está desarrollando esta alternativa utilizando NM de Au. Un primer ejemplo, es la determinación de tiramina [8]. Esta amina biógena se puede determinar mediante un método enzimático basado en la reacción con la Tiramina Oxidasa (TAO) siguiendo el esquema de las reacciones 1 y 2 [9]. Cuando la reacción 1 se lleva a cabo en presencia de Au(III) se observa la aparición de AuNP. La figura 1 muestra la secuencia de espectros de absorción de las AuNP formada, el cambio de absorbancia observado a lo largo de la reacción (λ_{\max}) para una concentración de tiramina y las propiedades analíticas más relevantes del método desarrollado a partir de ellas. Al aumentar la concentración de tiramina la concentración de AuNP aumenta y por tanto la representación $Abs=f(t)$. Para cuantificar se pueden usar varios parámetros, como la Abs máxima (Abs_{\max}) o la Abs a un tiempo dado (Abs_t).

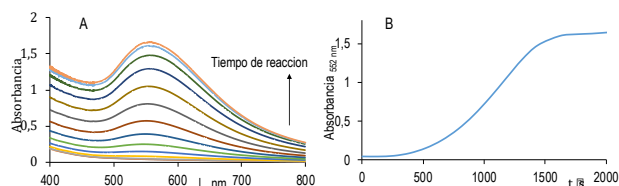


Figura 1.- Determinación de Tiramina (Tim) por formación enzimática de AuNP. Condiciones: [TAO]=51 μg/mL; pH=7 (fosfato 0,1M); [Au(III)]=1 μM; [Tim]=2,65·10⁻⁴ M; 20°C. Concentración máxima: 3,3·10⁻⁴ M. Lim. cuantif.: 9,5·10⁻⁶ M. DER: 5,6% (n=5)

Junto con la concentración de las diferentes especies que participan en la reacción, en esta metodología es especialmente importante la naturaleza de la disolución amortiguadora usada, que afecta a la forma química en la que se encuentra el Au(III) en disolución (y, por tanto, su potencial de reducción condicional); por ejemplo, el uso de Tris impide por completo la formación de AuNP, mientras que el tampón de fosfato es el más adecuado. Comparado con los métodos colorimétricos convencionales, la determinación por formación de AuNP es más lenta (aunque el tiempo total se puede reducir a unos 5 minutos trabajando a 40°C) y algo menos sensible, aunque se evitan los problemas asociados a la reacción 2. La interferencia más importante es la causada por Histamina (otra amina biógena presente en muestras de alimentos), probablemente debido a la formación de complejos Au(III)/histamina, pero se puede solucionar por adición estándar y ha permitido su aplicación en la determinación del analito en muestras de queso.

Se ha puesto un especial interés en intentar establecer el mecanismo responsable de la formación de las AuNP, con objeto de generalizar su uso a otros métodos basados en reacciones enzimáticas del mismo tipo. Hasta la fecha no se ha conseguido una elucidación completa del mismo. En el caso de la tiramina, se ha visto que el producto de la reacción, que es un aldehído, reduce el Au(III) a Au⁰, sin embargo, la formación de AuNP se produce también (y más rápidamente) cuando la concentración de analito es superior a la del O₂; este hecho es muy relevante ya que en ausencia de O₂ la

reacción 1 no se podría llevar a cabo a no ser que el Au(III) actuara también como regenerador de la enzima, lo que explicaría su reducción a Au⁰. Además, se ha observado que la presencia de la enzima es fundamental, no solo para la reacción, sino también para la estabilización de las AuNP formadas.

Un ejemplo de las posibilidades adicionales que esta metodología puede ofrecer para estas reacciones, es la determinación de putrescina (Put) y cadaverina (Cad). Ambas sustancias son también aminas biógenas, muy frecuentes en alimentos. Al ser diaminas no son sustratos de la TAO pero sí de la Diamino Oxidasa (DAO), que cataliza su oxidación por O₂. Cuando la determinación de ambas se realiza usando una reacción indicadora clásica, tanto la cinética observada para ambos sustratos como la sensibilidad de la determinación es muy similar, por lo que no es posible distinguirlas y solo se puede llevar a cabo su determinación conjunta [2]. Pero si se hace en presencia de Au(III) se observa que:

- * La velocidad de formación de AuNP es muy diferente para ambas, siendo más rápida para la Cad. En la figura 2 se ve que el punto de inflexión (t_{inf}) de la Cad aparece mucho antes que el de la Put (el t_{inf} es, en ambos casos, prácticamente independiente de la concentración de analito).

- * La absorbancia de las AuNP formadas por ambas es distinta, siendo la determinación más sensible para Cad.

- * Finalmente, cuando se tiene una mezcla de ambos compuestos el t_{inf} aparece a un tiempo que depende de la concentración de ambos, mientras que la absorbancia total es la suma de ambas.

Estos resultados permiten diferenciar claramente ambas aminas biógenas, pero además está haciendo posible su determinación diferenciada y su aplicación en muestras reales (en este caso, de pescado).

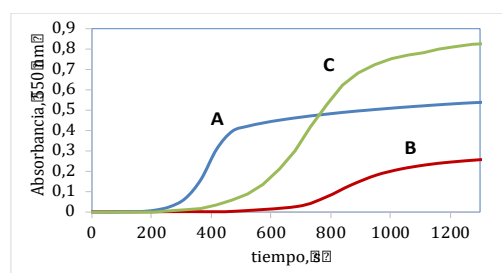


Figura 2.- Determinación de Putrescina (Put) y Cadaverina (Cad) por formación enzimática de AuNP. [DAO]=2 μg/mL; pH=7 (fosfato 0,1M); [Au(III)]=1 μM; 20°C. A) [Cad]=2·10⁻⁴M; B) [Put]=2·10⁻⁴M; C) [Cad]=2·10⁻⁴M; [Put]=2·10⁻⁴M

3.- Generación in-situ de nanoclusters

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes modelos teórico-experimentales que describen cinéticamente la formación de nanopartículas en disolución a partir de sus precursores iónicos [10]. La mayoría de ellos (basados, a su vez, en los clásicos de formación de sólidos), consideran que la formación de las AuNP supone una etapa de nucleación y otra de crecimiento regidas por sus correspondientes constantes

de velocidad (k_1 y k_2 respectivamente). Estos modelos se diferencian, entre otras cosas, en si las dos etapas se producen de forma consecutiva o simultánea (como el modelo de Finke-Watzky), o en considerar una tercera etapa de maduración (*ripening*) [11] que supone una reorganización del NM formado.

Haciendo modificaciones sobre la propuesta de Finke-Watzky [12], en el grupo se ha desarrollado un modelo que permite describir matemáticamente la variación de Abs con el tiempo en la determinación de tiramina:

$$Abs_t = \epsilon_n \frac{k_1}{k_{2n}} \left(\frac{1 - e^{-C_{Au}(k_1 + ak_{2n}C_{Tim})t}}{e^{-C_{Au}(k_1 + ak_{2n}C_{Tim})t} + \frac{k_1}{ak_{2n}C_{Tim}}} \right) \quad (3)$$

En la ecuación 3, C_{Au} y C_{Tim} son las concentraciones de Au(III) o tiramina, ϵ_n es la absorptividad de las AuNP por átomo (que para partículas esféricas hemos estimado que tiene un valor en torno $3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), k_1 es la constante de nucleación, k_{2n} es la de crecimiento (por átomo) y "a" es la estequiometría de la reacción (2/3 en este caso). La aplicación de este modelo ha permitido obtener información valiosa del proceso, como que los valores de k_1 son del orden de 10^{-1} - $10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y que disminuyen al aumentar la concentración de TAO, mientras que los valores de k_{2n} son del orden de 10^4 - $10^5 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ y que aumentan con la concentración de enzima. Además, el cumplimiento del modelo implica que durante la reacción enzimática se debería observar la formación de agregados más pequeños que irían creciendo a lo largo de la misma. Esto es importante desde el punto de vista analítico ya que antes de las AuNP se deberían formar AuNC, cuya fluorescencia podrían usarse también para la medida del sustrato.

Esto no se observó en ninguna de las determinaciones citadas hasta ahora; el principal motivo puede estar en los valores relativos de las dos constantes ($k_{2n} \gg k_1$; una vez formados los núcleos, crecen muy rápidamente). Un resultado muy interesante, en este sentido, se ha obtenido al estudiar la determinación de glucosa empleando su reacción clásica con la glucosa oxidasa (enzima de tipo oxidasa). Los resultados experimentales han mostrado que, en función del pH utilizado para llevar a cabo la reacción, el NM obtenido cambia. Si se trabaja a pH=6, se observa la aparición de AuNC fluorescentes ($\lambda_{exc}=335 \text{ nm}$, $\lambda_{flu} = 410 \text{ nm}$) que permanecen estables con el tiempo (figura 3), mientras que al trabajar a pH=8 primero se observa la formación de AuNC que con el tiempo evolucionan a la formación de AuNP.

Este comportamiento permite utilizar también la fluorescencia molecular en este tipo de metodologías.

4.- Uso de otros NM metálicos mixtos

Hay otros muchos tipos de NM metálicos susceptibles de ser generados in-situ durante las reacciones enzimáticas a partir de sus iones. En el grupo, se han realizado

pruebas usando Ag(I), Cu(II), Pd(II), Pt(II), Ir(III), Rh(II), Ru(II) y Os(II), solos o en combinación con Au(III).

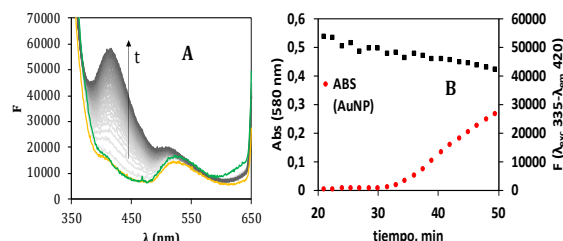


Figura 3.- Determinación de glucosa por formación enzimática de nanomateriales
 A) Fluorescencia de AuNC (pH=6) [GOx]=300 U/mL; [Au(III)]=1 mM; [Glu]=1 mM; 20°C
 B) Transición de AuNC a AuNP (condiciones similares excepto pH=8)

Algunos de estos materiales están dando resultados prometedores (particularmente Cu(II) y Ag(I)) y están siendo objeto de un estudio más detallado, pero hasta la fecha los más interesantes se han obtenido al combinar Au(III) con Pd(II) o Pt(II). En ambos casos, se ha utilizado también la reacción de la tiramina como modelo. Las conclusiones derivadas de estos estudios son:

* Se ha observado, mediante STEM, que tanto Pt(II) como Pd(II) dan lugar a la formación de NP mixtas con Au(II).

* Al combinar con Pd(II) se consigue:

- mejorar la sensibilidad respecto del Au(III) sólo (en torno a un 30%),
- aumentar la velocidad de la reacción (figura 4),
- corregir parcialmente una cierta deriva que se observa en la señal del Au(III) a tiempos largos, y que se atribuye a la maduración de las AuNP,
- mejorar el problema de la interferencia de la Histamina.

Analíticamente, no se observan cambios espectrales respecto del uso de Au(III) (figura 4), pero el rango de respuesta lineal se acorta.

* Por su parte, la combinación con Pt(II):

- mejora también la sensibilidad de la determinación, haciéndola 1 orden de magnitud más sensible que con Au(III)
- hace desaparecer por completo la deriva,
- aumenta mucho la velocidad de la reacción,
- mantiene el tamaño del rango de respuesta lineal.

Analíticamente (figura 4), se producen cambios en el espectro de absorción, que se concretan en la aparición de un 2º máximo, cuya longitud de onda exacta depende de la forma en la que se realiza la adición de los metales.

Estos resultados muestran las ventajas analíticas que se pueden conseguir al combinar NM y justifican el interés de ampliar estudios.

5.- Biosensores desechables basados en NM. Medidas de imagen.

Una de las posibilidades que ofrece este tipo de metodologías es su implementación como base de sensores ópticos enzimáticos desechables, en los que el analito se puede detectar bien de forma visual o bien

utilizando sistemas de imagen (teléfonos móviles o cámara digitales) [13]. Para el caso concreto de las aminas biógenas, su aplicación está dirigida al desarrollo de “envases inteligentes” que permitan detectar el estado de conservación del alimento.

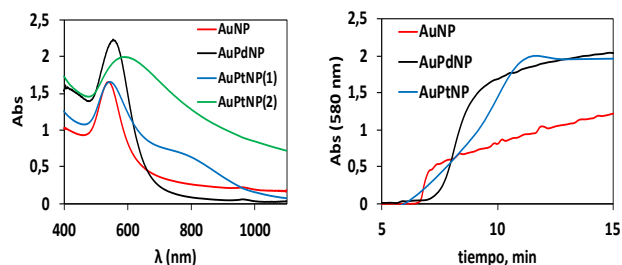


Figura 4.- Reacción enzimática de tiramina con mezclas de NM ([TAO]=0,5 μg/mL; [Tym]=2,5*10⁻⁴M; [Au(III)]=1mM; [Pt(II)]= [Pt(IV)]=2mM)

A) Espectros obtenidos B) Transición de AuNC a AuNP

Se han ensayado diferentes tipos de soportes sólidos. Por ejemplo, se ha implementado el método de determinación de tiramina en plataformas fabricadas a partir de una mezcla de celulosa, Au(III) y el estabilizante Stabilcoat®. A la lámina formada se añade la TAO y, tras dejar secar, se añade la tiramina observándose la formación de AuNP. La cuantificación de las mismas se hace utilizando un teléfono móvil y la medida de las coordenadas RGB, con la ayuda de una caja de iluminación (figura 5C) diseñada a tal efecto. En la figura 5 se observa una recta de calibrado obtenida usando la coordenada R así como la coloración observada en dichas plataformas.

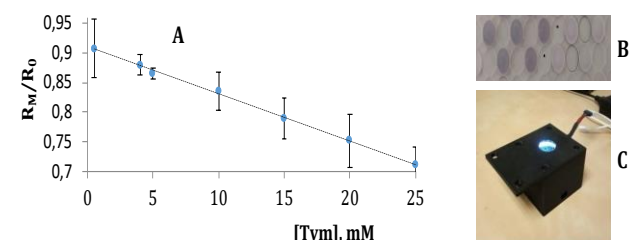


Figura 5.- Determinación de tiramina en soportes de celulosa

A) Calibración mediante coordenada cromática R/R₀ es la medida en blanco)

B) Replicas para 0,5 mM de tiramina y blancos (condiciones como en A)

C) Caja de iluminación

6.- Conclusiones y estudios futuros.

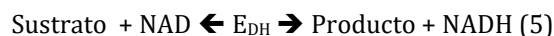
Los resultados mostrados indican que la formación de NM de Au podría servir como alternativa indicadora a reacciones enzimáticas catalizadas por oxidasas. Es necesario, por un lado, seguir ensayando con nuevas reacciones enzimáticas y, por otro, realizar estudios que permitan elucidar el mecanismo definitivo que regula su formación.

Pero también es posible combinar la generación de NM con otros tipos de reacciones enzimáticas distintas de las oxidasas, abriendo así el abanico que ofrecen. En este sentido hay dos direcciones que se están considerando:

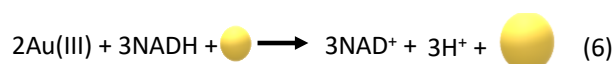
1) La idea de que los aldehídos pueden reducir el Au(III) a Au⁰, permite generalizar este tipo de metodología a

reacciones enzimáticas en las que se formen estos productos.

2) Junto con las reacciones catalizadas por oxidasas, hay otro gran grupo de métodos enzimáticos ópticos conformado por los basados en deshidrogenasas (E_{DH}) dependientes de NAD:



Willner *et al* [14] describieron que se pueden recrear AuNP, utilizadas como semillas, mediante la reacción del Au(III) con NADH:



y que se puede combinar con reacciones enzimáticas del tipo indicado en la reacción 5. Recientemente, hemos empezado a hacer estudios sobre esta alternativa. Los resultados indican que la reacción entre Au(III) y NADH forma directamente AuNP (sin necesidad de añadir semillas). Dado que los NM presentan, en conjunto, mejores propiedades de absorción que el NADH, estos resultados permitirán ampliar el campo de aplicación de esta metodología a todas aquellas determinaciones basadas en la reacción 5.

Agradecimientos

Esta línea de investigación se está desarrollando gracias a la financiación del MICIIN proyecto PID2019-105408GB-I00.

Referencias

- 1.- J. Galbán, I. Sanz-Vicente, J. Navarro, S. de Marcos. *Methods Appl. Fluoresc.* **2016**, *4*, 042005
- 2.- J. Navarro, I. Sanz-Vicente, R. Lozano, S. de Marcos, J. Galbán. *Talanta* **2020**, *208*, 120392
- 3.- W. Haiss, N.T. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215.
- 4.- S. Maity, D. Bain, A. Patra. *Nanoscale* **2019**, *11*, 22685
- 5.- T. Higaki, Q. Li, M. Zhou, S. Zhao, Y. Li, S. Li, R. Jin. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2764.
- 6.- M.K. Mahata, H. Bae, K.T. Lee. *Anal. Bional. Chem.* **2017**, *409*, 5875
- 7.- B. Diez-Buitrago, N. Briz, L.M. Liz-Marzán, V. Pavlov. *Analyst* **2018**, *143*, 657
- 8.- J. Navarro, S. de Marcos, J. Galbán. *Microchim. Acta* **2020**, *187*, 174
- 9.- S. Oliver, S. de Marcos, I. Sanz-Vicente, V. Cebolla, J. Galbán. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1164*, 338.
- 10.- H. You, J. Fang. *Nano Today* **2016**, *11*, 145.
- 11.- M.A. Watzky, R.G. Finge. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10382
- 12.- A.L. Brazeau, N.D. Jones. *J. Phys.Chem. C* **2009**, *113*, 20246.
- 13.- I. Sanz-Vicente, A. López-Molinero, S. de Marcos, J. Navarro, P. Cebrián, Ch. Arruego, V. Visiedo, J. Galbán. *Anal. Bional. Chem.* **2020**, *412*, 4261.
- 14.- Y. Xiao, V. Pavlov, S. Levien, T. Niazov, G. Markovitch, I. Willner. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4619.