

Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de un método de screening (criba) para la detección rápida de aminas biógenas en alimentos mediante la generación de nanopartículas.

Autor

Carlos Felices Manero

Director

Javier Galbán Bernal

Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica.
Curso 2020/2021

Este trabajo ha sido realizado con cargo del proyecto PID 2019/105408GB—I00 y del Grupo de Investigación de la DGA E25_20R.

Resumen.

Con este trabajo se pretendió mejorar las prestaciones analíticas que ofrecía la reacción enzimática para la determinación de tiramina por medio de formación de nanopartículas de oro (AuNP). Para ello, se introdujo Pd (II) en la reacción, induciendo así la mejora de los resultados analíticos del método.

Se llevó a cabo el estudio de optimización de las condiciones de reacción, es decir, las concentraciones óptimas de cada uno de los reactivos que participaban (Pd (II), Au (III), TAO, disolución amortiguadora de fosfatos), así como a qué pH debía transcurrir la reacción enzimática. Obteniéndose como parámetros óptimos, [Au (III)]= $5,0 \times 10^{-4}$ M; [Pd (II)]= $1,5 \times 10^{-3}$ M; [TAO]= 0,125 U/mL; disolución amortiguadora de pH 7 y 0,3 M en fosfatos.

Se realizó un estudio de calibración con el fin de determinar la Tir (tiramina) presente en disolución. Obteniéndose un rango lineal de $5,0 \times 10^{-5}$ M hasta $2,5 \times 10^{-4}$ M.

Se estudió el efecto de la His (histamina) como amina biógena interferente en la determinación de Tir. Se elaboraron una serie de procedimientos para eliminar esta amina y así poder evitar la interferencia aditiva en la señal que suponía a la determinación de Tir con nuestro método.

Se comprobó la presencia de paladio en las nanopartículas de oro vistas anteriormente, gracias a técnicas como Microscopía Electrónica de Transmisión-Barrido (STEM) con detector de Rayos-X EDX o Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS).

Por último, se realizaron una serie de estudios con el fin de conocer la función del Pd (II) dentro de la reacción. Dichos estudios nos permitieron comprobar el aumento de la señal y mejora de esta producidos por la presencia de Pd (II). Además, gracias a ellos pudimos ver el papel fundamental que tiene la enzima TAO en la formación y estabilización de las nanopartículas.

Abstract.

This project aimed to improve the analytical performance offered by the enzymatic reaction for the determination of tyramine by means of gold nanoparticles (AuNP) formation. To achieve this, Pd (II) was introduced into the reaction, inducing the improvement of the method's analytical results.

The optimization study of the reaction conditions was carried out. Optimal concentrations of each of the reagents (Pd (II), Au (III), TAO, phosphate buffer) were studied, as well as, what pH the enzymatic reaction should take place. Obtaining as optimal parameters [Au (III)]= $5,0 \times 10^{-4}$ M; [Pd (II)]= $1,5 \times 10^{-3}$ M; [TAO]= 0,125 U/mL; pH7 and 0,3 M phosphate buffer solution.

A calibration study was carried out in order to determine the Tyr present in solution. Obtaining a linear range of $5,0 \times 10^{-5}$ M- $2,5 \times 10^{-4}$ M.

The effect of His as an interfering biogenic amine in the determination of Tir was studied. Several series of procedures were elaborated to eliminate this amine with de purpose of being able to avoid the additive interference in the signal for the determination of Tir with our method.

The presence of palladium in the gold nanoparticles seen previously was verified, thanks to techniques such as Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) with an Ray- X EDX detector or X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

Finally, several studies were carried out in order to know the role of Pd (II) within the reaction. These studies allowed us to verify the increase in the signal and its improvement produced by the presence of Pd (II). Thanks to them, we also were able to see the fundamental role that the TAO enzyme has in the formation and stabilization of nanoparticles.

Índice.

1.	Introducción.....	1
1.1.	Utilización de nanomateriales en determinaciones analíticas.....	1
1.1.1.	Propiedades ópticas de los NM.....	1
1.1.2.	Nanopartículas de oro en biosensores.....	2
1.2.	Aminas biógenas.....	2
1.2.1.	Determinación de aminas biógenas.....	3
1.2.2.	Formación de NP de oro. Reacción de Au (III) ⁹ con tiramina, adición de Pd (II).....	3
2.	Objetivos y planteamiento.....	4
3.	Parte experimental.....	5
3.1.	Reactivos y disoluciones.....	5
3.2.	Instrumentación y material.....	5
3.2.1.	Instrumentos.....	5
3.2.2.	Material y aparatos.....	6
3.3.	Procedimiento experimental.....	6
3.3.1.	Preparación disolución de Pd (II) 50 mM.....	6
3.3.2.	Reacción enzimática para la determinación de tiramina por formación de NP de oro y paladio.....	6
3.3.3.	Preparación de las muestras para TEM y XPS.....	7
4.	Resultados y discusión.....	7
4.1.	Optimización.....	7
4.1.1.	Estudio de la reacción enzimática de determinación de Tir con Pd(II) como único metal.....	7
4.1.2.	Estudio concentración de Au (III).....	8
4.1.3.	Estudio concentración de Pd (II).....	8
4.1.4.	Estudio concentración de TAO.....	9
4.1.5.	Estudio de disoluciones amortiguadoras.....	10
4.1.5.1.	pH óptimo de la disolución amortiguadora.....	10
4.1.5.2.	Concentración de fosfatos en la disolución amortiguadora.....	10
4.2.	Aspectos analíticos.....	11
4.2.1.	Recta de calibrado de Tiramina.....	11
4.2.1.1.	Espectros.....	12
4.2.1.2.	Representación de la señal en función del tiempo.....	12
4.2.1.3.	Test F.....	13
4.2.2.	Estudio de precisión de un punto de la recta de calibrado.....	14

4.3. Estudio de la interferencia de Histamina	15
4.3.1. Estudio del efecto interferente.	15
4.3.2. Estudio del origen de la interferencia y su eliminación.	16
4.3.2.1 Estudio precipitado His-Pd.	16
4.3.2.2. Método para la separación y eliminación de Histamina.	17
4.3.3. Estudio de formación de precipitado en presencia de TAO.	18
4.4. Mecanismo de la reacción: función del Pd (II).	18
4.4.1. Presencia de paladio en las nanopartículas.	19
4.4.1.2. Resultados del XPS.	19
4.4.1.1. Resultados del TEM.	20
4.4.2. Información sobre el mecanismo de formación de la NP.	20
4.4.2.1. Producto de la reacción: estabilización con la enzima.	21
4.4.2.2. Necesidad de la TAO.	21
4.4.2.3. Efecto del resto de los componentes: Estudio de cómo afecta el H ₂ O ₂ en la reacción.	22
4.4.2.4. Introducción de Pd (II) a la reacción de formación de NPs de Au.	23
5. Conclusiones.	24
6. Bibliografía.	25

1. Introducción.

1.1. Utilización de nanomateriales en determinaciones analíticas.

Muchos de los ámbitos de investigación en cuanto a la Química Analítica se refiere, se han visto envueltos en el desarrollo de nuevos métodos y campos de estudio, debido a la aparición de los nanomateriales (NM). En concreto, uno de los puntos que más posibilidades permite en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas van a ser las propiedades ópticas de estos.

Estos materiales, debido a tener unas dimensiones comprendidas entre 1 y 100 nm van a necesitar de técnicas de caracterización estructural avanzadas como pueden ser: microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de barrido (SEM), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) u otras técnicas más sencillas como la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) o la espectroscopía Uv-Vis¹.

La principal ventaja de este tipo de materiales es su reducido tamaño, dando lugar a una elevada relación superficie-volumen. El control de su tamaño, forma, superficie y naturaleza ha dado lugar al desarrollo de técnicas novedosas para diversidad de campos como la industria o la medicina, pero desde luego y como ya ha sido mencionado, una de las áreas donde el desarrollo de estos materiales ha supuesto un gran punto de inflexión ha sido en la Química Analítica.

1.1.1. Propiedades ópticas de los NM.

En concreto, uno de los puntos que más posibilidades permite en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas van a ser las propiedades ópticas de estos. Dichas metodologías en desarrollo pueden ser:

1. Metales nobles (Au o Pt) o semi-nobles (Ag o Cu) tanto para la generación de nanopartículas (NP) como nanocluster (NC).
2. Los "puntos cuánticos" (Quantum dots, QD).
3. Las nanopartículas con propiedades up-conversión. (UCNP).

Dichos materiales competirán con cromóforos o fluoróforos orgánicos en el progreso tanto de métodos en disolución, como en el caso de sensores ópticos o en fluorescencia de imagen. Si se compara unos con otros, se puede ver que los NM van a presentar como ventajas, desplazamientos Stokes más largos, mayor absorptividad molar y mayor estabilidad frente a la luz, aunque del mismo modo que hay ventajas, existen una serie de desventajas frente a los cromóforos y fluoróforos como pueden ser, su mayor tamaño y su menor rendimiento cuántico².

Como sucedía con cromóforos y fluoróforos, los NM siguen sin ser muy selectivos. Hay dos razones principales que explican este hecho:

1. Su propia configuración estructural y los procedimientos de síntesis utilizados para estos. Los NM no dejan huecos estructurales con capacidad receptora específica.
2. Los mecanismos intrínsecos por los que los analitos producen variaciones ópticas en los NM son poco selectivos.

Cabe destacar en este campo el uso de las nanoestructuras de metales que presentan el denominado plasmón superficial: nanopartículas, nanorods, nanobipiramides...

El plasmón superficial depende de la forma, tamaño y naturaleza de la NP (Au, Ag y Pt, son los más usados), así como del medio; por lo que modificando algunos de estos parámetros se puede ajustar la propia nanoestructura a las necesidades del método. En el caso de la absorción molecular, lo más habitual es que el analito actúe como aglutinante entre dos o más NP, haciendo así que aumente el tamaño de las NP y se desplace la banda del plasmón³.

Por otro lado, también se debe destacar que en el caso de los quantum-dots y nanoclusters sus propiedades ópticas están relacionadas con la fluorescencia de los mismos.

El uso de este tipo de nanoestructuras con las propiedades ópticas mencionadas, en combinación con biomoléculas como enzimas, ADN o anticuerpos, ha permitido mejorar cuantitativamente el desarrollo de los biosensores analíticos^{4,5}.

1.1.2. Nanopartículas de oro en biosensores.

La resonancia del plasmón de superficie de las nanopartículas de oro se encuentra en la parte del espectro visible, en concreto en torno a unos 540 nm. Como ya se había mencionado, la posición dentro del espectro de la banda del plasmón de superficie está determinada por una combinación de características de la nanopartícula, como la composición, el tamaño y la forma. También depende de la agregación de las nanopartículas, cuando las nanopartículas se encuentran en un estado agregado, absorben como una única nanopartícula grande lo que va a producir que la banda del plasmón se verá desplazada unos nm a longitudes de onda mayores.

La utilización de biosensores con las nanopartículas de oro, típicamente utiliza las propiedades ópticas de las mismas. La resonancia del plasmón de superficie es una propiedad que puede ser utilizada en sí misma como sensor. Esto es debido a que cualquier cambio en las nanopartículas, como la modificación de la superficie, agregación, el índice de refracción del medio, entre otras, causa el cambio colorimétrico, al desplazarse la banda del plasmón en el espectro. En el caso de la agregación, las nanopartículas absorben a longitudes de onda mayores, lo mismo ocurre con nanopartículas de oro de mayor tamaño.

Las nanopartículas de oro, así como otras nanopartículas metálicas, tienen diversas aplicaciones. En cuanto a la aplicación en métodos analíticos y creación de biosensores, las nanopartículas de oro serán útiles para la determinación de una amplia variedad de analitos, en los cuales podemos incluir ácidos nucleicos, proteínas, sacáridos, moléculas pequeñas, iones metálicos y células enteras⁴.

En cuanto a la utilización de AuNP con fines biomédicos, el tamaño, forma y concentración, de estas son factores cruciales. Sobre todo, son determinantes el tamaño y la concentración de las NP para su posterior consumo por células vivas, su circulación y su biodistribución a través de organismos⁶.

1.2. Aminas biógenas.

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular formados principalmente por la descarboxilación de aminoácidos o por la aminación y transaminación de

aldehídos y cetonas. Desempeñan un papel fundamental en el correcto funcionamiento de muchas de las funciones psicológicas del individuo⁷.

Pueden clasificarse según su procedencia en aminas biógenas endógenas, las que va a sintetizar el propio organismo o exógenas, aquellas que se ingieren por la dieta.

Las aminas biógenas que se encuentran mayoritariamente en alimentos son.

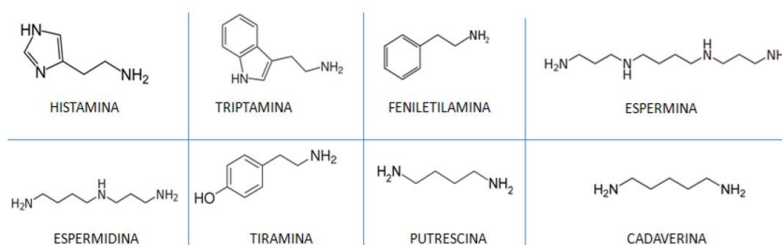


Figura 1: Estructura química de las aminas biógenas mayoritarias presentes en alimentos.

Estos compuestos, como ya se ha mencionado, cumplen una función biológica importante, sin embargo, su ingesta en grandes cantidades puede producir episodios de toxicidad, debido a que el organismo del individuo que los consume no es capaz de metabolizarlos. Podemos encontrar altas concentraciones de estos compuestos en alimentos como queso, vino o pescados⁸. Siendo la histamina y la tiramina las aminas biógenas que causan el mayor número de intoxicaciones alimentarias.

1.2.1. Determinación de aminas biógenas.

Existen una gran cantidad de métodos para la determinación de aminas biógenas, aunque los más utilizados para su separación y cuantificación se basan en cromatografías, generalmente en HPLC de fase reversa. Aunque últimamente están surgiendo algunas alternativas que son más rápidas y económicas. Enzimas como la TAO han hecho posible el desarrollo de biosensores, los cuales se basan en la reacción de oxidación del H_2O_2 obtenido de la reacción de oxidación de la amina biógena a un aldehído en presencia de agua y oxígeno⁷.

1.2.2. Formación de NP de oro. Reacción de Au (III) con tiramina, adición de Pd (II).

Se ha podido demostrar la formación de AuNP, utilizando aminas como reductores, en este caso una amina biógena como es la tiramina⁹.

La tiramina reaccionará con el Au (III) reduciendo este a Au^0 . Dicha especie puede dar lugar a tres sólidos distintos dependiendo del entorno en el que se encuentre el Au (III) en el momento que se produzca la reducción, estos sólidos serán Au^0 en forma de un precipitado negro, nanoclusters fluorescentes o en forma de nanopartículas AuNPs.

El grupo de investigación ha desarrollado una metodología por la cual, en presencia de la enzima tiramina oxidasa (TAO), la tiramina reduce el Au (III) dando lugar a AuNP¹⁰. El objetivo de este trabajo será la introducción de Pd (II) en esta reacción con el fin de mejorar las prestaciones analíticas.

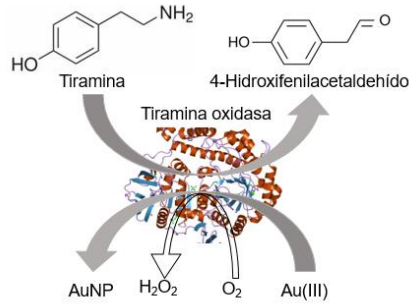


Figura 2: Reacción de formación de nanopartículas de oro, a partir de Au (III) y tiramina

Esta reacción va a dar como resultado que las AuNP otorguen una coloración morada a la disolución y puedan ser determinadas por espectroscopía UV-vis, por lo que puedan ser empleadas como nanosensores para la determinación de tiramina.

2. Objetivos y planteamiento.

Este trabajo se basa en estudios previos, en concreto de la reacción enzimática de determinación de tiramina por formación de NP de oro. Partiendo de que el mecanismo de formación de AuNP durante la reacción mencionada va, aparentemente, ligado a las propiedades redox del Au (III), otros metales con propiedades similares (en concreto, metales nobles o seminobles) deberían poder también reducirse al estado elemental durante la reacción enzimática y utilizarse como base de métodos analíticos alternativos. Además, el efecto plasmón puede darse teóricamente, en todos los metales. También, el uso de otros metales alternativos al Au, pueden suponer ventajas desde el punto de vista analítico. Por ejemplo, en la selectividad.

Por todo esto, el trabajo tiene como principal objetivo, evaluar la posibilidad de mejorar las prestaciones analíticas de la reacción de determinación enzimática, anteriormente indicada, gracias a la introducción de otros metales en la reacción. Para ello y en concreto, se va a introducir Pd (II), metal con propiedades similares a las del Au (III) al ser noble y presentar el efecto plasmón¹¹. Dicho metal, se ha visto que si será capaz de mejorar las prestaciones del método. En el trabajo se hará un estudio exhaustivo de las condiciones necesarias para llevar a cabo la determinación de esta manera. En este contexto, se tratará de estudiar y conocer cuáles son las interferencias provocadas por otras aminas biógenas como la histamina a nuestra reacción en presencia de Pd (II) y si fuera posible, eliminar o minimizar dichas interferencias. Los resultados obtenidos a lo largo del trabajo se compararán con los obtenidos al usar solo oro.

Finalmente, se tratará de entender por qué el Pd (II) mejora la reacción, es decir, se realizarán una serie de estudios con el fin de explicar cuál va a ser el papel del Pd (II).

El trabajo estará estructurado de la siguiente manera, atendiendo al carácter de los distintos objetivos.

- Objetivos de tipo formativo:
 1. Consultar artículos y material bibliográfico sobre la situación del tema hasta el momento.

2. Comprender el funcionamiento y aprender el correcto manejo tanto de un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis.
 3. Aprender a resolver un problema en el ámbito de la Química Analítica siguiendo las pautas del método científico
- Objetivos de carácter científico:
 1. Llevar a cabo una serie de estudios de optimización de las condiciones de reacción.
 2. Realizar un estudio de calibración para la reacción de tiramina con Au (III) y Pd(II) para diferentes concentraciones de amina biógena.
 3. Llevar a cabo una serie de estudios para determinar las interferencias producidas por la histamina y como evitarlas.
 4. Realizar una serie de estudios con el fin de conocer el papel del Pd (II) en la reacción de determinación de tiramina.

3. Parte experimental.

3.1. Reactivos y disoluciones.

- Disoluciones amortiguadoras $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de pH 6, 7 y 8 de concentración aproximada 0,1 y 0,3M. Preparadas disolviendo aproximadamente 4,26 g (0,1M) y 12,78 g (0,3M) de Na_2HPO_4 (Panreac 131679.1211) en aproximadamente 300 mL de agua miliQ. Se ajustó hasta el pH buscado añadiendo progresivamente y con cuidado HCl 2M.
- Disolución de tiramina oxidasa (TAO) de concentración 50 U/mL (Sekisui Diagnosis, 4.6 U/mL) Disolviendo la TAO aproximadamente 11 mg en 1 mL de disolución amortiguadora pH 7 0,3M en fosfatos.
- Disolución Au (III) 50mM. Disolviendo ácido cloroáurico hidratado (Sigma 254,169) en agua miliQ.
- Disolución de Pd (II) 50mM. Disolviendo 16,8 mg de acetado de Pd (II) (Sigma CAS 3375-31-3) en 1,5 mL HCl 2M.
- Disolución de Tiramina (Tyramine hydrochloride) (Sigma-Aldrich 53300) 98% pureza. Para todas las disoluciones de tiramina se va a pesar una masa exacta dependiendo de la concentración deseada y se va a disolver en 1 mL tampon pH 7 0,3M en fosfatos.
- Disolución de Histamina (Histamine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich 53300) 99% pureza. Para todas las disoluciones de histamina se va a pesar una masa exacta dependiendo de la concentración deseada y se va a disolver en 1 mL tampon pH 7 0,3M en fosfatos.

3.2. Instrumentación y material

3.2.1. Instrumentos.

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Agilent 8453 (Haz simple), con lámparas de wolframio y deuterio, red de fotodiodos y un rango de medida comprendido entre 190 y 1100nm.

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Specord 210 Plus (Analytik Jena), con lámparas de wolframio y deuterio y un rango de medida comprendido entre 185 y 1200nm.
- pH-metro CRISON, Basic 20
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión ± 0.01 mg.
- Centrifuga eppendorf 5427 R (con control de temperatura)
- Baño de ultrasonidos P Selecta, Precistern.

3.2.2. Material y aparatos.

- Micropipetas Socorex.
- Centrifugal filters Amicon Ultra- 4 mL (UltraCell – 10K Membrane), Millipore (UFC801024).
- Centrifugal filters Amicon Ultra - 0.5 mL (UltraCell – 10K Membrane), Millipore (UFC801024).
- Material desechable: cubetas plástico, puntas micropipetas, Eppendorf, tubo Falcon.
- Cubetas de vidrio y cuarzo, con 1 cm de paso óptico.
- Agitador magnético A-01, SB5.
- Tiras reactivas para la determinación semicuantitativa de peróxido de hidrogeno. (Quantofix 91319).
- Filtro óptico Kodak amarillo que corta por debajo de 390 nm.

3.3. Procedimiento experimental.

3.3.1. Preparación disolución de Pd (II) 50 mM.

Se toman 16,8 mg de acetato de Pd (II) y se disuelven en 1,5 mL de HCl 2 M. Para ayudar a su disolución se introdujo en un baño de ultrasonidos. La disolución de la sal de Pd debe ser en medio ácido (HCl 2M), no hay que neutralizar dicha disolución para que el Pd se encuentre formando complejos en la forma Pd (II), la cual es necesaria para nuestra reacción enzimática.

3.3.2. Reacción enzimática para la determinación de tiramina por formación de NP de oro y paladio.

Se llevaron a cabo las medidas de absorbancia en un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis. Se utilizaron indistintamente cubetas de plástico, vidrio o cuarzo, de 1 cm de paso óptico y cuyo volumen total van a ser 2 mL. Se utilizó un filtro óptico que absorbía la luz de longitud de onda hasta 390 nm.

Previamente a la medición se realizó un blanco con la disolución amortiguadora de pH 7,0, 3M en fosfatos.

Posteriormente, se añadió la disolución de TAO en concentración 0,125 U/mL y se inició la medida siguiendo el registro cinético a 570 nm (longitud de onda del máximo). A los 30 segundos, se añadió la amina biógena correspondiente, normalmente tiramina en una concentración comprendida entre $5,0 \times 10^{-5} \text{M}$ y $2,5 \times 10^{-4} \text{M}$. Tras la adición de la amina, se esperaron 5 minutos con el fin de que la reacción evolucionase, se produjera la oxidación de la amina y se consumiera el O_2 presente en disolución. Una vez hubo transcurrido dicho tiempo,

se añadieron Pd (II) y Au (III) al mismo tiempo, en concentraciones $1,5 \times 10^{-3} \text{M}$ y $5,0 \times 10^{-4} \text{M}$ respectivamente.

Transcurrido un tiempo de entre 1 y 7 minutos (dependiendo de la concentración de tiramina en disolución) desde la adición de los metales, comenzó a formarse el pico que indicaba la aparición de las NP.

Por último, se dejó avanzar la reacción enzimática, hasta que esta se hubo estabilizado.

3.3.3. Preparación de las muestras para TEM y XPS.

Se sintetizaron las NP de Au/Pd por medio de la reacción enzimática de determinación de tiramina. Una vez sintetizadas, se filtraron por medio de ultracentrifugación y se lavaron con agua destilada con la intención de eliminar las sales de fosfato presentes en la disolución. Se tomaron 10 μL la disolución de NP. Para el TEM, se depositaron sobre unas rejillas porta muestras (Grids), sin embargo, en el caso de la preparación de la muestra para el XPS, se depositó sobre una oblea de silicio. Se dejaron secar ambas muestras. Finalmente se llevaron las muestras preparadas al TEM y XPS para su análisis.

4. Resultados y discusión.

4.1. Optimización.

Se van a realizar varios estudios con el fin de obtener las condiciones óptimas para la reacción estudiada de formación de NPs de Au/Pd. Para ello, se seguirán una serie de criterios para determinar cuál será la mayor calidad de pico posible, estos serán.

- Forma del espectro: mayor calidad de pico, cuanto más definido y estrecho sea este, sin subida de línea base, ni aumento de la anchura de este con el tiempo. Es posible que exista una relación entre el ensanchamiento del pico y la aparición de NP de diferente forma. El uso de medidas NIR podría ayudar a corroborar o desmentir este hecho, pero este tipo de medidas no se han podido realizar. Sería necesario estudiar más en detalle estos espectros.
- Tiempo: mayor calidad de pico, cuanto mayor sea la velocidad de la reacción, es decir, cuanto antes llegue esta a alcanzar la estabilidad.
- Deriva de señal: bastante ligado con el criterio anterior, mayor calidad de pico cuanto menor sea la deriva, es decir, una vez alcanzada la estabilidad, cuanto menor sea el aumento de la señal y esta se mantenga más estable.
- Abs_{max} : mayor calidad de pico, cuanto mayor sea la señal en el máximo medido.

Basándonos en el sumatorio de todos estos criterios, y en algunos menores que se irán mencionando se determinarán los parámetros óptimos de la reacción estudiada.

4.1.1. Estudio de la reacción enzimática de determinación de Tir con Pd(II) como único metal.

Se realizó un primer estudio en el cual se trató de llevar a cabo la reacción enzimática, únicamente en presencia de Pd (II) como metal, es decir, sin presencia de Au (III) como se hacía

anteriormente. Se obtuvo lo siguiente. Se produjo una reducción del metal al aumentar algo la señal, aunque no se llegó a formar el pico indicativo de la presencia de NP. Es por esto, que se confirmó que el Pd por si solo no iba a ser capaz de formar NP y para que estas se formasen iba a ser necesaria la presencia de Au (III). A partir de aquí, se trató de buscar cuáles serían las mejores condiciones para que se diese la reacción enzimática con la presencia de los dos metales, Au (III) y Pd (II). Anexo 1.

4.1.2. Estudio concentración de Au (III).

Se realizó un estudio para determinar la concentración óptima de Au (III) para llevar a cabo la reacción. Se pudo observar una tendencia clara en los espectros, que era el aumento de la línea base de estos a medida que aumentaban las concentraciones de Au (III), manteniendo una concentración fija de 1.5 mM de Pd (II). Produciendo así una disminución en la calidad del pico al ensancharse mucho este. Pese a que el valor de la Abs_{max} fue mayor para los puntos de mayor concentración, se adoptó como criterio de optimización más importante, la estrechez del pico por lo comentado anteriormente. Se utilizaron concentraciones de Au (III) de $2,5 \times 10^{-4}$ M; 5×10^{-4} M; 1×10^{-3} M y $1,5 \times 10^{-3}$ M.

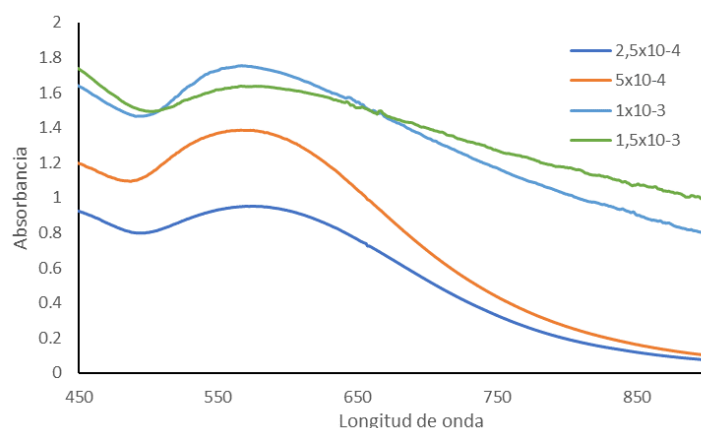


Figura 3: Espectros pertenecientes al estudio de la concentración óptima de Au (III) para la reacción enzimática.

Finalmente, y siguiendo los criterios comentados anteriormente, se determinó como concentración óptima para llevar a cabo la reacción la de **$5,0 \times 10^{-4}$ M**.

4.1.3. Estudio concentración de Pd (II).

Mismo estudio que en el caso anterior, frente a una concentración fija de Au (III) de $5,0 \times 10^{-4}$ M obtenida anteriormente, se fue variando la concentración de Pd (II) con el objetivo de determinar la concentración óptima de este metal para la reacción. Las concentraciones de Pd (II) fueron de $0,5 \times 10^{-3}$ M; $1,0 \times 10^{-3}$ M; $1,5 \times 10^{-3}$ M y $2,0 \times 10^{-3}$ M. En este caso se observó que el aumento de la señal se producía con el aumento de la concentración de Pd (II) en disolución. Pero en el último punto estudiado, es decir, en el de concentración $2,0 \times 10^{-3}$ M se produjo un ensanchamiento de pico, así como una disminución en la velocidad de la formación de este. Por lo que, pese a que el punto de concentración $2,0 \times 10^{-3}$ M tuvo un mayor valor de Abs_{max} que el de $1,5 \times 10^{-3}$ M; se decidió que el pico con mayor calidad tanto por su velocidad, como por su

estrechez iba a ser el tercero. En definitiva, se concluyó que la concentración de Pd (II) óptima iba a ser la de $1,5 \times 10^{-3}$ M.

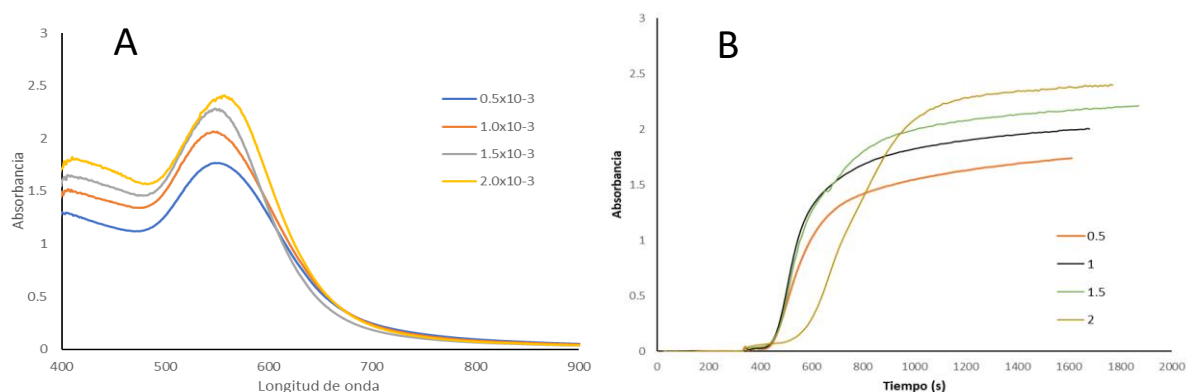


Figura 4: A) Espectros pertenecientes al estudio de la concentración óptima de Pd (II) para la reacción enzimática. B) Registro de Abs-t pertenecientes al estudio de la concentración óptima de Pd (II).

4.1.4. Estudio concentración de TAO.

El estudio consistió en ver el comportamiento del pico de formación de las NPs al variar la concentración de enzima TAO. En los espectros, como norma general, pudimos observar que, según aumentaba la concentración de TAO el pico se iba ensanchando, y además, este también se desplazaba hacia longitudes de onda mayores. En cuanto a la optimización en el valor de la concentración, se pudo observar que tanto para la mayor concentración de enzima (0,5 U/mL) como para la menor concentración de esta (0,0625 U/mL) la calidad de los picos era claramente inferior a los dos valores intermedios. Este hecho se correspondió con una deformación en los picos. Estos se ensancharon, se obtuvo un valor menor de señal en su máximo (Abs_{max}) y por último apareció deriva en los registros de LO-t.

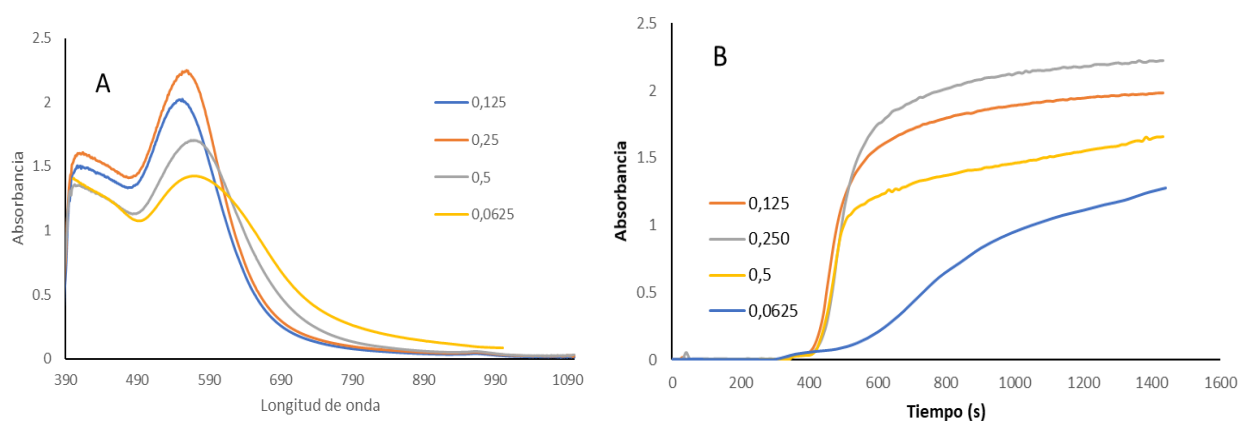


Figura 5: A) Espectros pertenecientes al estudio de la concentración óptima de TAO para la reacción enzimática. B) Registro de Abs-t pertenecientes al estudio de la concentración óptima de TAO.

Por el contrario, para los dos valores intermedios de concentración de enzima, es decir, 0,125 U/mL y 0,250 U/mL se pudo ver un comportamiento muy similar en cuanto a calidad del pico se refiere, tanto en la velocidad de formación, deriva o aspecto del pico. Con la pequeña diferencia

de que para el de concentración mayor, se dio un pequeño aumento en el valor de la señal con el tiempo. Pero al tratarse de un cambio muy pequeño y teniendo en cuenta que la concentración de enzima para este caso era el doble, se eligió la concentración de **0,125 U/mL** como óptima.

4.1.5. Estudio de disoluciones amortiguadoras.

Se separó este estudio en dos partes diferenciadas. La primera de ellas relativa al pH de la disolución amortiguadora en el cual la reacción transcurrirá de forma óptima y la segunda parte, a cuál sería la concentración de fosfatos óptima de la disolución amortiguadora para que se produjese la reacción.

4.1.5.1. pH óptimo de la disolución amortiguadora.

Se realizó un estudio para comprobar en que pH se produciría la reacción con una mayor calidad de pico. Es decir, con mayor señal de Abs en el máximo, con menor deriva y con un tiempo de reacción menor. Se probó con tres disoluciones amortiguadoras distintas de fosfatos de pH 6, 7 y 8.

En el estudio se observó como la disolución amortiguadora de pH 6 no fue capaz de tamponar la reacción de formación de NPs y no se formó ningún tipo de pico.

Por otro lado, tanto la disolución amortiguadora de pH 7 como la de pH 8, fueron capaces de tamponar la reacción y formar el pico que indicativo de la formación de las NP. En cuanto a qué pH se eligió como óptimo, nos basamos en la calidad de los picos. Se pudo observar que para la reacción amortiguada en pH 7 el valor de Abs en el máximo iba a ser mayor, obteniendo una mayor señal y además un pico más estrecho. Por esto, se eligió el pH 7 como óptimo para llevar a cabo nuestra reacción.

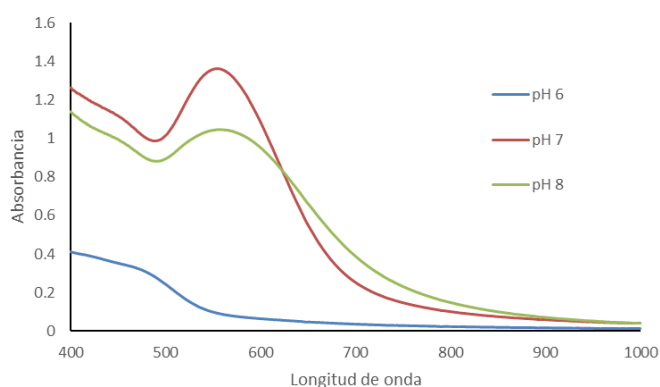


Figura 6: Espectros pertenecientes al estudio del pH óptimo de la disolución amortiguadora de fosfatos.

4.1.5.2. Concentración de fosfatos en la disolución amortiguadora.

En un primer momento, se intentó trabajar con disolución amortiguadora 0,1 M como se hacía en la reacción conocida con Au (III) como único metal. Pero se vio, que no se obtenía señal en el

pico que indica la formación de NP. Este hecho, se debía a que dicha concentración de disolución amortiguadora no era capaz de tamponar la disolución de Pd (II). Ya que el metal se encontraba disuelto en medio ácido y la reacción de formación de NP requería de un medio neutro para darse. Debido a esto, se probó a aumentar la concentración de fosfatos hasta 0,3 M y se observó que ahora sí, esta disolución amortiguadora 0,3 M y pH 7 iba a permitir que la reacción transcurriese de manera óptima.

Por último, se trató de aumentar la concentración de fosfatos con la intención de ver si la reacción estaba aún más favorecida. Pese a que la señal aumentaba, en cuanto al valor de la Abs max se refiere. La calidad del pico era peor, este se ensanchaba notablemente, la velocidad de formación era claramente menor y además la estabilización parecía ser mejor para la disolución amortiguadora 0,3 M en fosfatos.

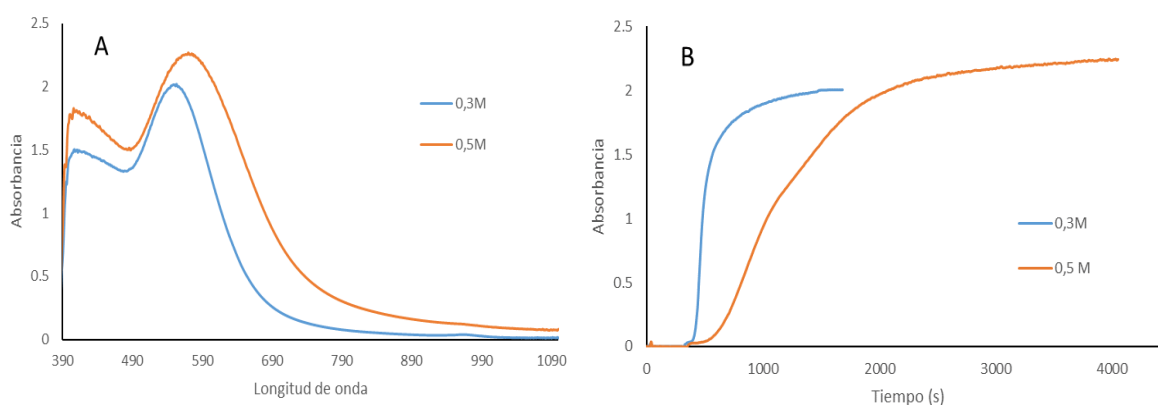


Figura 7: A) Espectros pertenecientes al estudio de la concentración óptima de la disolución amortiguadora pH 7. B) Registros Abs-t pertenecientes al estudio de la concentración óptima de disolución amortiguadora de pH 7.

Como aspecto global a todo el estudio, cabría destacar el papel del fosfato. Ya que, en estudios previos, con la reacción enzimática utilizando Au (III) como único metal, el fosfato tuvo un papel determinante en la formación de AuNP, es decir, era necesaria la presencia de este para que se produjera la formación de las NP. En este caso, no se probó con otras disoluciones amortiguadoras que no contuviesen fosfatos, directamente se trató de conocer las condiciones óptimas de este para que la reacción se llevase a cabo de la mejor manera posible.

4.2. Aspectos analíticos.

4.2.1. Recta de calibrado de Tiramina.

Una vez se optimizaron todos los parámetros y condiciones para que la reacción se produjese con la mayor calidad posible, se llevó a cabo la calibración. Como se ha ido viendo, las condiciones obtenidas tras la optimización fueron: [Au (III)]= $5,0 \times 10^{-4}$ M; [Pd (II)]= $1,5 \times 10^{-3}$ M; [TAO]= 0,125 U/mL; disolución amortiguadora de pH 7 y 0,3 M en fosfatos. A partir de estas se realizó el estudio de calibración para diferentes concentraciones de tiramina. Se obtuvieron los siguientes resultados.

4.2.1.1. Espectros.

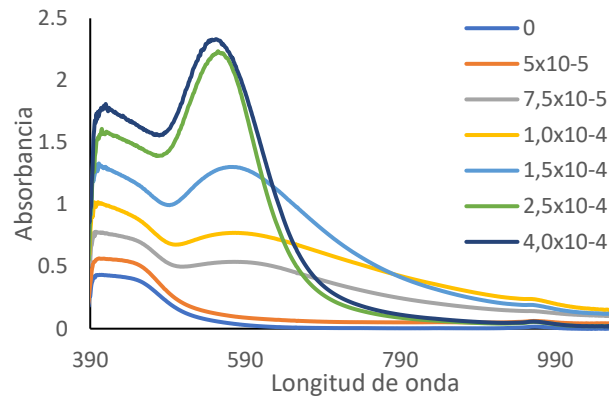


Figura 8: Espectros pertenecientes a la calibración de la reacción enzimática para la determinación de tiramina por formación de NP de oro y paladio.

Se pudo ver que, para concentraciones bajas en tiramina no se formó el pico indicativo de la presencia de las NP. Además, se observó que a medida que aumentaba la concentración de tiramina en disolución, no solo aumentaba la señal como cabría esperar, sino que la calidad de los picos mejoraba en cuanto a lo que definición y estrechez del pico se refería. Posteriormente, en los registros con el tiempo se vieron otros indicadores de mejora de pico que se dieron.

Por otro lado, no se observó un desplazamiento evidente de los picos a mayores longitudes de onda con el aumento de la concentración.

4.2.1.2. Representación de la señal en función del tiempo.

Registro que compara la señal de Abs de las diferentes concentraciones de tiramina frente al tiempo y que corresponde con los espectros ya vistos. Como se mencionaba anteriormente, la calidad de los picos fue mayor conforme se aumentó la concentración de tiramina. Puesto que, para los puntos de mayor concentración de tiramina en la recta de calibrado, la velocidad de reacción fue mayor, la estabilización fue mejor y más rápida y la deriva en las medidas fue disminuyendo.

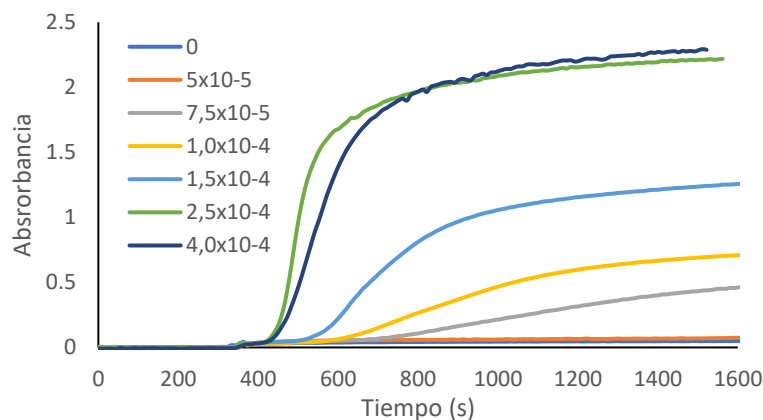


Figura 9: Registros de Abs-t pertenecientes a la calibración de la reacción enzimática de determinación de tiramina por formación de NP de oro y paladio.

Se tomó un tiempo en el cual todas las reacciones se encontraban en la fase de estabilización. En nuestro caso tomamos las medidas a 1200 segundos. Ya que, a ese tiempo se consideró que las reacciones para todas las concentraciones estudiadas se encontraban estables. Obteniéndose la siguiente calibración.

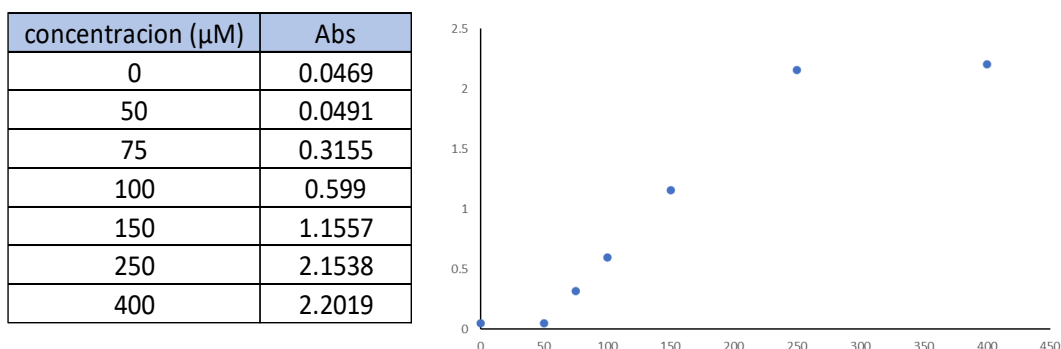


Figura 10: Recta de calibrado perteneciente a la reacción ezimática con $[\text{Au (III)}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Pd (II)}] = 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{TAO}] = 0,125 \text{ U/mL}$; disolución amortiguadora de pH 7 y 0,3 M en fosfatos.

Como se puede observar en la figura, tanto el primer punto como el último parecían restar linealidad a la recta de calibrado. Por lo que, a los valores supuestamente anómalos, se les aplicó un test F para así, asegurar que podían eliminarse utilizando un método estadístico fiable.

4.2.1.3. Test F.

Por medio de un análisis de los residuales de las rectas de calibrado pudimos determinar si los puntos que considerábamos anómalos eran rechazables o no.

- *Eliminación del último punto de la recta de calibrado, $4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$.*

En primer lugar, se realizó un estudio para determinar si el ultimo punto, de concentración $4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ iba a estar fuera del rango lineal al considerarse anómalo.

La varianza de los residuales de la recta de calibrado con todos los puntos fue 0,1443.

Var residuales	0.1443
----------------	--------

Por otro lado, eliminando ese punto de la recta, la varianza varió hasta 0,0363.

Var residuales	0.0363
----------------	--------

Una vez tuvimos ambas varianzas de residuales calculamos la F_{exp} , la cual fue 15,87.

Por último comparamos la F_{exp} con la F_{tab} (95%) que fue 7,71.

Como $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$ pudimos decir que el punto de concentración $4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ se podía eliminar de la recta de calibrado.

- *Eliminación del primer punto de la recta de calibrado.*

En segundo lugar, realizamos el mismo procedimiento para tratar de eliminar el primer punto de la recta de calibrado. Entonces, la recta con todos los puntos fue la obtenida en el apartado

anterior con la varianza de residuales obtenida anteriormente y el punto a eliminar fue el de concentración 0.

Var residuales	0.0363
----------------	--------

La varianza de residuales si eliminamos el primer punto fue 0,0007.

Var residuales	0.0007
----------------	--------

Una vez obtenidas las dos varianzas, se calculó el F_{exp} , que este segundo caso fue 204,42

En cuanto al F_{tab} (95%) fue 10,13; comparando los dos, $F_{exp} > F_{tab}$. Por lo cual, pudimos rechazar el dato y eliminarlo de la recta de calibrado.

En conclusión, el test estadístico F nos permitió eliminar los dos puntos de concentración 0 y $4,0 \times 10^{-4}$ M.

Obtuvimos una recta de calibrado final con un $R^2 = 0,9992$, se mejoró claramente la linealidad de la calibración. Se obtuvo también un rango lineal que fue desde el $5,0 \times 10^{-5}$ M hasta $2,5 \times 10^{-4}$ M.

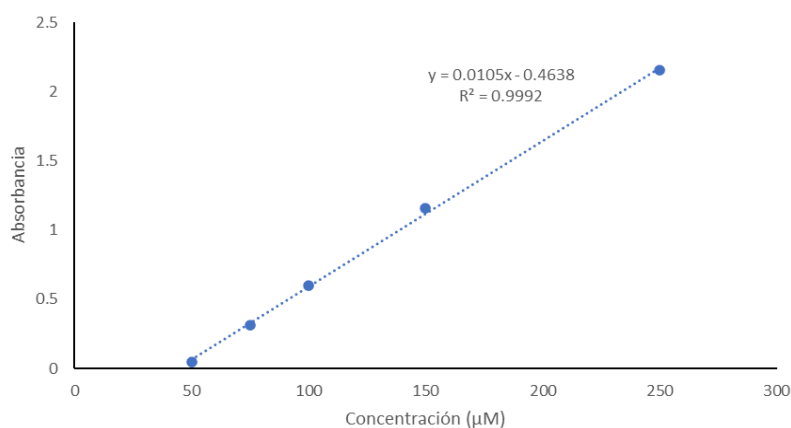


Figura 11: Recta de calibrado para la determinación enzimática de tiramina, habiendo eliminado dos puntos. $[Au(III)] = 5,0 \times 10^{-4}$ M; $[Pd(II)] = 1,5 \times 10^{-3}$ M; $[TAO] = 0,125$ U/mL; disolución amortiguadora de pH 7 y 0,3 M en fosfatos.

4.2.2. Estudio de precisión de un punto de la recta de calibrado.

Se realizó un estudio con el punto de mayor concentración de la recta de calibrado ($2,5 \times 10^{-4}$ M) con el fin de evaluar la precisión del método de calibración. Idealmente, se tendría que haber realizado un estudio para cada uno de los puntos, pero consideramos extrapolables estos resultados al resto de puntos de la recta de calibrado.

Se realizaron cuatro ensayos distintos todos ellos con la misma disolución de Tir $2,5 \times 10^{-4}$ M, en los cuales se tomaron cuatro medidas diferentes, es decir, se realizaron cuatro replicas de la misma reacción. Se obtuvieron una serie de valores tomados a 1400 s de comenzar la reacción, cuando todas ellas se encontraban estables. Dichos valores fueron:

Réplicas	Abs (1400 s)		
1ª	2.1960		
2ª	2.2176	Desv. Estand	0.050
3ª	2.1296	Media	2.165
4ª	2.1163	DER	2.3

Se determinó la DER de estos valores para la concentración mencionada, obteniéndose un valor de 2,3%. Es decir, la precisión de la medida en esa concentración y extrapolable al resto del método fue de **2,3%**.

4.3. Estudio de la interferencia de Histamina.

Las aminas biógenas más abundantes, junto con tiramina, en muestras de alimentos son putrescina (Put), cadaverina (Cad) e histamina (His). De estas tres, las dos primeras no producen interferencia apreciable en la determinación de tiramina con TAO basada en la formación de AuNP, pero la His sí que produce una fuerte interferencia, que se traduce en la desaparición de la señal (interferencia negativa). En este trabajo se pretende ver si la presencia de Pd (II) en la reacción enzimática, actúa de alguna manera sobre la interferencia de la His.

Se realizaron varios estudios para determinar si otras aminas biógenas como es el caso de la Histamina producían interferencias en nuestra reacción. La aparición de turbidez en la cubeta cuando teníamos altas concentraciones de Histamina sugería la formación de un precipitado. Igualmente, el ensanchamiento del pico de formación de NPs, disminuía la calidad de este.

4.3.1. Estudio del efecto interferente.

- Tiramina $1,0 \times 10^{-4}$ M.

El principio del estudio fue ver como afectaba o interfería la histamina en nuestra reacción. En este caso se mantuvo constante una concentración de tiramina situada en un punto intermedio de nuestra recta de calibrado ($1,0 \times 10^{-4}$ M), y se fue variando la concentración de His presente en la disolución.

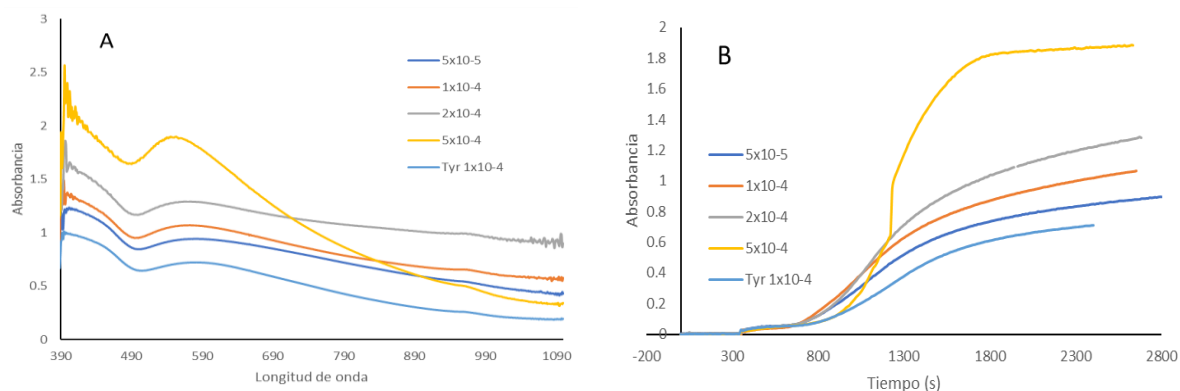


Figura 12: A) Espectros pertenecientes al estudio de la His como sustancia interferente. B) Registros Abs-t pertenecientes al estudio de la His como sustancia interferente.

Como se puede ver en la figura, partiendo de una concentración de $1,0 \times 10^{-4}$ M de tiramina y sin presencia de histamina, conforme aumentábamos la concentración de esta segunda amina

biógena, la señal aumentaba progresivamente. Este hecho nos sugirió que en la histamina estaba produciendo una interferencia aditiva a nuestra señal de Abs.

Pudimos ver igualmente, que la estabilización de la señal se veía claramente perjudicada con la aparición de deriva.

Una vez comentado esto, tratamos de ver si el comportamiento descrito seguía alguna relación de linealidad. Por lo que tomamos las Abs a un tiempo de 2000 s para las diferentes concentraciones estudiadas. Se obtuvo lo siguiente:

[His] (M)	Abs (2000 s)
5.00E-05	0.7826
1.00E-04	0.9293
2.00E-04	1.1099
5.00E-04	1.845
0.00E+00	0.6543

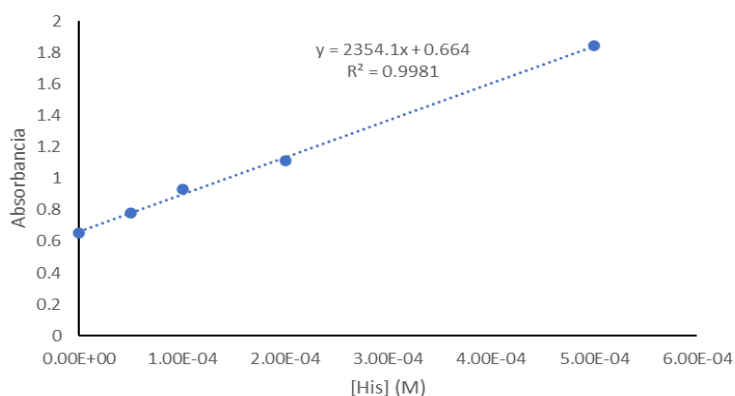


Figura 13: Recta de calibrado para determinar la concentración de His presente en la disolución.

Como se observa en la figura, para un tiempo de 2000 segundos, el comportamiento que siguió la variación de la señal con la concentración de histamina fue claramente lineal. Esto podría sugerir que, para un punto de concentración intermedia en nuestra recta de calibrado (1×10^{-4} M), la interferencia producida por la histamina sería aditiva pero con un comportamiento lineal. Este hecho, podría servirnos para determinar esta amina en presencia de tiramina, aunque habría que profundizar más para poder decirlo con seguridad.

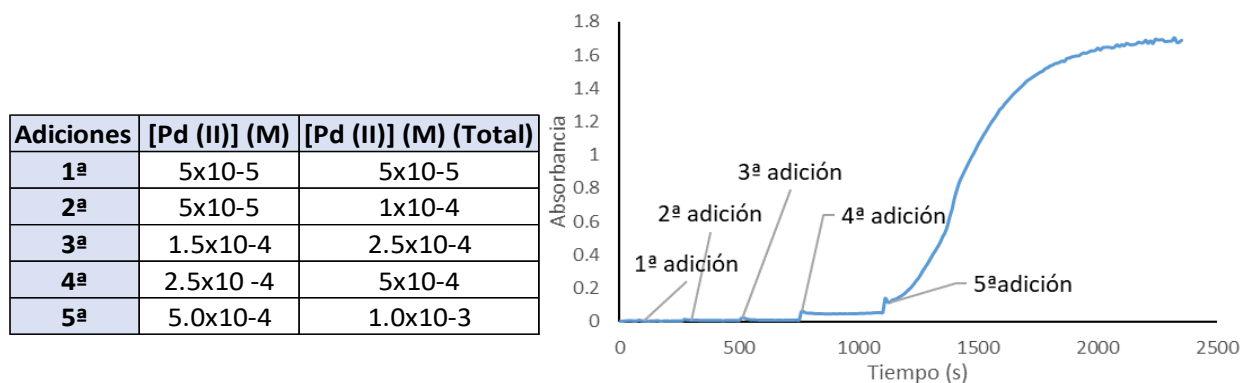
Se compararon estos estudios con los realizados con Au (III) como único metal. Se observó que existía una gran diferencia entre ellos, ya que en los realizados con Au (III) la interferencia producida por la His hacía que ni siquiera se diese la reacción enzimática para formar las AuNP. Por lo que se pudo ver, la presencia de Pd (II) en combinación con Au (III) permitía que la reacción al menos se produjese. Por esto, en los siguientes estudios, se trataría de estudiar el origen de la interferencia.

4.3.2. Estudio del origen de la interferencia y su eliminación.

4.3.2.1 Estudio precipitado His-Pd.

Como ya se ha mencionado y se vio durante los estudios anteriores, para proporciones de concentración (Tir:Hist) de (1:1) o de (1:2) en la disolución resultante de la reacción aparecía una ligera turbidez, sugiriendo así la presencia de un precipitado. Por este motivo se llevaron a cabo una serie de ensayos previos con el fin de obtener la naturaleza de dicho precipitado. Finalmente, se llegó a la conclusión de que el causante, era la formación de complejos Histamina-Pd (en presencia de disolución amortiguadora de fosfato).

El siguiente paso fue hacer un estudio más sistemático con el objeto de conocer para que concentraciones o en que momento iba a comenzar a darse la aparición de dicho precipitado. Se planteó el siguiente estudio. A partir de una concentración elevada de histamina, en concreto de $5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ se realizaron adiciones sucesivas de Pd (II) en concentraciones conocidas, determinando así para que concentración de Pd (II) comenzó a formarse el precipitado.



Como puede verse en la figura, el momento en el que el precipitado por formación del complejo Histamina-Pd se produjo, la concentración de Histamina era de $5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ y la de Pd (II) de $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$. Además, la figura muestra el registro Abs frente al tiempo de dicho precipitado, en cuanto al espectro, en el momento de la precipitación, se observaría un espectro típico de dispersión que se enseñará más adelante.

4.3.2.2. Método para la separación y eliminación de Histamina.

Con el fin de evitar la interferencia en la señal provocada por la presencia de histamina, y al ver que estas eran aún más notables cuando se producía el precipitado por la reacción His-Pd, se planteó la eliminación de dicho precipitado por medio de ultrafiltración en centrífuga.

Para ello, se introdujo Pd (II) en una cubeta con presencia de las dos aminas biógenas, tiramina e histamina. Se aseguró que la concentración del Pd (II) presente fuera suficiente para que se produjese el precipitado His-Pd. Todo esto, en ausencia de TAO, ya que como se había visto la precipitación estaba favorecida en ausencia de esta. Una vez producido el precipitado, se realizó la ultrafiltración en centrífuga, separando así el precipitado His-Pd del resto de la disolución, la cual contendría idealmente tiramina, libre de la amina biógena interferente.

Una vez realizado este proceso, al producto de la centrífuga (tiramina) se le añadió TAO y posteriormente Au (III) y Pd (II), es decir, nuestra reacción estudiada. Se formó, como cabía esperar, el pico que indicaba la presencia de NPs de Au/Pd.

En definitiva, podemos decir, que el método de eliminación de la interferencia histamina, aunque laborioso, fue un éxito, ya que se logró determinar la presencia de tiramina en la muestra con una sensibilidad muy parecida a cuando inicialmente no había presencia de histamina.

4.3.3. Estudio de formación de precipitado en presencia de TAO.

En este estudio se pretendió ver si se iba a dar la formación del precipitado visto anteriormente por formación de complejos Histamina-Pd, en unas condiciones similares a las de la reacción de formación de NPs estudiada. Para ello, se optó por realizar dos ensayos diferentes:

1. Tiramina ($2,5 \times 10^{-4}$ M) + Histamina ($5,0 \times 10^{-4}$ M) + Pd (II)
2. Tiramina ($2,5 \times 10^{-4}$ M) + Histamina ($5,0 \times 10^{-4}$ M) + Pd (II) + TAO

Es decir, la diferencia entre ellos radicaría en la presencia o ausencia de TAO, en ambos la concentración de Pd (II) era suficiente para que se produjese la formación del complejo Hist-Pd y por tanto la precipitación. Por otro lado, la ausencia de Au (III) explicaría porque no vemos el pico de formación de NPs en la reacción 2.

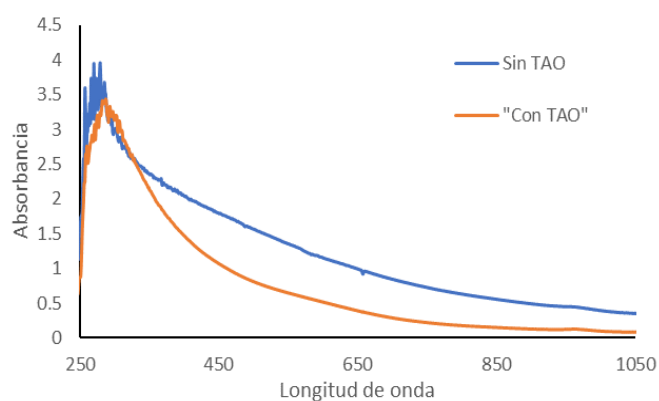


Figura 15: Espectros pertenecientes al estudio de formación del precipitado His-Pd en presencia y ausencia de TAO.

Se pudo observar que en la reacción que ha transcurrido en ausencia de TAO, el precipitado formado es mayor, ya que el espectro de dispersión que refleja la figura tiene una señal de Abs mayor. En el otro lado, se encuentra la reacción que se ha llevado a cabo en presencia de TAO, y que por tanto es más parecida a nuestra reacción estudiada, en este caso, se ha dado en menor medida el precipitado al tener una señal de Abs menor en el espectro de dispersión.

Este hecho observado, podría sugerir que el Pd (II), al igual que luego veremos que pasa con el Au (III), interacciona con la TAO para después estabilizar la formación de NPs, y esto hace que quede menos Pd (II) libre en disolución y por tanto en condiciones de complejarse con la Histamina presente en el medio y de dar lugar al precipitado visto.

4.4. Mecanismo de la reacción: función del Pd (II).

Se realizaron una serie de ensayos con el fin de obtener el mecanismo por el cual transcurriría la reacción y conocer cuál sería el papel que tiene el Pd (II) en esta. Dichos estudios estarían enfocados en responder el porqué del aumento de la señal, la mejora de la estabilización de la reacción y la mayor calidad de pico. Comparando dichos aspectos con la reacción utilizando Au (III) como único metal.

4.4.1. Presencia de paladio en las nanopartículas.

Se realizaron una serie de estudios cuyo principal objetivo era poner de manifiesto la presencia de Pd en las nanopartículas formadas. Para ello, se utilizaron una serie de técnicas de microscopía electrónica como pueden ser, la utilización de microscopio electrónico de transmisión o TEM con acoplamiento de EDX y la utilización de espectrometría fotoelectrónica X o XPS.

El TEM con acoplamiento de EDX es un microscopio electrónico que va a utilizar un haz de electrones producido generalmente por un cátodo con un filamento de W incandescente. El haz de electrones pasa a través de unas lentes magnéticas cuyo objetivo es dirigirlo hacia la muestra. Dicho haz interacciona con la muestra, emitiendo fotones de rayos-X que serán captados por un detector en este caso un detector EDS el cual mostrará las características de la muestra y su composición química, es decir, una imagen en 2D de la muestra y su información elemental.

Por otro lado, utilizamos XPS. En dicha técnica espectroscópica, se obtuvieron espectros inducidos por fotones de rayos-X. En cuanto al fundamento de la técnica, cuando una muestra es irradiada por rayos-X, se van a liberar electrones con una energía determinada, que podrá asociarse con la energía de los enlaces. Esto, nos da información de que átomos se encuentran presentes de la muestra, es decir, información elemental de la misma.

Al fin y al cabo, son técnicas que otorgan una información parecida. En nuestro caso, nos permitieron afirmar la presencia de paladio, junto con el oro formando las NP.

4.4.1.2. Resultados del XPS.

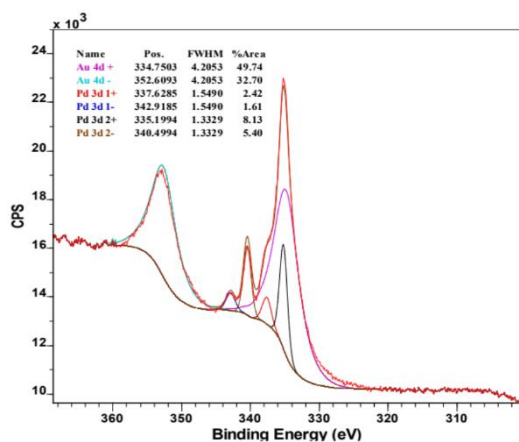


Figura 16: Espectros pertenecientes al resultado de la reacción enzimática con Au (III) y Pd (II), utilizando XPS.

Au: Teniendo en cuenta el error posible introducido en la calibración de las posiciones detectadas para las señales Au 4f 7/2 son compatibles con los valores reportados en literatura para Au (0).

Pd: En la muestra AuPd se detecta dos especies de Pd con energías de enlace Pd 3d 5/2 a 335.2 y 337.6 eV respectivamente. La de menor energía de enlace corresponde a los valores reportados para Pd (0) mientras que la de mayor energía de enlace es consistente con valores indicados en la literatura para haluros de Pd.

Estos resultados nos indicaron al igual que sucedió con el TEM la presencia tanto de Pd (0) como de Au (0) en la muestra, es decir, la presencia de paladio y oro formando las NP. Sin embargo,

por medio de esta técnica no se obtuvo ninguna imagen que confirmando la variación de la forma de las NP como sucedía en el TEM.

También se especifica en el apartado del Pd la presencia de haluros de Pd en la muestra. esto pudo deberse a la presencia de la especie PdCl₂ resultado de la preparación de la disolución de la sal de Pd en HCl.

4.4.1.1. Resultados del TEM.

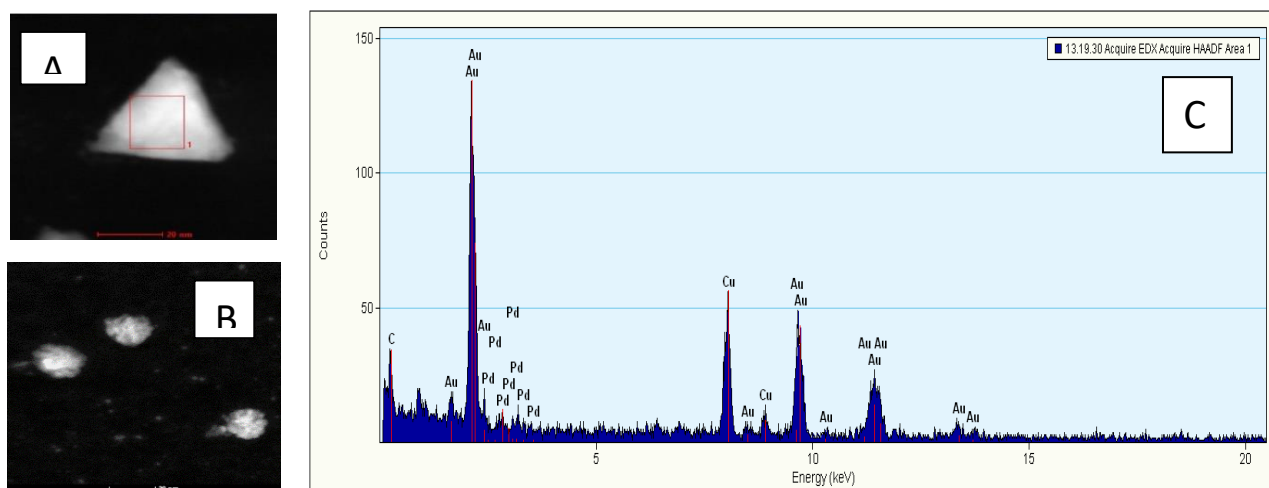


Figura 17: A) y B) NP de oro y paladio. C) composición elemental de la NP.

Se pudo observar que las NP tenían formas diferentes, algunas de ellas más parecidas a las AuNP. Mientras que otras, adquirieron formas muy distintas a las anteriormente observadas, como es el caso de la imagen A, NP con caras mucho más definidas y regulares, con formas casi poligonales. Estos cambios en la conformación de las NP con respecto a las AuNP, así como en análisis elemental de las mismas, nos confirmaron la presencia de paladio junto con el oro dando lugar a las NP.

Como conclusión y después de ver ambos estudios, se confirmó la presencia de Pd en las NP formadas por la reacción enzimática conocida. Y a su vez, la presencia de Pd, induciría un cambio de forma en las NP con respecto a las formadas solo por oro según lo observado en el TEM.

4.4.2. Información sobre el mecanismo de formación de la NP.

Se realizaron una serie de estudios con el fin de explicar el mecanismo de la reacción enzimática. Se barajaron dos posibilidades en cuanto al proceso se refiere.

1. El producto de reacción actuaba como reductor del Au (III) y la TAO presente en la reacción estabilizaba la formación de las NP.
2. El Au (III) podía regenerar la enzima, reduciéndose a Au (0) y este era estabilizado mediante la enzima regenerada.

Como se ha dicho, los siguientes estudios consistieron en aportar más evidencia sobre el mecanismo y trataron de explicar el papel que jugaría el Pd (II) en la reacción.

4.4.2.1. Producto de la reacción: estabilización con la enzima.

Se realizaron una serie de estudios con el producto de la reacción con el objetivo de conocer cuál es su papel en la formación del pico de NPs y en la estabilización de estas. Puesto que, en un principio se pensó que podía ser este uno de los causantes de la estabilización en la formación de las NPs. Ya que conforme avanzaba la reacción y había más tiramina en la forma oxidada la formación de estas parecía más favorable.

En cuanto a la síntesis de dicho producto, se siguió el procedimiento siguiente. Se añadieron a una cubeta, el tampón de fosfatos pH7 0,3M, TAO en concentración 0,125 U/mL, la Tir en concentración $2,5 \times 10^{-4}$ M y se insufló O_2 durante 5 min con el fin de que la Tir reaccionase al completo para formar el producto de reacción. Una vez formado dicho producto se aisló por ultracentrifugación, es decir, la enzima quedaría separada del producto de reacción formado y tan solo obtendríamos la Tiramina en su forma oxidada.

Una vez aislado el producto de reacción se le añadieron los metales Au (III) y Pd (II), lo que hizo que se produjese un aumento en la línea base del espectro. Este hecho sugeriría que se produjo una reacción de reducción de los metales, pero en ningún momento se formó un pico definido que indicase la presencia de las NPs. Ante esta situación se hicieron dos cosas. La primera de ellas ante ese producto con los metales presentes en disolución se añadió TAO, el resultado fue la aparición del pico de formación de las NP. La segunda, al producto de la ultracentrifugación se le añadió TAO y ambos metales siguiendo las pautas normales de adición de los reactivos y se produjo una subida de pico con una calidad similar a lo que se había visto en la reacción enzimática conocida.

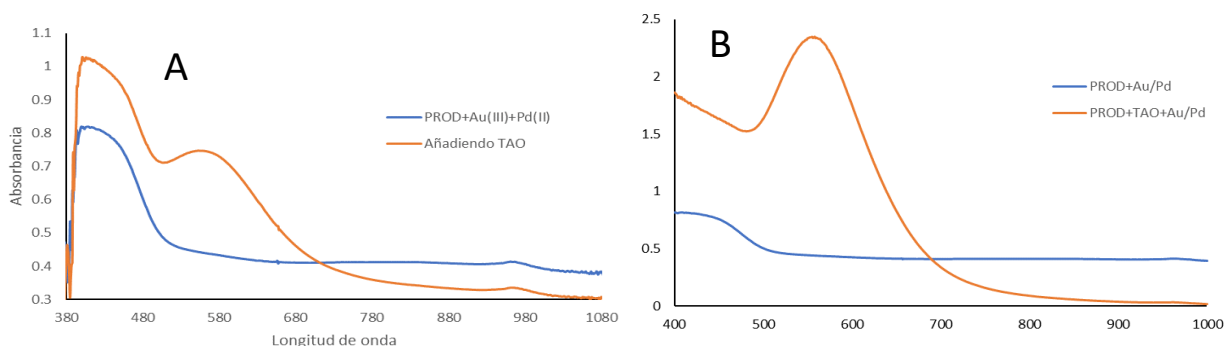


Figura 18: A) Espectros pertenecientes a la primera situación descrita. B) Espectros pertenecientes a la segunda situación descrita.

Se pudo observar que para las dos situaciones la presencia de TAO en la disolución parecía estabilizar la formación de las NP de Au/Pd y ya no tanto el producto de la reacción como se pensó en un primer momento.

4.4.2.2. Necesidad de la TAO.

Después de estudiar el papel del producto en la reacción y observar que la TAO podría ser una de las causantes en la estabilización de las NPs. Se pensó hacer una serie de ensayos con diferentes enzimas para ver si alguna de ellas era capaz de estabilizar la formación de NPs de Au/Pd, al igual que lo hacía la TAO.

Se probó con enzimas como la BSA, la GOx y la Lacasa, teniendo esta última un centro activo de Cu como en el caso de la TAO, por lo que se pensó que podría estabilizar del mismo modo la reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo con el mismo procedimiento seguido para el segundo estudio del apartado anterior, es decir, frente al producto de reacción se le añadieron los metales Au (III) y Pd (II) y las distintas enzimas y en ninguna de las diferentes reacciones se produjo la estabilización del pico de formación de NPs. Ni si quiera en el caso de la Lacasa, por lo que se desechó la hipótesis de que la estabilización de las NP estuviese causada por el metal del centro activo. Por todo esto, podríamos decir que la formación de NPs requeriría de la TAO para darse, y que la estructura de esta y su especificidad por el sustrato podrían ser factores diferenciales en la estabilización de las NP.

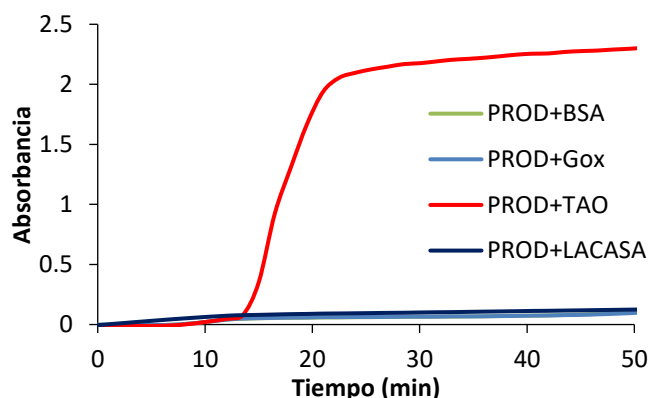


Figura 19: Registros Abs-t pertenecientes al estudio de la reacción enzimática utilizando el producto de reacción con otras enzimas distintas a la TAO.

4.4.2.3. Efecto del resto de los componentes: Estudio de cómo afecta el H_2O_2 en la reacción.

El objeto de este estudio es el determinar cuál es el papel de los peróxidos en nuestra reacción, es decir, como van a afectar en el pico observado. Si van a hacer que la velocidad aumente, que establezca mejor la señal, etc.

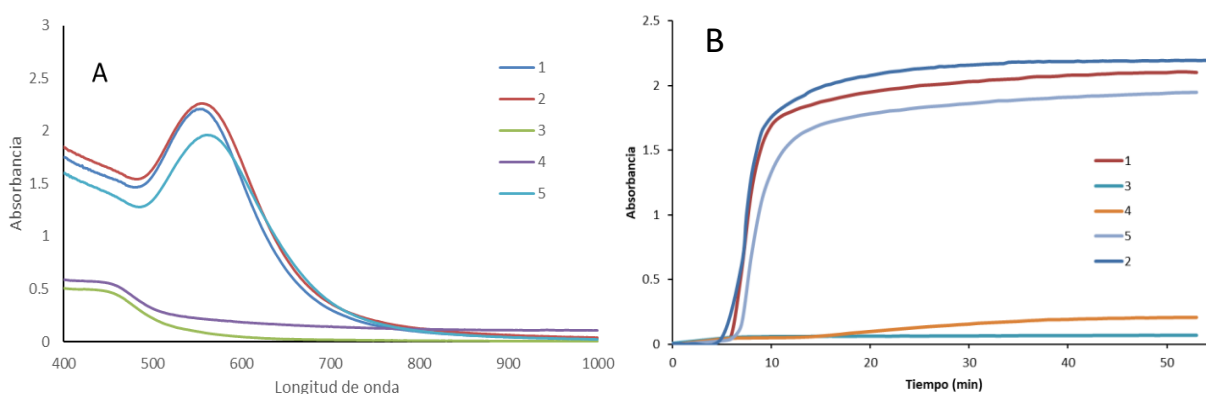


Figura 20: A) Espectros pertenecientes al estudio de cómo afectan los peróxidos a la reacción. B) Registros Abs-t pertenecientes al estudio de cómo afectan los peróxidos a la reacción enzimática.

1. Tyr + TAO + Pd/Au
2. Tyr + H_2O_2 ($2,5 \times 10^{-4} M$) + TAO + Pd/Au

3. TAO + H₂O₂ (2,5x10⁻⁴ M) + Pd/Au
4. TAO + H₂O₂ (5,0x10⁻⁴ M) + Pd/Au
5. Tyr + TAO + Catalasa + Pd/Au

Pudo verse que los peróxidos por sí solos no van a generar un pico como tal en ausencia de tiramina. No obstante, se vio que a mayor concentración de estos, en concreto con 5,0x10⁻⁴ M se produciría un pequeño aumento en la línea base, lo cual sugeriría una reducción de los metales, en este caso del Au (III) y Pd (II) a Au (0) y Pd (0).

Por otro lado, no se apreciaba un cambio en la velocidad considerable con peróxidos o en ausencia de ellos, ya que las tres reacciones en las que estaba presente la tiramina tenían una velocidad de reacción y un tiempo de estabilización muy similar.

En cuanto a los valores de señal, o de Abs_{max} se pudo ver como los peróxidos aumentaban esta, aunque fuese levemente. Ya que la reacción llevada a cabo con catalasa (5), es decir, en ausencia total de peróxidos (puesto que dicha enzima cataliza la dismutación de los peróxidos para dar H₂O y O₂) tuvo una señal menor que la reacción a la que se le añadió una concentración adicional de 2,5x10⁻⁴M de estos (2). Quedando entre medio de estas dos, la reacción (1) que era nuestra reacción enzimática conocida. Se vio que se encontraba entre ambas, debido a que si la presencia de peróxidos aumentaba mínimamente la señal, nuestra reacción contendría más peróxidos que la (5) pero menos que la reacción (2).

Posteriormente se realizaron otra serie de ensayos con el fin de conocer el efecto de otras especies en la reacción. Los tres ensayos que se hicieron fueron:

1. TAO + Au (III) + Pd (II).
2. Tyr (sin TAO) + Au (III) + Pd (II).
3. H₂O₂ + Au (III) + Pd (II).

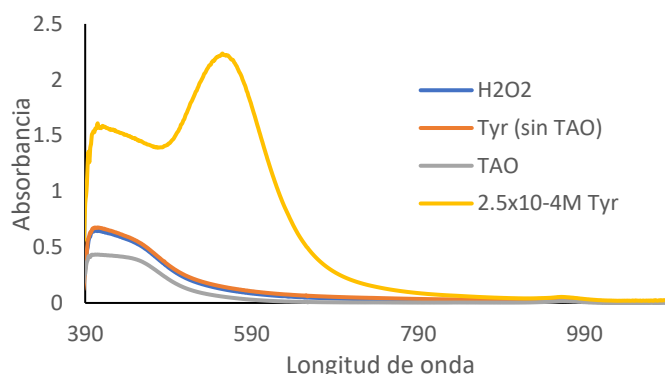


Figura 21: Espectros pertenecientes al estudio de cómo afectan las diferentes especies en la reacción enzimática.

Estos ensayos se realizaron para descartar que fuesen la TAO, la Tyr (en ausencia de TAO) o los peróxidos los causantes de la mejora del pico, y todos ellos no dieron apenas señal, lo que indicaba que no se formaban las NPs.

Se puede observar que ni la Tyr por si sola, ni los peróxidos, ni la TAO van a ser capaces de formar NPs con los metales y por lo tanto no se van a considerar como los causantes de la mejora de la calidad del pico.

4.4.2.4. Introducción de Pd (II) a la reacción de formación de NPs de Au.

El estudio se realizó con la misma intención que en los anteriores, saber cuál es el papel del Pd (II) en esta reacción. Para ello, se optó por realizar la reacción conocida de formación de NPs,

pero en este caso, solo con Au (III) es decir, en un principio, en ausencia de Pd (II) y conforme avanzase la reacción y comenzase a estabilizarse la formación de NPs de Au, se añadiría Pd (II).

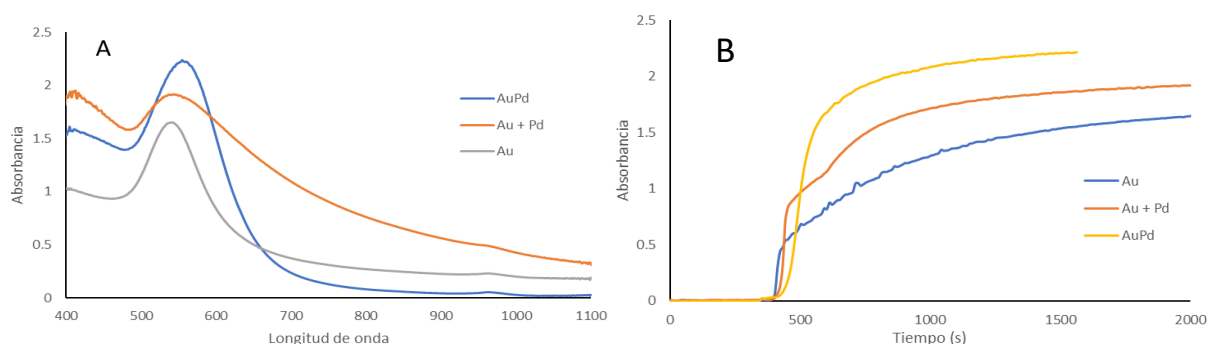


Figura 22: A) Espectros pertenecientes al estudio del papel del Pd (II) en disolución con diferentes formas de introducirlo en la reacción enzimática. B) Registros Abs-t de lo descrito en A

- AuPd: Procedimiento normal de la reacción estudiada, Au (III) y Pd (II) se añaden a la vez una vez hayan reaccionado tiramina y TAO.
- Au + Pd: Una vez han reaccionado tiramina y TAO se introduce el Au (III), cuando comienza a estabilizar la reacción se añade Pd (II).
- Au: Cuando han reaccionado tiramina y TAO se añade el Au (III).

Una vez la reacción comenzaba a estabilizarse, se pudo observar que al introducir el Pd (II) en la cubeta, se producía un aumento de la señal, sugiriendo la formación de NPs de Au/Pd y una mejor estabilización de la reacción, que para la reacción utilizando únicamente Au (III).

Por otro lado, llevando a cabo la reacción de la manera habitual, es decir, introduciendo ambos metales Au (III) y Pd (II) al mismo tiempo. La señal de Abs fue mayor todavía, este hecho sugeriría, que si el Pd (II) se encontrase desde un principio participando en la reacción, la formación de NPs estaría favorecida. Ya fuese porque el Pd (II) estabilizaría la formación de estas, porque igual que sucede con el Au (III) reaccionaría con el producto de tiramina aumentando la señal de Abs o por ambas situaciones.

Todos estos hechos evidenciaron que la presencia de Pd (II) en la reacción iba a ayudar a que la reacción de formación de NPs diese una mayor señal de Abs y por consiguiente estuviera más favorecida.

5. Conclusiones.

Como conclusión general y de cara a lograr el principal objetivo del trabajo, se ha visto que al introducir Pd (II) en la reacción enzimática para la determinación de tiramina por medio de AuNP, se ha logrado mejorar las prestaciones analíticas del método. Además, gracias al desarrollo del trabajo se han llegado a una serie de conclusiones más.

- El Pd (II) por si solo, es decir, en ausencia de Au (III) no ha sido capaz de formar NP, por lo cual se ha optado por combinar ambos metales, dando lugar a mejores resultados que utilizando el Au (III) como único metal en la determinación de tiramina.
- Se han determinado las condiciones óptimas de trabajo para obtener la mayor sensibilidad en la reacción enzimática que son: $[Au(III)] = 5,0 \times 10^{-4} M$; $[Pd(II)] = 1,5 \times 10^{-3} M$; $[TAO] = 0,125$

U/mL; disolución amortiguadora de pH 7 y 0,3 M en fosfatos. Obteniendo un rango lineal en la determinación de Tir de $5,0 \times 10^{-5}$ M hasta $2,5 \times 10^{-4}$ M.

- Se ha determinado que la His va a producir una interferencia aditiva a la señal de Tir, pero al contrario que sucedía en la reacción utilizando solo Au (III), va a existir una señal de Abs cuantificable. Además, parece que esta interferencia, sigue un comportamiento lineal permitiendo cuantificar la concentración de His. Por otro lado, se ha ideado un método para su eliminación (ultrafiltración del precipitado His-Pd) y evitar así su interferencia cuando quiera conocerse la concentración de Tir en la muestra.
- Se ha determinado gracias a la microscopía TEM o espectroscopía XPS la presencia de paladio en las NP que antes solo eran de oro.
- Se ha concluido que la enzima TAO va a cumplir un papel fundamental en la reacción, ya no solo ayudando en la oxidación la Tir, sino como especie estabilizante para la formación de NP. Por el contrario, se ha visto que otras enzimas como la GOx, LACASA o la BSA no van a permitir que se de la reacción de formación de NP.
- En cuanto al Pd (II), ya sea introduciéndolo en la reacción a la vez que el Au (III) o minutos después, va a hacer que la señal de Abs para el pico de formación de NP aumente, y logre una mejor estabilización.

6. Bibliografía.

- 1) Flores, C. Nanopartículas de Plata Con Potenciales Aplicaciones En Materiales Implantables: Síntesis, Caracterización Físicoquímica y Actividad Bactericida, Universidad nacional de la Plata, 2014. <https://doi.org/10.35537/10915/34946>.
- 2) U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Vavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Mann, Nat. Meth. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels, 2008, 5, 763. DOI: 10.1038/nmeth.1248.
- 3) L. Chen, C. Wang, Z. Yuan, H. Chang, Gold nanoparticles as sensitive optical probes, Anal. Chem. 2015, 87, 216 DOI: [10.1039/C5AN02651B](https://doi.org/10.1039/C5AN02651B).
- 4) Wajsblat, M.; Silberstein, C. Campylobacter Fetus Fetus, Universidad ORT Uruguay, 2016.
- 5) Vanesa, J. Tesis Doctoral Manipulación de Fluorescencia Molecular Mediante Nanopartículas Metálicas. Jesica Vanesa Pellegrotti, "Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar/>," 2015.
- 6) Nikolai G. Khlebtsov. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra. Anal. Chem. 2008, 80, 6620–6625.
- 7) Doeun, D.; Davaatseren, M.; Chung, M. S. Biogenic Amines in Foods. Food Sci. Biotechnol. 2017, 26 (6), 1463–1474.
- 8) Benkerroum, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2016, 15 (4), 801–826.
- 9) Newman, J. D. S.; Blanchard, G. J. Formation of Gold Nanoparticles Using Amine Reducing Agents. Langmuir 2006, 22 (13), 5882–5887.
- 10) Navarro, J.; de Marcos, S.; Galbán, J. Colorimetric-Enzymatic Determination of Tyramine by Generation of Gold Nanoparticles. Microchim. Acta 2020, 187 (3). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4141-y>.
- 11) S. de Marchi Lourenço, S. Núñez-Sánchez, G. Bodelón, J. Perez-Juste and I. Pastoriza-Santos, Nanoscale, Pd nanoparticles as plasmonic material: synthesis, optical properties and applications, 2020, DOI: 10.1039/D0NR06270G.