



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de un método óptico enzimático para la determinación de alcaloides tropánicos.

Development of an enzymatic optical method for the determination of tropane alkaloids.

Autor/es

Santiago Lasso Fernández

Director/es

Isabel Sanz Vicente

Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica.
Grupo de Nanosensores y Sistemas Bioanalíticos
Curso 2021/2022

RESUMEN

Se pretende desarrollar un método analítico rápido para la determinación de alcaloides de tropano, concretamente atropina.

El inicio se basa en la oxidación alcalina de la atropina para obtener tropina por la acción de una disolución de NaOH 2M. Posteriormente, se estudia mediante absorción molecular la oxidación del grupo alcohol a una cetona de la molécula de tropina mediante la enzima Tropinona Reductasa, utilizando el NAD⁺ como cofactor. El seguimiento de esta reacción se realiza a la longitud de onda de 340 nm, el máximo de absorción del NADH, que es proporcional a la tropina.

Para aumentar el rango lineal, se acopla una segunda reacción enzimática. Se trata de una reacción colorimétrica en la cual, mediante la enzima diaforasa se oxida el NADH generado en la reacción anterior. A su vez, se produce la reducción de un colorante produciéndose así un compuesto con un color rojizo. Esta reacción se estudia a la longitud de onda de absorción del colorante, 490 nm, que es proporcional a la concentración de atropina.

Una vez optimizado el método analítico para la determinación de alcaloides de tropano en disolución, se realizan las primeras pruebas en muestras reales y se lleva a cabo el estudio del efecto matriz que conllevan las muestras de cereales para alimentación infantil más habituales.

Se obtiene un LD=7,10·10⁻⁷ M, un LQ= 2,37·10⁻⁶ M, un rango lineal desde el LQ hasta C= 1·10⁻⁴ M y una DSR=3,84%. Este es un primer paso para el estudio de la reacción en un soporte sólido para desarrollo de biosensores.

ABSTRACT

This project pretends to develop a rapid analytic method to achieve the establishment of tropane alkaloids, atropine in particular.

The onset is based on the alkaline oxidation of atropine to obtain tropine by the action of a 2M NaOH solution. Subsequently, the alcohol group oxidation of a tropine's molecule through the Tropinone Reductase enzyme to a ketone is studied by molecular absorption, using the NAD⁺ as a cofactor. The monitoring of this reaction is conducted using the absorption wavelength of the NADH, 340nm.

In order to increase the linear range, a second enzymatic reaction is joined. It is a colorimetric reaction in which, the NAHD resulted from the previous reaction is oxidized through the diaphorase enzyme. In turn, a colourant is reduced resulting in a red toned compound. This reaction is studied under the wavelength of the colourant, 490 nm.

Once that the analytic method to determine tropane alkaloids in dissolution is optimized, the first test on real samples is conducted and the study of the matrix effect in the cereal samples used more regularly in a child's diet is done.

A LD=7,10·10⁻⁷ M, a LQ= 2,37·10⁻⁶ M, a lineal range from LQ to C=1·10⁻⁴ M and a DSR=3,84% are obtained. This is a first step for the study of the reaction in a holder for the development of biosensors

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Alcaloides de tropano.....	1
1.2 Toxicología alimentaria.....	2
1.3 Métodos para la determinación de alcaloides de tropano.....	3
1.4 Métodos enzimáticos.....	3
2. OBJETIVOS.....	4
3. PARTE EXPERIMENTAL	5
3.1 Reactivos y disoluciones	5
3.2 Instrumentación y material	5
3.3 Procedimiento experimental	6
3.3.1 Hidrólisis de la atropina	6
3.3.2 Medidas por absorción molecular.....	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4.1 Estudio de la reacción de la tropina a 340 nm.....	7
4.1.1 Optimización del pH.....	7
4.1.2 Optimización de la temperatura.....	8
4.1.3 Calibración de la reacción.....	8
4.1.4 Límite de detección y cuantificación.....	9
4.1.5 Reproducibilidad	9
4.2 Estudio de la reacción del colorante.....	9
4.2.1 Optimización del pH.....	9
4.2.2 Optimización de la temperatura.....	10
4.2.3 Optimización de la concentración de la diaforasa.....	11
4.2.4 Optimización de la concentración de colorante.....	11
4.2.5 Calibración de la reacción.....	12
4.2.6 Límite de detección y cuantificación.....	13
4.2.7 Reproducibilidad	13
4.3 Estudio de la reacción de la tropina a 490 nm.....	14
4.3.1 Optimización de la diaforasa.....	14
4.3.2 Optimización de la Tropinona reductasa	15
4.3.3 Calibración de la reacción	15
4.3.4 Límite de detección y cuantificación	16
4.3.5 Reproducibilidad	17
4.4 Estudio de la reacción de la atropina.....	17
4.4.1 Optimización de la hidrólisis.....	17
4.4.2 Calibración de la reacción.....	18
4.4.3 Reproducibilidad	19
4.4.4 Ensayo en muestra.....	19
4.4.5 Estudio de recuperación en muestra.....	19
5. CONCLUSIONES.....	20
6. BIBLIOGRAFÍA.....	21

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Alcaloides de tropano.

Los alcaloides conforman la familia de compuestos químicos con el mayor número de sustancias conocidas. Esto se debe a que se considera como alcaloides a todas aquellas moléculas orgánicas que posean uno o más átomos de nitrógeno de estado de oxidación negativo, lo que le otorga un ligero carácter básico [1,2]. En los últimos años el interés por estos compuestos ha ido en aumento, dado que algunos tienen o pueden tener aplicaciones en el campo de la salud. [1]

Los alcaloides tropánicos, o alcaloides de tropano (AT), llamados así por ser derivados del anillo tropano (Figura 1), merecen especial atención por sus propiedades anticolinérgicas. Un anticolinérgico es aquel compuesto que puede disminuir o anular los efectos de la acetilcolina, un neurotransmisor, y se dividen en dos clases según los receptores de la acetilcolina que afecten: antimuscarínicos y antinicotínicos. La mayoría de los AT pertenecen al primer grupo. [3]

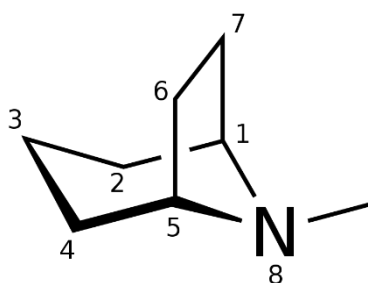


Figura 1: Tropano

Estos AT conforman un grupo de unos 200 compuestos, que se pueden encontrar en la naturaleza en plantas como la mandrágora (*Atropa Mandragora*), belladona (*Atropa Belladona*), beleño (*Hyoscyamus Niger*) o estramonio (*Datura Stramonium*), entre las más conocidas. A pesar de haber sido aislados por primera vez a principios del siglo pasado, se conocen los efectos de los AT desde la Edad Antigua, ya que existen registros del uso de la belladona para tratar a los pacientes asmáticos y la mandrágora o el estramonio han sido utilizados también de manera tradicional en sedantes. [4]

Dentro de los AT, cabe destacar tres metabolitos: la atropina, la hiosciamina y la escopolamina. Estos se utilizan en diversos campos de la medicina, la cardiología, la oftalmología y gastroenterología, por sus propiedades anticolinérgicas anteriormente nombradas. En este estudio nos centraremos en la atropina (Figura 2).

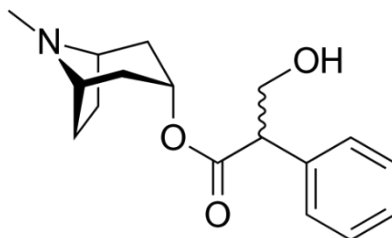


Figura 2: Atropina

La atropina es del grupo más común de anticolinérgicos, los inhibidores de los receptores muscarínicos de la acetilcolina. Esta provoca en el organismo una serie de síntomas que

caracteriza su alta toxicidad y las restricciones legales en su uso. Estos efectos son; dilatación de las pupilas, reducción de las secreciones y taquicardias [5, 6].

1.2 Toxicología alimentaria.

Conociéndose la variedad de plantas que contienen AT, los efectos que producen en el organismo y que suelen crecer de forma habitual en los alrededores de campos de cultivo y cosechas, hay que tener en cuenta que alimentos tales como trigo, alforfón, mijo, soja, lino y maíz pueden estar contaminados por estas sustancias. Esto puede derivar en intoxicaciones alimentarias a las distintas especies que se alimentan de estas cosechas, y puede extenderse siguiendo la cadena alimentaria a especies no herbívoras [6, 7, 8].

Son conocidas intoxicaciones en seres humanos y animales como caballos, ovejas, cabras, cerdos, ganado y aves de corral. Habitualmente los animales, dado que poseen una enzima capaz de hidrolizar los AT de manera específica y los excretan con mayor facilidad, poseen menor riesgo a envenenarse [9]. Todas estas condiciones han llevado a establecer límites de estos compuestos en alimentos, tanto para consumo humano como animal.

Se han tomado distintas medidas según el ámbito del organismo gubernamental:

- La Agencia Europea para la Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) establece como Dosis de Referencia Aguda (Acute Reference Dose, ARfD); 0,016 µg de atropina y escopolamina en 1 kg de peso corporal. [5]
- En el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la Comisión del Parlamento Europeo se establece como límite máximo para atropina y escopolamina; 0,1 µg/kg en todos los alimentos que contienen mijo, sorgo, alforfón y derivados que estén destinados al consumo de niños. [10]
- La Directiva 2002/32/CE del Consejo Europeo exige también un máximo de 1 g de semillas de estramonio por kg de producto. [11]
- El Reglamento (UE) Nº 37/2010 de la Comisión permite un límite del 1% de belladona en los medicamentos destinados al ganado. [12]

Incluso con estas medidas se producen envenenamientos por atropina y escopolamina en animales y seres humanos. Por esto mismo, es de gran importancia el desarrollo de métodos de determinación de atropina, que puedan implementarse en un proceso de producción continuado, de manera rápida y con sensibilidad suficiente.

1.3 Métodos para la determinación de alcaloides de tropano.

Dada la importancia que tienen los AT, tanto por sus múltiples beneficios conocidos como por el riesgo tan grande de provocar intoxicaciones, hay numerosos métodos desarrollados para su determinación.

La cromatografía de líquidos (HPLC) y la de gases (GC); son las metodologías más sensibles y efectivas para la determinación de atropina en muestra de cereales. Acopladas a la espectrometría de masas (MS), los límites de detección y cuantificación son muy bajos, del orden de $3,46 \cdot 10^{-9}$ mol/L [13]. Además de estas técnicas, también son habitualmente utilizadas como método de separación y detección, la cromatografía de capa fina y la electroforesis capilar [14].

A pesar de que las técnicas de separación son las más utilizadas, tienen varios inconvenientes, ya que son técnicas muy costosas, lentas y que requieren de personal cualificado para su manejo.

Como alternativa en este estudio se propone la determinación de AT basada en una reacción enzimática acoplada con una colorimétrica.

El objetivo final sería inmovilizar los reactivos en soportes fijos de celulosa, de manera que solo se requiere depositar la muestra en disolución, y la reacción colorimétrica mostrará, a simple vista, si se supera el límite de atropina en un producto. Todo este proceso puede resultar muy útil en grandes producciones de cereales, que necesiten optimizar su control de calidad para no retrasar la producción.

1.4 Métodos enzimáticos.

La selectividad que proporcionan las enzimas es lo que hace realmente interesantes a estos métodos ya que evita etapas de separación y los convierte en métodos rápidos.

Las rutas enzimáticas de degradación de atropina pasan por una primera reacción de desesterificación con la Tropinaesterasa (TPase 3.1.1.10) para dar lugar al tropato y la tropina.

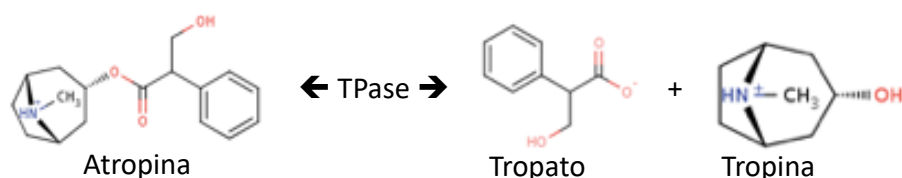


Figura 3: Desesterificación de la atropina

Posteriormente se produce la oxidación del grupo alcohol de la tropina a una cetona usando el NAD^+ como cofactor. La reacción de oxidación de la tropina se basa en la acción de la enzima Tropinona Reductasa I (TRase, 1.1.1.206).

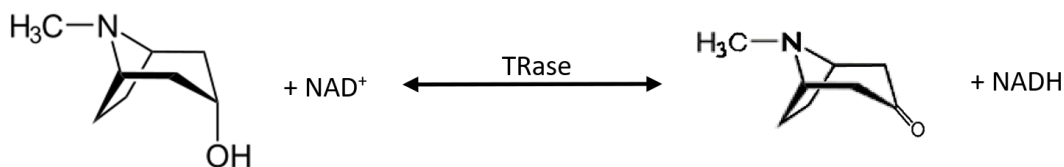


Figura 4: Reacción enzimática de la oxidación de tropina

Esta reacción se puede seguir espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 340 nm del NADH formado. Sin embargo, con el objetivo de avanzar hacia el desarrollo de sensores colorimétricos para atropina, en este trabajo se acopla una reacción indicadora colorimétrica.

Por tanto, la siguiente reacción enzimática que tiene lugar es la reducción del colorante, en nuestro caso idonitrotetrazoliumchloride (INT), que tiene lugar por medio de la enzima Diaforasa.

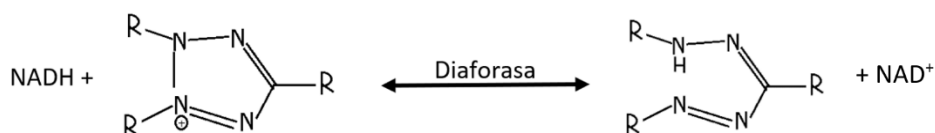


Figura 5: Reducción enzimática del colorante

El producto de la reacción de reducción del colorante es el formazán. Este compuesto presenta un máximo de absorbancia a 490 nm, por lo que la reacción se seguirá a esa longitud de onda.

Posee además el formazán un color rojizo en disolución que permitirá apreciar visualmente el transcurso de la reacción.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal es el desarrollo de un método colorimétrico para la determinación de alcaloides tropánicos, basado en el acoplamiento de una hidrólisis seguida de dos reacciones enzimáticas. Este proceso se muestra en la siguiente figura de forma esquemática:

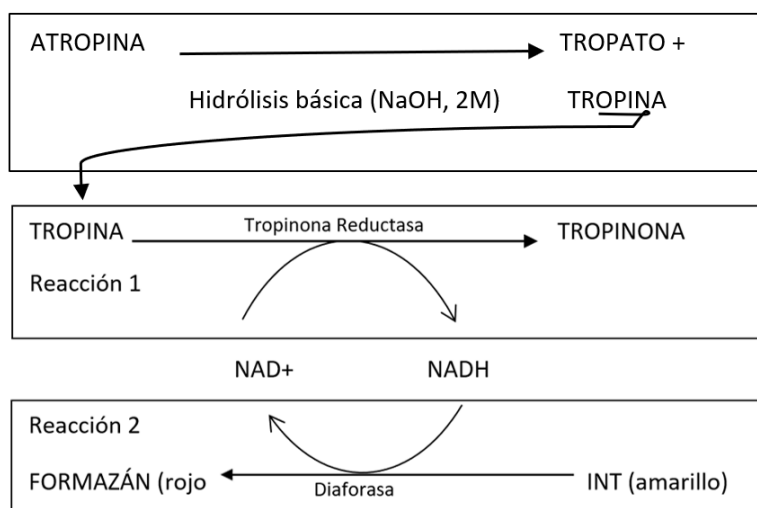


Figura 6: Mecanismo de la reacción global

En la primera reacción tiene lugar la hidrólisis básica de la molécula de atropina que da lugar a una molécula de tropato y a una de tropina.

En la segunda de las reacciones tiene lugar la oxidación de grupo -OH de la tropina obtenida de la hidrólisis, a una cetona mediante la enzima tropinona reductasa (T.Red), utilizando el NAD⁺ como cofactor.

La tercera es una reacción indicadora. En ella, por medio de la actuación de la enzima diaforasa, se oxida el NADH a NAD⁺, producido por la primera reacción. Para esto se reduce un colorante (INT), cuya forma reducida da lugar a un compuesto coloreado rojizo que se medirá por Espectrometría de Absorción Molecular Uv-Visible.

Los objetivos concretos son:

1. Estudio de la reacción de hidrólisis de la atropina
2. Estudio de la reacción enzimática en disolución de oxidación de la tropina, a partir de las propiedades espectroscópicas de NADH que resulta como producto.
3. Estudio de la reacción enzimática colorimétrica.
4. Estudio del acoplamiento de las reacciones.
5. Aplicación a una muestra real.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos y disoluciones.

- Disolución amortiguadora $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ 0,1M pH=9, pH=10 y pH=11. Se prepara disolviendo 0,53g de Na_2CO_3 (105,99g/mol) en 50mL de H_2O milliQ y ajustando el pH con una disolución HCl 1M.
- Disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=6, pH=7 y pH=8. Se prepara disolviendo 2,13 g de NaH_2PO_4 (120 g/mol) en 50 mL de H_2O miliQ y se ajusta el pH con una disolución de NaOH 2M.
- Tropinona Reductasa I (TRase, 1.1.1.206) de Gecco, 8,8 mg/mL.
- Colorante cloruro de Iodonitrotetrazolio (INT). Se prepara disolviendo 1 mg en 1 mL de H_2O miliQ.
- Diaforasa de D5540 de Sigma-Aldrich (Diaphorase from Clostridium kluyveri 5,6 U/mg). Se prepara disolviendo 2 mg en 1 mL de H_2O miliQ.
- β -Nicotinamidaadeninucleotidohidrato (NAD) de Sigma-Aldrich, 96,5%.
- β -Nicotinamidaadeninucleotidohidrato reduced (NADH) de Sigma-Aldrich, 96,5%.
- Tropina de Aldrich, 97%. Se prepara disolviendo en agua miliQ.
- Atropina de Sigma-Aldrich, 97%. Se prepara disolviendo en agua miliQ.

3.2 Instrumentación y material.

- Agitador magnético A-01, SBS.
- pH-metro CRISON, Basic 20, para la realización de las medidas del pH.
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión $\pm 0,01$ mg.
- Micropipetas de volumen variable: Socorex (5-50 μL , 10-100 μL y 100-1000 μL), Pipetman Gilson (2-20 μL , 50-200 μL y 200-1000 μL), Eppendorf Research plus (10-100 μL , 30-300 μL y 100-1000 μL).
- Material de vidrio: vidrio de reloj, matraces (10 y 25 mL), vasos de precipitados (50, 100 mL).
- Material desechable: cubetas de absorción, viales, tubos falcon, puntas de micropipeta, tubos eppendorf (0,5 mL, 2 mL), pipetas pasteur.
- Centrifuga eppendorf 5427 R.
- Baño Ultrasonidos P Selecta, Precistern
- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Agilent 8453A, con lámpara de deuterio, red de fotodiodos y rango de medida comprendido entre 190 y 1100 nm.

3.3 Procedimiento experimental.

3.3.1 Hidrólisis de la atropina

Para la hidrólisis se utiliza una disolución de hidróxido de sodio de concentración, $[\text{NaOH}] = 2 \text{ M}$, y se realiza en un volumen muy bajo, para no afectar al $\text{pH} = 10$, óptimo de la reacción de determinación. Se procede experimentalmente de la siguiente manera; se comienza con la adición de 20 microlitros de atropina a 20 microlitros de $\text{NaOH} 2\text{M}$, ahí comienza la hidrólisis. En un tiempo de reacción determinado, se para la reacción de hidrólisis añadiendo 960 microlitros de la disolución tampón a $\text{pH} = 10$.

Este mililitro de disolución resultante se transvasa a una cubeta de plástico y tras añadir la disolución tampón restante necesaria, se procede a adicionar los reactivos de la reacción necesarios.

3.3.2 Medidas por absorción molecular:

Todas las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción molecular ultravioleta visible que permite medidas cinéticas. Para preparar las disoluciones se utilizaron cubetas de plástico de 1 cm de paso óptico, y el volumen total utilizado en todas las disoluciones fue de $2000 \mu\text{L}$.

Las longitudes de onda utilizadas coinciden con los máximos de absorbancia del NADH y del colorante; 340 y 490 nm respectivamente.

Al utilizar el colorante, pasa a ser una reacción colorimétrica que es perceptible al ojo humano, ya que la disolución se torna rojiza con el aumento de concentración de NADH, que aumenta según aumente la concentración de tropina.



Figura 7: Cubetas en concentración creciente de Tropina

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de la reacción de la tropina a 340 nm

Esta primera reacción, ya se había comenzado a estudiar en el laboratorio del Grupo de Biosensores Analíticos midiendo a las longitudes de onda del máximo de absorción del NADH, 340 nm.

Para esta reacción se optimizará únicamente el pH y la temperatura. Las concentraciones usadas son las siguientes; $[\text{TRase}] = 1,1 \cdot 10^{-5} \text{ mg/mL}$, $[\text{NAD}] = 10^{-3} \text{ M}$. Es importante que la $[\text{NAD}]$ este en

exceso respecto de la [Tropina], nuestro analito, ya que así nos aseguramos de que reaccione al completo, ya que ayuda a desplazar el equilibrio de la reacción hacia los productos.

Las concentraciones indicadas son las presentes en las cubetas de medida.

4.1.1 Optimización del pH:

Con las condiciones establecidas se mide la eficacia de la enzima a pH=6, 7, 8, 9 y 10. Se comprueba experimentalmente que la reacción no tiene lugar a los pHs más ácidos, así que solo se muestran las curvas cinéticas de pH= 9 y 10.

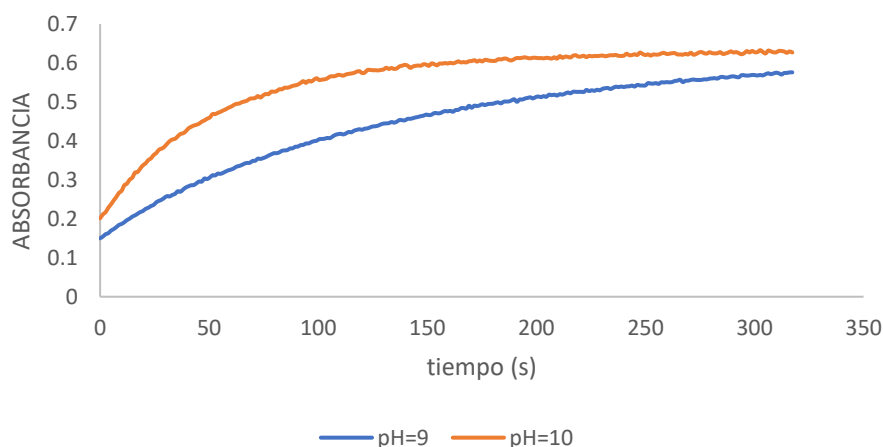


Figura 8: Variación de la sensibilidad de la reacción respecto del pH

Tras estos resultados, se establece como pH=10 el óptimo para la reacción ya que se alcanza la señal estable en un menor tiempo.

4.1.2 Optimización de la temperatura:

Se procede ahora a las medidas de la reacción variando la temperatura, desde 20°C hasta 50°C. Se estudia la temperatura ya que puede afectar a la cinética y la estabilidad estructural de las enzimas. Todas las medidas se realizaron con el pH ya optimizado y las condiciones nombradas anteriormente.

Experimentalmente se observa que a temperaturas iguales o mayores a 40°C la enzima se descompone dando una señal que no corresponde con la reacción de la tropina, por lo que solo se muestran en la gráfica los valores obtenidos a temperaturas más bajas.

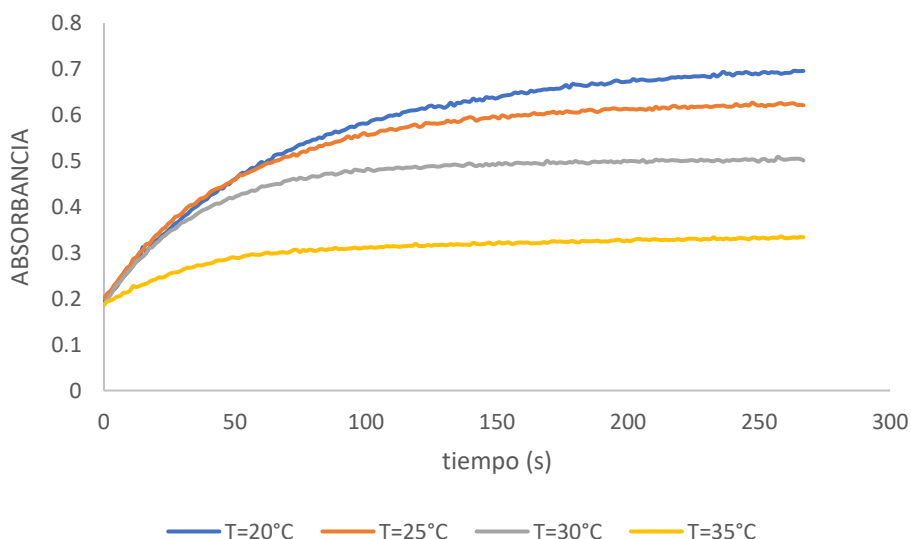


Figura 9: Variación de la señal de absorbancia respecto de la temperatura

Si se observa la gráfica, la mayor sensibilidad está en la $T=20^{\circ}\text{C}$, pero se escoge como temperatura óptima $T= 25^{\circ}\text{C}$, ya que es más estable.

4.1.3 Calibración de la reacción:

Tras optimizar la acidez del medio y la temperatura de reacción para obtener la máxima señal en un tiempo prudencial y con el mínimo gasto de reactivos, se realizó una calibración para estudiar el rango lineal.

Por tanto, se mantienen las condiciones establecidas en los apartados anteriores. Los valores de absorbancia se han obtenido de la diferencia del valor máximo en trescientos segundos de reacción y la línea base.

[Topina]	ABS
$3 \cdot 10^{-4}$ M	1.634
$1 \cdot 10^{-4}$ M	0.590
$6 \cdot 10^{-5}$ M	0.368
$3 \cdot 10^{-5}$ M	0.179
$1 \cdot 10^{-5}$ M	0.058
$6 \cdot 10^{-6}$ M	0.0327
$3 \cdot 10^{-6}$ M	0.0182

Tabla 1. Datos de [Topina] (M) y absorbancia de la recta de calibrado

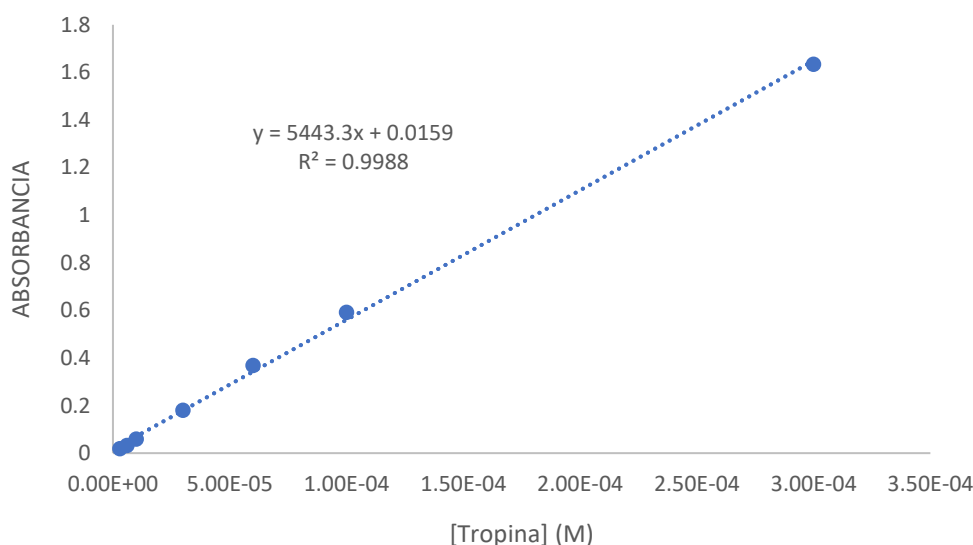


Figura 10: Recta de calibrado de la reacción de tropina a 340 nm

El rango de la recta de calibrado llega hasta $[\text{Topina}] = 3 \cdot 10^{-4}$ M, porque es el último punto que mantiene la linealidad. A concentraciones mayores la recta se curva.

4.1.4 Límite de detección y cuantificación:

Para el estudio de este apartado se preparan tres ensayos en blanco cuyas señales de absorbancia se muestran a continuación, y se ha obtenido la desviación estándar de sus señales.

El valor se ha obtenido mediante la diferencia del valor máximo alcanzado en un tiempo de reacción de 500 segundos y la línea base.

	ABS
Blanco1=	0.0091
Blanco2=	0.0057
Blanco3=	0.0102

DESVEST(Blanco)	0.0024
-----------------	--------

Tomando este resultado y el valor de la pendiente de la recta de calibrado se puede obtener el límite de detección como el triple del cociente de la desviación estándar de la señal del blanco y la pendiente de la recta. El límite de cuantificación se obtiene como diez veces ese mismo cociente:

LD=	$1,30 \cdot 10^{-6}$ M
LQ=	$4,34 \cdot 10^{-5}$ M

Con esto se puede disponer del rango lineal de la reacción las siguientes concentraciones de NADH; $4,34 \cdot 10^{-6} \rightarrow 3 \cdot 10^{-4}$ M.

4.1.5 Reproducibilidad:

Se muestran a continuación tres medidas en la misma concentración de tropina. El valor de absorbancia se ha obtenido de la diferencia de la señal máxima obtenida en un tiempo de reacción de 300 segundos y la línea base. Las condiciones de las medidas son las siguientes: [Tropina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M, [NAD]= 10^{-3} M, [T.Red]= $1,1 \cdot 10^{-5}$ mg/mL , pH=10 y T=25°C.

1	2	3
0,058	0,060	0,058

De estos valores se obtiene la siguiente desviación estándar relativa; **DSR= 2,03 %**.

4.2 Estudio de la reacción del colorante a 490 nm

Se comienza comprobando que la reacción establecida tiene lugar. Esta medida se realizó seis veces, bajo las siguientes condiciones; [NADH⁺]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [DIAF]=0,56 U/mL , [INT]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, pH=8 y T=25°C. Estas condiciones se mantienen en las próximas medidas hasta que se obtengan las condiciones óptimas en cada caso.

Todas estas medidas se realizaron a la longitud de onda de absorción del colorante, 490 nm, y las concentraciones que se nombran son las utilizadas en las cubetas de medida.

Se obtuvo una señal con el siguiente valor medio, ABS= 0,575 y con una desviación estándar s=0,030.

Tras esta medida se procedió a la optimización de parámetros.

4.2.1 Optimización del pH:

Las enzimas suelen ser muy sensibles a los cambios de acidez del medio, es por esto que se preparan distintas disoluciones amortiguadoras con distinto pH: disolución de HAc/Ac⁻ de pH=5, disoluciones de H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ de pH= 6, 7 y 8, disoluciones de CO₃²⁻/HCO₃⁻ de pH= 9 ,10, 11 y 12.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente gráfica:

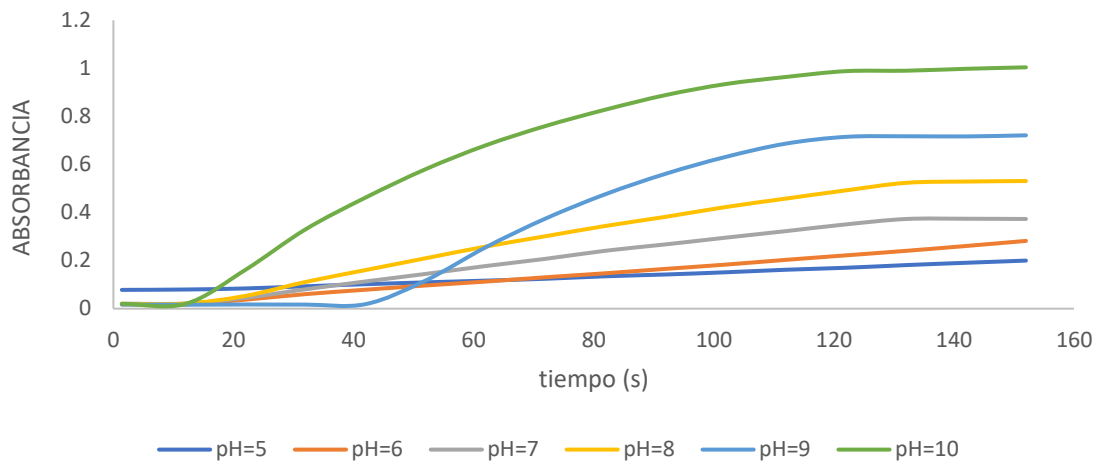


Figura 11: Variación de la señal de absorbancia de la reacción del colorante respecto del pH

A pH= 11 y 12 no ocurre la reacción, por lo que se entiende que la actividad de la diaforasa se pierde en medio tan básico.

Tras este estudio, se concluye que el pH óptimo de la reacción es pH=10, por proporcionar un mayor valor de la señal. Esto es muy conveniente, ya que el objetivo es acoplar la reacción de la tropina con esta, en consecuencia, se debería trabajar con la misma acidez de medio en ambas reacciones, por lo que siendo la misma, facilita el trabajo y producirá mejores resultados que trabajar con un pH intermedio para ambas.

4.2.2 Optimización de la temperatura:

Se procede ahora a las medidas de la reacción variando la temperatura, desde 25°C hasta 50°C, teniendo en cuenta que en las temperaturas altas la enzima puede descomponer dando distinta señal. Todas las medidas se realizaron con el pH=10 óptimo.

Los resultados se muestran en la siguiente figura:

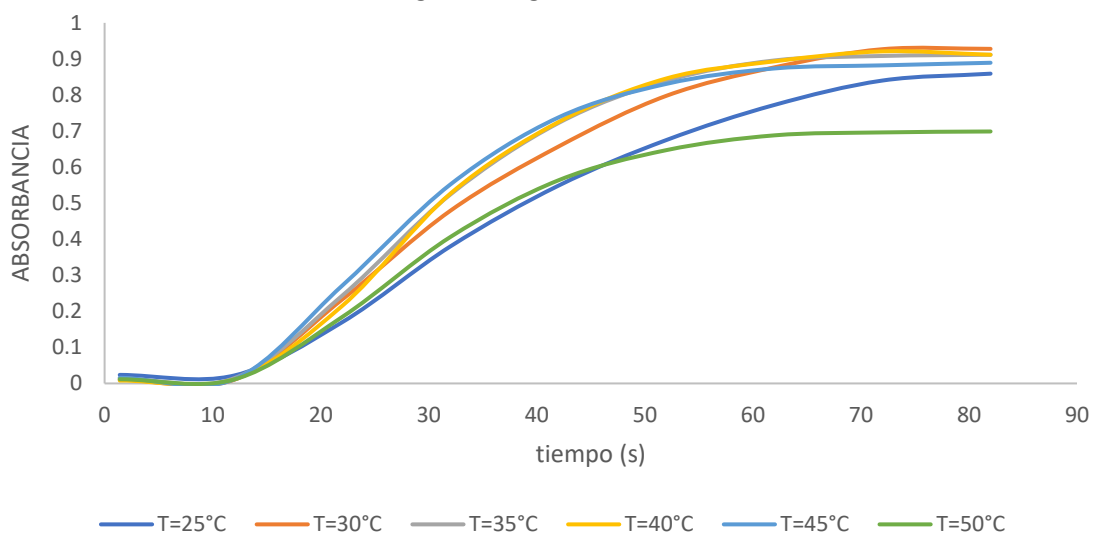


Figura 12: Variación de la señal de absorbancia respecto de la temperatura

Como se puede apreciar, no varía apenas la señal ni el tiempo de reacción, excepto en 50°C que disminuye. Por este motivo se escoge como temperatura óptima 25°C, dado que es más cómodo trabajar a temperatura ambiente.

4.2.3 Optimización de la concentración de diaforasa:

Tras estudiar el pH y la temperatura se varía la concentración de diaforasa para comparar los tiempos de reacción. Las medidas se realizan a pH=10, T=25°C y las medidas de absorbancia a 490 nm. Aquí se trata de estudiar la relación entre la concentración de enzima y la velocidad de reacción. La señal máxima no varía, al ser la diaforasa un catalizador, solo varía la velocidad.

Se muestran a continuación los resultados en los primeros 90 segundos.

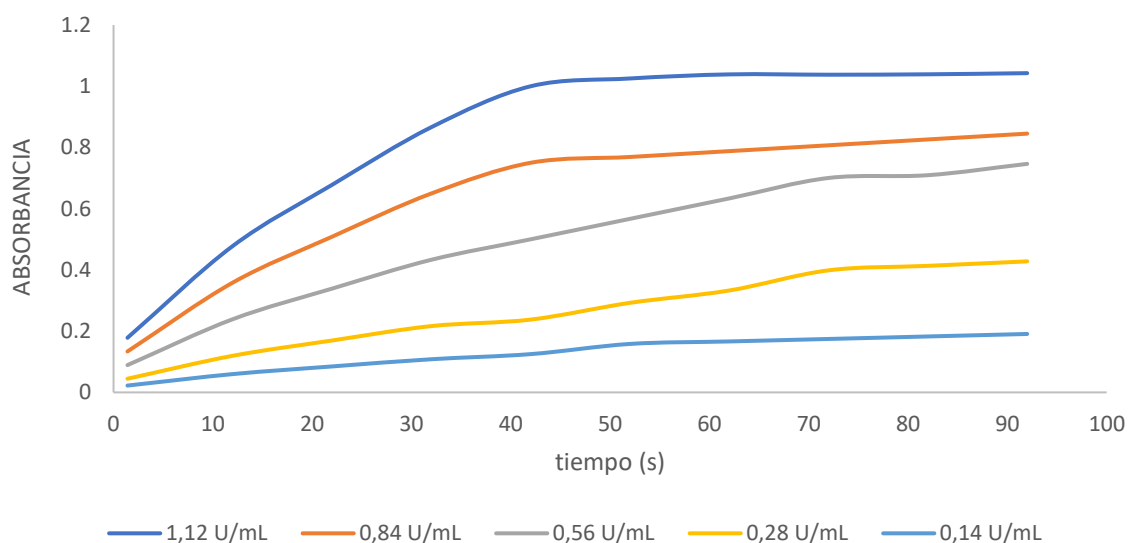


Figura 13: Variación de la señal de absorbancia de la reacción del colorante respecto a [DIAF]

En la gráfica se refleja como la velocidad de reacción a medida que aumente la [DIAF], ya que, en el mismo tiempo, de aproximadamente 90 segundos, la mayor [DIAF] nos proporciona el máximo de señal.

Dados estos datos se eligió como [DIAF]= 0,56 U/mL, ya que, aunque concentraciones mayores nos proporcionan la señal máxima más rápidamente, la señal obtenida es adecuada y supone un ahorro de reactivo.

4.2.4 Optimización de la concentración de colorante:

Se utilizan las condiciones óptimas establecidas anteriormente para las siguientes medidas, en las que se estudiará la variación de señal respecto del aumento o disminución de la concentración del colorante; [INT]. En este apartado se trata de establecer las relaciones entre la concentración de colorante y señal de absorbancia, ya que el colorante es un reactivo de la reacción y puede aumentar la absorbancia hasta un máximo. Nos interesa que la sensibilidad de la reacción sea la máxima posible para que disminuya los límites de detección y cuantificación.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente gráfica:

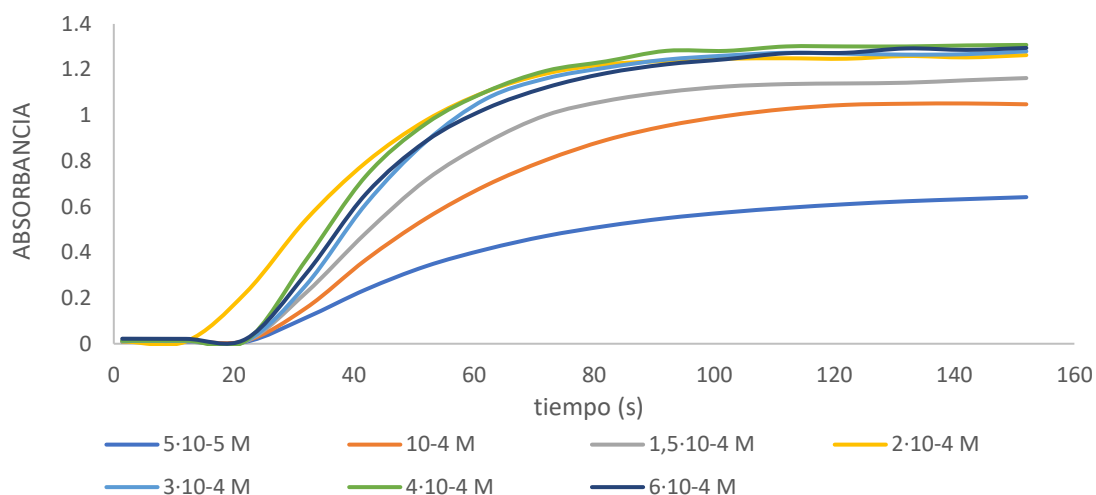


Figura 14: Variación de la señal de absorbancia de la reacción del colorante respecto a [INT]

Como se observa en la gráfica, a partir de [INT]= $2 \cdot 10^{-4}$ M se estabiliza la señal, por lo que esa será la concentración óptima, ya que nos permite la mayor sensibilidad con el menor gasto de colorante.

4.2.5 Calibración de la reacción

Tras optimizar todas las condiciones de la reacción para obtener la máxima señal en un tiempo prudencial y con el mínimo gasto de reactivos, toca realizar una calibración para estudiar el rango lineal.

Por tanto, se mantienen las condiciones establecidas en los apartados anteriores y se mide la absorbancia a 490 nm.

[NADH]	ABS
$1 \cdot 10^{-4}$ M	1.23
$6 \cdot 10^{-5}$ M	0.698
$3 \cdot 10^{-5}$ M	0.376
$1 \cdot 10^{-5}$ M	0.0859
$6 \cdot 10^{-6}$ M	0.046
$3 \cdot 10^{-6}$ M	0.0232

Tabla 2: Datos de [NADH] (M) y absorbancia de la recta de calibrado

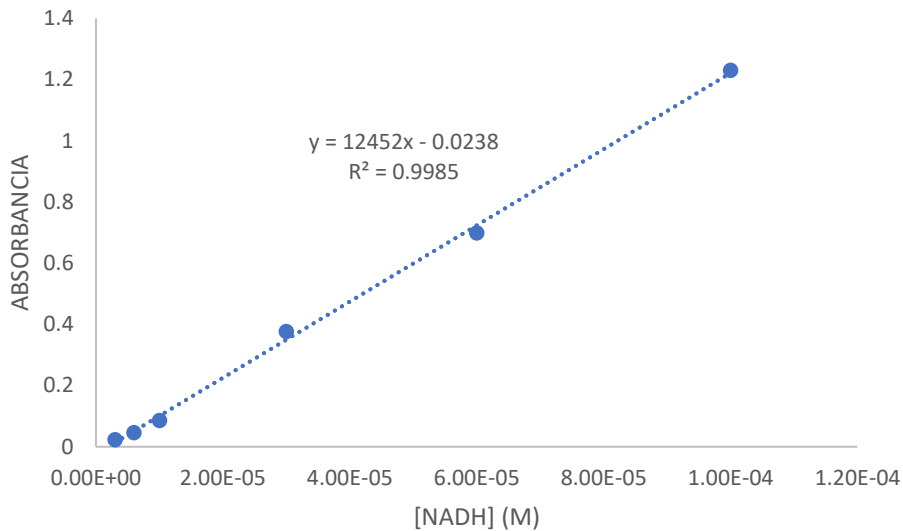


Figura 15 : Recta de calibrado de la reacción del colorante

En la figura se observa la recta de calibrado, únicamente con los puntos que entran dentro del rango lineal, siendo este desde el límite de cuantificación, que en apartados posteriores se establece.

4.2.6 Límite de detección y de cuantificación:

Para establecer el límite de detección se preparan tres ensayos en blanco cuyas señales de absorbancia se muestran a continuación, y se ha obtenido su desviación estándar. El valor se ha obtenido mediante la diferencia del valor máximo alcanzado en un tiempo de reacción de 500 segundos y la línea base.

	ABS	
Blanco1=	0.0035	DESVEST(Blanco) 0.0019
Blanco2=	0.0065	
Blanco3=	0.007	

Tomando este resultado y el valor de la pendiente de la recta de calibrado podemos obtener los límites de detección y cuantificación:

LD=	$4,57 \cdot 10^{-6}$ M
LQ=	$1,52 \cdot 10^{-5}$ M

Con esto se puede disponer del rango lineal de la reacción las siguientes concentraciones de NADH; $1,52 \cdot 10^{-5} \rightarrow 1 \cdot 10^{-4}$ M.

4.2.7 Reproducibilidad:

Para el ensayo de reproducibilidad se muestran a continuación tres medidas en la misma concentración de NADH+. El valor de absorbancia se ha obtenido de la diferencia de la señal máxima obtenida en un tiempo de reacción de 300 segundos y la línea base. Las condiciones de las medidas son las siguientes: [NADH]= $6 \cdot 10^{-5}$ M, [INT]= $2 \cdot 10^{-4}$ M, [DIAF]=0,56 U/mL, pH=10 y T=25°C.

1	2	3
0,731	0,708	0,655

De estos valores se obtiene la siguiente desviación estándar relativa; **DSR= 5,57 %**.

4.3 Estudio de la reacción de la tropina a 490 nm

Se comienza acoplando las dos reacciones, para comprobar que tiene lugar la reacción esperada. Para ello se coloca en las cubetas de plástico las siguientes concentraciones de reactivos en el orden indicado. $[NAD]= 10^{-3}$ M, $[T.Red]= 1,1 \cdot 10^{-5}$ mg/mL, $[INT]= 2 \cdot 10^{-4}$ M, $[DIAF]=0,56$ U/mL y todo esto en una disolución tamponada de carbonatos, que le permite mantener el pH=10. Con estos reactivos se mide la línea base, y tras esto se añade el analito, la tropina.

En este caso para probar únicamente el funcionamiento de la reacción, la concentración de analito utilizado será la siguiente; $[Tropina]= 1 \cdot 10^{-4}$ M.

El valor de absorbancia obtenido es $ABS= 1,257$; siendo esto el resultado de la diferencia del valor máximo obtenido en un tiempo de reacción de trescientos segundos y la línea base.

Sabiendo ahora que la reacción tiene lugar estudiaremos las dos enzimas, Diaforasa y Tropina reductasa, para ver el efecto que causan, y cuál de las dos es la que controla la cinética de la reacción.

4.3.1 Estudio de la diaforasa:

En este apartado se varía la concentración de la diaforasa, manteniendo todas las condiciones optimizadas, para ver si se experimenta algún cambio en la pendiente de la reacción. Esto puede ser posible, aunque ya se haya estudiado la relación de esta enzima, porque hay dos reacciones acopladas, y una de ellas será la etapa limitante que marque toda la cinética de la reacción.

Se muestran a continuación los resultados de reducir la $[DIAF]$ (U/mL) en un tiempo de reacción de 120 segundos.

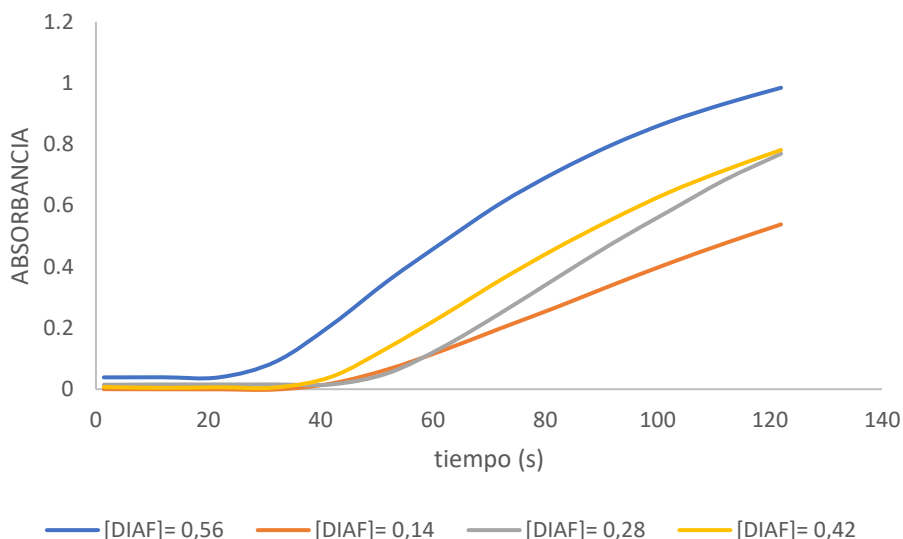


Figura 16: Variación de la señal de absorbancia respecto la $[DIAF]$ (U/mL) en las reacciones acopladas

Como se puede observar, al aumentar la concentración de diaforasa aumenta la pendiente de subida de la reacción.

Se realiza también un estudio de los puntos de concentración superiores a los usados habitualmente y se observa que no hay variación significativa, por lo que se asegura como concentración óptima la enzima; **[DIAF]= 0,56 U/mL**.

4.3.2 Estudio de la reductasa:

Pasamos ahora al estudio de la otra enzima; la Tropinona reductasa. Se mide un intervalo de concentraciones observando que no hay efecto en la cinética de la reacción con este cambio.

La variación con la concentración se muestra en la siguiente gráfica:

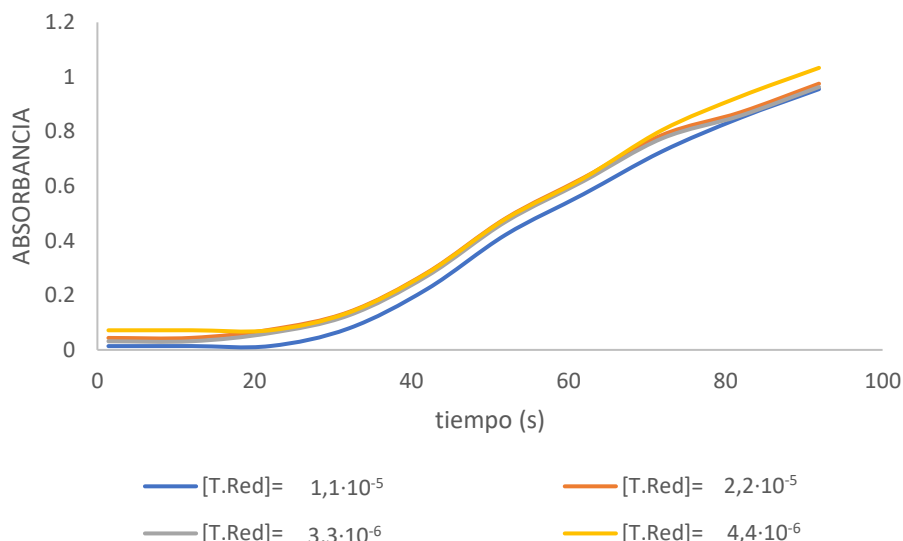


Figura 17: Variación de la señal de absorbancia frente a la variación de [T.Red] (mg/mL)

Como se puede apreciar en los datos obtenidos, no hay apenas variación de pendiente con el aumento de concentración. Por tanto, establecemos como concentración óptima de Tropina Reductasa; **[T.Red]= 1,1·10⁻⁵ mg/mL**.

4.3.3 Calibración

Ahora que quedan optimizadas todas las condiciones de las dos reacciones acopladas, se procede al estudio de la calibración, para establecer el rango lineal. Todas las medidas obtenidas de la recta se han medido bajo las condiciones optimizadas previamente; T=25°C, pH=10, [NAD⁺]=10⁻³ M, [T.Red]= 1,1·10⁻⁵ mg/mL, [INT]= 2·10⁻⁴ M, [DIAF]= 0,56 U/mL; y λ= 490 nm. Se miden las siguientes concentraciones de tropina obteniéndose las siguientes absorbancias; siendo esta la diferencia entre la señal máxima en un tiempo de 250 segundos y la línea base:

[Tropina]	ABS
5·10 ⁻³ M	1.880
6·10 ⁻⁴ M	1.876
3·10 ⁻⁴ M	1.875
1·10 ⁻⁴ M	1.227
6·10 ⁻⁵ M	0.672
3·10 ⁻⁵ M	0.321
1·10 ⁻⁵ M	0.090
6·10 ⁻⁶ M	0.054
3·10 ⁻⁶ M	0.026

Tabla 3: Datos de variación de [Tropina] (M) frente a absorbancia

La recta de calibrado obtenida se tumba radicalmente en los puntos altos, por lo que están fuera del rango lineal. Se usan criterios estadísticos para eliminar los tres puntos de mayor concentración, por lo que los datos y la gráfica resultan de la siguiente manera mostrada a continuación:

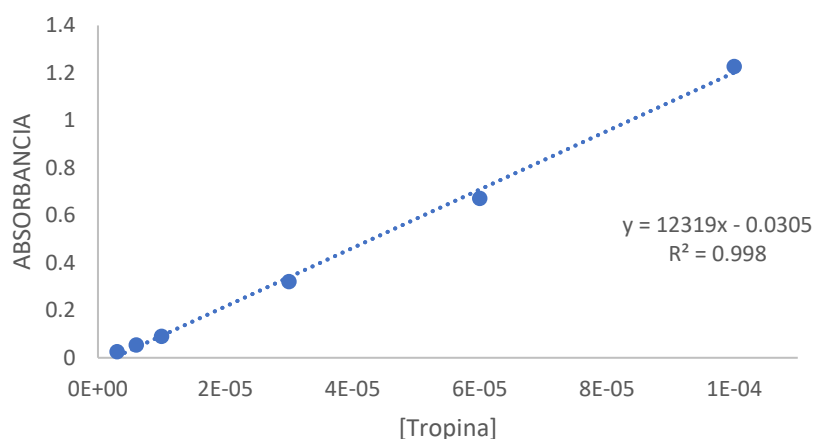


Figura 18: Recta de calibrado de la reacción global

Como se observa en la figura, el rango de la recta de calibrado llega hasta [Tropina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, porque es el último punto que mantiene la linealidad.

Como se puede observar la pendiente de la recta de calibrado, y por tanto la sensibilidad del método, es unas tres veces superior a la obtenida sin colorante.

4.3.4 Límite de detección y cuantificación:

Para este apartado se preparan cinco disoluciones de blanco, es decir, sin analito, con todas las condiciones optimizadas, y se mide la diferencia de la señal máxima durante 250 segundos, ya que es el tiempo de reacción, y la línea base. Tras obtener estos valores se calcula la desviación estándar.

	ABS
Blanco1=	0.0082
Blanco2=	0.0024
Blanco3=	0.002
Blanco4=	0.0021

$$\text{DESVEST(Blanco)} = 0.0029$$

Tomando el valor de desviación estándar obtenido y la pendiente de la recta de calibrado se calculan los límites de detección y cuantificación:

$$\begin{aligned} \text{LD} &= 7,10 \cdot 10^{-7} \text{ M} \\ \text{LQ} &= 2,37 \cdot 10^{-6} \text{ M} \end{aligned}$$

Con esto se dispone como rango lineal de la reacción global, las siguientes concentraciones de Tropina; $2,37 \cdot 10^{-6} \rightarrow 1 \cdot 10^{-4}$ M.

4.3.5 Reproducibilidad:

En este apartado se muestran cinco medidas en la misma concentración de tropina. El valor de absorbancia se ha obtenido de la diferencia de la señal máxima obtenida en un tiempo de reacción de 250 segundos y la línea base. Las condiciones de las medidas son las siguientes: [Tropina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M, T=25°C, pH=10, [NAD⁺]= 10^{-3} M, [T.Red]= $1,1 \cdot 10^{-5}$ mg/mL, [INT]= $2 \cdot 10^{-4}$ M, [DIAF]= 0,56 U/mL.

1	2	3	4	5
1.270	1.213	1.333	1.268	1,264

De los valores mostrados se obtiene la siguiente desviación estándar relativa; **DSR= 3,84 %**.

4.4 Estudio de la reacción de atropina

Ahora se acoplará la reacción anterior a la determinación de la atropina. Como se ha explicado en páginas anteriores, la atropina se puede descomponer en tropato y tropina. Esto puede suceder por dos mecanismos, una reacción enzimática de desesterificación por medio de la Tropinaesterasa (TPase 3.1.1.10) o por medio de una hidrólisis básica.

El estudio de esta reacción se realizó de forma paralela a este trabajo, llegando a la conclusión que la hidrólisis básica con NaOH 2M, era la opción más efectiva.

4.4.1 Optimización de la hidrólisis:

Se estudia la reacción con concentraciones de atropina conocida, con el fin de establecer que rendimiento tiene la hidrólisis y optimizar también el tiempo de esta.

Sabiendo ya como se prepara esta reacción procedemos a medir la absorbancia variando los tiempos de hidrólisis, desde un minuto hasta estabilización de la señal obtenida. Los resultados se muestran en la siguiente figura.

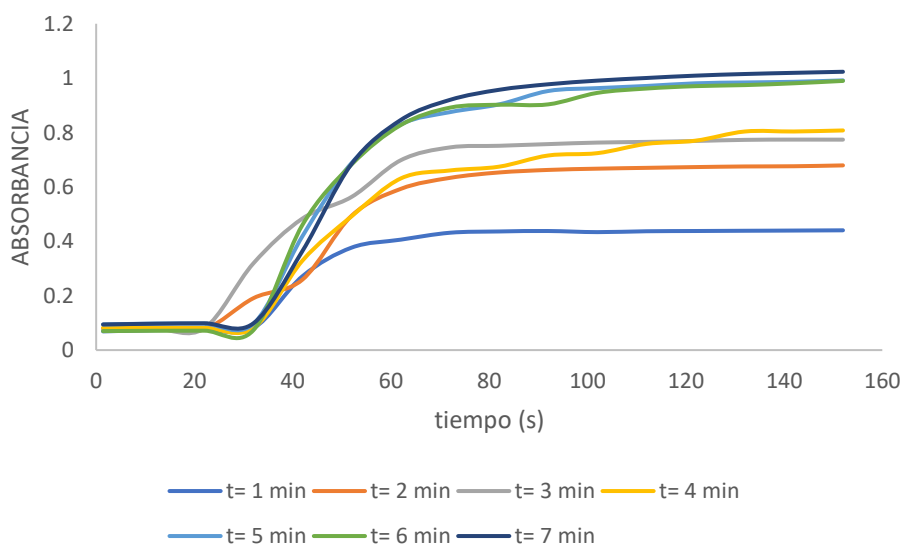


Figura 19: Variación de la señal de absorbancia respecto a la variación del tiempo de hidrólisis

Como se puede observar en la gráfica, en el mismo tiempo de reacción de 150 segundos se obtiene un aumento de absorbancia con el aumento del tiempo de hidrólisis, que se estabiliza

a partir de los cinco minutos de reacción. Por tanto, se establece como tiempo de hidrólisis óptimo, para una disolución de NaOH 2M es; **t(hidrólisis)= 5 minutos**.

4.4.2 Calibración de la reacción:

Optimizado en el apartado anterior el tiempo de hidrólisis, se procede ahora con la calibración de la reacción.

Realizamos seis medidas de concentración conocida de atropina, y se obtiene la siguiente recta de calibrado.

[Atropina]	ABS
$1 \cdot 10^{-4}$ M	1.138
$6 \cdot 10^{-5}$ M	0.654
$3 \cdot 10^{-5}$ M	0.359
$1 \cdot 10^{-5}$ M	0.122
$6 \cdot 10^{-6}$ M	0.0657
$3 \cdot 10^{-6}$ M	0.0331

Tabla 4: Datos de [Atropina] (M) y absorbancia de la recta de calibrado ajustada.

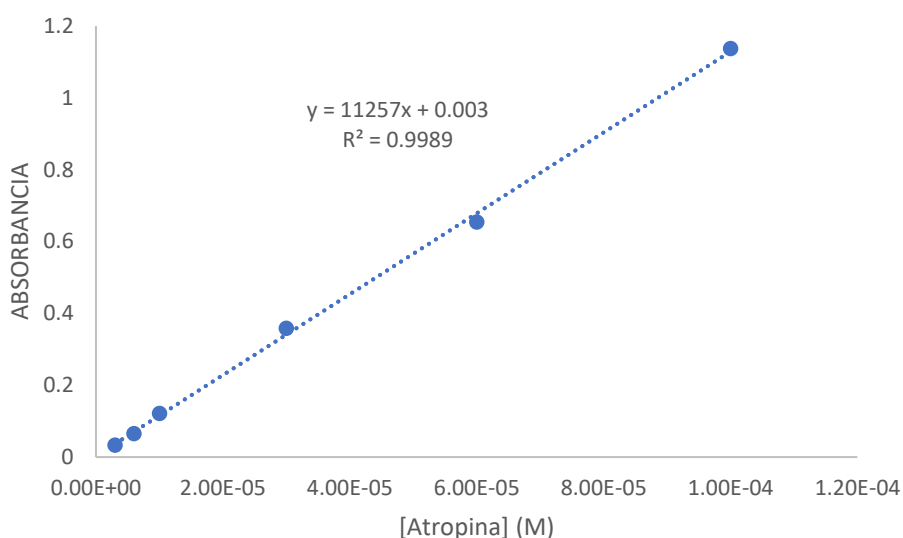


Figura 20: Recta de calibrado de la reacción global

Al observar la gráfica, se pueden concluir varios datos realmente relevantes:

- El rendimiento de la hidrólisis es del 100%, esto se observa al comparar las pendientes de las rectas. Esto resulta muy interesante ya que no hay pérdidas de la concentración original de atropina, por lo que, a la hora de medir las muestras, sabemos que no afectará la hidrólisis a la señal.
- Observando también el R^2 de la recta también podemos concluir que este método con reacción de hidrólisis es robusto, ya que todas las concentraciones han dado los resultados lineales esperados, a pesar de tener esta etapa previa, que podía haber afectado.

4.4.3 Reproducibilidad

Se realizan tres medidas para el estudio de la reproducibilidad.

Como se ha establecido anteriormente estas medidas son la diferencia entre la señal máxima obtenida en un tiempo de 250 segundos y la línea base. Las condiciones utilizadas son las óptimas establecidas anteriormente, añadiendo el tiempo de hidrólisis de cinco minutos. La concentración de atropina medida es; $[Atropina] = 1 \cdot 10^{-4} M$.

1	2	3
1.295	1.229	1.314

Con estos valores se obtiene la siguiente desviación estándar relativa, **DSR= 3,5%**.

4.4.4 Aplicación a una muestra real

Las muestras para el estudio han sido proporcionadas por el Laboratorio de Salud Pública, y han sido determinadas por un método validado. Estas provienen de cereales destinados a la alimentación infantil, y poseen una concentración de atropina menor o igual a $0,75 \mu g/kg$, que equivale a $6,63 \cdot 10^{-6} M$. Esta concentración, si tenemos en cuenta la dilución que realizamos para medir, es demasiado baja para el método desarrollado, por lo que se va a enfocar el estudio hacia un ensayo de recuperación.

Las muestras se doparán con concentraciones conocidas de atropina, y se interpolarán en la recta de calibrado obtenida.

4.4.5 **Ensayo de recuperación:**

Se preparan cuatro muestras con concentración creciente de atropina, y se obtienen las señales de absorbancia que se muestran a continuación.

	[Atropina] añadida	ABS
Muestra 1	$1 \cdot 10^{-5} M$	0.03654
Muestra 2	$3 \cdot 10^{-5} M$	0.1148
Muestra 3	$6 \cdot 10^{-5} M$	0.2542
Muestra 4	$1 \cdot 10^{-4} M$	0.4585

Tabla 5: Datos de [Atropina] (M) y absorbancia obtenida en la muestra

Según las absorbancias obtenidas los valores de concentración recuperados serían los de la tabla 6. Estos datos de concentración de atropina recuperada han sido obtenidos al interpolar las absorbancias en la recta de calibrado de la atropina.

Ahora para obtener la recuperación, se dividen estas concentraciones entre las reales y se multiplica por 100. Los resultados se muestran en la tabla 6.

	[Atropina] añadida	[Atropina] recuperada	% recuperación
Muestra 1	$1 \cdot 10^{-5} M$	$2,98 \cdot 10^{-6} M$	30%
Muestra 2	$3 \cdot 10^{-5} M$	$9,93 \cdot 10^{-6} M$	33%
Muestra 3	$6 \cdot 10^{-5} M$	$2,23 \cdot 10^{-5} M$	37%
Muestra 4	$1 \cdot 10^{-4} M$	$4,05 \cdot 10^{-5} M$	39%

Tabla 6: Datos de [Atropina] recuperada(M) y % de recuperación

Como se puede observar, el tanto por ciento de recuperación es bastante bajo. La media de los valores obtenidos es del 35%. Este valor de recuperación solo es aplicable a las muestras que provengan de cereales destinados a la alimentación infantil, ya que, si cambiamos de matriz, la recuperación podría variar.

Los resultados también indican que parece haber un importante efecto matriz de la muestra en la determinación.

Este efecto puede ser sobre la reacción de hidrólisis (disminuyendo el rendimiento) o en las reacciones enzimáticas posteriores de determinación de la tropina formada (disminuyendo las señales obtenidas). Para comprobarlo se debería estudiar cada reacción enzimática en presencia de la matriz, pero no se disponía de más muestra por lo que es un estudio que queda pendiente.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se aborda la determinación enzimática de alcaloides tropánicos. Se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. La determinación de Tropina se puede llevar a cabo mediante la reacción con la Tropina Reductasa a partir de las propiedades espectroscópicas del NADH, utilizado como cofactor, por espectrometría absorción molecular ultravioleta visible midiendo a 340 nm.
2. Las condiciones óptimas de esta determinación son; pH=10, T= 20°C, [T.Red]= $1,1 \cdot 10^{-5}$ mg/mL, [NAD]= 10^{-3} M.
3. La reacción enzimática de Diaforasa con el colorante (INT), usando el NADH como cofactor, es posible acoplarla a la reacción de determinación de la tropina y aumentar la sensibilidad, y disminuir los límites de detección y cuantificación.
4. Las condiciones óptimas de estas reacciones acopladas son; pH=10, T= 25°C, [T.Red]= $1,1 \cdot 10^{-5}$ mg/mL, [NAD]= 10^{-3} M, [INT]= $2 \cdot 10^{-4}$ M, [DIAF]=0,56 U/mL. Estableciendo el siguiente rango lineal de determinación; [Tropina]= $2,36 \cdot 10^{-6}$ → [Tropina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M.
5. Para acoplar la determinación de Atropina a la reacción de determinación, es necesario realizar una hidrólisis básica con NaOH 2M. El tiempo óptimo de hidrólisis es de 5 minutos, y la hidrólisis tiene un 100% de rendimiento.
6. La muestra de cereales destinados a la alimentación infantil tiene un importante efecto matriz que produce una recuperación promedio del 35 %.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. Christen, Tropane alkaloids: old drugs used in modern medicine, in: *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 2000: pp. 717–749. doi:10.1016/S1572-5995(00)80038-1.
- [2] A. Gurib-Fakim, Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Mol. Aspects Med.* 27 (2006) 1–93. doi:10.1016/j.mam.2005.07.008.
- [3] R. Willstätter, Ueber die Umwandlung von Tropicidin in Tropin, *Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft.* 35 (1902) 1870–1870. doi:10.1002/cber.190203502124
- [4] K.P.S. Khalsa, Low dose herbs, *J. Herb. Pharmacother.* 7 (2007) 87–98. doi:10.1080/J157v07n01_08.
- [5] EFSA, Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed, *EFSA J.* 2013. 11 (2013) 3386; 1-113. doi:10.2903/j.efsa.
- [6] I.I. Koleva, T.A. van Beek, A.E.M.F. Soffers, B. Dusemund, I.M.C.M. Rietjens, Alkaloids in the human food chain - natural occurrence and possible adverse effects, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 30–52. doi:10.1002/mnfr.201100165.
- [7] J. Alexander, D. Benford, A. Cockburn, J. Cravedi, E. Dogliotti, A. Di Domenico, M.L. Fernández-Cruz, P. Fürst, J. Fink-gremmels, C. Lodovico Galli, P. Grandjean, J. Gzyl, G. Heinemeyer, N. Johansson, A. Mutti, J. Schlatter, R. van Leeuwen, C. van Peteghem, P. Verger, Tropane alkaloids (from *Datura* sp.) as undesirable substances in animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, *EFSA J.* 691 (2008) 1–55. doi:10.2903/j.efsa.2008.691.
- [8] P. Adamse, H.P. van Egmond, M.Y. Noordam, P.P.J. Mulder, M. De Nijs, Tropane alkaloids in food: Poisoning incidents, *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods.* 6 (2014) 15–24. doi:10.3920/QAS2013.0314.
- [9] Z. Jandrić, M.N. Rathor, J. Švarc-Gajić, B.M. Maestroni, J.J. Sasanya, R. Djurica, A. Cannavan, Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of tropane alkaloids and glycoalkaloids in crops, *Food Addit. Contam. Part A.* 28 (2011) 1205–1219. doi:10.1080/19440049.2011.584908
- [10] Comisión Europea, Reglamento (CE) No 1881/2006 de la Comisión, *D. Of. La Unión Eur.* (2006) 5–24. doi:10.2903/j.efsa.2010.1573.
- [11] Parlamento Europeo y Consejo, Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, *D. Of. Las Comunidades Eur.* (2002) 10–21.
- [12] Comisión Europea, Reglamento (UE) No 37/2010 de la Comisión, (2010) 1–72.
- [13] Chen, HX, Chen, Y., Du, P. et al. LC-MS para la identificación y elucidación de la estructura de metabolitos de atropina in vivo e in vitro. *Croma* 65, 413–418 (2007). <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0187-9>.
- [14] Romera Torres, Ana Estudio de la presencia de alcaloides tropánicos y calisteginas en alimentos y piensos, Universidad de Almería, 2019.