



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Estudio de un método espectrofotométrico para la determinación de aminas biógenas (diaminas) basado en su reacción enzimática con Putrescina Oxidasa y en la generación de nanopartículas de oro como método indicador

Autora

**Paula Calavia Vicente**

Director

**Javier Galbán Bernal**

Facultad de Ciencias  
2022



## **Resumen**

Con este trabajo se pretende desarrollar un método enzimático para la determinación rápida y específica de la amina biógena putrescina basado en su reacción enzimática con Putrescina Oxidasa y en la generación de nanopartículas de oro como método indicador.

En primer lugar, se realiza la optimización de las condiciones de reacción; el pH al que se lleva a cabo la reacción, la temperatura, las concentraciones tanto de enzima como de Au (III) y el efecto de la concentración y/o fuerza iónica de la disolución amortiguadora. Tras la optimización, se obtienen parámetros analíticos como la incertidumbre que proporcionan el equipo y la reacción.

Para estos estudios se tienen en cuenta tanto la procedencia de la señal, como el procedimiento de formación de las nanopartículas por coalescencia de los nanoclusters de oro, estudiados por fluorescencia.

Se prepara una calibración para la determinación de putrescina a 60°C, sobre una disolución amortiguadora de fosfatos a pH=7,5 y 0,1M, con una concentración  $3,57 \cdot 10^{-7}$  M de PutOx y  $1 \cdot 10^{-3}$  M de Au (III). En esta calibración se obtiene un polinomio cuadrático con un rango de trabajo desde  $1 \cdot 10^{-4}$  M, hasta  $8,5 \cdot 10^{-4}$  M y una DSR% de 4,3% ([Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M, n=6).

La combinación de la reacción con oro y otros metales como Platino o Paladio, no consiguió mejorar los resultados.

Finalmente, se estudia el efecto de las interferencias de aminas biógenas similares al analito como son: cadaverina, histamina y tiramina.

## **Abstract**

This work aims to develop an enzymatic method for the rapid and specific determination of the biogenic amine putrescine based on its enzymatic reaction with Putrescine Oxidase and on the generation of gold nanoparticles as an indicator method.

First, the optimization of the reaction conditions is performed; the pH at which the reaction takes place, the temperature, the concentrations of both enzyme and Au (III) and the effect of the concentration and/or ionic force of the buffer solution. After optimization, analytical parameters such as the uncertainty provided by the equipment and the reaction are obtained.

These studies take into account both the origin of the signal and the process of formation of nanoparticles by coalescence of gold nanoclusters, studied by fluorescence.

A calibration is prepared for the determination of putrescine at 60 °C, on a buffer solution of phosphates at pH=7,5 and 0,1M, with a concentration of  $3,57 \cdot 10^{-7}$  M PutOx and  $1 \cdot 10^{-3}$  M Au (III). In this calibration a quadratic polynomial is obtained with a working range from  $1 \cdot 10^{-4}$  M, to  $8,5 \cdot 10^{-4}$  M and a DSR% of 4,3% ( $[Put]=5 \cdot 10^{-4}$  M, n=6).

Combining the reaction with gold and other metals such as platinum or palladium did not improve the results.

Finally, the effect of interferences of biogenic amines similar to the analyte, such as cadaverine, histamine and tyramine, is studied.

# Índice

1.- Introducción.....	1
1.1.- Determinación de aminas biógenas .....	1
1.2.- Reacción de Au (III) con putrescina. Formación de nanopartículas de oro .....	2
2.- Objetivos y planteamiento.....	2
3.- Parte experimental.....	4
3.1.- Reactivos y disoluciones .....	4
3.2.- Instrumentación y material.....	4
3.2.1.- Instrumentos .....	4
3.2.2.- Material y aparatos .....	5
3.3.- Procedimientos experimentales .....	5
3.3.1.- Procedimiento de medida .....	5
3.3.2.- Síntesis del producto de la reacción .....	6
4.- Resultados y discusión .....	6
4.1.- Método .....	6
4.2.- Optimización.....	7
4.2.1.- Optimización del pH .....	7
4.2.2.- Optimización de la temperatura.....	8
4.2.3.- Optimización de la concentración de enzima PutOx .....	8
4.2.4.- Optimización de la concentración de Au (III) .....	10
4.2.5.- Optimización de la concentración de la disolución amortiguadora/fuerza iónica .....	10
4.3.- Incertidumbre.....	12
4.4.- Estudio del origen de la señal .....	14
4.5.- Estudio de la señal con otros metales .....	15
4.5.1.- Estudio con Platino (II) .....	15
4.5.2.- Estudio con Paladio (II).....	16
4.6.- Calibración .....	16
4.7.- Estudio de la formación de nanopartículas de oro .....	18
4.8.- Interferencias .....	19
4.8.1.- Estudio con Au (III) .....	19
4.8.2.- Estudio con Paladio (II).....	20
5.- Conclusiones .....	22
6.- Bibliografía.....	23
ANEXOS .....	25
Anexo I: Incertidumbre.....	25
Anexo II: Estudio del origen de la señal .....	27



## 1.- Introducción

Las aminas biógenas (AB) son bases orgánicas nitrogenadas de bajo peso molecular, se pueden encontrar en alimentos fermentados. Las AB se obtienen por descarboxilación de aminoácidos o por transaminación de aldehídos y cetonas. En función de su procedencia, se clasifican en endógenas o exógenas. Endógenas son aquellas que provienen de la degradación de moléculas biológicas en las células durante los procesos metabólicos, y exógenas son las que se ingieren a través de la dieta<sup>1</sup>.

La presencia de estas AB es esencial para desarrollar funciones fisiológicas, por eso normalmente se encuentran en el organismo en bajas concentraciones. En pequeñas cantidades pueden ser eliminadas enzimáticamente por la acción de aminas oxidasas presentes en el intestino, pero si se encuentran a concentraciones altas es más complicado eliminarlas, lo cual supone graves problemas de salud.

Entre las aminas biógenas más comunes se encuentran:

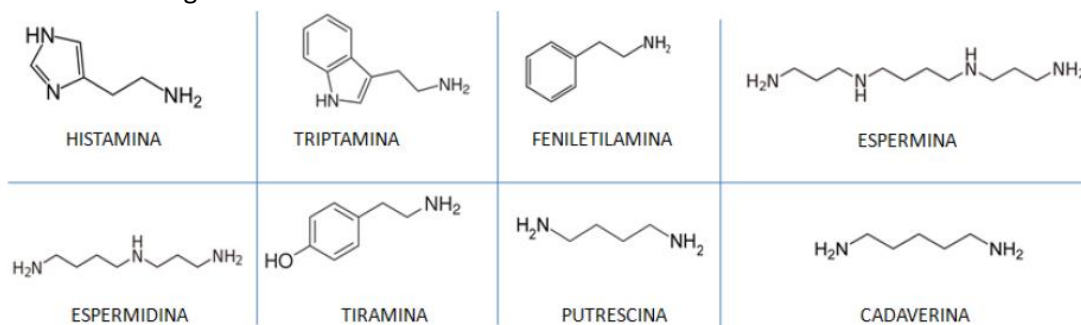


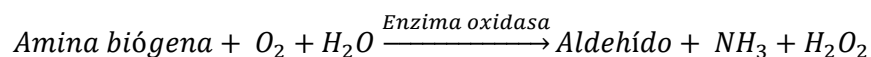
Figura 1.- Estructura química de las aminas biógenas de mayor presencia en alimentos

A pesar de que la histamina es la amina biógena con mayor toxicidad dada su propensión a reaccionar con nitritos dando lugar a nitrosaminas cancerígenas<sup>2</sup>; hay estudios que han demostrado que otras AB como la putrescina (principal analito de este trabajo), son capaces de aumentar su toxicidad, de ahí la importancia de su determinación.

### 1.1.- Determinación de aminas biógenas

Existen diferentes métodos para la determinación de aminas biógenas. Los más utilizados para su separación y cuantificación se basan en métodos analíticos cromatográficos, principalmente en HPLC de fase reversa. Actualmente están surgiendo varias alternativas más rápidas y económicas como son los biosensores.

Estos biosensores se fundamentan en la reacción de oxidación del  $H_2O_2$  obtenido previamente en la reacción de oxidación de la amina biógena mediante enzimas oxidasas.<sup>3</sup>



Existen distintas enzimas oxidasas en función del tipo de amina cuya oxidación catalizan. Algunas de ellas catalizan la oxidación de un analito determinado como es el caso de la Putrescina Oxidasa (PutOx) con la putrescina, hecho que se va a estudiar en este trabajo.<sup>4</sup> Mientras que hay otras como la Tiramina Oxidasa (TAO) o la Diamina Oxidasa (DAO), similares a la PutOx, que son menos específicas y oxidan a todas las aminas biógenas con más de un grupo amino en su estructura química.

## **1.2.- Reacción de Au (III) con putrescina. Formación de nanopartículas de oro**

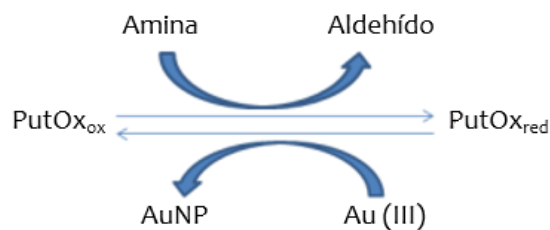
La incorporación de nanoestructuras metálicas, ha abierto nuevas líneas de investigación en las determinaciones ópticas enzimáticas, lo que permitiría simplificar la metodología existente (HPLC) abaratando su coste y la disminución del tiempo de análisis. De entre todos los metales, destaca el uso de nanomateriales de oro, cuya rápida expansión<sup>5</sup> se debe a la versatilidad química de superficie y a las excelentes propiedades ópticas y fisicoquímicas que ofrecen, fácilmente modificables a través de su tamaño y forma<sup>6</sup>.

Entre las nanoestructuras de oro se puede diferenciar entre; nanopartículas (entre 20 y 50 nm) que presentan absorción molecular debido a la resonancia de plasmón superficial longitudinal (LSPR) y/o nanoclusters (2-5 nm) con propiedades de fluorescencia en la zona del Vis-NIR.

Las nanopartículas que se forman como resultado de la reacción que se estudia en este trabajo presentan una coloración rosácea oscura en disolución. Este fenómeno se debe a que, al incidir luz visible sobre las mismas, la luz de una longitud de onda resonante es absorbida por las nanopartículas e induce la oscilación de electrones de superficie, lo que se denomina "plasmón de superficie".<sup>7</sup> Esta absorción puede ser determinada por espectroscopía UV-vis, por lo que las AuNPs podrían ser utilizadas como nanosensores para la detección de putrescina.<sup>8</sup>

Las nanopartículas de oro se han sintetizado utilizando diferentes métodos, aunque el más extendido es la reducción de  $\text{HAuCl}_4$  utilizando citrato de sodio como agente reductor. Pero en las últimas décadas se ha demostrado que se pueden usar ciertas aminas biógenas como agentes reductores para la formación de AuNPs.<sup>9</sup>

En el grupo de investigación, se ha estudiado que la tiramina con Au (III) a través de la enzima DAO<sup>10</sup> es capaz de generar AuNPs así que, en este trabajo se comprueba si la enzima PutOx también es capaz de formarlas con putrescina.



*Figura 2.- Oxidación enzimática de la putrescina catalizada por la Putrescina Oxidasa*

## **2.- Objetivos y planteamiento**

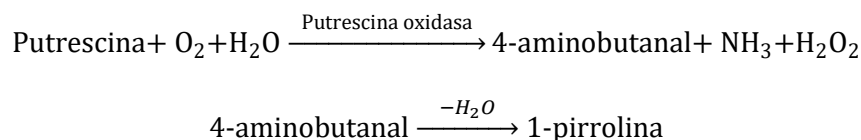
El objetivo de este trabajo es desarrollar un método enzimático que permita la determinación de putrescina a través de la formación de nanopartículas de oro mediante su oxidación catalizada por la enzima Putrescina Oxidasa.

La Putrescina Oxidasa es una enzima amino oxidasa que hasta hace poco tiempo no era comercial, pero a día de hoy se puede adquirir a través de la empresa de biotecnología Groningen Enzyme & Cofactor Collection "Gecco". Lo que diferencia a esta enzima, de otras aminas oxidasas estudiadas, es su selectividad por el analito, putrescina.<sup>4</sup>



Por ello en este trabajo se va a utilizar esta enzima para desarrollar un método enzimático basado en la formación de nanopartículas de oro, selectivo para putrescina. Uno de los principales objetivos será comprobar que esta reacción tiene lugar y optimizar las prestaciones analíticas del método.

La reacción enzimática que tiene lugar es la siguiente:



El producto final de la desaminación oxidativa es 1-pirrolina. Inicialmente se forma el aldehído (4-aminobutanal), quien sufre una ciclación intramolecular mediante el ataque interno del grupo amino al carbono del aldehído, que conlleva la eliminación de una molécula de agua, para dar lugar al producto.<sup>11</sup>

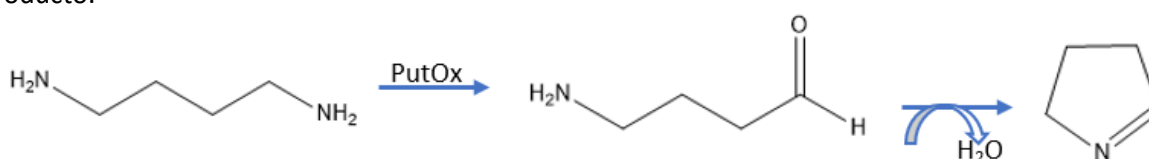


Figura 3.- Esquema de los productos de la reacción entre la PutOx y la putrescina

Los objetivos específicos del trabajo se estructuran de la siguiente forma:

1. Consulta de material bibliográfico y artículos sobre la situación de la temática estudiada.
2. Comprender el funcionamiento y aprender el correcto manejo 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.
4. Estudiar los parámetros de la reacción enzimática de putrescina con la enzima PutOx.
5. Estudiar y optimizar los parámetros de la generación de nanopartículas de oro a través de la reacción de putrescina con la enzima PutOx y Au (III), observando este fenómeno por absorción.
6. Preparar una calibración para dicha reacción a partir de distintas disoluciones de una disolución preparada de putrescina y calcular los parámetros analíticos asociados al método.
7. Estudio de interferencias por parte de las aminas biógenas: cadaverina, histamina y tiramina.
8. Extraer la información analítica de los datos obtenidos en el laboratorio, llevando a cabo los tratamientos de datos necesarios.

### **3.- Parte experimental**

#### **3.1.- Reactivos y disoluciones**

- Disoluciones amortiguadoras  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  de pH 7,5 de concentraciones 0,1 M y 0,3 M preparadas disolviendo aproximadamente 3,5g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Panreac 131679.1211) en un volumen también aproximado de 250 mL de agua miliQ. Se ajusta el pH con disoluciones de HCl y NaOH 1 y 5 M.
- Disolución de Au (III) (50 mM): preparada a partir de  $\text{HAuCl}_4$  sólido y disuelto en agua MilliQ.
- Disolución de Paladio (II) (50 mM): preparada disolviendo acetato de Pd (II) (Sigma CAS 3375-31-3) en HCl 2M.
- Disolución de Platino (II) (50 mM): preparada disolviendo  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  (Sigma, CAS: 10025-99-7) en agua Mili-Q.
- Disolución de Rodamina B de concentración  $1,5 \cdot 10^{-6}$  M
- Enzima Putrescina Oxidasa (PutOx; EC 1.4.3.10) (Gecco, 50  $\mu\text{M}$  en 1mL)
- Enzima Diamina Oxidasa (DAO; EC 1.4.3.22) (Molirom P021, 280 U/mL)
- Para preparar cada una de las disoluciones de aminas biógenas: se pesa una masa exacta y se disuelve en un volumen determinado de agua MilliQ. A partir de estas disoluciones, se hacen las diluciones necesarias para obtener las concentraciones deseadas. Se pesan aproximadamente 5 mg y se llevan a un volumen de 1,5 mL, de forma que las concentraciones que se obtienen son del orden  $10^{-2}$ M.
  - Putrescina (Putrescine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich P7505) 98% pureza.
  - Tiramina (Tyramine hydrochloride) (Sigma-Aldrich 53300) 98 % pureza.
  - Cadaverina (Cadaverine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich C8561) 98% pureza.
  - Histamina (Histamine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich 53300) 99% pureza.

#### **3.2.- Instrumentación y material**

##### **3.2.1.- Instrumentos**

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis HP8453 (Agilent) y Specord 210 Plus (Jena).

Para llevar a cabo las medidas de absorción en el equipo Specord 210 Plus hay que configurar los parámetros de medida del espectrofotómetro. En este caso van a ser:

- Modo: barrido espectral, velocidad 50.
- Accesorios, se selecciona el número de cubetas que se van a medir, ya que el equipo es capaz de medir 8 cubetas a la vez.

- Fluorímetro Cary Eclipse (Agilent)
- Sensor de oxígeno por fluorescencia (Ocean Optics)
- pH-metro CRISON, Basic 20.
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión  $\pm 0,01$  mg.

### **3.2.2.- Material y aparatos**

- Micropipetas Socorex de varios volúmenes.
- Material desechable: puntas de micropipetas, Eppendorf, pipetas Pasteur, tubos Falcon, cubetas de bajo volumen (1 cm paso óptico).
- Agitador magnético A-01, SBS
- Centrifuga LOCH (Bunsen)
- Tubos de centrifuga con filtro, Amicon Ultra – 4 ml (UltraCell - 10K Membrane), Millipore (UFC801024)
- Cubetas de cuarzo y vidrio, ambas con 1 cm de paso óptico (Hellma®)
- Tiras reactivas para la determinación semicuantitativa de peróxido de hidrógeno (Quantofix 913 19).

## **3.3.- Procedimientos experimentales**

### **3.3.1.- Procedimiento de medida**

Antes de realizar cada medida, se hace un blanco con la disolución amortiguadora correspondiente (generalmente fosfatos pH=7,5).

Para cada medida se añaden en la cubeta, sobre la disolución amortiguadora, los reactivos necesarios en el siguiente orden: primero se añade la enzima PutOx en concentración  $3,57 \cdot 10^{-7}$  M, se espera un minuto, se añade el analito, en este caso putrescina, en la concentración correspondiente en cada experimento (normalmente  $5 \cdot 10^{-4}$  M), y tras esperar cinco minutos se añade la disolución de Au (III)  $1 \cdot 10^{-3}$  M; a partir de ese momento se toman medidas cada 5 minutos durante aproximadamente tres horas, tiempo a optimizar en este trabajo.

Cuando concluye el tiempo de reacción, se procesan las medidas obtenidas. El resultado, son barridos espectrales de absorción desde 400 nm a 900 nm. Para convertir estos resultados en registros cinéticos, se representan las medidas de absorción a la longitud de onda de absorción máxima, 560 nm, se corrigen restando las de 800 nm, y se representan estos valores frente al tiempo. Esta diferencia se realiza para normalizar los espectros, de manera que a la longitud de onda 800 nm la absorbancia sea nula. Se resta esta longitud de onda (800 nm) y no otra, debido a que el rango óptico del material con el que está hecho la cubeta es de 400 a 800 nm.

Según el estudio, por ejemplo, en la calibración, a la longitud de onda máxima se toman los valores de absorción a los 30 minutos (o a diferentes tiempos según el caso).

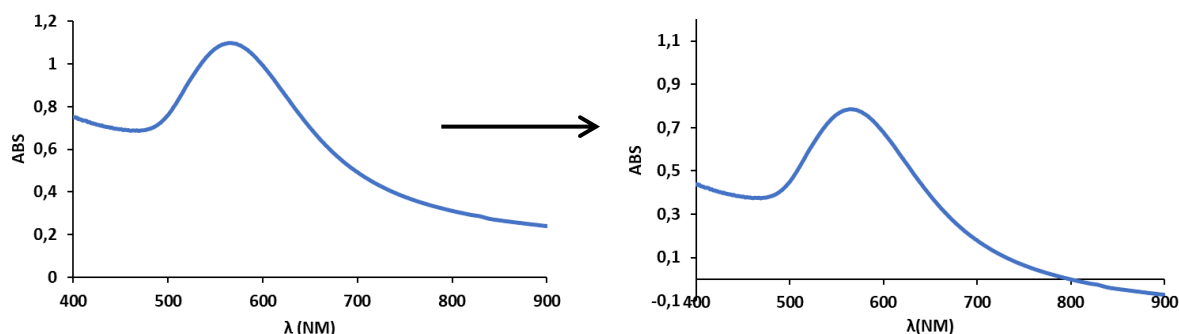


Figura 4.- Espectros de absorción que ejemplifican la normalización de las medidas frente a  $\lambda = 800\text{nm}$

### 3.3.2.- Síntesis del producto de la reacción

Para sintetizar el producto se añade sobre la disolución amortiguadora; la enzima Putrescina Oxidasa en concentración  $3,57 \cdot 10^{-7}$  M, se espera un minuto y se añade el analito (putrescina) en concentración  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Se deja reaccionar una hora, durante este tiempo se oxigena haciendo pasar una corriente de aire cada 10 minutos, durante 10 minutos. Transcurrido este proceso, se añade catalasa (100 u) para eliminar los peróxidos que se producen durante la reacción. Se comprueba con una tira reactiva de peróxidos que la catalasa ha cumplido su función. La disolución resultante se transvasa a un tubo de centrifugación y se centrifuga durante aproximadamente una hora, hasta que todo el producto se haya filtrado.

## 4.- Resultados y discusión

### 4.1.- Método

En los experimentos realizados para la formación de nanopartículas de oro, a partir de la reacción de putrescina con PutOx y Au (III), hay que tener en cuenta varias observaciones.

- 1) Debido a estudios anteriores realizados en el grupo de investigación<sup>10</sup>, para que se formen las nanopartículas de oro resulta favorable que el consumo de oxígeno de la disolución haya finalizado antes de añadir la disolución de Au (III).  
Por ello, se hizo un estudio a cerca del consumo de oxígeno, para saber cuándo se puede añadir la disolución de oro, para formar las nanopartículas. Con este mismo estudio se comprueba también que la enzima no pierde eficacia.  
En este estudio, se mide con un sensor de oxígeno basado en fluorescencia el tiempo que tarda la enzima en consumir el oxígeno disuelto, para ello se realizan varias oxigenaciones de la disolución.  
Se concluye que al cabo de aproximadamente algo más de 4 minutos la enzima ha consumido todo el oxígeno.
- 2) Según los resultados anteriores, se espera 5 minutos entre que se añade el analito (putrescina) y el Au (III) como se ha explicado en el punto 3.3.1.
- 3) Una vez que se han configurado los parámetros descritos en el punto 3.2.1 se introduce una cubeta con la disolución amortiguadora en la posición de referencia y otra en la posición 1, y se hace el blanco o referencia de la medida.

- 4) Para hacer las medidas del estudio se hacen barridos espectrales, que registran todos los espectros a lo largo del tiempo, a todas las longitudes de onda que permite recoger la cubeta, en este caso desde 400 nm hasta 900 nm.
- 5) Como se ha descrito en el apartado 3.3.1 para analizar los espectros que se obtienen, y sacar a partir de ellos los registros cinéticos, hay que corregir un aumento de la línea base que supone la reacción. Para ello, se resta a la absorbancia de cada una de las longitudes de onda obtenidas, o a la que interesa, la absorbancia que se registra a 800 nm. De esta manera se evita el error por aumento de línea base.

## 4.2.- Optimización

Antes de la realización de una recta de calibrado, se llevó a cabo la optimización de distintos parámetros de la reacción:

### 4.2.1.- Optimización del pH

Se preparan disoluciones amortiguadoras de fosfatos con valores de pH entre 6 y 8,5; ya que en este rango suele estar el pH óptimo para las enzimas. Se recogen los barridos espectrales de absorbancia para cada una de ellas durante aproximadamente tres horas.

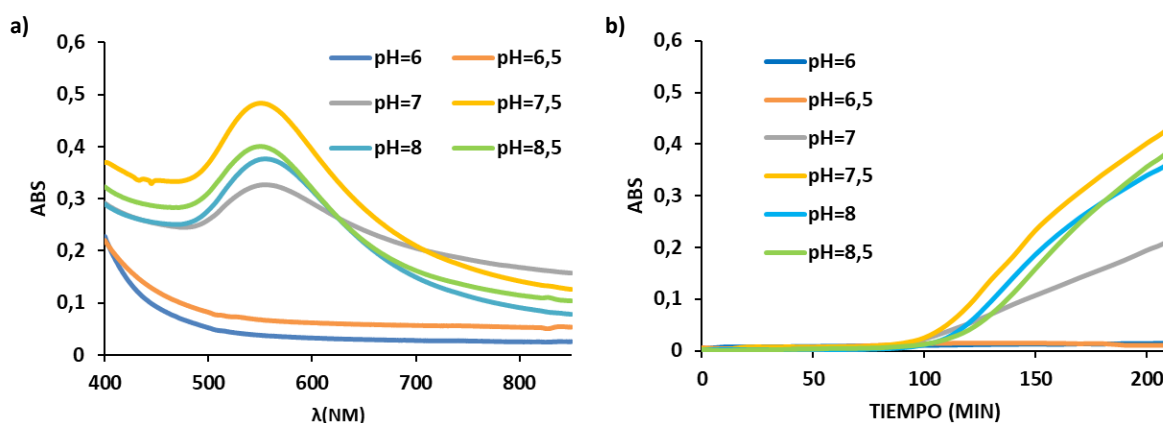


Figura 5.- a) Espectros de absorción obtenidos a los 200 minutos de reacción para disoluciones con  $[PutOx]=3,57 \cdot 10^{-7} M$ ;  $[Put]=5 \cdot 10^{-4} M$  y  $[Au(III)]=1 \cdot 10^{-3} M$ , a diferentes pH de disolución amortiguadora de fosfatos 0,1M y 40 °C. b) Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm.

Se escoge pH=7,5 como óptimo, ya que es en el que se obtuvo la mayor señal de absorbancia, mejor pico espectral y menor tiempo de reacción.

Hay que tener en cuenta que, el  $pK_a$  de los fosfatos es 7,2 por lo tanto, a pH= 8,5 la disolución ya no estará actuando como amortiguador.

Se hace un segundo estudio en el que se combinan las disoluciones amortiguadoras TRIS y fosfatos a pH 7 y 8,5. Tras tres horas de reacción no aumenta la absorbancia, es decir, no se obtiene señal. Con una tira reactiva indicadora de  $H_2O_2$  se comprueba que la reacción no está sucediendo, ya que no se observan peróxidos, por tanto, se plantea la idea de que la molécula TRIS inhibe la formación de las nanopartículas de oro a través de la coordinación de la misma con Au (III), lo que provoca la disminución del potencial redox del oro, y, por tanto, el de su capacidad reductora.

#### 4.2.2.- Optimización de la temperatura

Antes de optimizar este parámetro, como la putrescina tiene una presión de vapor alta, se comprueba que, en el tiempo de reacción, al aumentar la temperatura, el analito no se pierde por evaporación. Para ello se prepararon dos disoluciones con 970  $\mu\text{L}$  de disolución amortiguadora de concentración 0,1 M en fosfatos a pH 7,5 y 30  $\mu\text{L}$  de putrescina 0,018 M. Una de estas disoluciones se mantuvo a 25°C durante tres horas en la incubadora (1), y la otra se puso en un baño a 60°C (2) también durante tres horas. Al cabo de estas tres horas, se comprobó el volumen de estas, la de 25°C no experimentó cambios, mientras que en la de 60°C se vio reducido a 850  $\mu\text{L}$ . Se llevó la disolución (2) al volumen inicial, y se midió la absorbancia. Como entre ellas no se vieron cambios significativos en la absorbancia máxima, podemos concluir que la putrescina no se evapora a altas temperaturas, sino que lo que se evapora es solamente agua. De esta forma nos aseguramos la efectividad de los experimentos llevados a cabo a continuación.

Realizamos un barrido espectral de absorbancia para la reacción a diferentes temperaturas, desde 22°C hasta 60°C.

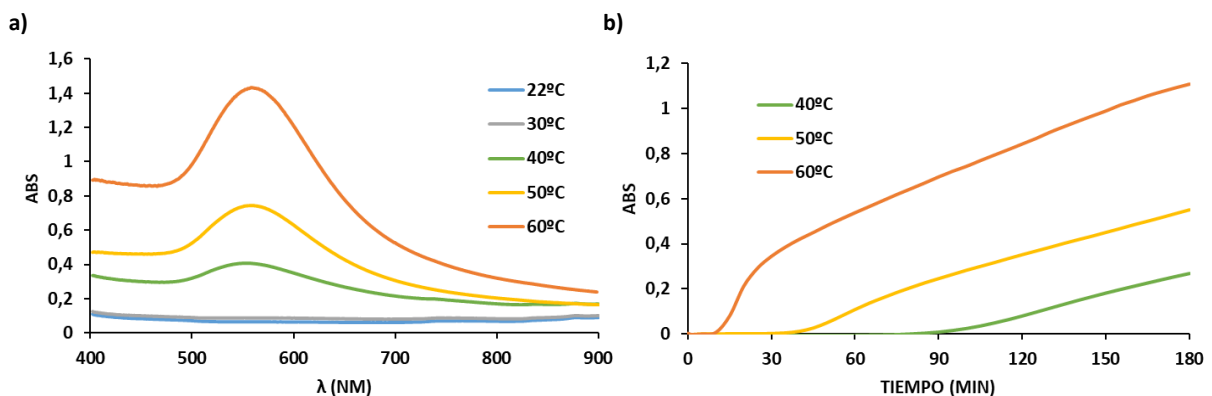


Figura 6.- a) Espectros de absorción obtenidos tras 180 minutos de reacción para disoluciones sobre fosfatos 0,1M a pH=7,5 con [PutOx]=3,57·10<sup>-7</sup> M; [Put]=5·10<sup>-4</sup> M y [Au (III)]=1·10<sup>-3</sup> M, a diferentes temperaturas. b) Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm.

Como se ve en la *Figura 6b)*, al aumentar la temperatura se consigue que la reacción sea más rápida, reduciendo el tiempo de reacción de 3 horas hasta 30 minutos. Por ello se escoge como temperatura óptima 60°C.

#### 4.2.3.- Optimización de la concentración de enzima PutOx

Para determinar la concentración óptima de enzima se eligen 5 concentraciones diferentes y se recogen los barridos espectrales de absorbancia para cada una de ellas durante 90 minutos. Se añade también un blanco en el que no se añade enzima.

Se elige como concentración óptima 3,6·10<sup>-7</sup> M (*Figura 7 c)*), ya que es la que más absorbancia alcanza en el menor tiempo.

Lo que se esperaría teóricamente es que, al aumentar la concentración de enzima, la reacción fuese más rápida, pero no es lo que sucede.

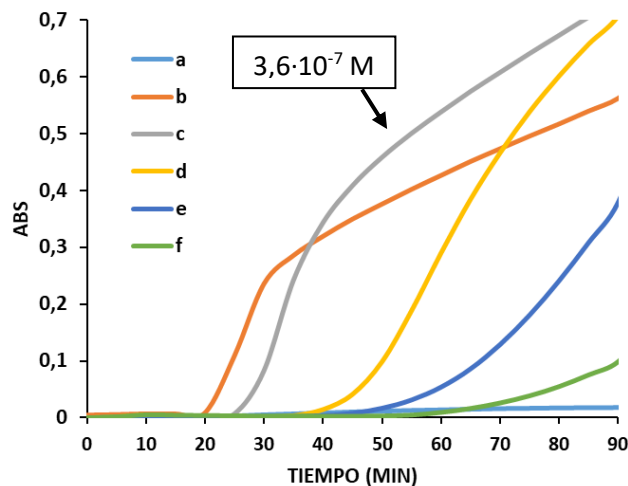


Figura 7.- Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm 90 minutos de reacción para disoluciones sobre fosfatos 0,1M a pH=7,5 con [PutOx]; a) 0 M, b)  $1,4 \cdot 10^{-7}$  M, c)  $3,6 \cdot 10^{-7}$  M, d)  $7,1 \cdot 10^{-7}$  M, e)  $1,1 \cdot 10^{-6}$  M, f)  $1,4 \cdot 10^{-6}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)] = $1 \cdot 10^{-3}$  M, a 60 °C

En estudios anteriores realizados en el grupo de investigación<sup>12</sup> se ha observado a través de imágenes TEM que las nanopartículas de oro que se forman son de tipo coral o ramificado, lo cual parece indicar que se forman por coalescencia de nanoclusters. Un hecho que corrobora que la formación de nanopartículas de oro no está relacionada con la concentración de enzima sino con la fusión de nanoclusters es lo que sucede en este estudio.

Al aumentar la concentración de PutOx, disminuye la formación de nanopartículas de oro, ya que su estructura rodea a los nanoclusters ejerciendo un efecto de repulsión y evitando que se unan para formar las nanopartículas por coalescencia (Véase Ilustración 1A). En cambio, cuando la concentración de PutOx disminuye, se forman más nanoclusters en una misma molécula de enzima, favoreciendo la coalescencia de los mismos y, por tanto, la formación de las nanopartículas (Véase Ilustración 1B).

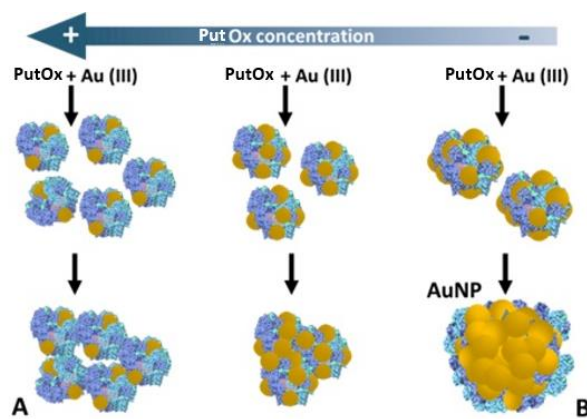


Ilustración 1.- Representación esquemática de la formación de A) nanoclusters de oro B) nanopartículas de oro, en función de la concentración de PutOx.

#### 4.2.4.- Optimización de la concentración de Au (III)

Para determinar la concentración óptima de oro se eligen 7 concentraciones diferentes y se recogen los barridos espectrales de absorbancia para cada una de ellas durante 120 minutos.

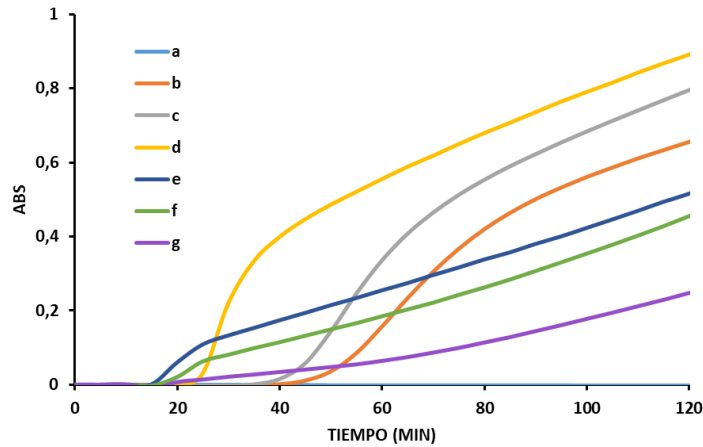


Figura 8.- Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm durante 120 minutos de reacción para disoluciones sobre fosfatos 0,1M a pH=7,5 [PutOx]=  $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]=  $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]; a)  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M, b)  $5 \cdot 10^{-4}$  M, c)  $7,5 \cdot 10^{-4}$  M, d)  $1 \cdot 10^{-3}$  M, e)  $1,5 \cdot 10^{-3}$  M, f)  $1,75 \cdot 10^{-3}$  M, g)  $2 \cdot 10^{-3}$  M, a 60°C

Como se ve en la Figura 8, al aumentar la concentración de oro la reacción es más rápida y se consigue mayor absorbancia, pero a partir de  $1 \cdot 10^{-3}$  M este efecto desaparece, y aunque la reacción empieza antes, la absorbancia disminuye, hasta tal punto que cuando la concentración es  $2 \cdot 10^{-3}$  M parece que cambia hasta la cinética de la reacción.

Por ello, se escoge  $1 \cdot 10^{-3}$  M como la concentración óptima de oro (III).

#### 4.2.5.- Optimización de la concentración de la disolución amortiguadora/fuerza iónica

Se ha descrito<sup>13</sup> que la concentración de fosfatos influye en la formación de las nanopartículas de oro, por ello se estudia la reacción a 4 concentraciones diferentes de esta disolución, manteniendo el pH en 7,5. Con este estudio también se analiza el efecto de la fuerza iónica.

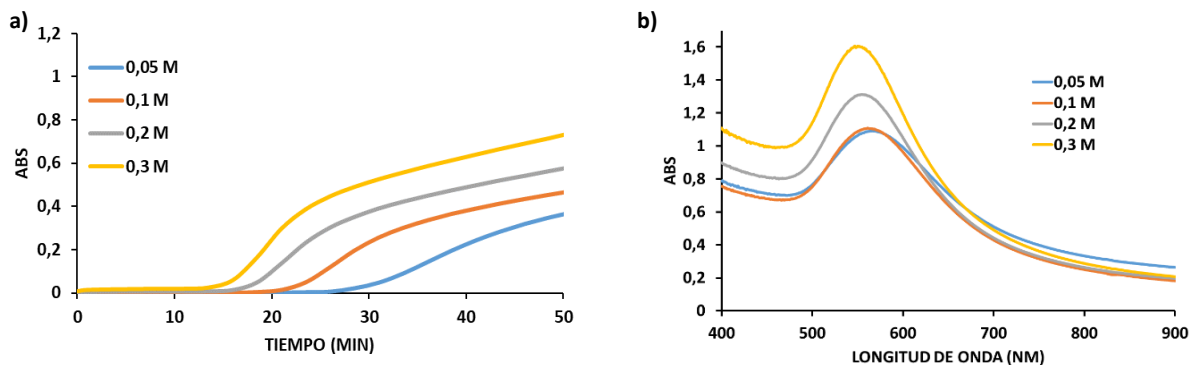


Figura 9.- a) Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm durante 50 minutos de reacción para disoluciones sobre disolución amortiguadora de fosfato a concentraciones 0,05 M; 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M a pH=7,5 [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M, a 60 °C. b) Espectros de absorción a los 120 minutos.



Al ir aumentando la concentración de la disolución amortiguadora, el pico se desplaza ligeramente hacia longitudes de onda menores:

Concentración de fosfatos	0,05 M	0,1 M	0,2 M	0,3 M
Longitud de onda Abs <sub>max</sub>	568 nm	565 nm	557 nm	550 nm

Cuanto mayor es la concentración de la disolución amortiguadora, más rápida es la reacción y mayor es la absorbancia que se obtiene para la reacción. Por lo tanto, en un primer momento se escogió 0,3M como la concentración de disolución amortiguadora óptima. Pero estudios posteriores, reflejados en el punto 4.3 demostraron que esta reacción en esas condiciones, genera problemas de irreproducibilidad. Como se verá posteriormente, la incertidumbre de la reacción en concentración 0,1M es más baja, por lo que es esta con la que se decide trabajar.

Se realiza un segundo estudio, combinando la disolución amortiguadora de fosfatos con otra de carbonato, para comprobar si el efecto observado en el estudio anterior se debe a la fuerza iónica o a la concentración de fosfatos como tal.

Como la concentración que da resultados más rápidos y de mayor absorción es la disolución de 0,3 M, se combinan fosfatos y carbonatos en diferentes concentraciones que sumen ese valor, para que la fuerza iónica sea la misma y se recogen los barridos espectrales de absorbancia para cada una de ellas.

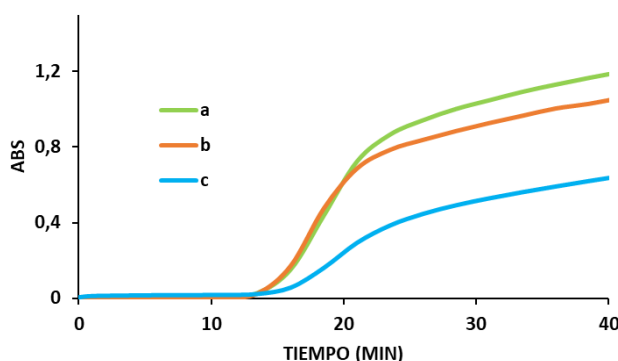
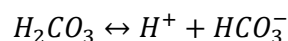


Figura 10.- Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm durante 40 minutos de reacción sobre disolución amortiguadora de fosfatos-carbonatos a concentraciones; a) 0,2M de carbonatos y 0,1 M de fosfatos; b) 0,1 M de carbonatos y 0,2 M de fosfatos; c) 0,3 M de fosfatos a pH=7,5 [PutOx]=3,57·10<sup>-7</sup> M; [Put]=5·10<sup>-4</sup> M y [Au (III)]=1·10<sup>-3</sup> M, a 60 °C

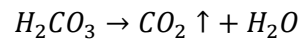
Aunque como se observa en la Figura 10 los resultados indican que no hay dependencia de la fuerza iónica, estos datos no pueden tenerse en cuenta. El problema de este experimento es que al finalizar la reacción el pH no es 7,5 sino 9-10, es decir, la disolución de carbonatos rompe la amortiguación de los fosfatos, y hace que la reacción quede amortiguada a otro rango de pH, basificándola.

Este hecho podemos justificarlo con la teoría de ácidos y bases de Brönsted y Lowry<sup>14</sup>:

Al inicio de la reacción, la disolución de carbonatos se encuentra en equilibrio:



Pero a lo largo de esta, como se produce a altas temperaturas (60°C) tiene lugar la siguiente descomposición:



Al evaporarse el CO<sub>2</sub> el equilibrio del bicarbonato se ve desplazado hacia la formación de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, por lo que se pierden protones.

Este hecho tiene la suficiente fuerza como para romper la disolución amortiguadora de fosfatos y aumentar el pH de la disolución.

Por esta razón, no se tienen en cuenta estos resultados.

### **4.3.- Incertidumbre**

Teniendo en cuenta que el espectrofotómetro donde se realizan las medidas de absorción, como se ha explicado en el apartado 3.2.1, tiene la posibilidad de medir ocho posiciones/cubetas de forma simultánea, para analizar la incertidumbre debida a la propia reacción se realiza un estudio en el que ésta, se lleva a cabo en ocho cubetas diferentes, cada una en una de las posiciones del equipo. En este caso, las condiciones del experimento son las que proporcionan resultados más rápidos: disolución amortiguadora de fosfatos 0,3 M a pH=7,5 y 60 °C.

Una vez finalizada la reacción se toman los valores de absorbancia máxima, la DSR% obtenida de estos datos es de un 12,7% (véase Anexo I, *Tabla 1*).

Mediante un análisis de varianza (véase Anexo I, *Tabla 2*) se demuestra la diferencia entre unas medidas y otras, por lo que la reproducibilidad de la reacción podrá mejorarse. Por ello, se buscan distintas soluciones, teniendo en cuenta que, aparte de por el equipo, la reacción que se describe en este trabajo, está condicionada por varios factores relacionados entre sí:

- 1) Se lleva a cabo en condiciones de alta temperatura (60°C), y el espectrofotómetro adquiere estas condiciones gracias a una bomba de agua proveniente de un baño configurado a esa temperatura. Debido a estas condiciones, cabe la posibilidad de que no todas las cubetas se calienten por igual. Como la reacción depende mucho cinéticamente de la temperatura, puede que este hecho genere incertidumbre.
- 2) La disponibilidad de enzima es limitada (2 mL) por lo que las medidas deben llevarse a cabo en condiciones de bajo volumen. Para ello, se usan cubetas de plástico de bajo volumen que permiten realizar la disolución en un total de 700 µL. Se baraja la posibilidad de que la incertidumbre se deba también a la mala transmisión de calor en este tipo de material.
- 3) Como las cubetas son de bajo volumen, no permiten físicamente introducir agitadores magnéticos para realizar la reacción de forma homogénea.

Teniendo en cuenta estos factores, se deciden valorar las posibles causas de incertidumbre, para disminuirla y aumentar la reproducibilidad.

En primer lugar, se hace un estudio para comprobar que la reproducibilidad de la reacción no depende de la posición en la que se mida, ni de la incertidumbre que genere esta característica del equipo. Para

ello, se mide una disolución de concentración conocida de Rodamina B en ocho cubetas diferentes, colocada cada una de ellas en una de las posiciones del equipo. En esta posición se realizan dos medidas. Después se intercambian las cubetas de posición de la siguiente forma:

$$\begin{array}{l} 1 \Leftrightarrow 8 \\ 2 \Leftrightarrow 7 \\ 3 \Leftrightarrow 6 \\ 4 \Leftrightarrow 5 \end{array}$$

Se vuelven a realizar dos medidas de la absorción (véase Anexo I, *Tabla 3*). Y se concluye que la DSR% asociada a la posición en las que se mide la cubeta es de un 5,36%.

Si estos datos se tratan en función de la cubeta en vez de en función de la posición, se obtiene que la DSR% asociada a la cubeta es de un 5,34% (véase Anexo I, *Tabla 4*).

Por otro lado, y teniendo en cuenta la baja cantidad de enzima disponible, se decide cambiar las cubetas de bajo volumen de plástico por cubetas de volumen estándar de cuarzo y vidrio, para comprobar si este hecho influye mucho en la incertidumbre.

El estudio realizado como en el caso anterior, en cubetas de cuarzo y vidrio con disolución de Rodamina B en ocho cubetas en las ocho posiciones, proporciona unos resultados que se estudian con un análisis de varianza (véase Anexo I, *Tabla 5*), dando lugar a una DSR% de 0,7%. Un resultado mucho menor que el de 5,3% de las cubetas de plástico.

Se asume que el resultado de incertidumbre del equipo, debido a las cubetas, es de un 0,7%, de forma que si se quiere mejorar la reproducibilidad se pueden cambiar las cubetas de plástico y bajo volumen, a cubetas de cuarzo y/o vidrio. En este caso, como no se dispone de suficiente enzima se sigue estudiando en cubetas de bajo volumen.

Otro de los factores que puede influir a la reacción como se ha explicado en el punto 4.2.5 es la concentración de disolución amortiguadora de fosfatos. Por eso, a partir de varias reacciones llevadas a cabo durante el desarrollo de este trabajo, en las condiciones: pH=7,5 0,1 M de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ;  $[\text{PutOx}]=3,57 \cdot 10^{-7}$  M;  $[\text{Put}]=5 \cdot 10^{-4}$  M y  $[\text{Au (III)}]=1 \cdot 10^{-3}$  M, a 60 °C, se comparan los resultados de concentración 0,3M descritos al principio de este apartado con los de 0,1M. Para ellos, se toman valores de absorbancia máxima al cabo de 50 minutos de reacción, de forma que esto sirva para determinar tanto la incertidumbre de la reacción como la propia reproducibilidad de la misma. Se obtienen los siguientes resultados:

<b>Abs<sub>max</sub> (50 min)</b>	0,6631	0,6856	0,4836	0,6435	0,7056	0,7407	0,7715
-----------------------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Tratando estos datos, se observa como posible valor anómalo: 0,4836.

Para comprobar que realmente es un valor anómalo y, por tanto, que se puede eliminar, se aplica un Test Q de Dixon<sup>15</sup> con un nivel de significación del 95%, los resultados son:

<b>Q<sub>exp</sub></b>	0,555
<b>Q<sub>crit</sub></b>	0,507

Como Q<sub>exp</sub> es mayor que Q<sub>crit</sub> el valor se considera anómalo y se puede eliminar, de forma que los datos que se usan para calcular la DSR% de la reacción son:

<b>Abs<sub>max</sub> (50 min)</b>	0,6631	0,6856	0,6435	0,7056	0,7407	0,7715
-----------------------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Los resultados obtenidos son:

<b>Media</b>	0,7017
<b>Desviación estándar</b>	0,05
<b>DSR%</b>	6,85%

Esta será la incertidumbre de la reacción junto con la del equipo, para saber la de la reacción como tal calculamos la diferencia de los cuadrados de ambas incertidumbres:

$$DSR\%_{reacción} = \sqrt{DSR\%_{combinada}^2 - DSR\%_{equipo}^2} = \sqrt{6,85^2 - 5,3^2} = 4,3\%$$

La incertidumbre o reproducibilidad de la determinación de putrescina mediante la reacción enzimática con Putrescina Oxidasa y la formación de nanopartículas de oro, es menor que la del propio equipo. Si se quisieran mejorar los resultados, la clave sería cambiar las cubetas de plástico por las de cuarzo y vidrio.

#### 4.4.- Estudio del origen de la señal

Antes de definir el mecanismo de formación de las nanopartículas de oro, se plantean diferentes posibilidades, en función de la reacción de la enzima con Au (III) con tres posibles sustratos: putrescina, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y producto.

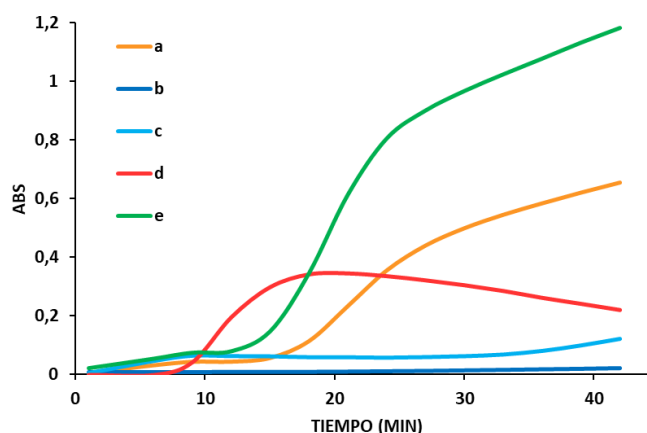


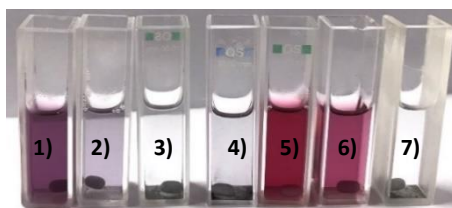
Figura 11.- Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm durante 45 minutos de reacción para diferentes combinaciones de los elementos de la reacción sobre fosfatos 0,3 M a pH=7,5; **a)** [PutOx]=3,57·10<sup>-7</sup> M; [Put]=5·10<sup>-4</sup> M y [Au (III)]=1·10<sup>-3</sup> M; **b)** [Put]=5·10<sup>-4</sup> M y [Au (III)]=1·10<sup>-3</sup> M; **c)** [PutOx]=3,57·10<sup>-7</sup> M y [Au (III)]=1·10<sup>-3</sup> M; **d)** Producto de la reacción previamente sintetizado y [Au (III)]=1·10<sup>-3</sup> M; **e)** Producto de la reacción previamente sintetizado; [PutOx]=3,57·10<sup>-7</sup> M y [Au (III)]=1·10<sup>-3</sup> M, todas ellas a 60°C

Según los resultados que se observan en la Figura 11:

- En primer lugar, se comprueba que la enzima por sí sola, con el Au (III) no reacciona. (Figura 11, c).
- El analito, putrescina sin la enzima, no interacciona con el Au (III) (Figura 11, b).
- La reacción tiene lugar cuando se ponen en disolución de fosfatos: enzima, putrescina y Au (III) (Figura 11, a).

La reacción anterior tiene como productos: 1-pirrolina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- Si se elimina el  $H_2O_2$  usando la enzima catalasa, vemos en la *Ilustración 2: 1) y 6)*, que tiene influencia en la reacción ya que el color de la disolución es diferente, pero que no es fundamental, ya que se sigue produciendo. (Este cambio se refleja en el espectro de absorción; *Anexo II.-Figura A1*).
- En cuanto al producto, por sí solo no forma nanopartículas, sino que necesita a la enzima para que la reacción de formación de las nanopartículas tenga lugar y que se estabilicen. (Véase *Figura 11, d) y e)*).



*Ilustración 2.- Cubetas tras 45 minutos de reacción para diferentes combinaciones de los elementos de la reacción sobre fosfatos 0,3 M a pH=7,5; 1) [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; 2) [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; 3) [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; 4) Producto de la reacción previamente sintetizado y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; 5) Producto de la reacción previamente sintetizado; [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; 6) [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Catalasa]=100 u y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; 7) [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; todas ellas a 60°C*

Teniendo en cuenta todo lo anterior;

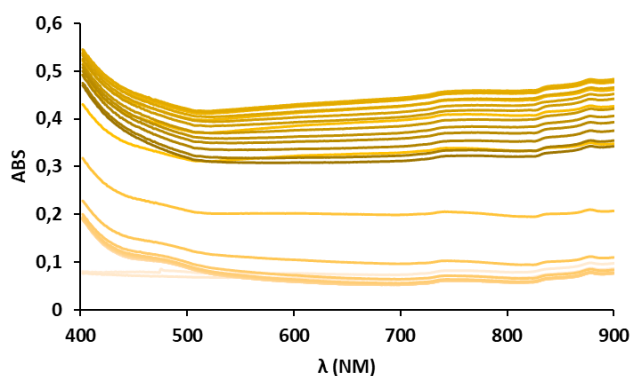
- 1) Hay que diferenciar entre la señal debida al plasmón de las nanopartículas y la señal debida a la coloración que provoca el  $Au^0$  precipitado. Solo producen señal debida al plasmón la reacción, la reacción sin  $H_2O_2$  (con catalasa) y el producto de la reacción con enzima.
- 2) El producto de la reacción reduce el Au (III) a  $Au^0$  que, en presencia de la enzima, forma las nanopartículas, y en su ausencia no será capaz de estabilizarlas y precipita el  $Au^0$ . (Véase *Ilustración 2.- 4) y 5)*). Por tanto, el mecanismo planteado en la *Figura 2* se complementa con la reducción de oro por parte del producto.
- 3) El  $H_2O_2$  influye en la reacción, pero no es fundamental.

#### **4.5.- Estudio de la señal con otros metales**

A la vista de los resultados obtenidos en anteriores estudios del grupo de investigación, los espectros cinéticos que poseen deriva, como en este caso, se han intentado corregir usando otros metales.

##### **4.5.1.- Estudio con Platino (II)**

Se realiza la reacción con normalidad, pero después de añadir el oro se añade también platino.



*Figura 12.- Espectros de absorción tomados cada 5 minutos, durante más de dos horas de reacción, de más claro a más oscuro según transcurre el tiempo. Para una reacción sobre disolución amortiguadora 0,1 M de fosfatos a pH=7,5 [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pt (II)]= $2 \cdot 10^{-3}$  M a 40 °C*

Este experimento se lleva a cabo a dos temperaturas, 30 °C y 40 °C, en ambos casos se observan los mismos resultados. Solo hay un aumento de línea base, no se forman las nanopartículas. Transcurrido el tiempo de reacción se observa en el fondo de las cubetas un precipitado negro.

Por lo tanto, el platino no soluciona el problema de la deriva.

#### 4.5.2.- Estudio con Paladio (II)

Se estudian varias concentraciones de paladio para ver su efecto en la reacción.

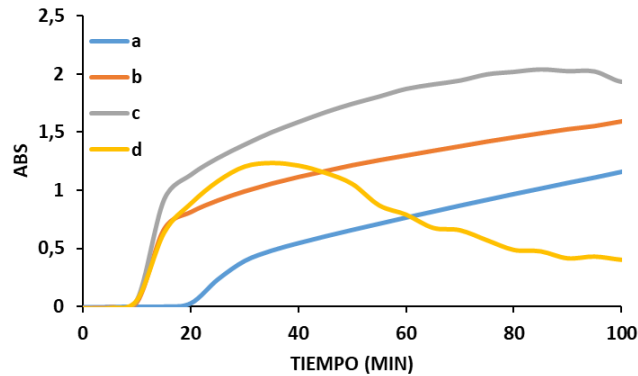


Figura 13.- Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm durante 100 minutos de reacción para disoluciones sobre fosfatos 0,3 M a pH=7,5 [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]; a) 0 M, b)  $1 \cdot 10^{-3}$  M, c)  $1,5 \cdot 10^{-3}$  M, d)  $2 \cdot 10^{-3}$  M a 60 °C

Al añadir Paladio (II), la reacción es más rápida, y se obtiene más absorbancia. El máximo de absorbancia se ve modificado, para la reacción sin Paladio (II) (Figura 13, a) es 550 nm, según se va aumentando la concentración de este metal el máximo pasa de 536 nm cuando la concentración es  $1 \cdot 10^{-3}$  M, 545 nm cuando es  $1,5 \cdot 10^{-3}$  M hasta 560 nm cuando es  $2 \cdot 10^{-3}$  M.

Además, a concentraciones muy altas del metal la reacción se ve saturada y precipita, por eso se observa que la señal cae.

No se soluciona el problema de la deriva, pero con este metal a una concentración moderada, como  $1 \cdot 10^{-3}$  M, la reacción es más rápida y los espectros de absorción son mejores (picos más definidos).

#### 4.6.- Calibración

Una vez estudiados todos los parámetros y condiciones que afectan a la reacción, se realiza la calibración.

Los resultados obtenidos tras las reacciones fueron los siguientes:

[Putrescina] (mM)	Abs (550 nm)
0	0,0671
0,1	0,1671
0,2	0,3525
0,3	0,4646
0,4	0,6214
0,55	1,2553
0,75	1,9553
0,85	2,3027

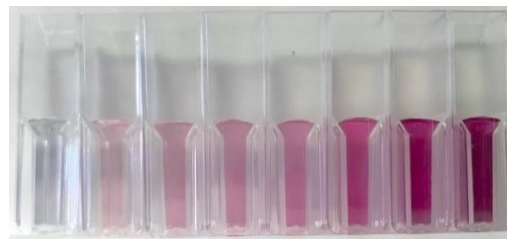


Ilustración 3.- Disoluciones de la calibración. Sobre disolución amortiguadora de fosfatos a pH=7,5 y 0,1 M; [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; para las siguientes concentraciones de putrescina: 0;  $1 \cdot 10^{-4}$  M;  $2 \cdot 10^{-4}$  M;  $3 \cdot 10^{-4}$  M;  $4 \cdot 10^{-4}$  M;  $5,5 \cdot 10^{-4}$  M;  $7,5 \cdot 10^{-4}$  M y  $8,5 \cdot 10^{-4}$  M

La calibración se ajusta con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9946$ , a un polinomio de segundo grado, cuya ecuación es:

$$Abs = 2,2879[Putrescina]^2 + 0,7425[Putrescina] + 0,0661$$

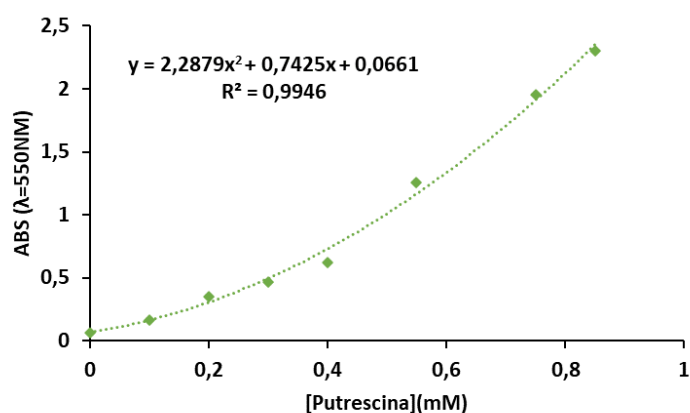


Figura 14.- Polinomio de calibración para la determinación enzimática de putrescina basada en su reacción y la formación de nanopartículas de Au. Realizada sobre disolución amortiguadora de fosfatos a pH=7,5 y 0,1 M; [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M y [Au(III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M a 60 °C

En este caso, el rango de trabajo es desde una concentración  $1 \cdot 10^{-4}$  M de putrescina, hasta  $8,5 \cdot 10^{-4}$  M. Y se toma como límite de cuantificación la concentración mínima estudiada a la cual se observa formación de nanopartículas de oro, que en este caso es  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Como no se dispone de medidas suficientes para determinar la desviación estándar del blanco, el límite de detección se calcula a partir del de cuantificación, de forma que será:  $3 \cdot 10^{-5}$  M.

Si se analiza con más detalle la calibración y teniendo en cuenta resultados obtenidos anteriormente en el grupo de investigación, se puede reinterpretar, y en vez de ajustarla a un polinomio de segundo grado, ajustarla a dos rectas de calibrado diferentes, debidas a un hipotético cambio en la cinética de la reacción por factores que se estudiarán más adelante, aunque parecen estar relacionados con el consumo de oxígeno de la reacción:

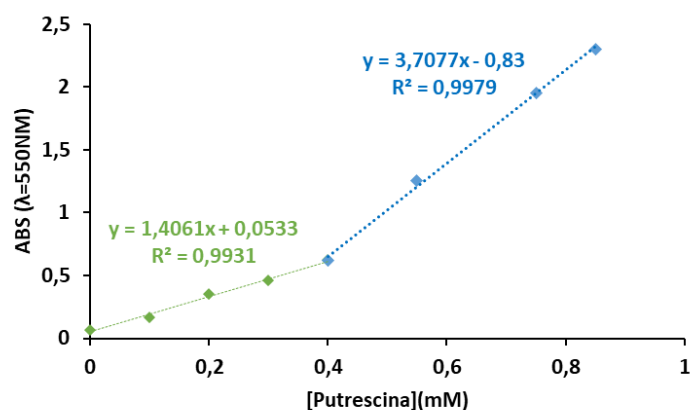


Figura 15.- Rectas de calibrado para la determinación enzimática de putrescina basada en su reacción y la formación de nanopartículas de Au. Realizada sobre disolución amortiguadora de fosfatos a pH=7,5 y 0,1 M; [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M y [Au(III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M a 60 °C

Entonces en este caso tendríamos:

Recta de calibrado	$R^2$	Rango lineal (mM)	LQ (mM)	LD (mM)
$y = 1,4061[putrescina] + 0,0533$	0,9931	0,1-0,4	0,1	0,03
$y = 3,7077[putrescina] - 0,83$	0,9979	0,4-0,85	0,4	0,12

#### 4.7.- Estudio de la formación de nanopartículas de oro

Como se ha explicado en el apartado 4.2.3, las nanopartículas de oro se forman por coalescencia de nanoclusters de oro.

Para comprobar este fenómeno en la reacción, se llevan a cabo dos pruebas.

Por un lado, se mide por fluorescencia la reacción, ya que los nanoclusters poseen fluorescencia, pero las nanopartículas no, por lo que si se obtiene señal esto indicará la presencia de los mismos.

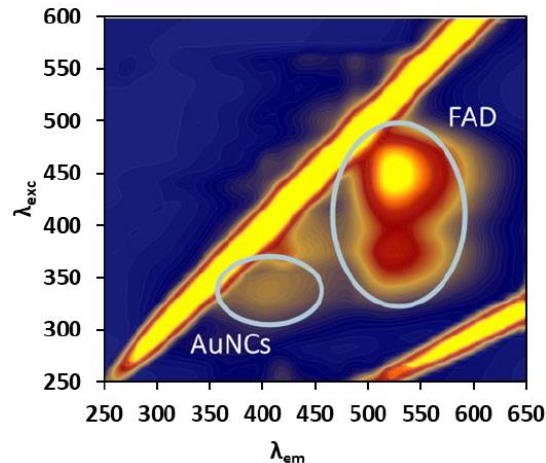


Figura 16.- Espectro 3D de fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación y de emisión para una reacción sobre disolución amortiguadora de fosfatos a pH=7,5 y 0,1 M; [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M a 60 °C

Como se observa en el espectro 3D de la Figura 16 la fluorescencia de los AuNCs está limitada en una zona caracterizada por una longitud de onda de excitación máxima en torno a 340 nm y una longitud de onda de emisión máxima en torno a 410 nm.

Por otro lado, para comprobar que esta fluorescencia es debida a estos nanoclusters de oro y no a otras sustancias presentes en la reacción, se analiza por microscopía el resultado de la reacción.

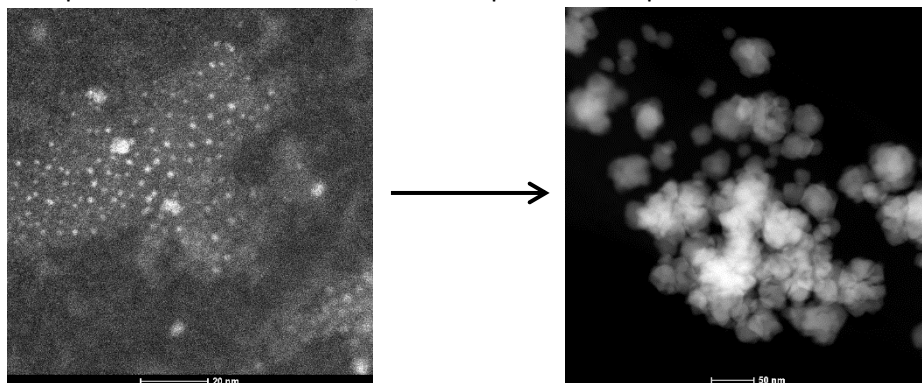


Ilustración 4.- Imágenes de STEM correspondientes a la reacción sobre una disolución amortiguadora de fosfatos a pH= 7,5 y 0,1 M; [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M a 60 °C

En las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (STEM), se pueden ver estructuras con un tamaño medio entre 2-3 nm que corresponde al tamaño de los AuNCs, y se pueden observar también estructuras de aproximadamente 50 nm que se corresponde con el tamaño de las AuNPs.

Por tanto, estas imágenes además de la fluorescencia obtenida, también justifican la formación de nanopartículas por coalescencia de los nanoclusters.



## 4.8.- Interferencias

### 4.8.1.- Estudio con Au (III)

Se realiza un primer estudio en el que se comparan los resultados de la reacción de la enzima: con el analito, putrescina, con la interferencia y con ambos sustratos combinados.

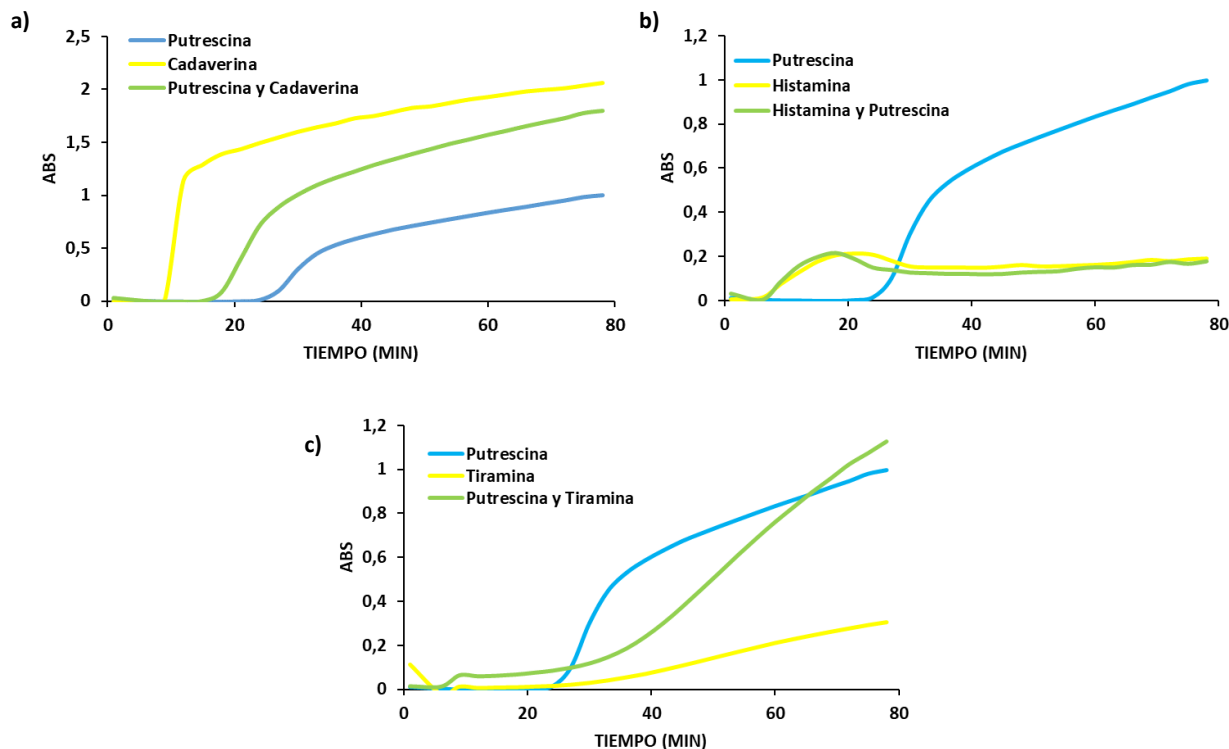
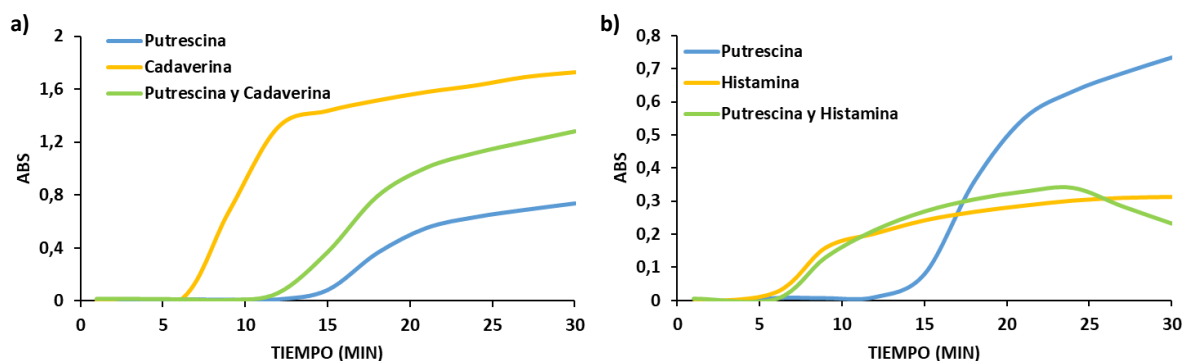


Figura 17.- Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm durante 80 minutos de reacción para disoluciones sobre fosfatos 0,1 M a pH=7,5 **a)**  $[PutOx]=3,57 \cdot 10^{-7}$  M;  $[Put]=5 \cdot 10^{-4}$  M;  $[Cad]=5 \cdot 10^{-4}$  M y  $[Au(III)]=1 \cdot 10^{-3}$  M, **b)**  $[PutOx]=3,57 \cdot 10^{-7}$  M;  $[Put]=5 \cdot 10^{-4}$  M;  $[His]=5 \cdot 10^{-4}$  M y  $[Au(III)]=1 \cdot 10^{-3}$  M, **c)**  $[PutOx]=3,57 \cdot 10^{-7}$  M;  $[Put]=5 \cdot 10^{-4}$  M;  $[Tir]=5 \cdot 10^{-4}$  M y  $[Au(III)]=1 \cdot 10^{-3}$  M, todas ellas a 60 °C

En el caso de la cadaverina, reacciona como el analito e interfiere. Además, la señal que proporciona la combinación de ambos sustratos, es menor que la que da la cadaverina sola.

Por otro lado, tanto la histamina como la tiramina, por sí solas no suponen una interferencia ya que, la histamina precipita y la tiramina es tan lenta que cuando acaba la reacción del analito, la suya prácticamente no ha empezado. Pero cuando se combinan con el analito, afectan a su cinética, en el caso de la histamina hace que precipite y en el caso de la tiramina la cinética es diferente.

Se realiza de nuevo este estudio, pero con una disolución amortiguadora de fosfatos 0,3 M y los resultados que se obtienen son los siguientes;



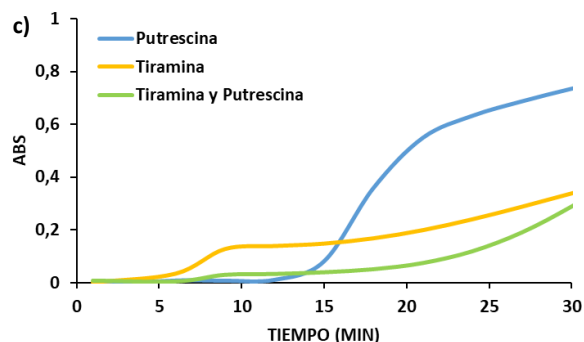


Figura 18.- Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm durante 30 minutos de reacción para disoluciones sobre fosfatos 0,3 M a pH=7,5 **a)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Cad]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M, **b)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [His]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M, **c)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Tir]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M, todas ellas a 60 °C

Al aumentar la concentración de la disolución amortiguadora, como ya se ha explicado, se consiguen mejores tiempos de reacción, este hecho afecta de igual manera a las interferencias. Por lo que, respecto al experimento anterior, los efectos de las interferencias sobre el analito son los mismos, solo que a menores tiempos de reacción.

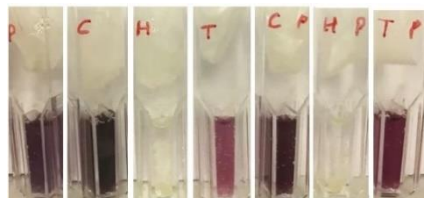


Ilustración 5.- Cubetas tras la reacción de la reacción sobre fosfatos 0,3 M a pH=7,5; de izquierda a derecha: **P)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; **C)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Cad]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M, **H)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [His]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; **T)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Tir]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$ ; **C P)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Cad]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; **H P)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [His]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M, **T P)** [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Tir]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M, todas ellas a 60 °C

Como se puede ver en la Ilustración 5, la cadaverina forma más nanopartículas, ya que su color es más intenso que el de la putrescina, la histamina precipita y la tiramina es más lenta. Cuando se combinan con putrescina parecen tener el mismo efecto sobre ella.

#### 4.8.2.- Estudio con Paladio (II)

Tras analizar los resultados que proporciona el Paladio (II) (Véase el punto 4.5.2), se estudia su efecto sobre la reacción de la enzima con el analito, putrescina, y con las interferencias.

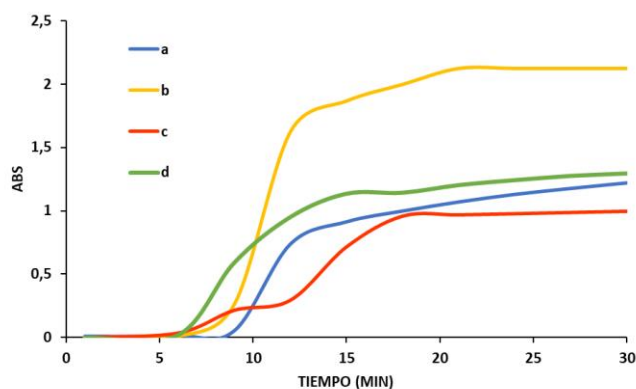


Figura 19.- Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm durante 40 minutos para disoluciones sobre fosfatos 0,3 M a pH=7,5 con: a) [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M b) [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Cad]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M c) [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [His]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M d) [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Tir]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M, todas ellas a 60 °C

Los resultados difieren de los que se obtienen solo con el oro (III) (Véase punto 4.5). La putrescina como ya se ha comentado, forma nanopartículas más rápido en presencia de este metal. En cuanto a las interferencias;

- La cadaverina, no puede ser más rápida, ya que en cuanto se añaden los metales se observa la formación de las nanopartículas. El cambio que se aprecia en este caso es el aumento de absorbancia. Sin paladio era 1,4 y con él 1,8 aproximadamente.
- La histamina, en este caso reacciona, pero acaba precipitando.
- La tiramina, sin paladio no reacciona (Véase Figura 18.c). En cambio, en presencia de este metal, sí que reacciona.

Por lo tanto, como este metal mejora las reacciones, empeora la interferencia que producen el resto de las aminas biógenas sobre la putrescina.

En vista de estos resultados se realiza otro estudio en el que se analiza el comportamiento de las interferencias por sí solas con el paladio, sin enzima.

Los resultados fueron los siguientes:

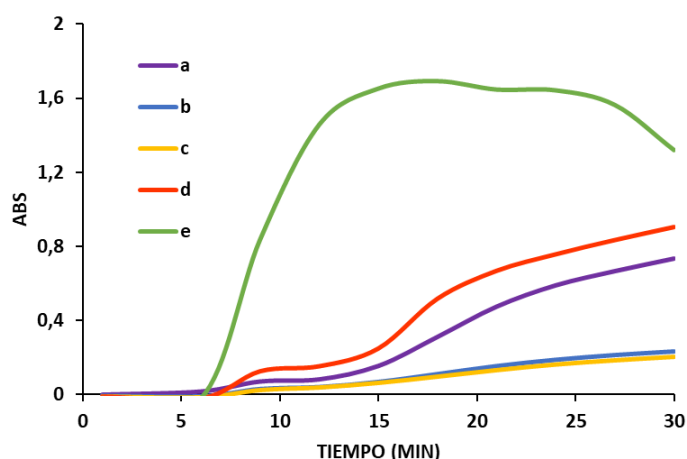


Figura 20.- Registros cinéticos a la longitud de onda del máximo de absorbancia normalizados frente a la absorbancia registrada a 800 nm durante 30 minutos para disoluciones sobre fosfatos 0,3 M a pH=7,5 con: a) [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]=  $1 \cdot 10^{-3}$  M b) [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]=  $1 \cdot 10^{-3}$  M c) [Cad]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]=  $1 \cdot 10^{-3}$  M d) [His]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]=  $1 \cdot 10^{-3}$  M e) [Tir]= $5 \cdot 10^{-4}$  M; [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M; [Pd (II)]=  $1 \cdot 10^{-3}$  M, todas ellas a 60 °C

- Tanto el analito putrescina, como la interferencia cadaverina, necesitan la enzima para estabilizar la formación de las nanopartículas.
- La señal de la interferencia histamina es prácticamente igual a la que da la propia enzima con la combinación de metales Au-Pd.
- La tiramina, junto al paladio, reacciona en el momento en el que se añaden los metales, pero como no cuenta con la presencia de la enzima para estabilizar las nanopartículas, acaba precipitando.

## 5.- Conclusiones

Gracias al desarrollo de este trabajo se han obtenido las conclusiones que se enumeran a continuación:

1. Es posible usar la enzima Putrescina Oxidasa para determinar putrescina mediante la formación de nanopartículas de oro, en un rango desde  $1 \cdot 10^{-4}$  M hasta  $8,5 \cdot 10^{-4}$  M, con una precisión de 4,3%, pero el trabajo demuestra que se podría mejorar con cubetas de cuarzo o vidrio que necesitan mayores volúmenes de enzima en la reacción, pero transmiten mejor el calor.
2. Gracias a un estudio del origen de la señal de formación de nanopartículas, se han obtenido dos conclusiones significativas. Por un lado, que el producto de la reacción necesita la presencia de la enzima para poder estabilizar las nanopartículas, sin ella precipita  $\text{Au}^0$ . Y, por otro lado, que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  influye en la reacción, pero no es fundamental.
3. No se consigue estabilizar la señal final de las nanopartículas, este hecho se intenta mejorar con metales como Platino y Paladio, que han funcionado en otras ocasiones, pero no es el caso.
4. Mediante estudios de fluorescencia y TEM, se demuestra que durante la reacción se forman nanoclusters de oro, los cuales por coalescencia dan lugar a las nanopartículas que determinamos por absorción.
5. Al aumentar la concentración de PutOx, disminuye la formación de nanopartículas de oro, ya que su estructura rodea a los nanoclusters ejerciendo un efecto de repulsión y evitando que se unan para formar las nanopartículas por coalescencia.
6. Las tres aminas biógenas estudiadas como posibles interferencias (cadaverina, histamina y tiramina), reaccionan con el oro ya sea formando nanopartículas o impidiendo la formación de las mismas a través de la putrescina. Por lo que se concluye que las tres interfieren en la reacción estudiada en este trabajo.

## 6.- Bibliografía

- (1) Doeun, D.; Davaatseren, M.; Chung, M. S. Biogenic Amines in Foods. *Food Science and Biotechnology*. The Korean Society of Food Science and Technology December 1, 2017, pp 1463–1474. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0239-3>.
- (2) al Bulushi, I.; Poole, S.; Deeth, H. C.; Dykes, G. A. Biogenic Amines in Fish: Roles in Intoxication, Spoilage, and Nitrosamine Formation-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2009**, 49 (4), 369–377. <https://doi.org/10.1080/10408390802067514>.
- (3) Lange, J.; Wittmann, C. Enzyme Sensor Array for the Determination of Biogenic Amines in Food Samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2002**, 372 (2), 276–283. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1130-9>.
- (4) van Hellemond, E. W.; van Dijk, M.; Heuts, D. P. H. M.; Janssen, D. B.; Fraaije, M. W. Discovery and Characterization of a Putrescine Oxidase from *Rhodococcus Erythropolis* NCIMB 11540. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, 78 (3), 455–463. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1310-4>.
- (5) Yaqoob, S. B.; Adnan, R.; Rameez Khan, R. M.; Rashid, M. Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A. June 3, 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00376>.
- (6) Bai, J.; Flowers, K.; Benegal, S.; Calizo, M.; Patel, V.; Bishnoi, S. W. Using the Enzymatic Growth of Nanoparticles To Create a Biosensor. An Undergraduate Quantitative Analysis Experiment. *Journal of Chemical Education* **2009**, 86 (6), 712. <https://doi.org/10.1021/ed086p712>.
- (7) Oliveira, E.; Núñez, C.; Santos, H. M.; Fernández-Lodeiro, J.; Fernández-Lodeiro, A.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C. Revisiting the Use of Gold and Silver Functionalised Nanoparticles as Colorimetric and Fluorometric Chemosensors for Metal Ions. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. Elsevier B.V. 2015, pp 297–328. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.026>.
- (8) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **2007**, 79 (11), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>.
- (9) Newman, J. D. S.; Blanchard, G. J. Formation of Gold Nanoparticles Using Amine Reducing Agents. *Langmuir* **2006**, 22 (13), 5882–5887. <https://doi.org/10.1021/la060045z>.
- (10) Navarro, J.; de Marcos, S.; Galbán, J. Colorimetric-Enzymatic Determination of Tyramine by Generation of Gold Nanoparticles. *Microchimica Acta* **2020**, 187 (3). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4141-y>.
- (11) Holmstedt, B.; Larsson, L.; Tham, R. Further Studies of a Spectrophotometric Method for the Determination of Diamine Oxidase Activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1961**, 48 (1), 182–186. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(61\)90530-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(61)90530-3).
- (12) J. Camacho-Aguayo, S. de M. J. G. Selective Generation of Gold Nanostructures Mediated by Flavo-Enzymes to Develop Optical Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics (In revision)* **2022**.
- (13) Ahmed, S. R.; Oh, S.; Baba, R.; Zhou, H.; Hwang, S.; Lee, J.; Park, E. Y. Synthesis of Gold Nanoparticles with Buffer-Dependent Variations of Size and Morphology in Biological Buffers. *Nanoscale Research Letters* **2016**, 11 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1290-3>.

- (14) Túnez Fiñana, I.; Galván Cejudo, A.; Fernández Reyes, E. *6. PH y Amortiguadores: Tampones Fisiológicos.*
- (15) *Designation: E 178-02 Standard Practice for Dealing With Outlying Observations 1.*

## ANEXOS

### Anexo I: Incertidumbre

Reacción en cubeta nº	Absorbancia máxima
1	1,511
2	1,51
3	1,298
4	1,415
5	1,657
6	1,5
7	1,607
8	1,964
DesvEst	0,1975
Media	1,5578
<b>DSR%</b>	<b>12,677</b>

Tabla 1.- Medidas de absorbancia máxima de la reacción en ocho cubetas diferentes, junto a la desviación, media y DSR%. Absorbancia de la reacción tras 75 minutos, para disoluciones sobre fosfatos 0,3 M a pH=7,5 [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M a temperatura 60 °C

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	2	3,003	1,5015	0,0001805		
Columna 2	2	3,011	1,5055	4,05E-05		
Columna 3	2	2,579	1,2895	0,0001445		
Columna 4	2	2,824	1,412	0,000018		
Columna 5	2	3,313	1,6565	5E-07		
Columna 6	2	2,993	1,4965	2,45E-05		
Columna 7	2	3,223	1,6115	4,05E-05		
Columna 8	2	3,914	1,957	9,8E-05		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,54952	7	0,078502857	1148,122	2,28965E-11	3,500
Dentro de los grupos	0,000547	8	6,8375E-05			
Total	0,550067	15				

Tabla 2.- Análisis de varianza de un factor para las medidas de absorbancia máxima de la reacción tras 75 minutos, para disoluciones sobre fosfatos 0,3 M a pH=7,5 [PutOx]= $3,57 \cdot 10^{-7}$  M; [Put]= $5 \cdot 10^{-4}$  M y [Au (III)]= $1 \cdot 10^{-3}$  M a temperatura 60 °C, en las ocho posiciones disponibles en el espectrofotómetro

POSICION	Absorbancia máxima				DesvEst	Media	DSR%
	1ª disposición		2ª disposición				
1	0,155	0,1534	0,1513	0,1442	0,0048	0,1510	3,1555
2	0,1541	0,1524	0,1439	0,1411	0,0063	0,1479	4,2935
3	0,1565	0,1567	0,1481	0,1407	0,0077	0,1505	5,0928
4	0,158	0,154	0,143	0,1372	0,0096	0,1481	6,4978
5	0,1558	0,1514	0,1466	0,1422	0,0059	0,1490	3,9516
6	0,1551	0,1561	0,1472	0,1413	0,0070	0,1499	4,6647
7	0,1603	0,1577	0,1402	0,1391	0,0112	0,1493	7,5212
8	0,1557	0,1591	0,1399	0,1362	0,0114	0,1477	7,6890
							<b>5,358</b>

Tabla 3.- Medidas de la absorbancia máxima de una disolución de Rodamina B, con sus respectivas desviaciones, medias y DSR%. En color amarillo se muestra la DSR% media, que será la desviación que provoca la posición en la que se mide la cubeta.

Absorbancia máxima							
CUBETA	1ª disposición		2ª disposición		DesvEst	Media	DSR%
1	0,155	0,1534	0,1399	0,1362	0,0095	0,1461	6,4796
2	0,1541	0,1524	0,1402	0,1391	0,0079	0,1465	5,3912
3	0,1565	0,1567	0,1472	0,1413	0,0075	0,1504	5,0035
4	0,158	0,154	0,1466	0,1422	0,0071	0,1502	4,7428
5	0,1558	0,1514	0,143	0,1372	0,0083	0,1469	5,6804
6	0,1551	0,1561	0,1481	0,1407	0,0071	0,1500	4,7659
7	0,1603	0,1577	0,1439	0,1411	0,0097	0,1508	6,4034
8	0,1557	0,1591	0,1513	0,1442	0,0064	0,1526	4,2156
							<b>5,335</b>

Tabla 4.- Medidas de la absorbancia máxima de una disolución de Rodamina B, con sus respectivas desviaciones, medias y DSR%. En color amarillo se muestra la DSR% media, que será la desviación que provoca la cubeta en la que se mide la disolución.

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo						
RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Fila 1	8	1,3477	0,1684625	4,38827E-05		
Fila 2	8	1,3484	0,16855	3,04229E-05		
Fila 3	8	1,3438	0,167975	4,13136E-05		
Fila 4	8	1,3203	0,1650375	2,96855E-05		
Fila 5	8	1,344	0,168	4,03114E-05		
Fila 6	8	1,3212	0,16515	3,02257E-05		
Fila 7	8	1,3425	0,1678125	4,58841E-05		
Fila 8	8	1,3281	0,1660125	3,55584E-05		
Columna 1	8	1,2352	0,1544	1,42571E-06		
Columna 2	8	1,3569	0,1696125	1,84982E-06		
Columna 3	8	1,3366	0,167075	4,92214E-06		
Columna 4	8	1,3288	0,1661	2,04286E-06		
Columna 5	8	1,3199	0,1649875	2,89839E-06		
Columna 6	8	1,3466	0,168325	1,95357E-06		
Columna 7	8	1,3789	0,1723625	1,75982E-06		
Columna 8	8	1,3931	0,1741375	1,01398E-05		
		MEDIA	0,167125			
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0,00012221	7	1,74586E-05	12,81891062	3,18138E-09	2,203231586
Columnas	0,002014255	7	0,000287751	211,2802128	2,46022E-34	2,203231586
Error	6,6735E-05	49	1,36194E-06			
Total	0,0022032	63				
		S	0,001			
		DSR	0,698			

Tabla 5.- Análisis de varianza de dos factores para las medidas de absorbancia máxima de una disolución de Rodamina B, en cubetas de cuarzo y vidrio en las ocho posiciones disponibles en el espectrofotómetro



## Anexo II: Estudio del origen de la señal

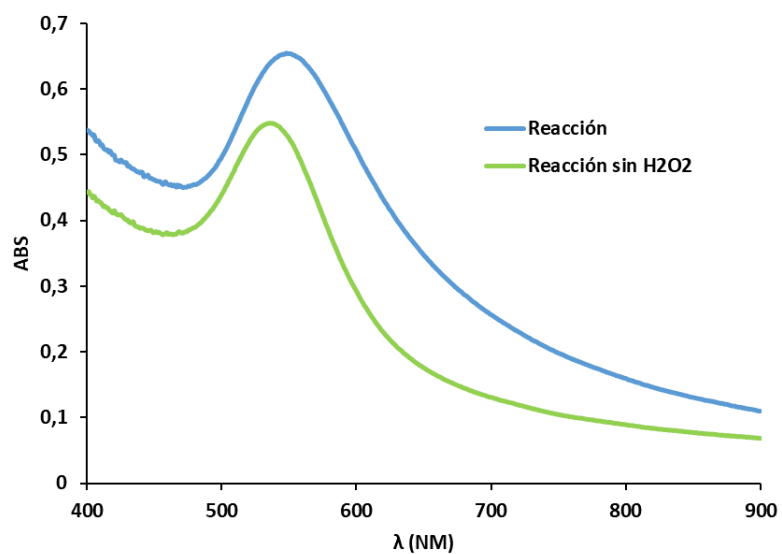


Figura A1.- Espectros de absorción a los 45 minutos de reacción para la reacción con y sin  $H_2O_2$  sobre fosfatos 0,3 M a  $pH=7,5$ ; **Reacción**)  $[PutOx]=3,57 \cdot 10^{-7} M$ ;  $[Put]=5 \cdot 10^{-4} M$  y  $[Au(III)]=1 \cdot 10^{-3} M$ ; **Reacción sin  $H_2O_2$** )  $[PutOx]=3,57 \cdot 10^{-7} M$ ;  $[Put]=5 \cdot 10^{-4} M$ ;  $[Catalasa]=100 u$  y  $[Au(III)]=1 \cdot 10^{-3} M$ ; ambas a  $60^\circ C$