

MÉTODOS ENZIMÁTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES TROPÁNICOS (ATROPINA Y ESCOPOLAMINA): SENSORES COLORIMÉTRICOS DESECHABLES Y GENERACION IN-SITU DE NANOPARTICULAS METÁLICAS

Susana de Marcos, Mario Domínguez, Javier Galbán, Isabel Sanz-Vicente.

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

1.- Alkaloides tropánicos: Importancia y métodos de análisis

Los Alkaloides Tropánicos (AT) son metabolitos secundarios (sustancias químicas que no participan en los procesos metabólicos principales) de algunas plantas, cuya función principal es actuar como mecanismo de defensa frente a insectos herbívoros [1]. Estos compuestos son sintetizados por las plantas a partir de Putrescina (una amina biógena que proviene de la bio-degradación de aminoácidos) y tienen una estructura básica común, constituida por un anillo de tropano o su forma des-metilada, Nortropano.

Se han descrito más de 200 AT diferentes; comúnmente se suelen agrupar en 4 familias [2] (Figura 1):

- 1.- Los AT de baja masa molecular (Figura 1A); los más relevantes son la tropina (y nortropina) y la escopina.
- 2.- Las Calisteginas, que son derivados del nortropano con 3(tipo A), 4(tipo B) o mas -OH (Figura 1B; las Caligestina A3 es un ejemplo)
- 3.- Los Convolvuláceos, que consisten básicamente en esteres de la (nor)tropina con el ácido fenilacético (la Cocaína, Figura 1C, es la más representativa)
- 4.- Los derivados de la Datura (Figura 1D), que también son esteres de la tropina/escopina, en este caso con el ácido benzoico, siendo los más importantes la (-)-Hiosciamina y la (-)-Escopolamina. La mezcla racémica de los dos estereoisómeros de la Hiosciamina se conoce como Atropina, aunque hay cierto desacuerdo en la nomenclatura.

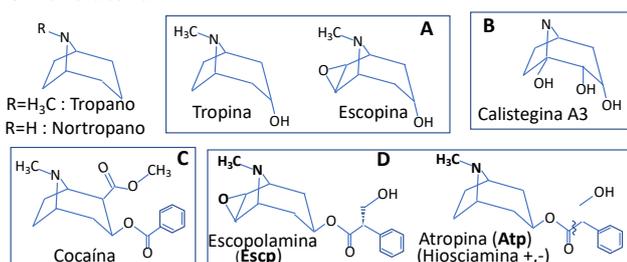


Figura 1.- Familias de Alkaloides Tropánicos

Los estudios de toxicidad realizados sobre estos compuestos se han centrado en la Atropina (Atrp) y la Escopolamina (Escp), que son el objeto de este trabajo. En realidad, en el organismo humano estas sustancias tienen un efecto anticolinérgico positivo, razón por la cual se utilizan como fármacos en diferentes tipos de patologías, que van desde el tratamiento de afecciones pulmonares (EPOC), Parkinson, trastornos gastrointestinales hasta cinetosis [3] (hasta hace poco se utilizaban parches de Escp para evitar el mareo producido en medios de transporte). El problema es que tienen un rango terapéutico estrecho y al estar

presentes en algunos alimentos, pueden dar lugar a sobredosis involuntarias. Además, desde hace unos años es bien conocido el grave problema social asociado al uso ilícito de la Escp (“burundanga”); dosis altas de este compuesto producen efectos de relajación extremos que desembocan en lo que se ha dado en llamar “sumisión química” en víctimas de delitos sexuales o de robos.

Los AT pueden aparecer en los alimentos por dos vías. La primera es que sean constituyentes de las partes comestibles de las plantas de los que proceden; por ejemplo, las Calisteginas son constituyentes de multitud de productos vegetales como las coles, brócoli, calabaza, grelos, patatas, berenjenas o batatas. La segunda, que es la más importante, es que aparezcan como consecuencia de contaminación natural. Así, en plantaciones como lino, soja, sorgo, mijo o girasol crecen, como malas hierbas, plantas de la familia de la datura que contienen altas cantidades de Atp y Esp (pueden llegar hasta los 3 g/Kg [5]), y que son recolectadas junto con ellas; dado que los AT se encuentran presentes en todas las partes de la planta la contaminación es prácticamente imposible de evitar.

La presencia de AT en alimentos (en especial, aquellos destinados a los niños), es un tema que preocupa a las autoridades nacionales e internacionales. Estudios detallados publicados por la Autoridad Europea en Salud Alimentaria (EFSA) en el año 2013 [6], se centran en la peligrosidad para las personas de la Atrp y la Escp, y han concluido la necesidad de establecer como dosis máxima de ingestión 0,016 mg/Kg de peso corporal (suma de ambos). A raíz de estos estudios, la Unión Europea (UE) estableció una concentración máxima de cada una de esos dos AT de 1,0 mg/Kg en alimentos para lactantes y niños de corta edad (tabla 1) [7]. Posteriormente, en el año 2016 [8], se publicaron los resultados de un nuevo estudio auspiciado por la EFSA en el que se realizó la determinación de AT de las cuatro familias citadas anteriormente (un total de casi 40 compuestos) en muestras (más de 1300) de alimentos muy variados procedentes de diferentes países de la UE, encontrando cantidades de Atrp y Escp, así como de otros AT, en gran parte de las muestras. En el 2021, la UE ha actualizado la legislación sobre contenidos máximos de AT ampliándolo a un mayor número de productos, legislación que entro en vigor el pasado mes de septiembre [9] (tabla 1).

Alimentos	Máximos (cg/Kg)
Alimentos transformados a base de cereales y alimentos para lactantes y niños de corta edad que contengan mijo, sorgo, alforfón, maíz o sus productos derivados	Atrp=1 Escp=1
Mijo y sorgo no transformados	Atrp=Escp=0
Maíz no transformado, excepto: - el destinado a molienda por vía húmeda - el reventón	Atrp=Escp=0,5
Alforfón (trigo sarraceno) no transformado	Atrp=Escp=0
Maíz reventón Mijo, sorgo, y maíz, comercializados para el consumidor final Producto de la molienda del mijo, del sorgo y del maíz	Atrp=Escp=0
Alforfón comercializado para el consumidor final Producto de la molienda del alforfón	Atrp + Escp = 0
Infusiones de hierbas (producto desecado), excepto las de semillas de anís.	Atrp=Escp=0,5
Infusiones de hierbas (producto desecado) de semillas de anís.	Atrp=Escp=0
Infusiones de plantas (líquidas)	Atrp + Escp = 0,2

Los métodos más eficaces para el análisis completo de AT en muestras de alimentos se basan en cromatografía instrumental [10,11]. De hecho, la UE recomienda el uso HPLC-MS/MS y, alternativamente de GC-MS. Para realizar análisis rápidos de AT individuales se pueden encontrar (en bibliografía científica) métodos basados en inmunoensayos [12], aunque los que existen comerciales se destinan al análisis forense o a la detección de AT en el dopping.

2.- Desarrollo de métodos enzimáticos para Alcaloides Tropánicos: NAD(P)H

Nuestro grupo de investigación trabaja en el desarrollo de métodos enzimáticos colorimétricos y fluorimétricos, y su implementación en tiras reactivas desechables o sistemas de monitorización en continuo. Los sistemas de detección que utilizamos están basados en:

- 1) sistemas indicadores clásicos para la medida del H₂O₂ generado en la reacción enzimática, basados en HRP y un colorante/fluoróforo;
- 2) las propiedades intrínsecas de las enzimas, cuando estas las poseen, como es el caso de las flavoenzimas y hemoproteínas; esta metodología evita el uso de las reacciones anteriores y permite reusar las enzimas, si previamente se han inmovilizado.
- 3) generación de nanomateriales metálicos, durante la reacción enzimática, a partir de los iones precursores, como sistema indicador alternativo [13].

Para el desarrollo de los métodos para **Atrp** y **Escp**, al no encontrarse antecedentes bibliográficos, se estudiaron posibles rutas de degradación enzimática de estos compuestos [3,14]. Para **Atrp** se seleccionó una basada en dos etapas que involucran a la **Tropina estearasa** (3.1.1.10) y la **Tropinona Reductasa I** (1.1.1.206) (Figura 2).

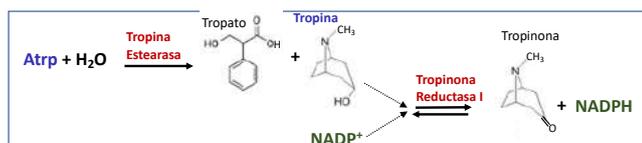


Figura 2.- Secuencias de reacciones propuestas para el análisis de **Atrp**

El problema con estas enzimas (muy frecuente en el análisis enzimático) es que los proveedores comerciales

habituales no disponen de ellas. Afortunadamente, en la actualidad es posible contactar con empresas de biotecnología que las pueden sintetizar (a partir del gen) o extraer a costes razonables; para esta aplicación nos las proporcionaron la empresa Gecco™. Sin embargo, las empresas biotecnológicas no suelen, por lo general, responsabilizarse del correcto funcionamiento de la enzima para la aplicación solicitada, sino solamente de su síntesis (y en todo caso, de su actividad para un sustrato modelo), y es el propio cliente quien tiene que contrastar si funciona o no, y su actividad.

Por ello, empezamos a evaluar la **Tropinona Reductasa I** empleando Tropina como analito, midiendo la absorbancia del NAD(P)H (340 nm). Es importante indicar que la determinación de la Tropina tiene también interés dado que pertenece a la Familia 1 de AT citada al principio. El estudio de optimización permitió poner a punto un método para determinar el analito desde 3*10⁻⁶M (límite de cuantificación, LoQ) hasta, al menos, 2*10⁻⁴M. El LoQ es satisfactorio si se tiene en cuenta la absorptividad molar del NAD(P)H (en torno a 5000 M⁻¹cm⁻¹) y la estequiometría de la reacción.

El uso de **Atrp** como sustrato (Figura 2) permitió evaluar la **Tropina Estearasa**. La actividad de la enzima resultó ser (mucho) menor de lo esperado, pero se pudo suplir sustituyéndola por un método de hidrólisis básico convencional con NaOH. Tras el estudio de optimización se pudo poner a punto un método para este analito (medida a 340 nm) con un LoQ de 4*10⁻⁶M, similar al de la Tropina sola, lo que pone de manifiesto la eficacia del método de hidrólisis optimizado.

Como se ha indicado, nuestro interés también se centra en la determinación de **Escp**. Al aplicar esta misma metodología se obtuvieron resultados positivos, si bien el método es 1 orden de magnitud menos sensible que para la **Atrp** (LoQ 10 veces mayor), que es debido a la menor afinidad de la enzima por ella. Este resultado se considera interesante ya que en la mayoría de las muestras de alimentos donde coexisten ambos AT, las concentraciones de **Atrp** son mayores que las de **Escp** (en muchos casos, unas 10 veces mayores), por lo que la interferencia de la segunda en la primera está dentro de la incertidumbre del método. Por otro lado, en muestras donde solo hay **Escp**, esta es muy mayoritaria. No obstante, el interés del análisis de **Atrp** y **Escp** en alimentos no es tanto determinar cada uno por separado como establecer su riesgo. Los valores de DL50 (en ratones o rata) para **Atrp** son unas 4 veces menores que los de **Escp**, por lo que tiene más significado establecer la concentración del primero.

3.- Métodos para AT basados en reacciones colorimétricas y generación de Nanoparticulas

La medida de la absorción del NAD(P)H solo se utilizó como prueba de concepto y evaluación de las enzimas. Nuestro objetivo era, dentro de lo posible, desarrollar métodos basados en las tres metodologías citadas al inicio del punto anterior. En este caso se limitan a

reacciones indicadoras clásicas y la posibilidad de usar la generación de nanopartículas de oro (**AuNP**) u otros nanomateriales, dado que no se observaron propiedades ópticas intrínsecas en la Tropinona Reductasa I. Se comentará brevemente el estado en el que se encuentran ambas investigaciones.

A) Reacciones indicadoras. Para mejorar las propiedades ópticas asociadas a la generación del NAD(P)H es frecuente acoplar una reacción indicadora con una sal de tetrazolio como cromógeno y catalizada por una diaforasa (familia de enzimas que catalizan la reoxidación del NAD(P)H), que responde a una reacción general del tipo indicado en la Figura 3. En nuestro caso se ha utilizado el violeta de 4-iodotetrazolio (INT).

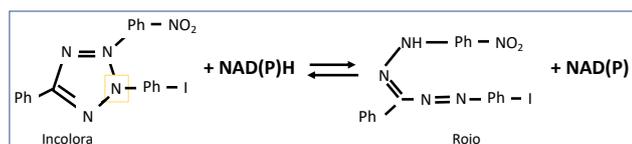
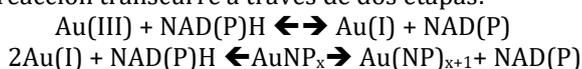


Figura 3.- Reacción indicadora basada en INT

Acoplando esta reacción indicadora se gana algo de sensibilidad (la absorptividad molar del producto está en torno a $12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), con lo que se rebaja el LoQ hasta $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, y sobre todo la medida se desplaza hacia la zona visible (en torno a 490 nm). Esta variante indicadora nos ha permitido aplicar el método a la determinación de **Atrp** en un extracto de cereales infantiles proporcionado por el Centro de Salud Pública del Gobierno de Aragón (DGA), obteniendo un valor de $1,0 (\pm 0.2) \text{ mg/Kg}$ que es estadísticamente similar al obtenido por ellos ($0,9 \pm 0.1, \text{ mg/Kg}$) utilizando un método propio basado en HPLC-MS [15].

B) Generación de nanopartículas metálicas. Pavlov y Willmar [16] demostraron hace un tiempo que el NAD(P)H puede reducir el Au(III) y, con ello, hacer crecer AuNP previamente añadidas como semillas. La reacción transcurre a través de dos etapas:



Nuestro objetivo es utilizar este mismo proceso para detectar el NAD(P)H formado (como alternativa al sistema diaforasa/tetrazolio indicado en la Figura 3), pero sin necesidad de añadir semillas de AuNP; en su lugar, se lleva cabo la reacción en un medio que estabilice el Au⁰ como AuNP, como puede ser el uso de una disolución amortiguadora de fosfatos. Hemos obtenidos resultados positivos (Figura 4A) con mezclas Au(III)/NAD(P)H. Sin embargo, cuando se acopla al sistema enzimático completo para la determinación de **Atrp** (Figura 2), el rango dinámico se vuelve muy corto, menor de un orden de magnitud, dado que solo funciona cuando se trabaja con concentraciones de NAD del orden de la concentración de Au(III) que se use. Los estudios que hemos realizado para resolver esta limitación han permitido establecer que el problema radica en que el Au(III) (también el Au(I)) puede formar complejos con

la adenina del NAD(P). Cuando hay exceso de NAD respecto de Au(III) (situación que se debe cumplir necesariamente en la determinación de **Atrp**), el complejo Au(III)/NAD reduce el potencial normal condicional del Au(III)/Au(I)/Au⁰ evitando que oxide al NAD(P)H formado.

Estamos tratando de resolver el problema usando miméticos del NAD(P)H (Figura 4B), es decir, sustancias que contienen el grupo nicotinamida (el grupo redox activo de la molécula) y sustituyentes que le permiten unirse a la enzima, pero sin el resto adenina. Este tipo de miméticos han sido propuestos como alternativa económica al NAD(P), pero no funcionan para todas las deshidrogenasas, sino que hay que adecuarlos a cada enzima en particular. Los estudios están ofreciendo resultados satisfactorios y se están llevando a cabo en colaboración de con el grupo de la Dra. Christine Paul (Universidad de Graz) que es especialista en la síntesis de este tipo de reactivos [17].

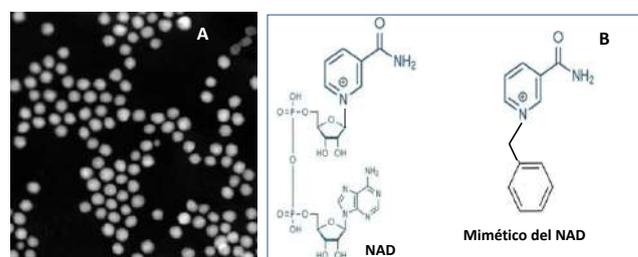


Figura 4.- A) TEM de AuNP formadas por reacción del NAD(P)H con Au(III); **B)** NAD y miméticos del NAD

4.- Conclusiones y estudios futuros

La toxicidad real de las diferentes familias de AT no está todavía suficientemente establecida y requiere de muchos estudios adicionales [2,6,8], por lo que es necesario seguir avanzando en el desarrollo de métodos rápidos para estos compuestos.

Los resultados aquí mostrados permiten indicar que el uso de métodos enzimáticos basados en la **Tropinona reductasa I** son una alternativa eficaz para la determinación de **Atrp** y **Escp**; esta metodología (basada en esta u otras enzimas) podría extenderse a otros tipos de AT. Los estudios que estamos y vamos a seguir realizando van en dos direcciones:

1) Sensores desechables colorimétricos. Estamos implementando el método colorimétrico basado en Tetrazolio/Diaforasa en la fabricación de tiras reactivas de celulosa (sensores desechables) que permitan la determinación rápida de **Atrp** en extractos de alimentos; también estamos estudiando el uso de estas tiras reactivas para la determinación rápida de **Escp** en muestras de bebidas fraudulentamente adulteradas con este alcaloide, dado que los LoQ requeridos para estas determinaciones son menos exigentes [18]. La determinación se realizará utilizando un dispositivo de medida de color (coordenadas RGB) que estamos desarrollando en el contexto de un proyecto PDC [19].

2) Generación de nanopartículas metálicas. Se van a llevar a cabo estudios dirigidos a encontrar el mimético

del NAD(P)H más adecuado para la determinación de **Atrp** utilizando no solo la formación de AuNP [20,21], sino también nanopartículas mixtas Au/Pt ó Au/Pd que mejoran las propiedades de las AuNP como reacción indicadora.

5.- Agradecimientos

Esta publicación es parte del proyecto de I+D+i PID2019-105408GB-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/.

6.- Bibliografía

- [1] I. Shonle, J. Belgerson, Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura Stramonium* L. (Solanaceae), *Ecology* **2000**, *54*, 778. DOI: [10.1111/j.0014-3820.2000.tb00079.x](https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00079.x)
- [2] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed, *EFSA Journal* **2013**, *11*, 3386. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3386.
- [3] K.L. Hohnen-Johannsen, O.Kayser, Tropane Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production. *Molecules* **2019**, *24*, 976: DOI: 10.3390/molecule3s24040796.
- [4] M. de Nijs, C. Crews, F. Dorgelo, S. MacDonald, P.P.J. Mulder, Emerging issues on tropane alkaloid contamination of food in Europe. *Toxins* **2023**, *15*, 98: DOI: 10.3390/toxins15020098.
- [5] M. Sharma, I. Dhaliwal, K. Rana, A.K. Delta, P. Kaushik, C, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of Datura Species-A Review. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1291: DOI: 10.3390/antiox10081291.
- [6] EFSA y M. Binaglia, Assesment of the conclussions of the joint FAO/WHO expert meeting on tropane alkaloids, *EFSA Journal* **2022**, *20*, 7229. DOI: 10.2903/j.efsa.2022.7229.
- [7] Reglamento (UE) 2016/239 L 45/3. Transcripcion al BOE: <https://www.boe.es/doue/2016/045/L00003-00005.pdf> (ultimo acceso Febrero 2023).
- [8] P.J. Mulder, M. de Nijs, M. Castellari, M. Hortos, S. McDonald, C. Crews, J. Hajslova, M. Stranska. Ocurrance of tropane alkaloids in food. *EFSA Supporting publication* **2016**:EN-1140. DOI: 10.2903/sp.efsa.2016.EN-1140.
- [9] Reglamento (UE) 2021/1408 L 304/1. Transcripcion al BOE: <https://www.boe.es/doue/2021/304/L00001-00004.pdf> (ultimo acceso Febrero 2023).
- [10] P. Christen, S. Bieri, S. Berkov S. Methods of Analysis: Tropane Alkaloids from Plant Origin. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) Natural Products. Springer, Berlin, Heidelberg, **2013**
- [11] L. González-Gómez, S. Morante-Zarcelero, D. Pérez-Quintanilla, I. Sierra, Occurrence and chemistry of tropane alkaloids in foods, with a focus on sample analysis methods: a review on recent trends and technological advances. *Foods* **2022**, *11*, 407. DOI: 10.3390/foods11030407
- [12] **a)** Z. Ren, H. Zhang, Z. Wang, X. Chen, L. Yang, H. Jiang, Progress in immunoassays of toxics alkaloids in plant-derived medicines: a review, *Toxins* **2022**, *14*, 165. DOI: 10.3390/toxins14030165; **b)** <https://www.neogen.com/en-gb/categories/toxicology/ipratropium-atropine-racing-elisa-kit/>.
- [13] S. de Marcos, I. Sanz-Vicente, Á. López-Moliner, J. Camacho-Aguayo, M. Domínguez, P. Cebrián, J. Navarro, A. Martín-Barreiro y J. Galbán. Biosensores enzimáticos basados en la generación in-situ de nanomateriales de oro: una alternativa a los métodos enzimáticos ópticos clásicos. *Actualidad Analítica* **2021**, *75*.
- [14] L. Ellis, S. Balcome, Artropine degradation pathways. Publicado en internet: http://eawag-bbd.ethz.ch/atp/atp_map.html).
- [15] E. Perisé, R. Velarte, J.L. Naya, Determinación de alcaloides tropánicos por cromatografía de líquidos con detector de espectrometría de masas (LC-MS/MS), IT ITE-FQ/096 Rev. 05 Abril 2021.
- [16] Y. Xiao, V. Pavlov, S. Levien, T. Niazov, G. Markovitch, I. Willner, Catalytic growth of Au nanoparticles by NAD(P)H cofactors: optical sensors for NAD(P)+-dependent biocatalyzed transformations. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4619. DOI: 10.1002/ange.200460608.
- [17] U. Hanefeld, F. Hollman, C.E. Paul, Biocatalysis making waves in organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 594. DOI: 10.1039/d1cs00100k.
- [18] N. Jornet-Martinez, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falco, Scopolamine analysis in beverages: Bicolorimetric device vs portable nano liquid chromatography, *Talanta*. **2021**, *232*, 122406. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122406.
- [19] J. Galbán, S. de Marcos, Nuevos dispositivos de lectura de biosensores ópticos para monitorizar la seguridad y calidad de alimentos: determinación de aminos biógenas (ESFERA), PDC2021-121224-I00, Ministerio de Ciencia e Innovación.
- [20] J. Navarro, S. de Marcos, J. Galbán. Colorimetric-enzymatic determination of tyramine by generation of gold nanoparticles, *Microchim. Acta* **2020**, *187*, 174. DOI: 10.1007/s00604-020-4141-y.
- [21] J. Camacho-Aguayo, S. de Marcos, V. Mora-Sanz, J. Galbán, Selective generation of gold nanostructures mediated by flavo-enzymes to develop optical biosensors *Biosens.Bioelectron.* **2022**, *215*, 114579. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114579.