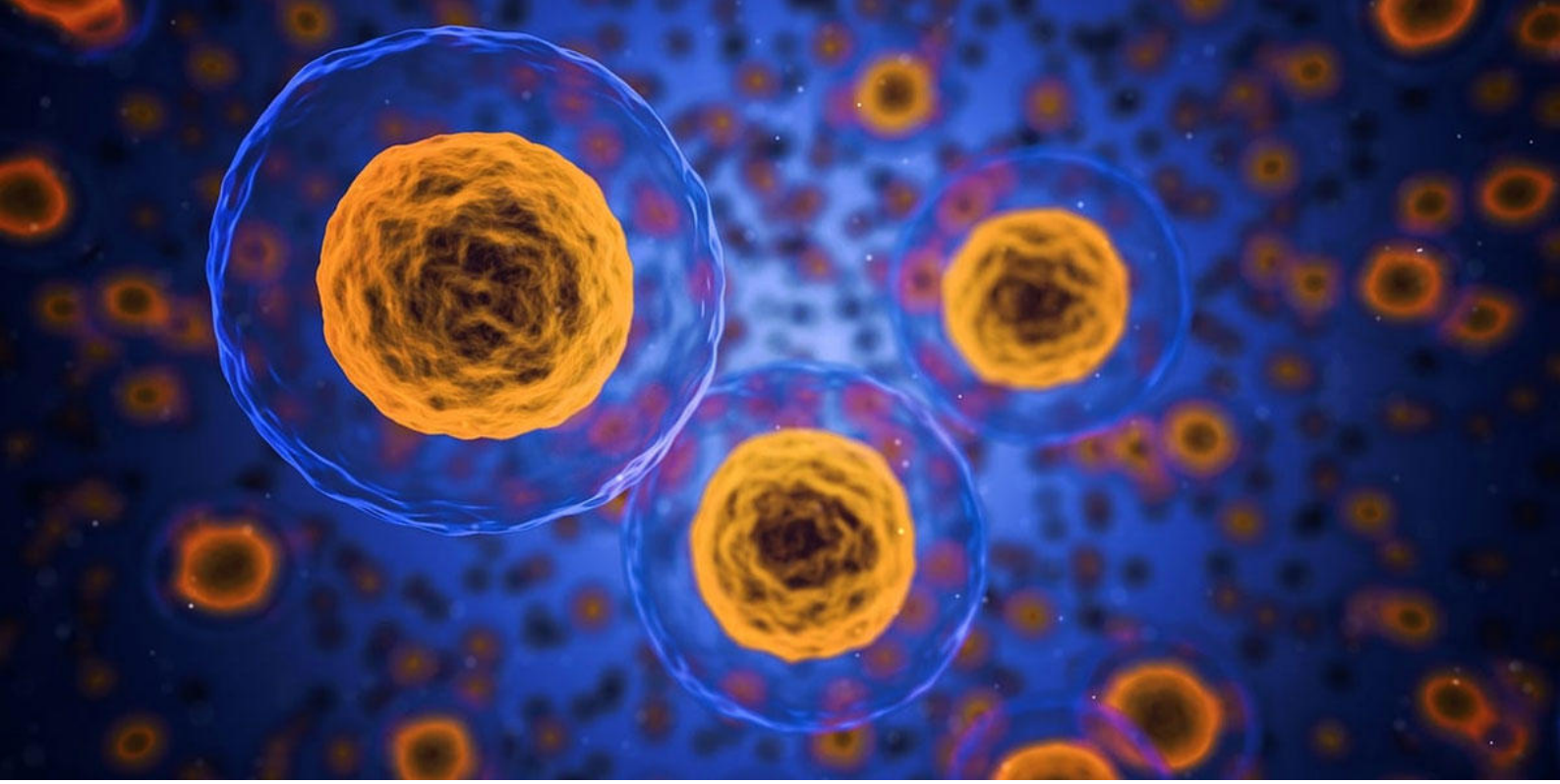


Application Note AN-FLU-002

Comprender el mecanismo de un indicador de bioensayo por fluorescencia.

Análisis del Azul Alamar durante sus procesos electroquímicos con espectroelectroquímica de fluorescencia.

El azul de Alamar, también conocido como resazurina, se utiliza ampliamente como indicador redox en ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular debido a sus propiedades ópticas. Alamar Blue es un tinte azul débilmente fluorescente. Su forma reducida (resorufina) es un tinte rosa muy fluorescente.
La espectroelectroquímica de fluorescencia ofrece a los investigadores un método poderoso para seguir y controlar las reacciones redox. Esta técnica permite estudiar diferentes procesos, como la transferencia de electrones o la presencia de productos intermedios generados durante una reacción química.
Esta Nota de Aplicación describe cómo se monitorea la fluorescencia característica de Alamar Blue durante procesos electroquímicos para obtener el conocimiento completo de este sistema.

INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

El monitoreo espectroelectroquímico de la resazurina se realizó con SPELEC, un instrumento totalmente integrado para espectroelectroquímica que combina los componentes electroquímicos (bipotensióntato/galvanostato) y espectroscópicos (fuente de luz UV-Vis y detector) en un sistema portátil. Aunque SPELEC contiene una fuente de luz con un rango de longitud de onda de 200 nm a 900 nm, se utilizó un LED de 395 nm (LEDVIS395) como fuente de luz de excitación. Este LED tiene un rango de emisión luminosa bien definido, evitando cualquier aporte de luz en longitudes de onda donde Alamar Blue fluoresce.

El resto de la configuración consistió en una sonda de reflexión (RPROBE-VIS-UV), una celda de reflexión espectroelectroquímica para electrodos serigrafiados de celda de flujo de capa delgada (TLFCL-REFLECELL) y los componentes incluidos en el kit de fluorescencia (FLKIT). El FLKIT contiene dos fibras ópticas cortas (600 µm), dos filtros ópticos (uno de los cuales filtra longitudes de onda entre 230 y 500 nm y el otro filtra longitudes de onda entre 300 y 750 nm) y dos soportes para los filtros. La configuración total se muestra en Figura 1.

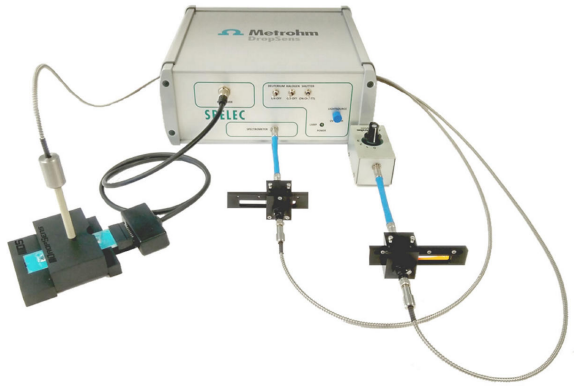


Figure 1. Configuración de espectroelectroquímica de fluorescencia utilizada para el estudio del Azul Alamar.

El electrodo de carbono circular serigrafiado integrado de celda de flujo de capa delgada (TLFCL110-CIR) consta de una tarjeta cerámica plana que contiene la celda electroquímica con un sistema de tres electrodos (electrodo de trabajo de carbono circular de 4 mm de diámetro, un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de plata, Figura 2). Esta plataforma electródica está cubierta por un tobogán con un canal que limita el espesor de la solución a 400 µm.

SPELEC se controló con DropView SPELEC, un software dedicado que proporciona información espectroelectroquímica e incluye herramientas para realizar un tratamiento y análisis adecuado de los datos recopilados. Todo el hardware y software utilizado para este estudio está compilado en tabla 1.

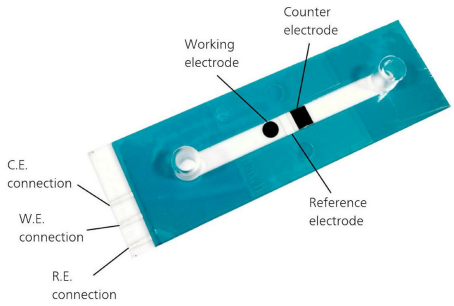


Figure 2. Electrodo de carbono circular serigrafiado integrado de celda de flujo de capa delgada (TLFCL110-CIR) con el sistema de tres electrodos descrito.

tabla 1. Descripción general del equipo de hardware y software.

Equipo	Número de artículo
Instrumento	SPELEC
Sonda de reflexión	RPROBE-VIS-UV
Luz de excitación	LEDVIS395
Kit de fluorescencia	FLKIT
Celda de flujo de reflexión espectroelectroquímica para SPE de celda de flujo de capa delgada	TLCFL-REFLECELL
Cable de celda de flujo de capa delgada SPE	CAST-TLFCL
SPE de celda de flujo de capa delgada	TLFCL110-CIR
Software	DropView SPELEC

ESPECTROELECTROQUÍMICA DE FLUORESCENCIA DEL AZUL DE ALAMAR

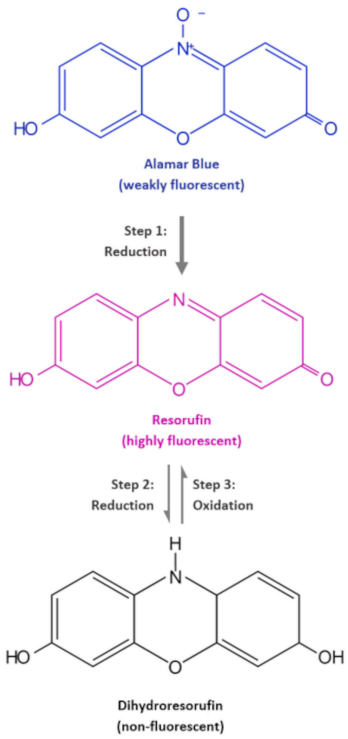


Figure 3. Esquema del mecanismo redox del azul de Alamar a dihidroresorufina.

Alamar Blue es una molécula débilmente fluorescente que puede reducirse irreversiblemente a resorufina, un tinte rosa altamente fluorescente. Sin embargo, cuando la resorufina se expone a condiciones de reducción más fuertes, se convierte de forma reversible en dihidroresorufina, una especie incolora que no emite fluorescencia. Las reacciones de oxidación-reducción se muestran en figura 3.

La reducción electroquímica de 0,001 mol/L de azul Alamar se realizó en una solución acuosa de 0,1 mol/L de KCl. La emisión de fluorescencia se registró simultáneamente junto con la senal electroquímica, recopilando información sobre los procesos electroquímicos que tuvieron lugar en la superficie del electrodo durante todo el experimento.

Para obtener la mayor información posible sobre este sistema, se realizó un experimento de cronoamperometría multipulsos donde se aplicaron tres pulsos amperométricos diferentes. En el primer paso, se aplicó un potencial de -0,45 V durante 300 s para reducir Alamar Blue a resorufina. Durante el segundo paso, se aplicó un potencial de -1,00 V durante 300 s para reducir la resorufina a dihidroresorufina. Finalmente, se aplicó un potencial de -0,10 V durante 300 s para oxidar la dihidroresorufina generada en el paso anterior a resorufina.

REDUCCIÓN CONTROLADA DEL AZUL ALAMAR

En el primer paso del experimento de cronoamperometría multipulso descrito en la sección anterior, se llevó a cabo la reducción irreversible de Alamar Blue aplicando -0,45 V durante 300 s. La emisión de fluorescencia se registró junto con la senal electroquímica, adquiriendo espectros cada 0,75 s. Figura 4a muestra la senal electroquímica (línea gris), y los espectros de fluorescencia registrados durante la medición se muestran en Figura 4b. Aquí se diferencia claramente una banda de emisión centrada en 590 nm. Según las propiedades espectroscópicas de la resorufina, esta banda de emisión es característica de esta molécula.

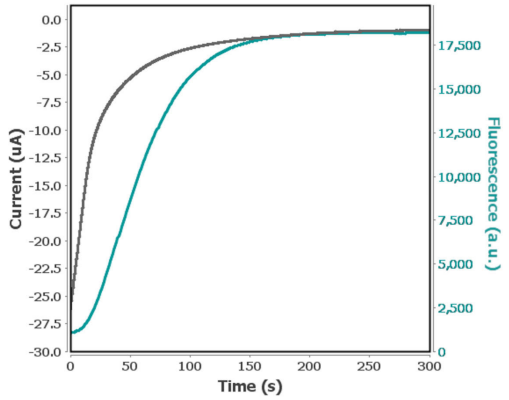


Figura 4a Potencial del primer paso de un experimento de cronoamperometría multipulso aplicando -0,45 V durante 300 s en una solución de 0,001 mol/L de Azul Alamar en 0,1 mol/L de KCl (línea gris) y evolución de los espectros de fluorescencia a 590 nm en el tiempo (Línea verde).

Figura 4a También se muestra la evolución de la banda de fluorescencia centrada en 590 nm con el tiempo (línea verde). Las mediciones Operando permiten a los usuarios obtener información espectroscópica durante toda la medición. La senal de fluorescencia aumenta desde el inicio del experimento y luego permanece constante desde 200 s hasta el final del experimento debido a la reducción completa de Alamar Blue a resorufina. Un potencial de -0,45 V es suficiente para reducir Alamar Blue a resorufina, pero no suficiente para reducir la resorufina a dihidroresorufina.

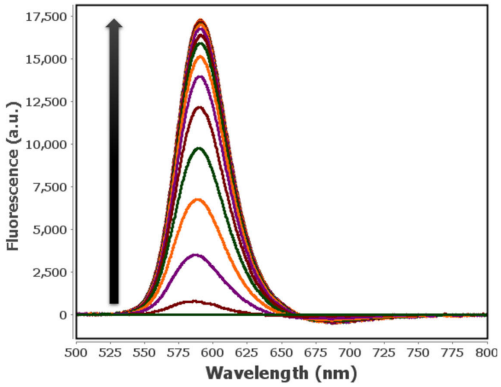


Figura 4b Espectros de fluorescencia registrados durante el primer paso potencial del experimento de tres partes.

REDUCCIÓN DE RESORUFINA A DIHIDRORRESORUFINA

Para reducir la resorufina (generada en el paso anterior) a dihidroresorufina, el siguiente pulso potencial se realizó aplicando -1,00 V durante 300 s. Figura 5a Muestra la senal electroquímica (línea gris) así como la evolución de la banda de fluorescencia a 590 nm con el tiempo (línea verde). Figura 5b muestra los espectros de fluorescencia registrados durante este segundo paso.

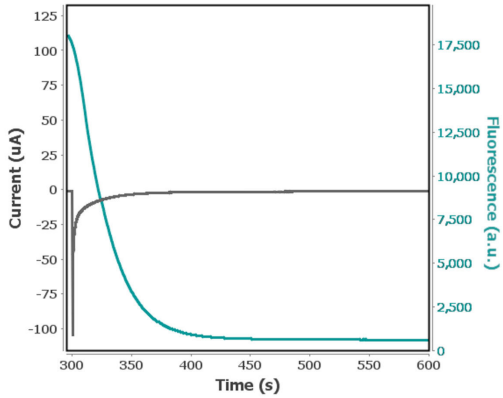


Figura 5a Potencial del segundo paso de un experimento de cronoamperometría multipulso aplicando -1,00 V durante 300 s en una solución de 0,001 mol/L de Azul Alamar en 0,1 mol/L de KCl (línea gris) y evolución de los espectros de fluorescencia a 590 nm en el tiempo (Línea verde).

Aunque la intensidad de la banda de emisión a 590 nm fue completamente estable al final del primer paso (Figura 4a, línea verde), el segundo paso demuestra que esta banda de emisión disminuye abruptamente durante 100 s cuando se aplica un potencial de -1,00 V. No se detectó fluorescencia durante el resto del experimento, lo que demuestra la reducción exitosa de resorufina (altamente fluorescente) a dihidroresorufina, una molécula no fluorescente (figura 3).

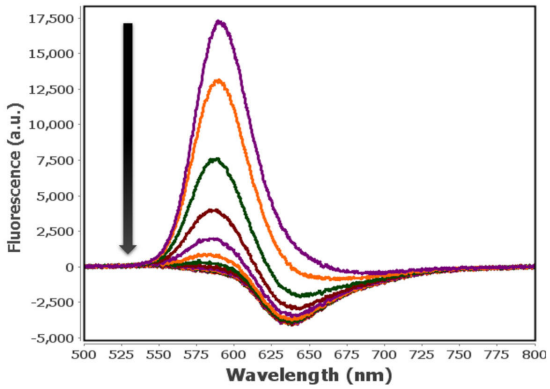


Figure 5b Espectros de fluorescencia registrados durante el segundo paso potencial del experimento de tres partes.

REOXIDACIÓN DE DIHIDRORRESORUFINA A RESORUFINA

Finalmente, se aplicó un tercer paso potencial con el objetivo de reoxidar la dihidroresorufina generada en el segundo paso a resorufina. Figura 6a muestra la senal electroquímica (línea gris) y la evolución espectral de la banda de fluorescencia centrada en 590 nm (línea verde) cuando se aplicó -0,10 V durante 300 s. Este gráfico muestra que la senal óptica alcanza los valores de fluorescencia obtenidos en el primer pulso del experimento de cronoamperometría, mostrado en Figura 4a.

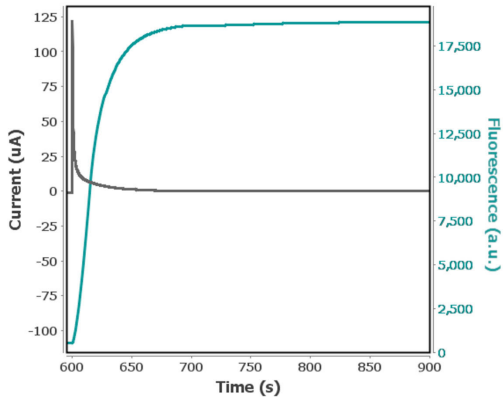


Figure 6a Potencial del tercer paso de un experimento de cronoamperometría multipulso aplicando -0,10 V durante 300 s en una solución de 0,001 mol/L de Azul Alamar en 0,1 mol/L KCl (línea gris) y evolución de los espectros de fluorescencia a 590 nm en el tiempo (Línea verde).

La evolución del espectro mostrada en Figura 6b confirma el aumento de la banda de fluorescencia centrada en 590 nm. La dihidroresorufina se oxida completamente de nuevo a resorufina debido al máximo de fluorescencia observado en el primer paso del experimento (Figura 4b) también se obtiene aquí en el tercer paso. Por tanto, queda claramente demostrada la reversibilidad del proceso redox entre resorufina y dihidroresorufina.

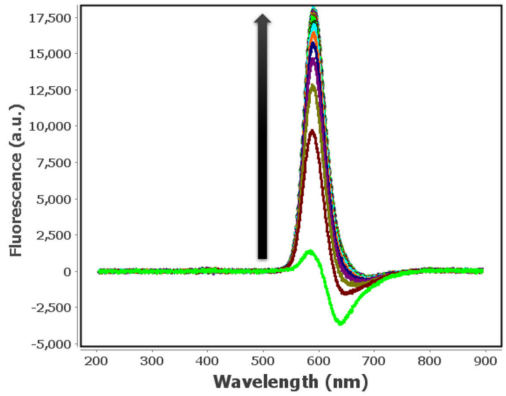


Figure 6b Espectros de fluorescencia registrados durante el tercer paso potencial del experimento de tres partes.

CONCLUSIÓN

La espectroelectroquímica es una poderosa técnica que proporciona información de diferente naturaleza combinando las ventajas de la electroquímica y la espectroscopia. En este estudio, la senal de fluorescencia asociada con Alamar Blue se ha analizado con potencial variable. La reducción de esta molécula a un potencial de -0,45 V para generar resorufina produce una senal de fluorescencia mejorada. Una mayor reducción de resorufina a dihidroresorufina tiene lugar a -1,00 V, lo que disminuye la senal óptica debido a las propiedades de las especies reducidas. Finalmente, la reoxidación de dihidroresorufina a resorufina muestra un aumento en la senal de fluorescencia y muestra la excelente reversibilidad de este proceso electroquímico. Comprender este mecanismo abre nuevas posibilidades para el desarrollo de nuevas aplicaciones de Alamar Blue, como su uso como indicador de viabilidad celular.

MÁS INFORMACIÓN

1. Ibánez, D.; Izquierdo-Bote, D.; Pérez-Junquera, A.; et al. Raman and fluorescence spectroelectrochemical monitoring of resazurin-resorufin fluorogenic system, *Dyes and Pigments*. 2020, *172*, 107848. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107848
2. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *Eur. J. Biochem.* 2000, *267*, 5421. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
3. Twigg, R.S.; Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin, *Nature*. 1945, *155*, 401. https://doi.org/10.1038/155401a0

1. Ibánez, D.; Izquierdo-Bote, D.; Pérez-Junquera, A.; et al. Monitoreo espectroelectroquímico de fluorescencia y raman del sistema fluorogénico resazurina-resorufina, *Tintes y pigmentos*. 2020, *172*, 107848. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107848
2. O'Brien, J.; Wilson, I.; Ortón, T.; et al. Investigación del tinte fluorescente Alamar Blue (resazurina) para la evaluación de la citotoxicidad de células de mamíferos. *EUR. J. bioquímica*. 2000, *267*, 5421. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
3. Twigg, RS; Aspectos de oxidación-reducción de la resazurina, *Naturaleza*. 1945, *155*, 401. https://doi.org/10.1038/155401a0

NOTAS DE APLICACIÓN RELACIONADAS

AN-GRIPE-001 Espectroelectroquímica de fluorescencia de $[Ru(bpy)_3]^{2+/3+}$ en régimen de difusión semiinfinito

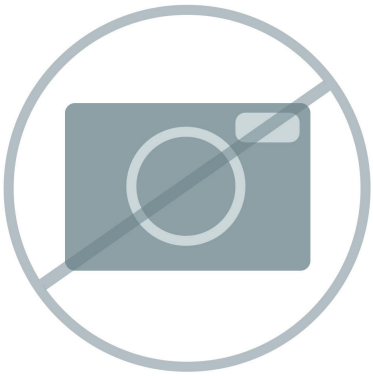
CONTACT

Metrohm Argentina S.A.
Avda. Regimiento de Patricios 1456
1266 Buenos Aires
info@metrohm.com.ar

CONFIGURACIÓN

Aparato UV-VIS SPELEC (200-900 nm)

SPELEC es un aparato para realizar medidas espectroelectroquímicas. Combina en un solo instrumento una fuente de luz, un bipotenciostato-galvanostato y un espectrómetro (gama de longitud de onda de UV/VIS: 200-900 nm) e incluye un software específico para espectroelectroquímica que permite la sincronización de experimentos electroquímicos y ópticos.



Sonda de reflexión VIS-UV

Sonda de reflexión VIS-UV disenada para realizar experimentos de reflexión y apta para trabajar con nuestra celda de reflexión para nuestros electrodos serigrafiados o con cualquier celda convencional.

Luz LED VIS 395 nm

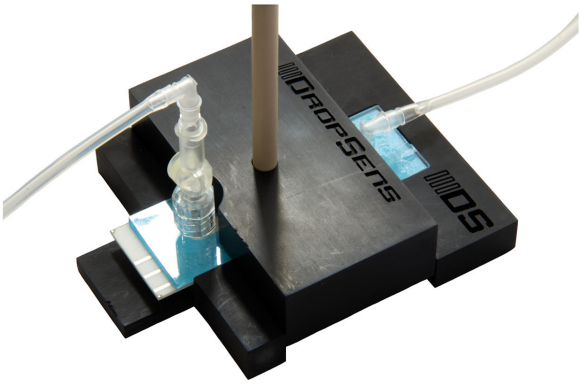
Luz LED con una longitud de onda de 395 nm

Kit de fluorescencia

Kit para realizar experimentos de fluorescencia compuesto por 2 cables cortos de fibra óptica (600 µm) terminados en conexiones SMA 905, 2 filtros ópticos, uno de 230-500 nm y otro de 300-750 nm de longitud de onda y 2
soportes para los filtros.

Complete su instalación anadiendo la luz de excitación requerida, en función de la gama de interés (ref. LEDUV275, LEDVIS395 o LEDRGB).

Para llevar a cabo experimentos de espectroscopía de fluorescencia combinados con espectroelectroquímica (ref. SPELEC) con electrodos serigrafiados, adquiera la sonda de reflexión (RPROBE) y la celda de reflexión (REFLECELL) adecuadas.



Celda espectroelectroquímica de reflexión para electrodos serigrafiados con celda de flujo continuo y capa delgada

Celda para la realización de medidas espectroelectroquímicas en condiciones de flujo en combinación con los electrodos serigrafiados en formato TLFCL-CIR, los accesorios adecuados y la ref. RPROBE-VIS-UV.

Cable Stat para electrodos serigrafiados en formato TLFCL

Conector de cable desde aparatos µStat y la línea de aparatos SPELEC hasta electrodos serigrafiados en formato TLFCL

Electrodo circular serigrafiado de carbono con celda de flujo de película fina integrada

Electrodo circular serigrafiado de carbono con celda de flujo de película fina integrada (aux.: C; ref.: Ag)