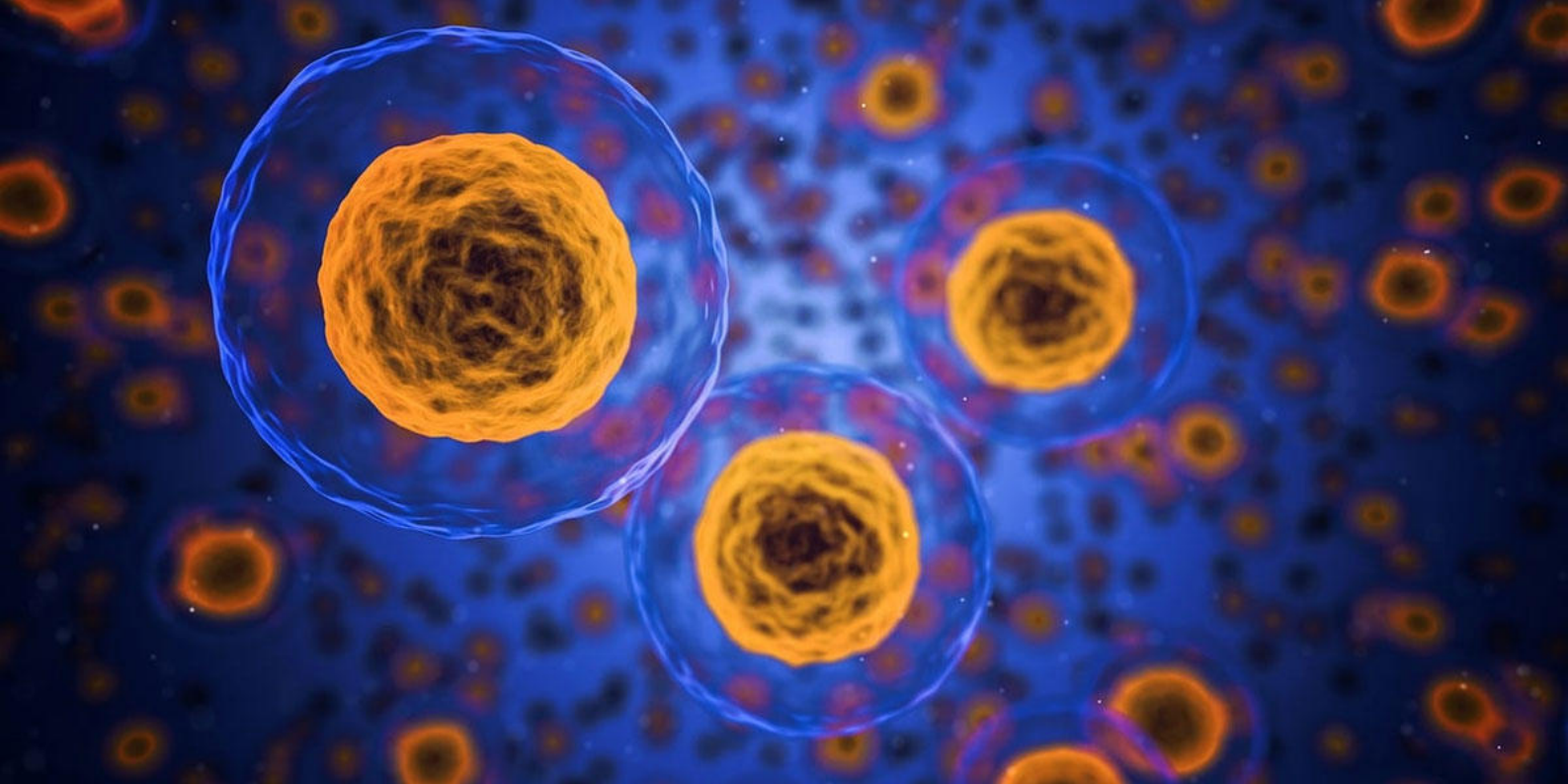




Application Note AN-FLU-002

Comprensione del meccanismo di un indicatore di biotest mediante fluorescenza

Analisi dell'Alamar Blue durante i suoi processi elettrochimici con spettroelettrochimica a fluorescenza

Alamar Blue, noto anche come resazurina, è ampiamente utilizzato come indicatore redox nei test di vitalità cellulare e citotossicità grazie alle sue proprietà ottiche. Il blu di Alamar è un colorante blu debolmente fluorescente. La sua forma ridotta (resorufina) è un colorante rosa altamente fluorescente.

La spettroelettrochimica a fluorescenza offre ai ricercatori un metodo efficace per monitorare e

controllare le reazioni redox. Questa tecnica consente di studiare diversi processi, come il trasferimento di elettroni o la presenza di prodotti intermedi generati durante una reazione chimica.

Questa Application Note descrive come la fluorescenza caratteristica dell'Alamar Blue viene monitorata durante i processi elettrochimici per ottenere una conoscenza completa di questo sistema.

STRUMENTAZIONE E SOFTWARE

Il monitoraggio spettroelettrochimico della resazurina è stato eseguito con SPELEC, uno strumento completamente integrato per la spettroelettrochimica che combina sia la componente elettrochimica (bipotenziostato/galvanostato) che quella spettroscopica (sorgente luminosa UV-Vis e rivelatore) in un sistema portatile. Sebbene SPELEC contenga una sorgente luminosa con un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 200 nm e 900 nm, è stato utilizzato un LED a 395 nm (LEDVIS395) come sorgente luminosa di eccitazione. Questo LED ha un intervallo di emissione luminosa ben definito, evitando qualsiasi contributo di luce nelle lunghezze d'onda in cui Alamar Blue è fluorescente.

Il resto della configurazione era costituito da una sonda di riflessione (RPROBE-VIS-UV), una cella di riflessione spettroelettrochimica per elettrodi serigrafati per celle a flusso a strato sottile (TLFCL-REFLECELL) e i componenti inclusi nel kit di fluorescenza (FLKIT). Il FLKIT contiene due fibre ottiche corte (600 μm), due filtri ottici (uno dei quali filtra lunghezze d'onda comprese tra 230 e 500 nm, e l'altro lunghezze d'onda comprese tra 300 e 750 nm) e due supporti per i filtri. La configurazione completa è mostrata in **Figura 1**.

L'elettrodo circolare in carbonio serigrafato integrato a cella di flusso a strato sottile (TLFCL110-CIR) è costituito da una piastra ceramica piatta contenente la cella elettrochimica con sistema a tre elettrodi (elettrodo di lavoro circolare in carbonio di 4 mm di diametro, un controelettrodo in carbonio e un elettrodo di pseudo-riferimento in argento, **Figura 2**). Questa piattaforma elettrodica è coperta da una slitta con un canale che limita lo spessore della soluzione a 400 μm .

SPELEC è stato controllato con DropView SPELEC, un software dedicato che fornisce informazioni spettroelettrochimiche e include strumenti per eseguire un'adeguata elaborazione e analisi dei dati raccolti. Tutto l'hardware e il software utilizzati per questo studio sono elencati nella **Tabella 1**.

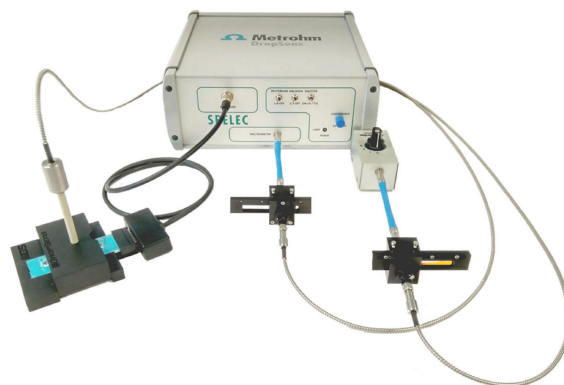


Figure 1. Configurazione spettroelettrochimica a fluorescenza utilizzata per lo studio di Alamar Blue.

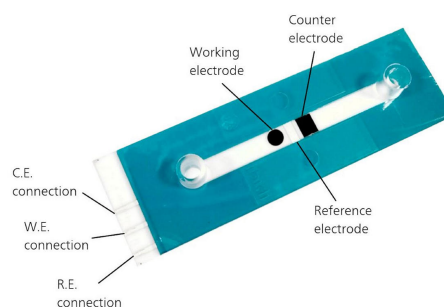


Figure 2. Elettrodo circolare in carbonio serigrafato integrato con cella di flusso a strato sottile (TLFCL110-CIR) con il sistema a tre elettrodi descritto.

Tabella 1. Panoramica delle apparecchiature hardware e software.

Strumentazione	Cod. articolo
Strumento	SPELEC
Reflection probe	RPROBE-VIS-UV
Excitation light	LEDVIS395
Fluorescence kit	FLKIT
Spectroelectrochemical Reflection Flow-Cell for Thin-Layer Flow-Cell SPE	TLCFL-REFLECELL
Cable Thin-Layer Flow-Cell SPE	CAST-TLFCL
Thin-Layer Flow-Cell SPE	TLFCL110-CIR
Software	DropView SPELEC

SPETTROELETTROCHIMICA A FLUORESCENZA DI ALAMAR BLUE

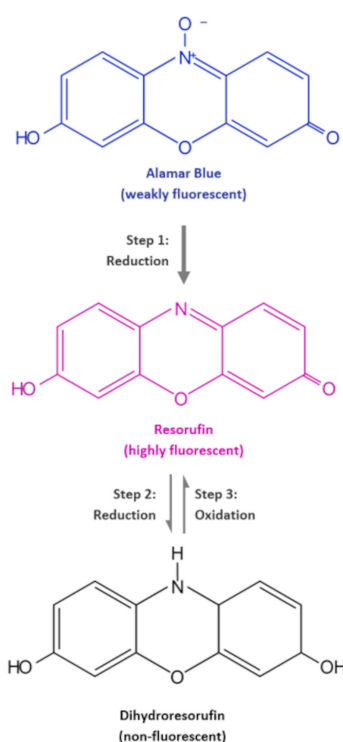


Figure 3 Schema del meccanismo redox di Alamar Blue in diidioresorufina.

Alamar Blue è una molecola debolmente fluorescente che può essere ridotta irreversibilmente a resorufina, un colorante rosa altamente fluorescente. Tuttavia, quando la resorufina viene esposta a condizioni di riduzione più forti, viene convertita reversibilmente in diidroresorufina, una specie incolore che non emette fluorescenza. Le reazioni di ossidoriduzione sono mostrate nella **Figura 3**.

La riduzione elettrochimica di 0,001 mol/L di Alamar Blue è stata eseguita in una soluzione acquosa di 0,1 mol/L di KCl. L'emissione di fluorescenza è stata registrata simultaneamente al segnale elettrochimico, raccogliendo informazioni sui processi elettrochimici

che hanno avuto luogo sulla superficie dell'elettrodo durante l'intero esperimento.

Per ottenere quante più informazioni possibili su questo sistema, è stato condotto un esperimento di cronoamperometria multi-impulso in cui sono stati applicati tre diversi impulsi amperometrici. Nella prima fase, è stato applicato un potenziale di -0,45 V per 300 s per ridurre Alamar Blue a resorufina. Nella seconda fase, è stato applicato un potenziale di -1,00 V per 300 s per ridurre la resorufina a diidroresorufina. Infine, è stato applicato un potenziale di -0,10 V per 300 s per ossidare nuovamente a resorufina la diidroresorufina generata nella fase precedente.

RIDUZIONE CONTROLLATA DI ALAMAR BLUE

Nella prima fase dell'esperimento di cronoamperometria multi-impulso descritto nella sezione precedente, la riduzione irreversibile di Alamar Blue è stata effettuata applicando -0,45 V per 300 s. L'emissione di fluorescenza è stata registrata insieme al segnale elettrochimico, acquisendo spettri ogni 0,75 s. La **Figura 4a** mostra il segnale elettrochimico (linea grigia), mentre gli spettri di fluorescenza registrati durante la misurazione sono mostrati nella **Figura 4b**. Qui è chiaramente differenziata una banda di emissione centrata a 590 nm. In base alle proprietà spettroscopiche della resorufina, questa banda di emissione è caratteristica di questa molecola.

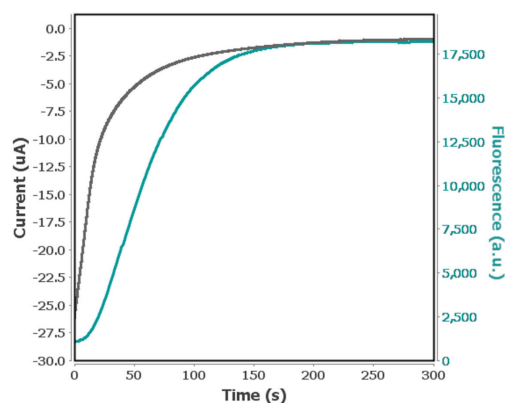


Figure 4a Potenziale del primo passo di un esperimento di cronoamperometria multi-impulso applicando -0,45 V per 300 s in una soluzione di 0,001 mol/L di Alamar Blue in 0,1 mol/L di KCl (linea grigia) ed evoluzione degli spettri di fluorescenza a 590 nm nel tempo (linea verde).

La **Figura 4a** mostra anche l'evoluzione nel tempo della banda di fluorescenza centrata a 590 nm (linea verde). Le misurazioni in Operando consentono agli utenti di ottenere informazioni spettroscopiche durante l'intera misurazione. Il segnale di fluorescenza aumenta dall'inizio dell'esperimento e rimane costante da 200 s fino alla fine dell'esperimento a causa della completa riduzione di Alamar Blue a resorufina. Un potenziale di -0,45 V è sufficiente per ridurre il Blu di Alamar a resorufina, ma non sufficiente per ridurre la resorufina a diidroresorufina.

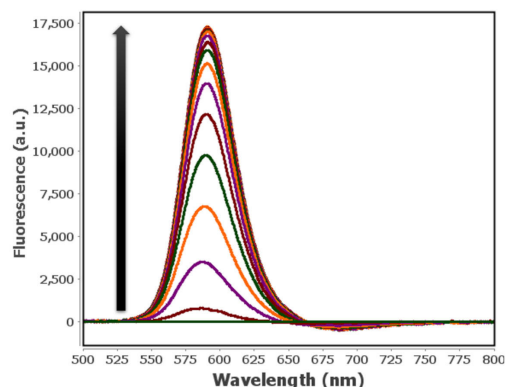


Figure 4b Spettri di fluorescenza registrati durante la prima fase potenziale dell'esperimento in tre parti.

RIDUZIONE DELLA RESORUFINA A DIIDRORESORUFINA

In order to reduce the resorufin (generated in the previous step) to dihydroresorufin, the next potential pulse was performed by applying -1.00 V for 300 s. **Figure 5a** displays the electrochemical signal (grey line) as well as the evolution of the fluorescence band at 590 nm with time (green line). **Figure 5b** shows the fluorescence spectra recorded during this second step.

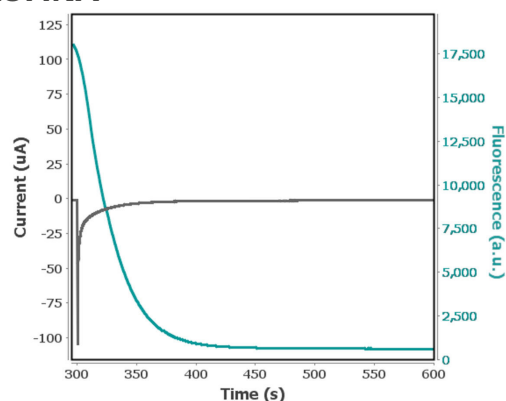


Figure 5a Second step potential of a multi-pulse chronoamperometry experiment applying -1.00 V for 300 s in a solution of 0.001 mol/L Alamar Blue in 0.1 mol/L KCl (grey line) and evolution of the fluorescence spectra at 590 nm over time (green line)

Sebbene l'intensità della banda di emissione a 590 nm fosse completamente stabile alla fine del primo passaggio (Figura 4a, linea verde), il secondo passaggio dimostra che questa banda di emissione diminuisce bruscamente per 100 s quando viene applicato un potenziale di -1,00 V. Non è stata rilevata alcuna fluorescenza durante il resto dell'esperimento, dimostrando la riuscita riduzione della resorufina (altamente fluorescente) a diidioresorufina, una molecola non fluorescente. (Figura 3).

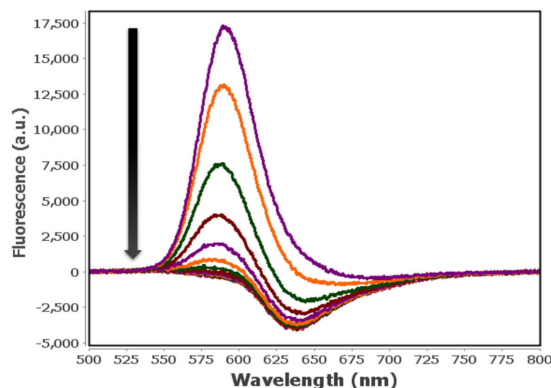


Figure 5b Spettri di fluorescenza registrati durante la seconda fase del potenziale dell'esperimento in tre parti.

RIOSSIDAZIONE DELLA DIIDRORESORUFINA A RESORUFINA

Infine, è stato applicato un terzo passaggio di potenziale con l'obiettivo di riossidare la diidioresorufina generata nel secondo passaggio, riportandola a resorufina. La Figura 6a mostra il segnale elettrochimico (linea grigia) e l'evoluzione spettrale della banda di fluorescenza centrata a 590 nm (linea verde) quando è stata applicata una tensione di -0,10 V per 300 s. Questo grafico mostra che il segnale ottico raggiunge i valori di fluorescenza ottenuti nel primo impulso dell'esperimento di cronoamperometria, mostrato in Figura 4a.

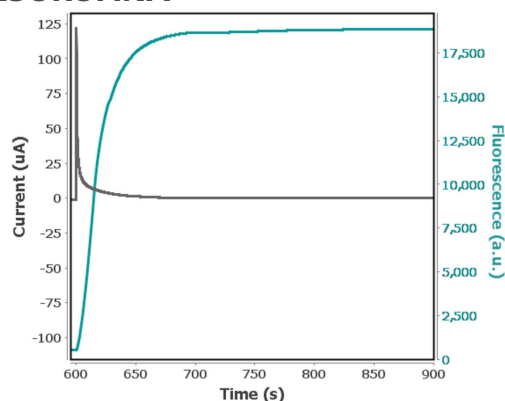


Figure 6a Potenziale del terzo stadio di un esperimento di cronoamperometria multi-impulso applicando -0,10 V per 300 s in una soluzione di 0,001 mol/L di Alamar Blue in 0,1 mol/L di KCl (linea grigia) ed evoluzione degli spettri di fluorescenza a 590 nm nel tempo (linea verde).

L'evoluzione degli spettri mostrata in **Figura 6b** conferma l'aumento della banda di fluorescenza centrata a 590 nm. La diidroresorufina viene completamente ossidata nuovamente a resorufina poiché il massimo di fluorescenza osservato nel primo passaggio dell'esperimento (**Figura 4b**) si ottiene anche qui nel terzo passaggio. Pertanto, la reversibilità del processo redox tra resorufina e diidroresorufina è chiaramente dimostrata.

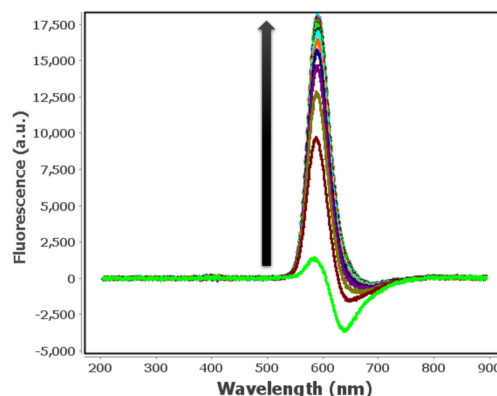


Figure 6b Spettri di fluorescenza registrati durante la terza fase del potenziale dell'esperimento in tre parti.

CONCLUSIONE

La spettroelettrochimica è una tecnica potente che fornisce informazioni di diversa natura combinando i vantaggi dell'elettrochimica e della spettroscopia. In questo studio, il segnale di fluorescenza associato a Alamar Blue è stato analizzato a potenziale variabile. La riduzione di questa molecola a un potenziale di -0,45 V per generare resorufina produce un segnale di fluorescenza potenziato. Un'ulteriore riduzione della resorufina a diidroresorufina avviene a -1,00 V,

diminuendo il segnale ottico a causa delle proprietà della specie ridotta. Infine, la riossidazione della diidroresorufina a resorufina mostra un aumento del segnale di fluorescenza e dimostra l'eccellente reversibilità di questo processo elettrochimico. La comprensione di questo meccanismo apre nuove possibilità per lo sviluppo di nuove applicazioni per Alamar Blue, come il suo utilizzo come indicatore di vitalità cellulare.

ULTERIORI LETTURE

1. Ibáñez, 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>

APPLICATION NOTE CORRETTA

AN-FLU-001 Spettroelettrochimica di fluorescenza di $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+/3+}$ in regime di diffusione semi-infinita

CONTACT

Metrohm Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

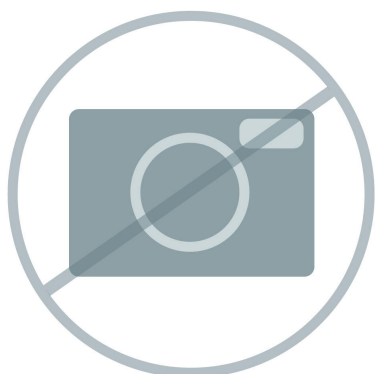
info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



Strumento UV-VIS SPELEC (200-900 nm)

SPELEC è uno strumento che consente di eseguire misure spettroelettrochimiche. Esso combina in un'unica scatola una fonte di luce, un bipotenziostato/galvanostato e uno spettrometro (intervallo di lunghezza d'onda UV-VIS: 200-900 nm) e include un software elettrochimico dedicato che permette la sincronizzazione degli esperimenti ottici ed elettrochimici.



Sonda di riflessione VIS-UV

Sonda di riflessione VIS-UV progettata per eseguire esperimenti di riflessione, idonea al funzionamento con la nostra cella di riflessione per i nostri elettrodi a membrana o con qualsiasi cella convenzionale.



Luce a LED-VIS 395 nm

Luce a LED con lunghezza d'onda di 395 nm

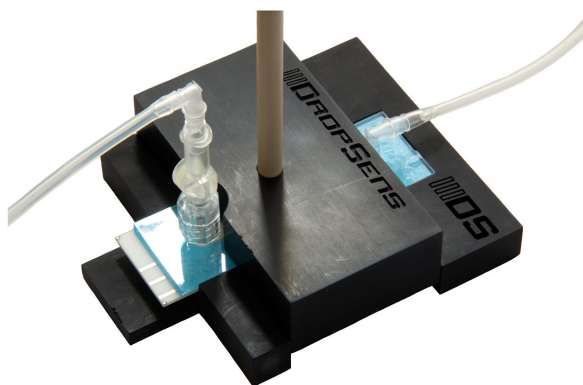


Kit per fluorescenza

Kit per l'esecuzione di esperimenti in fluorescenza composto da 2 fibre ottiche corte (600 μm) con connettori SMA 905, 2 filtri ottici, di cui uno con lunghezza d'onda di 230-500 nm e un altro con lunghezza d'onda di 300-750 nm e 2 supporti per i filtri.

Completate la configurazione aggiungendo la luce con l'eccitazione richiesta a seconda dell'intervallo di interesse (rif. LEDUV275, LEDVIS395 o LEDRGB).

Per eseguire esperimenti di spettroscopia di fluorescenza accoppiata alla spettroelettrochimica (rif. SPELEC) con SPE, acquistare la sonda di riflessione (RPROBE) e la cella di riflessione (REFLECELL) adatte.



Cella per esperimenti di riflessione

spettroelettrochimica per gli elettrodi stampati per cella di flusso a strato sottile

Cella per l'esecuzione di misure spettroelettrochimiche in condizioni di flusso con elettrodi stampati formato TLFLC-CIR, raccordi adatti e riferimenti. RPROBE-VIS-UV.



Cavo Stat per SPE formato TLFLC

Connettore cavo dagli strumenti μStat e dalla linea degli strumenti SPELEC agli elettrodi SPE formato TLFLC



Elettrodo circolare a membrana in carbonio integrato per cella di flusso a strato sottile

Elettrodo circolare a membrana in carbonio integrato per cella di flusso a strato sottile (AUX: C; REF:Ag)