



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Este trabajo es parte del proyecto de I+D+i PID2022-139235OB-I00 financiado por MICIN/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER “Una manera de hacer Europa”, y las ayudas del Gobierno de Aragón a los grupos de investigación E-25_23R.

Índice

1. Resumen.....	1
Abstract	1
2. Introducción	2
2.1. Aminas biógenas	2
2.2. Importancia de las aminas biógenas en los alimentos.....	3
2.3. Putrescina.....	5
2.4. Métodos de determinación de aminas biógenas.....	5
2.5. Nanopartículas de oro para el desarrollo de biosensores.....	6
2.6. Envases inteligentes	7
3. Justificación y objetivos.....	7
4. Metodología	8
4.1. Materiales.....	8
4.1.1. Reactivos y disoluciones.....	8
4.1.2. Instrumentación y materiales	9
4.2. Procedimiento experimental.....	10
4.2.1. Procedimiento de medida en disolución.....	10
4.2.2. Preparación y medida de los soportes sólidos	11
5. Resultados y discusión.....	12
5.1. Ensayos previos en disolución.....	12
5.1.1. Estudio reacción HRP y H ₂ O ₂ en presencia de TMB	12
5.1.2. Estudio de la reacción putrescina y PuO en presencia de TMB y HRP	13
5.1.3. Estudio de la reacción de putrescina y PuO en presencia de Au (III)	14
5.2. En soportes sólidos.....	15
5.2.1. Inmovilización de reactivos en soportes de celulosa	15
5.2.2. Calibración de putrescina con PuO en presencia de Au (III) y reproducibilidad	20
5.2.3. Aplicación a muestras reales.....	21
6. Conclusiones.....	28
Conclusions	28
7. Valoración personal.....	29
8. Bibliografía.....	29

1. Resumen

Las aminas biógenas son compuestos formados por la descarboxilación de los aminoácidos debido a la acción de enzimas presentes en los alimentos. Concentraciones elevadas de estos compuestos en los alimentos pueden llegar a causar intoxicaciones en los individuos, además de ser indicadores de higiene de estos.

En este trabajo se pretende desarrollar un biosensor acoplable a envases alimenticios para controlar la formación de estos compuestos. Las reacciones se llevarán a cabo en un soporte sólido a través de un cambio de color provocado por una reacción enzimática de la putrescina con su enzima oxidasa (PuO) en presencia de Au (III), dando lugar a la formación de nanopartículas de oro.

En primer lugar, se comprobó la formación de nanopartículas en disolución. Después, se optimizaron las condiciones del soporte sólido para obtener la mejor señal posible. Posteriormente, se aplicaron a muestras reales de carne acoplándolos a un envase, consiguiendo una señal positiva tras una semana en la nevera.

A pesar de que la investigación debe continuar mejorando varios aspectos, los resultados obtenidos indican que estos sensores podrían ser útiles para construir envases inteligentes.

Abstract

Biogenic amines are compounds formed by the decarboxylation of amino acids due to the action of enzymes present in food. Elevated concentrations of these compounds in food can cause intoxication in individuals and also serve as indicators of food hygiene.

This work aims to develop a biosensor that can be attached to food packaging to monitor the formation of these compounds. The reactions will take place on a solid support, resulting in a color change caused by an enzymatic reaction between putrescine and its oxidase enzyme (PuO) in the presence of Au (III), leading to the formation of gold nanoparticles.

First, the formation of nanoparticles in solution was confirmed. Next, the conditions of the solid support were optimized to obtain the best possible signal. Subsequently, the sensor was applied to real meat samples, resulting in a positive signal one week in the refrigerator. And finally, the aldehydes resulting from meat deterioration that led to the formation of AuNPs through the oxidation of gold were studied.

Although research must continue improving various aspects, the results obtained indicate that these sensors could be useful for constructing smart packaging.

2. Introducción

2.1. Aminas biógenas

Las aminas biógenas, AB, son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente debido a la descarboxilación de aminoácidos o por la aminación y transaminación de aldehídos y cetonas. (Silla Santos, 1996). Estas moléculas se forman y degradan habitualmente como parte del metabolismo normal de los seres vivos, incluyendo animales, plantas y microorganismos (Doeun, Davaatseren y Chung, 2017).

En cuanto a su estructura, las AB pueden clasificarse en aminas alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aminas aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina). Según el número de grupos aminos que contienen encontramos monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) y poliaminas (espermidina, espermina) (Silla Santos, 1996).

Las aminas biógenas se encuentran de forma natural en el organismo (endógenas), pero también pueden incorporarse a través de la dieta (exógenas). Las aminas predominantes en los alimentos se muestran en la Figura 1.

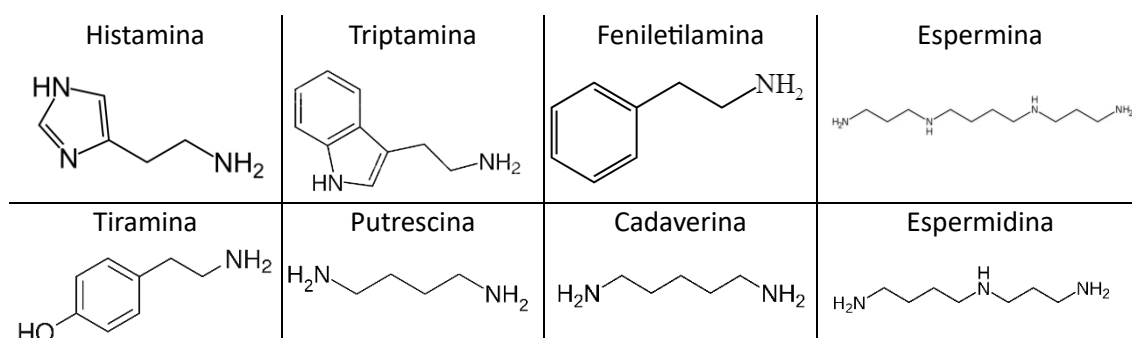


Figura 1. Estructura química de las aminas biógenas más abundantes en los alimentos.

La formación de estos compuestos en los alimentos se debe, principalmente, a la acción de microorganismos que llevan a cabo la descarboxilación de aminoácidos. En condiciones normales, el organismo es capaz de desintoxicar pequeñas cantidades de AB gracias a enzimas como la monoamino oxidasa (MAO) o diamina oxidasa (DAO). Sin embargo, cuando la capacidad de desintoxicación es inhibida debido a la ingesta de grandes cantidades de AB o se encuentra alterada por factores genéticos, alcohol o fármacos antidepresivos, pueden tener efectos tóxicos en el organismo provocando náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, erupción cutánea, picazón, dolor de cabeza e hipertensión, llegando a causar intoxicaciones.

2.2. Importancia de las aminas biógenas en los alimentos

La concentración de aminas biógenas es diferente en función del tipo de alimento. Además, se ve afectada por diferentes factores tanto durante el proceso de fabricación como a lo largo de su vida útil.

Los mayores niveles de concentraciones de AB los encontramos en alimentos como el pescado, el vino, el queso o en productos cárnicos. En los productos pesqueros las AB más abundantes son la histamina, tiramina, putrescina y cadaverina. Entre ellos destaca la histamina; esta se encuentra de forma natural en el músculo de algunos peces pertenecientes a la familia de los escómbridos y además puede formarse por la acción de la histidina descarboxilasa en cualquier punto de la cadena alimentaria. Es por ello que la mayoría de las intoxicaciones alimentarias producidas por AB son debidas a la histamina en los pescados, también denominadas “intoxicación por escómbridos”.

Los microorganismos utilizados durante la fermentación de productos cárnicos tienen la capacidad de producir AB, destacando la tiramina y la putrescina. La formación de AB en el queso puede ocurrir durante la etapa de maduración en la que la caseína se degrada en aminoácidos libres. (Doeun, Davaatseren y Chung, 2017). En el vino las AB pueden acumularse durante la fermentación alcohólica y maloláctica debido al metabolismo de algunas levaduras (Doeun, Davaatseren y Chung, 2017).

Pese a los riesgos toxicológicos vinculados a la ingesta de AB, todavía no existe una legislación específica que determine los niveles máximos permitidos de concentración en los alimentos para proteger la salud de los consumidores. Esto se debe a la dificultad que presenta la determinación de las concentraciones de AB que resultan nocivas, ya que los efectos tóxicos varían en función del tipo de amina y de la eficacia de los sistemas de detoxificación de cada individuo. Además, la determinación de estos límites puede verse alterada por la presencia de otras aminas, dificultando aún más establecer un límite máximo (Silla Santos, 1996).

Únicamente se han establecido estos valores para la histamina en pescados debido a su gran incidencia. La EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) detectó 80 brotes de intoxicación por escómbridos en 2018 (EFSA, 2018). El Reglamento (CE) n° 2073/2005 establece un valor de histamina para productos de la pesca procedentes de especies de pescado asociadas a un alto contenido en histamina (*Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* y *Scombresosidae*) de 100-200 mg/kg, mientras que para productos de la pesca sometidos a un tratamiento de maduración enzimática en salado es de 200-400 mg/kg.

Como ya se ha mencionado anteriormente, existen una serie de factores que hacen que la concentración de AB en los alimentos aumente (Karovičá, Kohajdová, 2003). Entre ellos encontramos:

- La presencia de microorganismos con actividades aminoácido descarboxilasa. Existen una gran cantidad de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas con capacidad de descarboxilar aminoácidos. Dentro de las Gram negativas el mayor número de bacterias productoras de AB pertenecen a la familia de las enterobacterias, asociadas a la producción de histamina en pescados y putrescina y cadaverina en carnes. Entre ellas destacan los géneros de *Morganella*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* y *Serratia*, *Pseudomonas* o *Photobacterium*. En cuanto a bacterias Gram positivas podemos encontrar BAL como *Lactococcus*, *Enterococcus* o *Lactobacillus*; *Staphylococcus* o cepas del género *Bacillus* (Río et al., 2020).

En la Tabla A2.1 del Anexo I podemos encontrar los principales microorganismos productores de AB en los alimentos.

Por consiguiente, una materia prima de calidad y unas buenas prácticas de fabricación e higiene van a reducir la posibilidad de formación de AB.

- La disponibilidad del sustrato, ya que la síntesis de AB requiere la presencia de aminoácidos como sustrato inicial.
- Las condiciones ambientales. El pH y la temperatura son dos de los más importantes. El pH óptimo de la actividad de las bacterias descarboxilasas es ácido (4-5,5). Mientras que temperaturas de 20-30 °C favorecen el crecimiento de estas bacterias. Las condiciones aeróbicas o anaeróbicas y el potencial redox también van a influir en este proceso, dependiendo del tipo de bacteria se requerirán unas concentraciones diferentes de oxígeno. Otros factores como la concentración de sal y etanol contribuyen a reducir la capacidad de lo microorganismo de formar AB (Silla Santos, 1996).

Algunos estudios realizados señalan que el control del proceso de elaboración y fabricación de los alimentos puede reducir significativamente la concentración de AB (Silla Santos, 1996). De esta manera, la formación de AB está relacionada con el deterioro microbiano, siendo también indicadores de frescura e higiene en los alimentos.

2.3. Putrescina

La putrescina se puede formar por dos vías diferentes, por descarboxilación de la ornitina o mediante descarboxilación y desaminación sucesiva de la agmatina. La espermina y espermidina se sintetizan a partir de reacciones de condensación de la putrescina.

El nivel de putrescina en alimentos es, en general, de los más altos, siendo una de las AB más comunes; además, cuando los alimentos se empiezan a descomponer, su nivel aumenta muchísimo, adquiriendo los alimentos el olor característico “a podrido” e impidiendo que los productos alimenticios sean aptos para el consumo humano (Navarro, 2021). Su determinación en los alimentos es importante tanto por indicar la calidad de los alimentos o el estado, como por sus efectos tóxicos producidos. Además, se ha estudiado que potencia los efectos tóxicos de la histamina.

Por otro lado, se ha demostrado la capacidad de la cadaverina y putrescina de reaccionar con nitritos para formar nitrosaminas, compuestos cancerígenos establecidos en la categoría 2A (IARC, 2024).

Debido a su gran impacto, la EFSA ha realizado una evaluación del riesgo para las nitrosaminas en los alimentos, concluyendo que son un riesgo para la salud pública y que se pueden formar durante la preparación y elaboración de estos, identificando 10 nitrosaminas cancerígenas (causantes de cáncer) y 6 genotóxicas (dañando el ADN) (EFSA, 2023). Estas sustancias se han detectado en alimentos como productos cárnicos, pescados procesados, cacao, cerveza, ...

Hoy en día no hay límites máximos regulados en los alimentos, pero es cuestión de tiempo debido a la gravedad e incidencia que presentan. Esto hace necesaria la determinación de la putrescina en los alimentos que consumimos.

2.4. Métodos de determinación de aminos biógenas

Debido a la preocupación con respecto a la seguridad alimentaria, la detección de aminos biógenas en los alimentos se ha ido desarrollando. Por ello, existen una gran cantidad de métodos para la detección de las AB: métodos cromatográficos, enzimáticos o electroforesis capilar, PCR, ... (Río et al., 2020). Los más comunes son los cromatográficos. Inicialmente se utilizaba cromatografía de capa fina, método que no permitía su cuantificación. Más tarde se descubrió que con la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) sí era posible su cuantificación. Los principales problemas que presenta esta técnica son dos. Por un lado, este tipo de técnicas requieren un primer paso de extracción de compuestos que suele ser largo y laborioso y, además, el análisis realizado en un momento específico no descarta que estos

compuestos se puedan generar en etapas posteriores (Fernández et al., 2005). Además, son métodos que requieren instrumentación costosa y personal cualificado.

Para el desarrollo de métodos más simples y accesibles en la determinación de la aptitud de los alimentos, se han desarrollado métodos rápidos de determinación in situ. Entre ellos destacan los métodos enzimáticos, donde gracias a diferentes enzimas oxidasas como la putrescina oxidasa es posible el desarrollo de biosensores enzimáticos. Esta enzima es capaz de oxidar a la putrescina produciendo H_2O_2 y aldehídos. Para poder realizar el seguimiento de la reacción es necesaria la presencia de otra enzima, la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), y también requiere la presencia de un colorante (TMB) que será oxidado para provocar un cambio de color.

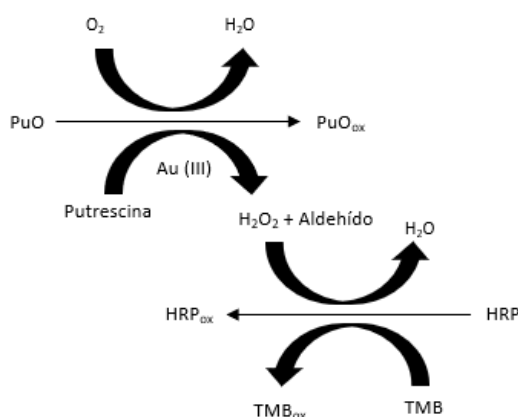


Figura 2. Esquema reacción con colorante.

En este trabajo el cambio de color se producirá por la formación de nanopartículas de oro debido a la reducción de Au (III) por el aldehído producido en la reacción, eliminando la reacción de la peroxidasa.

2.5. Nanopartículas de oro para el desarrollo de biosensores

La incorporación de nanomateriales como técnica para determinaciones ópticas enzimáticas está en desarrollo debido a su gran versatilidad, ya que pueden actuar tanto como indicadores como catalizando reacciones enzimáticas. Entre ellos destacan por sus propiedades ópticas y fisicoquímicas, su simplicidad, abaratamiento de costes y tiempo de análisis. Las nanoesferas de oro también se denominan nanopartículas de oro (AuNPs).

Estas nanopartículas de oro (AuNPs) son partículas agrupadas en el rango de unos cientos de nanómetros que consisten en un núcleo de oro y un revestimiento en la superficie. Han sido incorporadas en el desarrollo de biosensores ópticos a través de técnicas de detección colorimétricas, entre otras. El color de las nanopartículas cambia con el tamaño y el espacio

existente entre las nanopartículas. Las nanopartículas de oro pequeñas (10-50 nm) son de color rojo oscuro, cambiando a color morado al aumentar el tamaño (Zhao, Brook y Yingfu Li, 2008).

La putrescina es capaz de reaccionar con la putrescina oxidasa en presencia de Au (III) para formar las AuNPs, adquiriendo un color morado que se puede emplear como biosensor.

2.6. Envases inteligentes

Los envases inteligentes son aquellos que proporcionan información al consumidor en tiempo real sobre las condiciones del alimento, mejorando así la seguridad y calidad alimentaria. Estos sistemas monitorean las condiciones del producto envasado continuamente, registrando y aportando información sobre cualquier práctica anómala que haya podido sufrir el alimento. Los ejemplos más comunes de este tipo de envases son los indicadores tiempo-temperatura, los indicadores de fugas, los de frescura, etc. (Rodríguez-Sauceda, 2014).

Por todo ello, debido al problema de toxicidad causado por las aminas biógenas, sería interesante desarrollar un envase inteligente que nos proporcione información sobre la calidad de los alimentos y evitar así los efectos adversos producidos.

3. Justificación y objetivos

El objetivo fundamental de este trabajo es desarrollar un biosensor óptico acoplable a un envase que permita determinar aminas biógenas en los alimentos, concretamente putrescina.

Se pretende conseguir una señal de la concentración de putrescina, a través de la siguiente reacción:

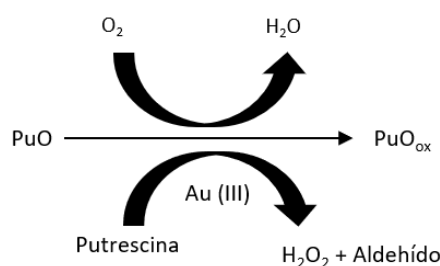


Figura 3. Esquema de la reacción estudio en presencia de Au (III).

La reacción está basada en la oxidación de la putrescina en presencia de la enzima putrescina oxidasa (PuO), oro y oxígeno (Figura 3). Al entrar en contacto el Au (III) con el aldehído obtenido a través de la oxidación del grupo amino de la putrescina, se forman las AuNPs. Gracias a esto se

puede determinar la presencia de la AB estudiada mediante métodos rápidos de detección a través de las coordenadas RGB con un Smartphone. Esta reacción se ha estudiado en disolución.

Como el aldehído es volátil se pretende que ese volátil generado forme las nanopartículas coloreadas en el biosensor que se colocaría en la parte superior del envase.

Para conseguir el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar el método en disolución para conocer la reacción Putrescina-PuO-Au (III).
2. Estudiar la posibilidad de la formación de nanopartículas en soportes sólidos y las condiciones óptimas de inmovilización de los reactivos de los soportes de celulosa: concentración y pH del tampón, y concentración de oro.
3. Estudiar las condiciones de la reacción enzimática.
4. Establecer las características analíticas del método.
5. Acoplar los sensores a envases convirtiéndolos en envases inteligentes.
6. Medir el color generado con el dispositivo móvil para determinaciones in situ.
7. Evaluar los resultados obtenidos.

4. Metodología

4.1. Materiales

4.1.1. Reactivos y disoluciones

- Disoluciones amortiguadoras $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de concentración 0'1 M y pH 6, 7, 7'5, 8, preparada disolviendo aproximadamente 2,84 g de Na_2HPO_4 (Panreac 131679.1211) en 200 mL de agua mili-Q y ajustando el pH con disoluciones de HCl 1 M y NaOH 1M.
- Disolución comercial de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 33% (m/V) (Panreac 131077.1211). Las disoluciones se preparan a partir de la disolución comercial correspondiente en agua mili-Q.
- Disolución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma-Aldrich 860336) $\geq 99\%$, preparada disolviendo 2 mg de TMB en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).
- Enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), 146 U/mL (EC 1.11.1.7) (Sigma P8125), preparada disolviendo 2 mg de HRP en 1 mL de disolución amortiguadora al pH correspondiente.
- Celulosa microcristalina 20 μm (Sigma-Aldrich 310697-50G).
- Enzima Putrescina Oxidasa (PuO), 100 μM (EC 1.4.3.10). Esta enzima ya está en disolución, por lo que deberemos de preparar las diluciones necesarias para obtener la concentración requerida en cada caso.

- Dihidrocloreuro de putrescina (Sigma P7505) 98% pureza, 161'07 g mol⁻¹.
- Chloroauric acid hydrate, H₂Cl₄HAu, (SIGMA REF: 254169). Se prepara una disoluci3n 50 mM con agua Milli-Q.

4.1.2. Instrumentaci3n y materiales

Instrumentos

- C3mara de un Smartphone Samsung Galaxy A40 de 16 Mpx y la aplicaci3n ColorGrabTM Versi3n 3.9.2. (Loomatix[®]) para medir las coordenadas RGB (Madrid, Espa1a).
- Espectofot3metro UV-Vis Agilent 8453A de red de diodos con l3mparas de wolframio y deuterio que mide en un rango de entre 190 y 1100 nm (Waldbronn, Alemania).
- pH-metro, CRISON, Basic 20 (Barcelona, Espa1a).
- Balanza anal3tica modelo GR-202-EC de precisi3n $\pm 0'01$ mg (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Espa1a).
- Psicr3metro de bulbo seco y bulbo h3medo (Almemo, Ahlborn, Alemania) con sonda de capacitancia (modelo ZAD936RAK).

Material y aparatos

- Cubeta de cuarzo y pl3stico de 1 cm 3ptico.
- Agitador magn3tico A-01, SBS.
- Vasos de precipitados de vidrio.
- Micropipetas de vol3menes Socorex (5-50 μ L, 10-100 μ L y 200-300 μ L) y Eppendorf (2-20 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L).
- Material desechable: puntas de micropipetas, Eppendorf, tubos Falcon, pipetas Pasteur.
- Placas de pocillos nuncTM.
- Envases de pl3stico.
- Tefl3n en cinta.
- Centr3fuga HERMLE Z300, laboratorios SAPHIR (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania).
- Incubadora (Thermo scientific HeraTherm, Madrid, Espa1a).
- Sales absorbentes (Labkem, Barcelona, Espa1a).

4.2. Procedimiento experimental

4.2.1. Procedimiento de medida en disolución

La medida de absorción molecular se realizó en un espectrofotómetro de absorción molecular ultravioleta visible de red de diodos. Se utilizaron cubetas de cuarzo o plástico de 1 cm de paso óptico cuyo volumen final es 1 mL o 800 µL, dependiendo de cada caso.

Antes de hacer las mediciones del analito se debe hacer una medición del blanco sólo con disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ al pH adecuado en cada caso. Una vez tomada la referencia se añaden los reactivos y el analito a la cubeta y se registra la variación de la señal hasta que la reacción se estabiliza. Durante la medida la disolución debe estar todo el tiempo en agitación.

El resultado se expresa como la diferencia entre el máximo valor de la absorbancia y el valor de la línea base. Tanto las muestras como los blancos se llevarán a cabo por triplicado en todas las pruebas realizadas.

A) Medida de la reacción enzimática con colorante TMB

La medida de la absorbancia molecular de la reacción enzimática con el colorante TMB se realizó a 650 nm. Previamente se deben preparar las disoluciones correspondientes.

Primero se estudió la reacción de HRP y H_2O_2 en presencia de TMB. En la cubeta se añadirán 1920 µL de disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M a pH 6, 40 µL de TMB y 20 µL de HRP, se agita hasta homogeneizar bien la disolución y, pasado 1 minuto, se añadirán 20 µL de H_2O_2 a la concentración deseada en cada caso. La concentración final en la cubeta debe ser: $[\text{HRP}] = 0,12 \text{ u/mL}$, $[\text{TMB}] = 6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

A continuación, se estudió la reacción de la putrescina y PuO en presencia de HRP y TMB. En la cubeta se añadirán 1915 µL de disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M a pH 6, 36 µL de TMB, 24 µL de HRP y 5 µL de PuO, se agita hasta homogeneizar bien la disolución y, pasado 1 minuto, se añadirán 20 µL de putrescina a la concentración deseada en cada caso. La concentración final en la cubeta debe ser: $[\text{HRP}] = 0,12 \text{ u/mL}$, $[\text{TMB}] = 6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{PuO}] = 0,25 \text{ µM}$.

B) Medida de la reacción enzimática con oro

La medida de la absorbancia molecular de la reacción enzimática en presencia de Au (III) se realizó a 580 nm. Previamente se deben preparar las disoluciones correspondientes.

Se estudió la reacción de putrescina y PuO en presencia de Au (III). Para ello, en la cubeta se añadirán 761 mL de disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M a pH 7,5, 20 μL de la disolución de putrescina a la concentración deseada en cada caso y 3 μL de PuO a una concentración de 100 μM . Se agita hasta homogeneizar la disolución y, pasados 5 minutos, se adicionan 16 μL de oro 50 mM. Las condiciones finales en la cubeta serán: $[\text{Au (III)}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{PuO}] = 0,36 \mu\text{M}$.

4.2.2. Preparación y medida de los soportes sólidos

Para la elaboración de los soportes sólidos se preparará una suspensión de celulosa al 5% en tampón fosfatos a la que se le añade Au (III) de forma que en la suspensión queda una concentración de oro igual a 1 mM. Se agita la disolución y, una vez homogeneizada, se reparten 75 μL en cada uno de los huecos de la tapa de la placa de pocillos que hace de molde. Se lleva a la incubadora a secar a 40 °C durante 1,5 horas.

Una vez secos los soportes de celulosa de la tapa, en cada uno de los pocillos de la placa se añaden 40 μL de la disolución que contenga la putrescina (analito de la reacción) con la concentración deseada en cada prueba, o de disolución amortiguadora en el caso del blanco y 10 μL de enzima putrescina oxidasa (PuO) para que quede una concentración final 25 μM . Por último, se tapan las placas con las tapas en donde están los soportes (simulando un envase) y se cierran con Parafilm para asegurar que queden bien selladas (Figura 4). Se dejan reaccionar protegidas de la luz a temperatura ambiente.

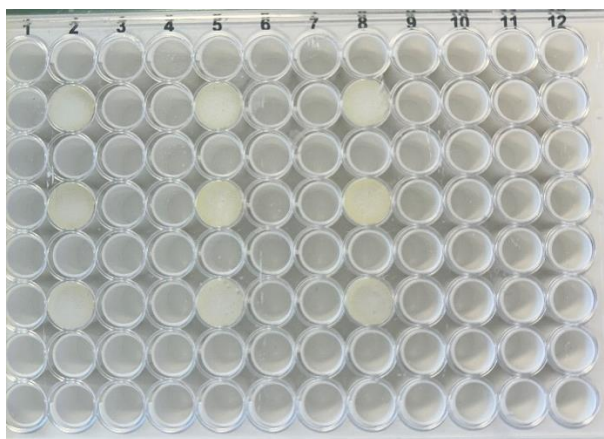


Figura 4. Placa de pocillos tapada con tapa con soportes sólidos de celulosa sólidos.

Para la medida de los soportes sólidos se utiliza un Smartphone con la aplicación ColorGrab, que proporciona las coordenadas RGB. En el ensayo se emplea una caja de iluminación (Figura 5) para asegurar unas condiciones constantes de luz y una distancia fija entre la cámara y el soporte y, de esta forma, prevenir la falta de reproducibilidad en los resultados.



*Figura 5. Móvil con caja de iluminación para la realización de las medidas de los soportes sólidos.
(Domínguez et al., 2024).*

De las tres coordenadas se selecciona la coordenada G, ya que es la que proporciona mayor sensibilidad. Para la interpretación de los resultados se utilizará el parámetro $G_0 - G$, donde G_0 representa la señal del blanco y G la señal de la muestra. Este parámetro refleja la diferencia entre ambas señales, permitiendo cuantificar el efecto de la muestra en comparación con el blanco.

Tanto las muestras como los blancos se llevarán a cabo por triplicado en todas las pruebas realizadas.

5. Resultados y discusión

5.1. Ensayos previos en disolución

Con el objetivo de aprender a trabajar con los instrumentos y ser reproducible en el uso de las reacciones enzimáticas, se comenzó trabajando en disolución (según el procedimiento descrito en 4.2.1 A) con la reacción de determinación de putrescina del esquema de la Figura 2.

5.1.1. Estudio reacción HRP y H_2O_2 en presencia de TMB

Se comenzó con la reacción indicadora. Se realizó una calibración, en las condiciones establecidas previamente en el grupo de investigación (Sanz-Vicente, I. et al., 2020), con concentraciones de H_2O_2 creciente de: 0 M, $1 \cdot 10^{-6}$ M, $2 \cdot 10^{-6}$ M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M, $1,96 \cdot 10^{-5}$ M, $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, $4 \cdot 10^{-5}$ M, $6 \cdot 10^{-5}$ M que se representa en la Figura 6. En la imagen de la izquierda, podemos observar cómo aumenta la absorbancia al añadir el analito hasta obtener un máximo que permanece estable, aumentando la absorbancia al aumentar la concentración de H_2O_2 . En la imagen de la derecha se observa la recta de calibrado, siendo lineal hasta 0,06 mM.

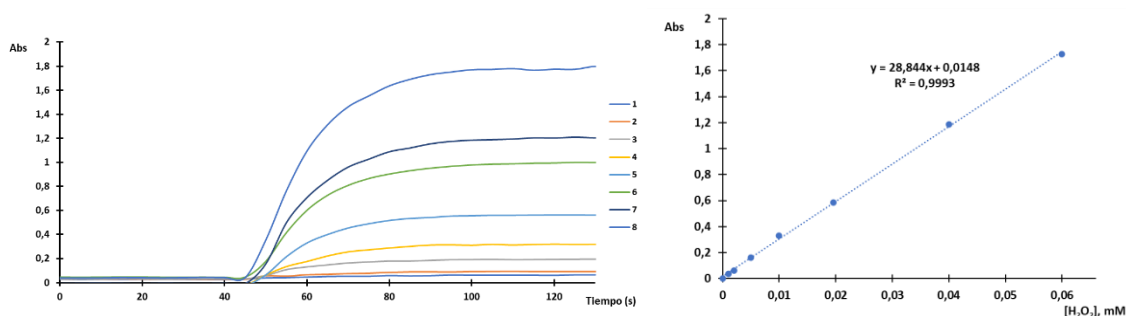


Figura 6. Imagen izquierda: variación de la absorbancia a 650 nm en función del tiempo a distintas concentraciones de H_2O_2 . Imagen derecha: recta de calibrado de H_2O_2 . $[HRP] = 0,12$ u/mL.

$[TMB] = 6 \cdot 10^{-4}$ M. $[H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}] = 0,1$ M pH 6.

La reproducibilidad del proceso expresada en DSR% fue del 2,97% para una concentración de $1 \cdot 10^{-3}$ M de H_2O_2 .

5.1.2. Estudio de la reacción putrescina y PuO en presencia de TMB y HRP

Una vez comprobada la reproducibilidad del proceso, se procedió a estudiar reproducibilidad de la reacción en presencia de putrescina y PuO. Para ello, se realizó una calibración en presencia de TMB y HRP. Las concentraciones en cubeta fueron: 0 M, $2 \cdot 10^{-6}$ M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M, $2 \cdot 10^{-5}$ M.

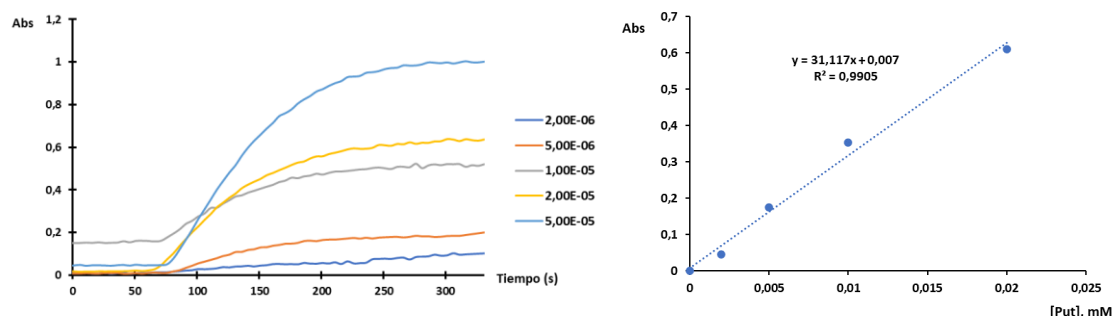


Figura 7. Imagen izquierda: variación de la absorbancia a 650 nm en función del tiempo a distintas concentraciones de putrescina. Imagen derecha: recta de calibrado de putrescina y PuO. $[HRP] = 0,12$ u/mL. $[TMB] = 6 \cdot 10^{-4}$ M. $[PuO] = 0,25$ μ M.

$[H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}] = 0,1$ M pH 6.

La Figura 7 muestra los resultados obtenidos. En ella podemos ver cómo al aumentar la concentración de putrescina aumenta la absorbancia, siendo lineal hasta 0,02 mM. La reproducibilidad del proceso en DSR% fue del 4,31%.

5.1.3. Estudio de la reacción de putrescina y PuO en presencia de Au (III)

Estudios previos en el grupo de investigación han demostrado la formación de nanopartículas en disolución a través de la oxidación enzimática de la putrescina en presencia de Au (III). (Navarro Dominguez, J., 2021). De esta forma, el primer paso fue comprobar que la reacción se lleva a cabo mediante la realización de una curva de calibrado (según el procedimiento descrito en 4.2.1 B).

Para ello se preparan las disoluciones pertinentes en disolución amortiguadora de fosfatos a pH 7,5 y se procede a hacer una medición de la absorbancia de las siguientes concentraciones de putrescina en cubeta según el procedimiento descrito en el apartado 4.2.1. B): 0 M, $5 \cdot 10^{-2}$ M, $1 \cdot 10^{-1}$ M, $3 \cdot 10^{-1}$ M, $5 \cdot 10^{-1}$ M, $8 \cdot 10^{-1}$ M.

Las señales que se obtienen son las de la Figuras 8 y 9. La Figura 8 muestra las gráficas de cinéticas de formación de nanopartículas. En ella se puede observar que, tras inyectar la disolución de Au (III) pasa un tiempo hasta que la señal comienza a aumentar. El tiempo disminuye a medida que aumenta la concentración de putrescina.

Tomando como señal analítica la variación de absorbancia a 2730 segundos, la calibración que se obtiene es la de la Figura 9, donde se observa que la absorbancia aumenta con la concentración, si bien no lo hace de forma lineal sino a través de una ecuación de segundo grado, lo que está de acuerdo con los resultados previos obtenidos en el grupo de investigación. (Navarro Domínguez, J., 2021).

La reproducibilidad del proceso calculada como DSR% fue del 4,13%.

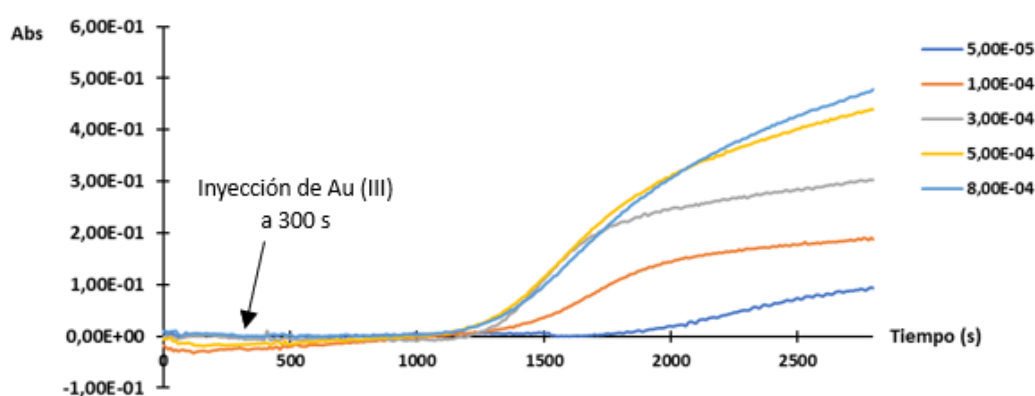


Figura 8. Variación de la absorbancia a 580 nm en función del tiempo a distintas concentraciones de putrescina. $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$. $[PuO] = 0,36 \text{ } \mu\text{M}$. $[H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}] = 0,1 \text{ M}$ pH 7,5.

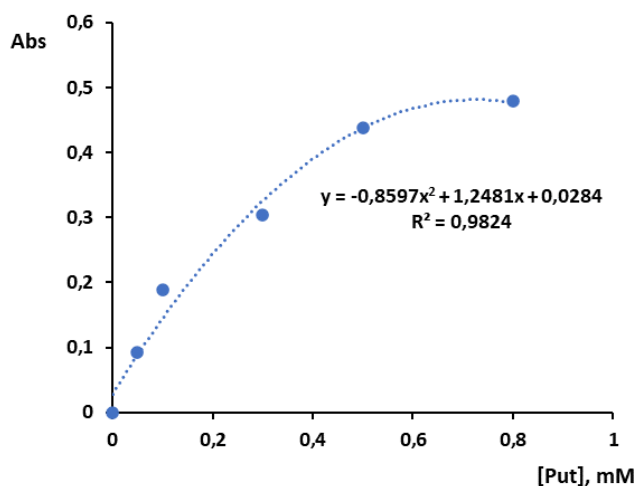


Figura 9. Curva de calibrado de putrescina para la formación de nanopartículas en disolución. $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$. $[PuO] = 0,36 \text{ }\mu\text{M}$. $[H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}] = 0,1 \text{ M}$ pH 7,5.

5.2. En soportes sólidos

5.2.1. Inmovilización de reactivos en soportes de celulosa

Una vez comprobado el funcionamiento de la reacción en disolución, se procede a inmovilizar los reactivos en soportes de celulosa. El primer paso es comprobar la formación de nanopartículas con el aldehído volátil generado en la reacción enzimática.

Para ello, se prepararon 5 soportes de celulosa al 5% con 1 mM de oro en disolución amortiguadora 0,1 M a pH 8. Se llevaron a la incubadora durante 1 hora y media. Se añadió en los pocillos 10 μL de PuO 25 μM y 40 μL de una disolución de putrescina $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ y se cerró la placa. En el blanco se añadieron 50 μL de disolución amortiguadora. La Figura 10 muestra los resultados obtenidos antes de que se produzca la reacción. Tras 24 horas, la reacción ha sucedido y se obtiene una señal medible apreciable en la Figura 11.



Figura 10. Placas de pocillos de celulosa sin reaccionar. $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$, $[PuO] = 25 \mu\text{M}$. $[Putrescina] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

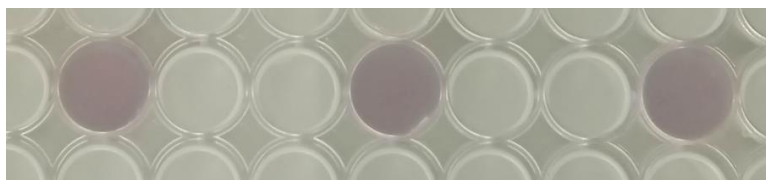


Figura 11. Placas de pocillos de celulosa tras la reacción. $[Au(III)] = 1\text{ mM}$, $[PuO] = 25\mu\text{M}$. $[Putrescina] = 1 \cdot 10^{-3}\text{ M}$.

Esta reacción sucede en el pocillo. Como resultado de esa reacción se produce un aldehído responsable de la formación de nanopartículas en el soporte sólido con oro inmovilizado.

Después de confirmar la obtención de una señal medible en dichos soportes, se estudiarán una serie de parámetros que pueden afectar a la señal obtenida.

5.2.1.1. Estudio del tiempo de reacción

Para el estudio del tiempo de reacción se preparan soportes de celulosa al 5% con 1 mM de oro inmovilizado. Por otro lado, se preparan disoluciones de putrescina a distintas concentraciones para estudiar si esta concentración afecta a la velocidad de la reacción y, por tanto, a la variación de la señal obtenida.

Se preparan 12 soportes de celulosa que van a estar divididos en 4 grupos; uno de ellos será el blanco y los 3 restantes llevarán una concentración de putrescina distinta. Las concentraciones de putrescina utilizada serán: $5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$, $1 \cdot 10^{-3}\text{ M}$, $5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$. Una vez los soportes de celulosa están secos, se añaden a los pocillos correspondientes 40 μL de putrescina a cada una de las concentraciones junto con 10 μL de PuO 25 μM . Después de agregar los reactivos a la placa de pocillos, se tapa y se cierra correctamente.

Se van tomando fotos de las placas hasta las 6 horas para observar cómo va aumentando la señal. En la Figura 12, podemos ver cómo, en los soportes en los que hemos añadido una concentración mayor de putrescina ($5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$), la señal se puede ver a las 2 horas, mientras que en los que hemos añadido $5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$, $1 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ la señal comienza a aparecer a las 3 horas. En la Figura 12 el soporte de $5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ a 1 hora se descartó por ser anómala. Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de putrescina se detecta antes la señal, lo cual es muy interesante si se quiere construir un sensor. Es de destacar que en los blancos no aumenta la señal. Por consiguiente, en el resto de la optimización se elige 3 horas como tiempo de medida.

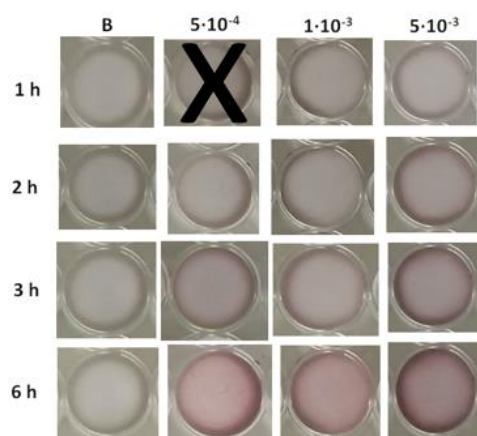


Figura 12. Color de las nanopartículas obtenidas con diferentes concentraciones de putrescina. $[Au(III)] = 1 \text{ mM}$, $[PuO] = 25 \mu\text{M}$. $[Putrescina] = 0 \text{ M}, 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}, 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}, 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

5.2.1.2. Optimización del oro

Para determinar la concentración de oro óptima en la reacción se preparan 3 suspensiones de celulosa al 5% con tres concentraciones de oro distintas; 0,5 mM, 0,75 mM y 1 mM en disolución amortiguadora a pH 8 y 0,1 M de fosfatos. Después del secado se añaden en los pocillos 40 μL de una disolución de putrescina $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ junto con 10 μL de PuO 25 μM . Se cierra la placa con Parafilm y se miden las señales pasadas las horas.

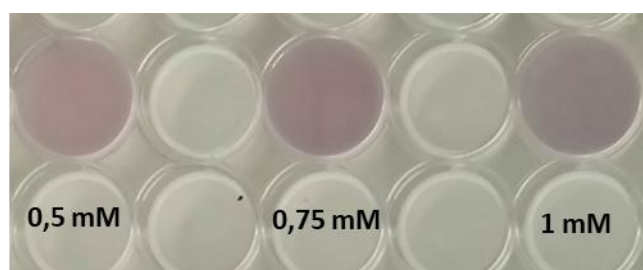


Figura 13. Color de las nanopartículas obtenidas con diferentes concentraciones de oro. $[Putrescina] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. $[PuO] = 25 \mu\text{M}$.

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos. En ella se puede observar cómo la concentración de oro 1 mM es la que presenta mayor intensidad del tono rosa-morado característico de las AuNPs. Comparando estos resultados con los de la Tabla 1, se puede decir que, a pesar de no presentar una gran variación de la señal entre las tres concentraciones, la de 1 mM Au (III) es la que presenta la mayor variación de la señal obtenida.

Tabla 1. Resultados de la optimización de la concentración de oro. [Putrescina]= $1 \cdot 10^{-3}$ M, [PuO]= 25 μ M.

[Au (III)]	0,50 mM	0,75 mM	1,00 mM
Media	26	26,5	31,7
DSR	3,85%	1,98%	6,57%

5.2.1.3. Optimización del pH y tampón fosfatos

Para determinar el pH y la concentración óptima de fosfatos para la formación de las nanopartículas se preparan suspensiones de celulosa con una concentración final de oro de 1 mM. Estas suspensiones se preparan en disoluciones amortiguadoras a dos concentraciones de fosfatos: 0,1 M y 0,3 M, cada una de ellas con valores de pH comprendidos entre 6 y 8. En todos los pocillos se añaden 40 μ L de putrescina $1 \cdot 10^{-3}$ M y 10 μ L de la enzima PuO 25 μ M.

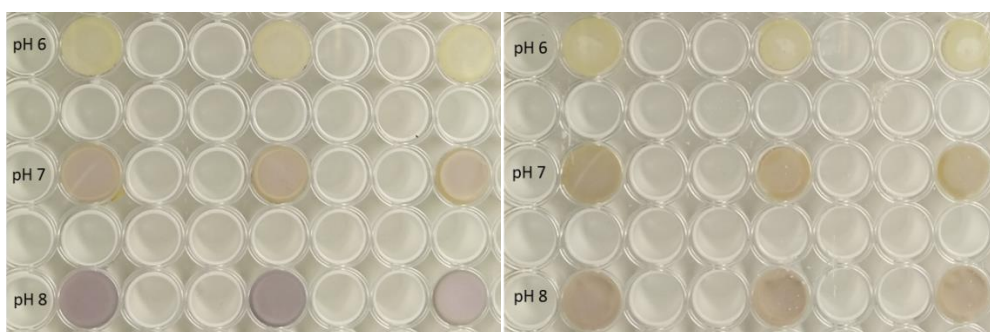


Figura 14. Color de las nanopartículas de oro formadas con valores de pH comprendido entre 6 y 8. Imagen derecha: concentración fosfatos 0,3 M. Imagen izquierda: concentración fosfatos 0,1 M. [Putrescina]= $1 \cdot 10^{-3}$ M. [PuO]= 25 μ M.

Una vez han reaccionado se toman las medidas obtenidas y se hacen fotos a las placas. Según los resultados obtenidos en la Figura 14; pH 8 y 0,1 M de concentración de fosfatos es la combinación óptima. En ella se puede ver que, a la combinación de pH y fosfatos elegida, los soportes de celulosa que contienen putrescina presentan el color rosa-morado característico de las nanopartículas de oro.

5.2.1.4. Optimización de la concentración de PuO

El siguiente paso fue estudiar la concentración de enzima. Para ello se emplean 4 concentraciones de PuO (12 μ M, 25 μ M, 30 μ M, 50 μ M). Una vez preparados los soportes de celulosa, se inyecta en cada pocillo 40 μ L de putrescina $1 \cdot 10^{-3}$ M y 10 μ L de una de las disoluciones de PuO preparadas y se coloca la tapa con los soportes. Se deja reaccionar y se toman las medidas obtenidas.

Tanto en la representación gráfica de los datos obtenidos (Figura 15) como en la Figura 16, podemos ver que la concentración de PuO apenas afecta a la señal obtenida, ya que en todos los casos es muy similar. De esta manera se selecciona la concentración de 25 μM para seguir con el trabajo dado que la disponibilidad de la enzima es limitada y así minimizar el gasto.

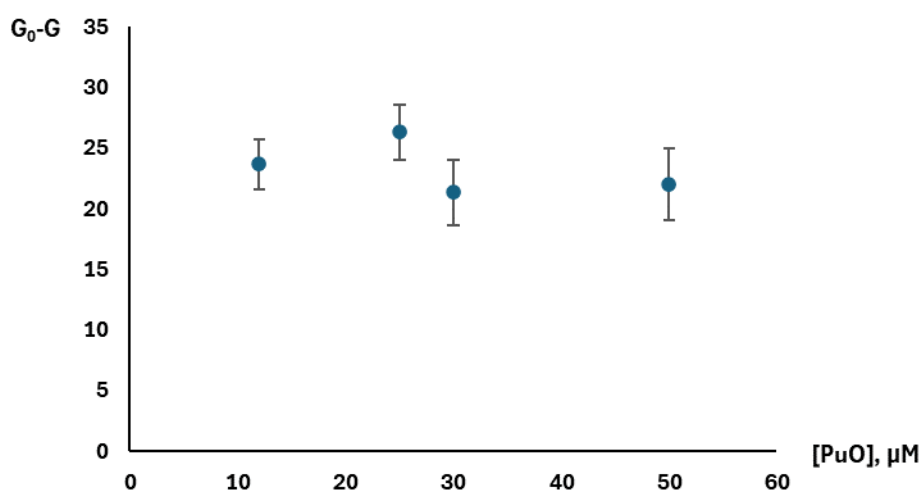


Figura 15. Representación gráfica de la variación de la señal obtenida con distintas concentraciones de PuO. [Putrescina]= $1 \cdot 10^{-3}$ M.

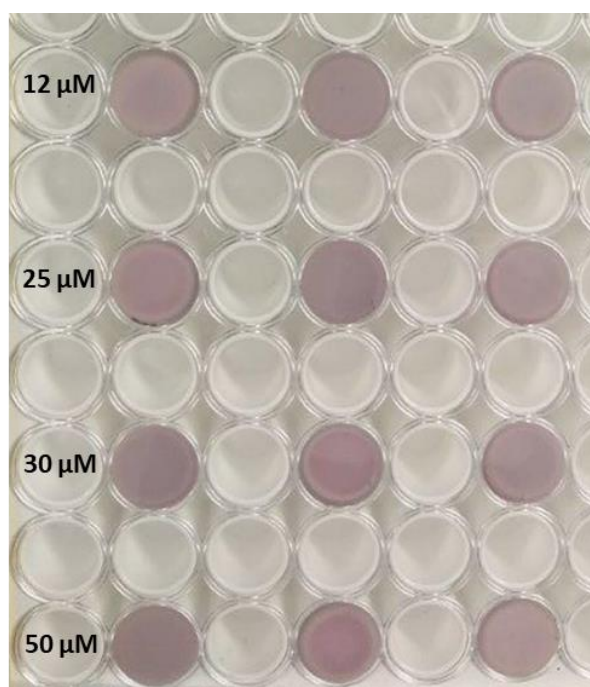


Figura 16. Color de las nanopartículas de oro formadas con distintas concentraciones de PuO. [Putrescina]= $1 \cdot 10^{-3}$ M.

5.2.2. Calibración de putrescina con PuO en presencia de Au (III) y reproducibilidad

Una vez estudiado cómo afectan los distintos parámetros, se realiza una calibración. Para ello se preparan soportes de celulosa al 5% con oro 1 mM inmovilizado y, una vez secos, se añaden en los pocillos 40 μL de disolución de putrescina con diferentes concentraciones: 0 M, $5 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M, $2 \cdot 10^{-3}$ M, $3 \cdot 10^{-3}$ M, $4 \cdot 10^{-3}$ M, $5 \cdot 10^{-3}$ M y 10 μL de PutOx 25 μM . Se cierran las placas y se mide la señal para obtener una curva de calibrado que se ajusta a una ecuación de segundo grado (Figura 17). En ella podemos observar cómo aumenta la señal con la concentración de putrescina según una ecuación de segundo grado, al igual que lo hacía en disolución.

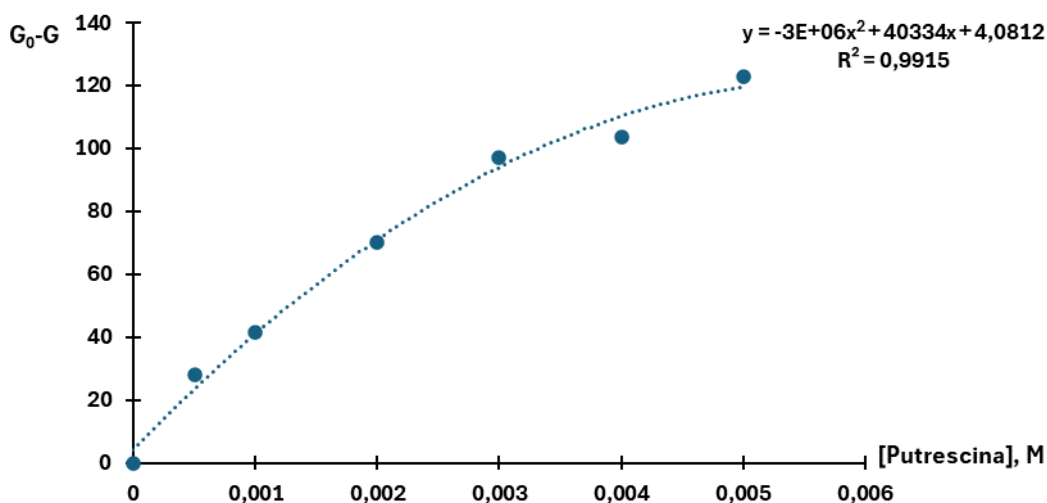


Figura 17. Recta de calibrado de putrescina para la formación de nanopartículas de Au en soportes de celulosa. $[\text{Au (III)}]=1\text{mM}$. $[\text{PuO}]=25\mu\text{M}$.

Para estudiar la reproducibilidad se elaboraron soportes sólidos de celulosa en las condiciones anteriores. Para ello, se prepararon 5 soportes de celulosa con un volumen en los pocillos de 50 μL (40 μL de putrescina $1 \cdot 10^{-3}$ M y 10 μL de PutOx 25 μM).

Tabla 2. Estudio reproducibilidad. $[\text{Putrescina}]=1 \cdot 10^{-3}$ M. $[\text{Au (III)}]=1$ mM. Promedio de las señales y desviación estándar relativa (DRS).

Coordenada G	Media	DSR
104,4	98,74	4,26%
94,5		
101,8		
97,3		
95,7		

5.2.3. Aplicación a muestras reales

Tras el desarrollo de los soportes sólidos de celulosa definitivos, se procede a acoplarlos a un envase para estudiar si dan respuesta en muestras reales de alimentos.

5.2.3.1. Aplicación en envases alimenticios

El primer paso fue simular un envase inteligente. Para ello se adquirieron envases de plástico con tapa y se colocaron en la parte superior los soportes sensores. Para lograr esto, se cortaron las tapas de los viales Eppendorf y, sobre ella, se dispuso la solución de celulosa con oro (Figura 18). Una vez secos se pegaron con cinta transparente de doble cara sobre la parte superior interna de los envases de plástico de forma que la parte sensor estuviera hacia dentro.

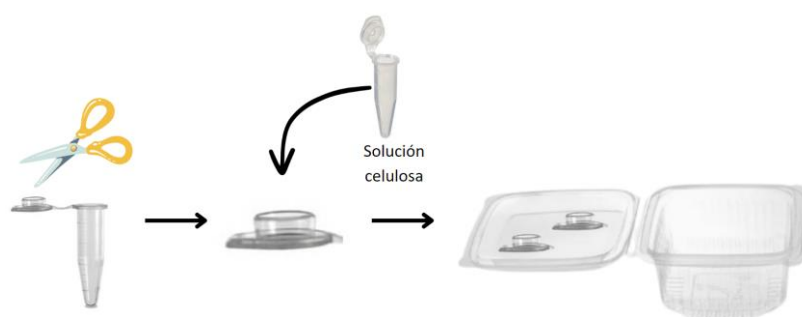


Figura 18. Diseño de envase inteligente con sensores los desarrollados.

El primer paso fue comprobar que se obtenía señal con carne deteriorada mientras que con los blancos no. Para realizar estos estudios no se añade PuO a la carne, partiendo de la premisa de que esta enzima (o la enzima diaminoxidasa que tiene la misma función) podría estar presente en la carne. Para ello se prepararon 16 soportes sólidos de celulosa con oro y se pegaron 4 en la parte superior de cada uno de los envases. Se utilizaron 2 muestras de carne, cada uno de los envases con 30 g (M1 y M2) y 2 blancos, uno de ellos con algodón mojado para simular la humedad de la carne (M3) y otro con aire (M4). Se cerraron bien y se dejaron en la nevera protegidos de la luz. Se fue observando su evolución a lo largo de los días.

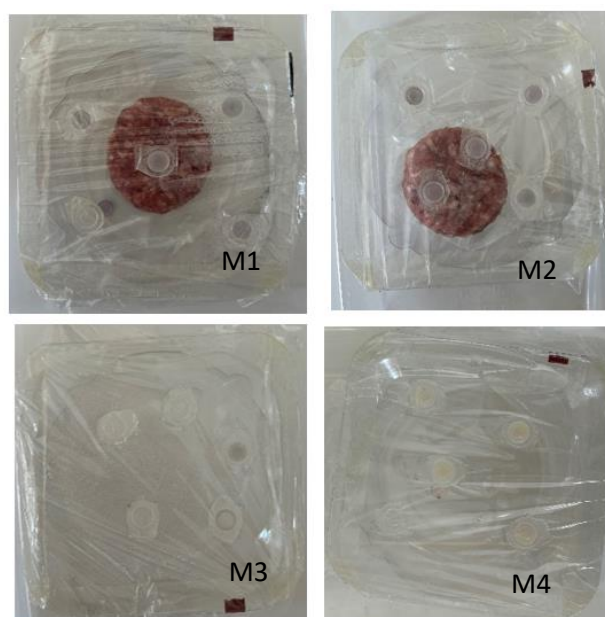


Figura 19. Envase inteligente con soportes sólidos de celulosa en la parte superior tras 1 semana en la nevera. M1= 30 g carne. M2= 30 g carne. M3= algodón húmedo. M4= aire.

La Figura 19 se tomó 1 semana después de meter las muestras a la nevera. Los resultados fueron satisfactorios. En ella se observa un cambio en la coloración de los sensores en las muestras con carne M1 y M2, lo que indica la formación de AuNPs en las muestras en que hay carne después de una semana. La muestra 4, el blanco, no dio señal. En la muestra 3 se observa un ligero color grisáceo en uno de los soportes, probablemente debido a alguna contaminación.

En la Figura 20 se puede ver que hay mucha humedad y condensación en el interior del envase y al abrirlo se observó que los soportes estaban muy húmedos también, lo que podría alterar su uso. Además, algunos soportes se cayeron y aparecieron en el fondo del envase.

Por lo que en el siguiente paso del trabajo se intenta reducir la humedad formada tanto en las paredes del envase como en los sensores desarrollados.



Figura 20. Humedad formada dentro del envase.

5.2.3.2. Reducción de la humedad de los envases

Para solventar el problema de la captación de humedad en los sensores se realizó una prueba con teflón. El teflón está compuesto por politetrafluoroetileno (PTFE) y una de sus principales características es la permeabilidad a los gases. Este material también es hidrofóbico, de manera que repele el agua. Por tanto, se realizó una prueba en placas de pocillos para ver si el teflón era permeable al volátil que provoca la formación de nanopartículas de oro y así evitar que la humedad generada llegara a la celulosa.

Para ello, se prepararon 4 soportes de celulosa como en el apartado 4.2.1. en dos tapas de placas distintas.

En una de las placas se añadió disolución amortiguadora y PuO 25 μ M y en la otra una disolución de putrescina 5 \cdot 10⁻³ M y PuO 25 μ M. Antes de cerrar las placas se dispuso sobre ellas una lámina de teflón de forma que este separa los pocillos con las disoluciones de los soportes sensores de celulosa.

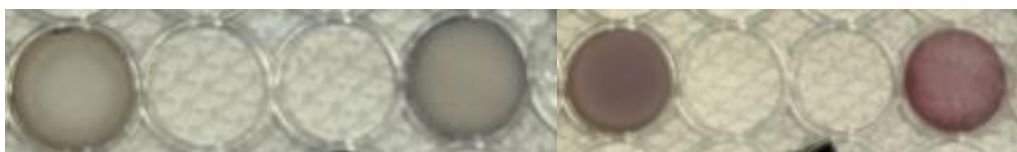


Figura 21. Color de nanopartículas de oro formadas con lámina de teflón. [Au (III)]= 1 mM. Figura izquierda Blanco. Figura derecha [Putrescina]= 5 \cdot 10⁻³ M.

La Figura 21 muestra que el volátil que forma las AuNPs sí es capaz de sobrepasar la lámina de teflón y, además, la humedad no llega al soporte de celulosa.

De esta manera, el siguiente paso fue introducir el teflón en los sensores de los envases inteligentes creados. Para ello, se prepararon los soportes sólidos de celulosa en las tapas de los tubos Eppendorf como en el caso anterior y, una vez secos, antes de pegarlos en los envases, se dispone alrededor de ellos una capa de teflón que se sujeta al soporte cerrándolo con un trozo del tubo Eppendorf. Después se pegan los sensores creados con cinta transparente de doble cara al envase siguiendo el esquema de la Figura 22.

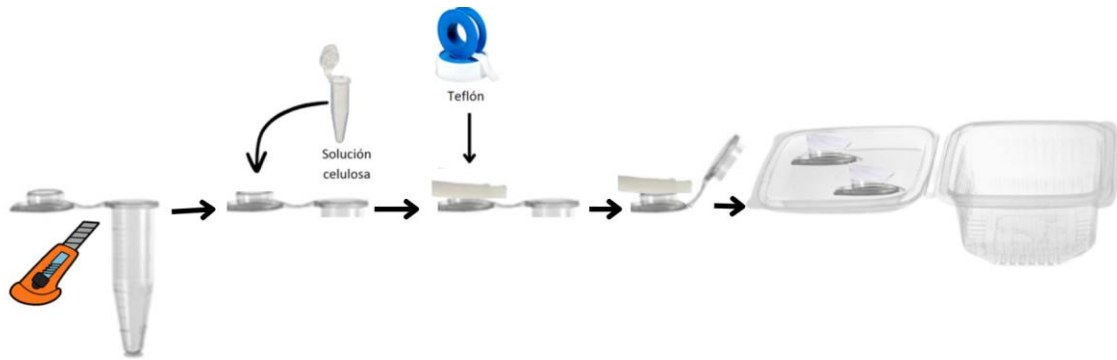


Figura 22. Diseño de los envases inteligentes con sensores con teflón.

Además, algunos soportes se pegaron con cinta aislante negra para evitar que la luz incidiera en el soporte y poder comparar el efecto. Una vez preparados los envases inteligentes, en uno de ellos se puso una muestra de 30 g de carne y en la otra un algodón mojado para simular la humedad de la carne.

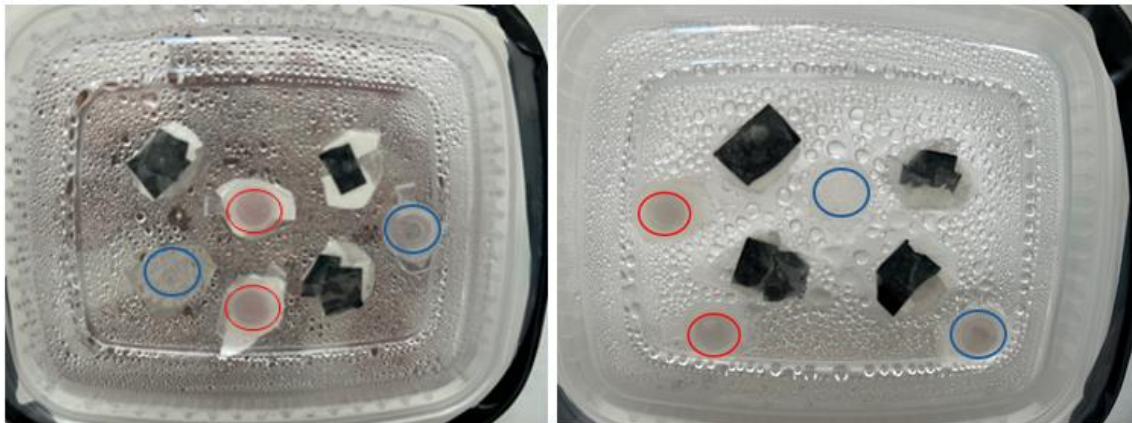


Figura 23. Envase inteligente con soportes sólidos de celulosa con teflón tras una semana en la nevera.

Ilustración izquierda= 30 g carne. Ilustración derecha= algodón mojado.

En la Figura 23 se pueden apreciar los soportes con teflón (círculo rojo) y los que no tenían teflón (círculo azul). Se observó que las muestras con carne dan señal, mientras que el blanco no. Además, el teflón ha servido para que el soporte de celulosa no capte humedad y se mantengan. En cambio, los que no tenían la lámina de teflón se han caído debido a la humedad. Por lo tanto,

para realizar las siguientes pruebas se utilizará dicho componente. En cuanto a la incidencia de luz en el soporte, no se observó diferencia alguna.

Por otro lado, se estudió la causa de la formación de humedad dentro del envase planteando que podría ser debida a una condensación.

Esta condensación ocurre al alcanzar el punto de rocío, temperatura a la cual el aire está saturado de agua (100% HR) (Fellows, 2000). Para confirmar nuestra hipótesis se midió la temperatura y humedad relativa (HR) del laboratorio con un psicrómetro mediante una sonda de capacitancia; el resultado fue una temperatura de bulbo seco de 25 °C y una humedad relativa del 47,7 %, por lo que se redondeó a 50 % HR. Los datos obtenidos se llevaron al diagrama psicrométrico para obtener una temperatura de punto de rocío de 13,3 °C. Esto quiere decir que si almacenamos el envase a una temperatura inferior de 13 °C se supera la temperatura del punto de rocío y va a condensar agua en el interior. Como se ha llevado el envase a una temperatura de 4 °C, va a condensar agua en el interior del envase.

Para evitar este problema lo ideal es seguir con la cadena de frío durante todo el proceso. Este es uno de los motivos por los que los envases de carne en los supermercados no presentan condensaciones en su interior, ya que en las industrias cárnicas se trabaja siempre a temperatura de refrigeración (4 °C) durante todo el proceso de elaboración, producción y distribución, de forma que no se daría este inconveniente. Además de garantizar la calidad y seguridad alimentaria del producto.

La imposibilidad de trabajar en el laboratorio siguiendo con el plan de la Cadena de Frío hace que se tengan que buscar otras posibilidades para solventar el problema. Por lo tanto, para continuar con la investigación se decidió añadir sales absorbentes de humedad dentro del envase. Aunque esta opción no sea adecuada para poner en los envases que van a ir destinados al consumidor, sirvieron para continuar con el trabajo, teniendo en cuenta que en este trabajo se muestran los primeros resultados en esta línea de investigación.

Para comprobar la función de las sales absorbentes se prepararon soportes de celulosa con teflón, y dentro de los envases se dispusieron las sales repartidas por todo el envase junto con los 30 g de carne en una de ellas. Se llevaron a la nevera y se observó su comportamiento a lo largo de los días de la semana. Por otro lado, también se estudió a partir de qué día los soportes de celulosa dan una señal considerada como positiva.



Figura 24. Envases inteligentes con sales absorbentes de la humedad.

Ilustración izquierda= 30 g de carne.

La Figura 24 muestra los resultados obtenidos. Durante los 2 primeros días, las sales absorbentes cumplen su función y no se forma humedad dentro de los envases. Sin embargo, a partir del día 3 comienzan a formarse pequeñas gotas, seguramente debido a la saturación de las sales. Aun así, la humedad formada dentro del envase es menor permitiéndonos seguir con la investigación. Esto es un aspecto para mejorar en futuras investigaciones.

Una vez obtenida una señal lo suficientemente clara, se pasa a estudiar a partir de qué día las muestras dan positivo. Para ello, se preparan los soportes sólidos de celulosa con teflón y se ponen en la parte superior de los envases. Se preparan 3 envases con 30 g de carne en cada uno y 2 blancos junto con las sales absorbentes se cierran bien y se guardan en la nevera. Se toman fotos de los envases cada día. La Figura 24 está tomada 1 semana después de llevar los envases por primera vez a la nevera. En este momento ya se observa una notable formación de nanopartículas de oro, este tiempo coincide con la vida útil de la carne.

De estas experiencias se puede concluir que algún volátil relacionado con la descomposición de los alimentos es capaz de formar nanopartículas de oro coloreadas, por lo que el método podría servir como un indicativo de la calidad del alimento, si bien para asegurar que es el aldehído de la putrescina se deben hacer más estudios.

5.2.3.3. Estudio de los volátiles que se forman durante la degradación de la carne

Aunque no era uno de los objetivos de este trabajo, se empezó con la identificación del volátil que es responsable de la formación de nanopartículas de oro contando para ello con la colaboración del Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE). Para ello se realizó microextracción en fase sólida (SPME) de los volátiles que hay en la atmósfera del envase, cuando ha dado positivo, para después analizarlo por cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG-SM). Para ello, se prepararon 4 de los envases inteligentes desarrollados. Además,

en cada uno de los envases se introdujo en la parte de arriba un tubo Eppendorf cortado como se aprecia en la Figura 25 que serviría para introducir la fibra de microextracción en el envase cuando el sensor hubiera dado señal positiva. Después, se añadieron 30 g de carne en 3 de ellos y el otro fue el blanco. Y, por último, se metieron en la nevera durante 1 semana hasta que los sensores dieron señal. En ese momento se realizó la extracción del aire del interior del envase para llevar al cromatógrafo.

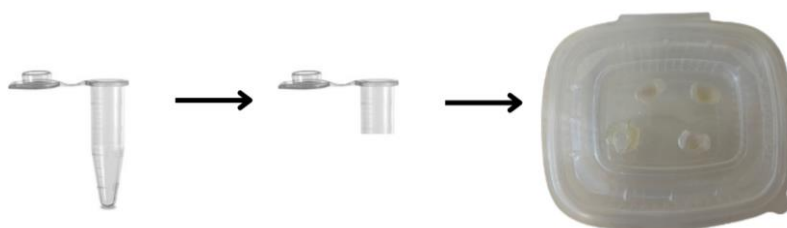


Figura 25. Envases inteligentes desarrollados para la extracción del aire.

En la siguiente Figura se puede observar el dispositivo para la toma de muestra.



Figura 26. Dispositivo para la toma de muestra de aire.

En ella se puede observar el envase, la fibra introducida en el envase y la bomba utilizada para la extracción. Después las fibras se llevaron al CG-MS para su desorción y análisis. Se obtuvieron cromatogramas de 85 minutos.

Si bien a fecha de conclusión de este TFG no se ha finalizado el análisis de los resultados, decir que se han detectado más de 50 compuestos volátiles en los envases de carne que no estaban en los blancos, por lo que alguno de ellos podría ser el responsable de formación de las nanopartículas de oro.

6. Conclusiones

1. Se ha establecido una relación entre la señal obtenida y la concentración de putrescina, tanto en disolución como en soportes sólidos, debido a la formación de nanopartículas de oro. En el método de soportes sólidos, la formación de estas AuNPs ha sido posible gracias a que un aldehído volátil de la putrescina entra en contacto con el oro inmovilizado del soporte sólido.
2. Las condiciones óptimas para la formación de AuNPs en soporte sólido de celulosa son: celulosa al 5% en disolución amortiguadora de fosfatos 0,1 M a pH 8, Au (III) 1 mM.
3. Se han formado AuNPs con muestras reales de carne debido a algún compuesto volátil formado en la descomposición del alimento 7 días después de poner la carne en refrigeración.
4. La humedad generada en los envases inteligentes se forma por alcanzar la temperatura del punto de rocío y se puede resolver siguiendo la cadena de frío o añadiendo sales absorbentes.
5. La carne después de 1 semana en la nevera produce una gran cantidad de volátiles, alguno de ellos responsable de la formación de nanopartículas de oro.

Conclusions

1. A relationship has been established between the obtained signal and the concentration of putrescine, both in solution and on solid supports, due to the formation of gold nanoparticles (AuNPs). In the solid support method, the formation of these AuNPs was possible due to a volatile aldehyde from the putrescine that reacts with the immobilized gold on the solid support.
2. The optimal conditions for the cellulose solid support for the formation of AuNPs are: 5% cellulose in a 0.1 M phosphate buffer solution at pH 8, and 1 mM Au (III).
3. AuNPs have been formed using real meat samples due to a volatile compound formed during the food's decomposition 7 days after refrigeration.

4. The moisture generated in smart packaging occurs when it reaches the dew point temperature and can be managed by maintaining the cold chain or by adding absorbent salts.
5. The meat, after one week in the refrigerator, produces a large amount of volatiles, some of which are responsible for the formation of gold nanoparticles.

7. Valoración personal

La realización del Trabajo de Fin de Grado ha sido una experiencia enriquecedora en la que he podido aumentar mis conocimientos sobre las aminos biógenas, la importancia de su determinación en los alimentos y nuevos métodos de medida que están en desarrollo.

A su vez, este trabajo me ha ayudado a desarrollar más mis habilidades en el laboratorio. Estar en el Departamento de Química Analítica me ha permitido refrescar y aumentar conceptos teóricos y prácticos adquiridos durante el Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Ha sido un reto y un complemento perfecto a mis estudios, mejorando mis habilidades de cara a la inserción en el mercado laboral.

Por otro lado, también me ha enseñado a recoger los datos adquiridos durante la investigación y ser capaz de analizarlos y sacar conclusiones de una forma clara y organizada.

Para finalizar, me gustaría agradecer a Isabel Sanz todos sus buenos consejos, su compromiso y su paciencia conmigo. Ha sido una suerte poder contar contigo. También a todo el grupo del laboratorio la ayuda que me han prestado a lo largo de todo este tiempo. No solamente por sus consejos y sus ideas, sino también por su cercanía, amabilidad y generosidad. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

8. Bibliografía

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2023). *La EFSA publica su evaluación del riesgo sobre las nitrosaminas en los alimentos concluyendo que plantean un problema de salud*. Disponible en: [Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición](https://www.aesan.mscd.es/seguridad-alimentaria/la-efsa-publica-su-evaluacion-del-riesgo-sobre-las-nitrosaminas-en-los-alimentos-concluyendo-que-plantean-un-problema-de-salud) [Consultado: 25-06-2024]

Al Bulushi, I. et al. (2009). "Biogenic Amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation- a review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49 (4), pp. 369-377. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408390802067514>

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2019). *The European Union One Health 2018 Zoonoses Report*. DOI: [10.2903/j.efsa.2019.5926](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926)

Días Gonzalez, A. I. (2014). *Presencia de aminos biógenas en los alimentos. Diseño de un laboratorio para su detección y uso en el control de la calidad alimentaria*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Oviedo.

Domínguez, M. et al. (2024). "Colorimetric enzymatic rapid test for the determination of atropine in baby food using a smartphone". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05401-x>

Doeun D., Davaatseren M., Chung M. (2017). "Biogenic amines in foods". *Food Sci Biotechnol*, 26 (6), pp. 1463-1474. DOI: [10.1007/s10068-017-0239-3](https://doi.org/10.1007/s10068-017-0239-3)

ELIKA Seguridad Alimentaria. (2021). *Histamina*. Disponible en: [ELIKA Seguridad Alimentaria | Histamina - ELIKA Seguridad Alimentaria](https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/nitratos-y-nitritos/) [Consultado: 24-062024]

ELIKA Seguridad Alimentaria. (2021). *Nitratos y nitritos*. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/nitratos-y-nitritos/> [Consultado: 24-06-2024]

Fellows, P. (2000). *Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y prácticas*. (2ª ed.) Zaragoza: ACRIBIA.

Fernández, M. et al. (2005). "Las aminas biógenas en los alimentos". *CTC Alimentación*, 26. pp. 84-90. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/5771> [Consultado: 07/07/2024]

Karovičá, J., Kohajdová, Z. (2003). "Biogenic Amines un Food". *Chemical papers*, 59 (1), pp. 70-79. Disponible en: https://chempap.org/file_access.php?file=591a70.pdf [Consultado: 25-06-2024]

Navarro Dominguez, J. (2021). *Nanosensores ópticos enzimáticos basados en la generación de nanomateriales para la determinación de aminas biógenas: una alternativa a los sistemas colorimétricos clásicos de respuesta rápida*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.

Río et al. (2020). "Aminas biógenas en alimentos: métodos moleculares para la detección e identificación de bacterias productoras". *Arbor*, 196 (795), pp. a545. DOI: <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1009>

Rodriguez-Sauceda, R. et al. (2014). "Envases inteligentes para la conservación de alimentos". *Ra Ximhai*, 10 (6), pp. 151-173. Disponible en: <https://raximhai.uaem.mx/index.php/rx/article/view/724> [Consultado: 25-06-2024]

Sanz-Vicente, I., Lopez-Molinero, A., de Marcos, S., Navarro, J., Cebrian, P., Arruego, C. y Visiedo, V. (2020). "Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in food". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412 (18), pp. 4261-4271. DOI: [10.1007/s00216-020-02677-7](https://doi.org/10.1007/s00216-020-02677-7)

Silla Santos, M. H. (1996). "Biogenic amines: their importance in foods". *International Journal of Food Microbiology*, 29 (2-3), pp. 213-231. DOI: [10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)

Zhao, W., Brook, M. A. y Li, Y. (2008). "Designo f Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensing Assay". *ChemBioChem*, 9 (15), pp. 2363-2371. DOI: <https://doi.org/10.3390/s18124166>

REFERENCIAS LEGALES:

Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas**, L338 de 20 de diciembre de 2006.