

Caracterización analítica de diamino
oxidasa procedente de soja para la
determinación selectiva de cadaverina
y putrescina en alimentos

Analytical characterization of diamine
oxidase from soybeans for the selective
determination of cadaverine and
putrescine in foods

Raquel Ramírez Moreno

Directora: Carmen Jarne Lardiés
Departamento de Química Analítica
Nanosensores y sistemas bioanalíticos (N&NB)
Curso: 2023/2024

RESUMEN

Las aminas biógenas (AB) son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular con una actividad biológica significativa. Las AB más comunes son la histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, β -feniletilamina, espermina y espermidina. Estas aminas pueden estar presentes en los alimentos debido a la degradación de sus proteínas o aminoácidos por enzimas descarboxilasas producidas por microorganismos. Las condiciones de conservación de los alimentos (pH y temperatura) y su procesamiento afectan a este proceso, aumentando su concentración con la degradación del alimento. Por lo tanto, la presencia de AB en los alimentos es indicativa de su calidad y frescura. Las AB pueden tener efectos tóxicos en los humanos cuando se ingieren alimentos que contienen altas concentraciones de ellas. El organismo tiene mecanismos para su degradación mediante enzimas como las amino oxidasas presentes en las células intestinales y hepáticas. Sin embargo, ciertos factores limitan la acción de estas enzimas, incluyendo factores alérgicos y genéticos, ingesta excesiva de aminas, consumo de medicamentos o alcohol, los cuales aumentan el potencial tóxico de las aminas. Por eso, es de gran interés para la industria alimentaria conocer la concentración de AB en los alimentos y disponer de métodos analíticos para su determinación que permitan un control de calidad más rápido, económico y en línea. En este contexto, los métodos electroquímicos basados en biosensores están ganando una relevancia significativa, combinando diferentes enzimas amino oxidasas según la amina biógena que se quiera determinar. En el trabajo presentado aquí, se caracterizará un extracto de diamino oxidasa (DAO) de plántulas de soja (*Glycine max*), proporcionado por la Estación Experimental Aula Dei (EEAD-CSIC), para evaluar la actividad y selectividad de esta enzima en la determinación de putrescina y cadaverina.

ABSTRACT

Biogenic amines (BAs) are low molecular weight nitrogen compounds with significant biological activity. The most common BAs are histamine, putrescine, cadaverine, tyramine, tryptamine, β -phenylethylamine, spermine, and spermidine. These amines can be present in food due to the degradation of its proteins or amino acids by decarboxylase enzymes produced by microorganisms. Food preservation conditions (pH and temperature) and processing affect this process, increasing their concentration with food degradation. Therefore, the presence of BAs in food is indicative of its quality and freshness. BAs can have toxic effects on humans when foods containing high concentrations of them are ingested. The body has mechanisms for their degradation through enzymes such as amino oxidases present in intestinal and hepatic cells. However, certain factors limit the action of these enzymes, including allergic and genetic factors, excessive intake of amines, consumption of medications or alcohol, which increase the toxic potential of the amines. For this reason, it is of great interest to the food industry to know the concentration of BAs in foods and to have analytical methods for their determination that allow for faster, more economical, and in-line quality control. In this context, electrochemical methods based on biosensors are gaining significant relevance, combining different amino oxidase enzymes depending on the biogenic amine to be determined. In the work presented here, an extract of diamine oxidase (DAO) from soybean seedlings (*Glycine max*), provided by the Aula Dei Experimental Station (EEAD-CSIC), will be characterized to evaluate the activity and selectivity of this enzyme in the determination of putrescine and cadaverine.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LAS AMINAS BIÓGENAS Y SU FORMACIÓN EN ALIMENTOS	1
1.2. IMPORTANCIA DE DETERMINAR AMINAS BIÓGENAS EN ALIMENTOS	1
1.3. DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS	2
2. OBJETIVOS	3
3. PARTE EXPERIMENTAL	4
3.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES	4
3.1.1 Reactivos y disoluciones generales	4
3.1.2 Enzimas	4
3.1.3 Aminas	5
3.2 INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL	5
3.2.1 Instrumentos	5
3.2.2 Materiales y aparatos	5
3.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE DAO (REALIZADA EN EEAD-CSIC).....	5
3.4 ALMACENAMIENTO Y TRATAMIENTO DEL EXTRACTO	6
3.5 PROCEDIMIENTO DE MEDIDA.....	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4.1 ENSAYOS PREVIOS. ELECCIÓN DEL COLORANTE	7
4.1.1 Estudio de la reacción HRP-H ₂ O ₂ -ABTS.	7
4.1.2 Estudio de la reacción HRP-ABTS-DAO-AB	8
4.1.3 Estudio de la reacción HRP-AR-DAO-AB	11
4.2 CADAVERINA	12
4.2.1 pH.....	12
4.2.2 DAO	13
4.2.3 HRP.....	13
4.2.4 Características analíticas.....	14
4.3 PUTRESCINA.....	15
4.3.1 pH.....	15
4.3.2 DAO	16
4.3.3 HRP.....	17
4.3.4 Características analíticas.....	17
4.4 MEZCLAS.....	18
4.4.1 Pruebas iniciales	18
4.4.2 Estudio cadaverina	21
4.4.3 Comparación señales cadaverina y putrescina	22
4.4.4 Estudio mezclas	23
5. CONCLUSIONES	24
6. BIBLIOGRAFÍA	26

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LAS AMINAS BIÓGENAS Y SU FORMACIÓN EN ALIMENTOS

Las aminas biógenas (AB) son compuestos de bajo peso molecular que poseen al menos un grupo amino en su estructura. Estos compuestos se encuentran de forma natural en los seres vivos y, desde un punto de vista biológico, presentan una actividad fisiológica importante¹.

Las AB más comunes son: histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, β -feniletilamina, espermina y espermidina. Su estructura se muestra en la Figura 1.

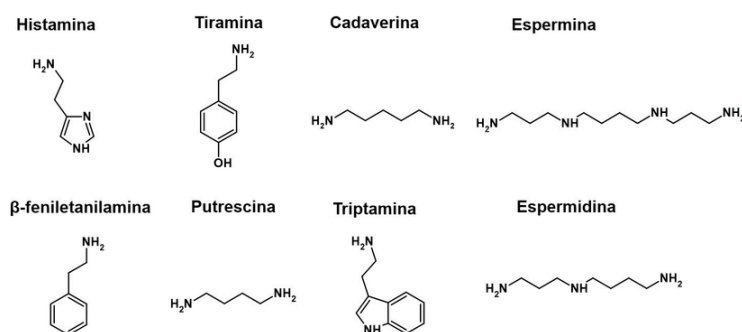


Figura 1. Estructura de diferentes aminas biógenas.²

Las AB pueden estar presentes en los alimentos debido a la degradación que pueden sufrir sus proteínas o aminoácidos por la acción de enzimas descarboxilasas generadas por microorganismos³. El proceso de formación de aminas biógenas en los alimentos está influenciado por varios factores: la disponibilidad de aminoácidos libres, la presencia de microorganismos capaces de descarboxilarlos, y condiciones favorables para el crecimiento y la producción de las enzimas de dichos microorganismos. Hay que destacar que las condiciones de conservación del alimento (como el pH y la temperatura) y su procesado afectan significativamente a este proceso⁴. Por otro lado, también se ha visto que el contenido en AB aumenta en los alimentos al mismo tiempo que su degradación, de modo que su contenido se ha empleado como un indicativo de calidad y frescura de estos.⁵

1.2. IMPORTANCIA DE DETERMINAR AMINAS BIÓGENAS EN ALIMENTOS

Las AB pueden generar un cuadro tóxico en personas debido a su ingesta. A pesar de que en el organismo existen diversas enzimas localizadas principalmente en el tracto gastrointestinal y el hígado que son capaces de degradar las aminas biógenas ingeridas con los alimentos facilitando su eliminación, no siempre es posible este proceso ya que existen ciertos factores que limitan su actuación como: factores alérgicos, genéticos, ingesta excesiva de aminas, consumo de medicamentos o alcohol. Estos factores aumentan el potencial tóxico de estas aminas en el organismo.⁶ Es por ello por lo que resulta de gran interés conocer su concentración, especialmente en alimentos con altos niveles proteicos y de aminoácidos libres ya que en estos existe un mayor riesgo de formación de AB (como por ejemplo carnes y pescados).

De las AB que se pueden encontrar con más frecuencia en alimentos, en este trabajo, nos hemos centrado en la determinación de cadaverina y la putrescina. Estas AB presentan toxicidad, como la histamina o la tiramina, pero, además, al ingerirse en altas dosis, estas pueden potenciar la

toxicidad de las otras. Por otro lado, cadaverina y putrescina son capaces de reaccionar con nitritos dando lugar a nitrosaminas, que son potenciales cancerígenos.⁴

1.3. DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS

Actualmente existen varios métodos analíticos para la detección de aminas biogénicas en productos alimenticios que incluyen métodos cromatográficos (HPLC-MS), electroquímicos (sensores) o espectrofotométricos (absorción y fluorescencia).

El creciente interés de la industria alimentaria por realizar un control de calidad más rápido, económico y que se ajuste a sus necesidades pudiendo ser utilizado en línea, está haciendo que la investigación se oriente hacia el desarrollo de métodos electroquímicos basados en biosensores para la determinación de AB en alimentos. Estos métodos incluyen la combinación de diferentes enzimas aminooxidasas en función de la amina biógena a determinar.⁷

Existen dos tipos principales de amino oxidasas según si contienen flavín adenín dinucleótido (FAD) como coenzima o si contienen Cu (II). Las mayoría de las monoamino oxidasas (MAO) pertenecen al primer tipo, mientras que las diamino oxidasas (DAO) y las poliamino oxidasas (PAO), junto a algunas MAO, contienen Cu (II) como coenzima.

El extracto de DAO que se ha utilizado en este trabajo y que fue proporcionado por la Estación Experimental Aula Dei (EEAD-CSIC) procede de plántulas de soja (soybean seedlings) que representan la etapa inicial de crecimiento de la planta de soja (*Glycine max*), esta enzima pertenece al grupo de las amino oxidasas dependientes de Cu (II) (Cu-AOs).⁸

En la Tabla 1 se recogen algunas propiedades de Cu-AOs procedentes de diferentes plantas de la familia de las leguminosas, entre ellas soja (*Glycine max*). Por otro lado, en la Tabla 2 se muestra la especificidad que presentan algunas DAO de distinta procedencia por diferentes sustratos.

Tabla 1. Propiedades de Cu-AOs procedentes de algunas plantas leguminosas.⁸

Properties	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Lens esculenta</i>	<i>Pisum sativum</i>
Molecular weight				
Gel chromatography	150 000	113 000	150 000	150 000
SDS-PAGE	72 000	77 000	75 000	72 000
Cu content				
% (g Cu/g protein)	ND	0.109	0.082	0.085
g atom/mol enzyme	ND	1.94	2	2
Isoelectric points	6.0	7.1	6.1	7.2
	5.8	7.05	5.9	6.8
	5.1	7.0	5.1	6.5
		6.9		
Carbohydrate content % (w/w)	ND	ND	14	14

Ref.: *Cicer* [41], *Glycine* [30], *Lens* [41], *Pisum* [41].

Tabla 2. Especificidad por el sustrato de Cu-AOs procedentes de algunas plantas.⁸

Substrate	Relative reaction rate (% of putrescine)					
	<i>Euphorbia characias</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Lathyrus sativus</i>	<i>Lens esculenta</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Vicia faba</i>
1,3-Diaminopropane	0	0	0	0	0	2
Putrescine	100	100	100	100	100	100
Cadaverine	100	183	81	91	111	90
1,6-Diaminohexane	56	—	21	31	44	—
Agmatine	43	52	19	15	56	64
Histamine	0	4	—	0	30	9
Spermidine	0	81	31	40	56	52
Spermine	0	15	18	20	8	8

Ref.: *Euphorbia* [8], *Glycine* [30], *Lathyrus* [15], *Lens* [16], *Pisum* [76], *Vicia* [26].

Así, vemos que la especificidad que presenta la DAO procedente de soja (*Glycine max*) por la cadaverina es superior a la presenta por la putrescina, es por ello por lo que cabe esperar que con nuestro extracto de DAO procedente de soja se obtengan mejores resultados en la determinación de cadaverina que de putrescina, y que esta última no interfiera en la determinación de la primera.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la caracterización analítica de la DAO procedente de plantulitas de soja con el fin de aplicar esta enzima a la determinación de cadaverina y putrescina en alimentos. Para completar este estudio también se pretende evaluar la selectividad de esta enzima hacia la determinación de la cadaverina (en función de lo visto en la Tabla 2) con el propósito de poder encontrar unas condiciones de trabajo en las que sea posible la determinación selectiva de cadaverina incluso en presencia de putrescina sin que esta última suponga una interferencia en la determinación.

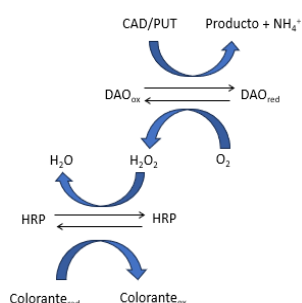


Figura 2. Reacción principal de estudio

Para llevar a cabo este estudio se ha puesto a punto un método basado en la reacción de las aminas (cadaverina y putrescina) con la enzima DAO produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que a su vez reacciona con la enzima peroxidasa (HRP) en presencia de un colorante cuyas propiedades ópticas cambian durante la reacción produciéndose un cambio de color que se podrá medir por absorbancia a la longitud de onda correspondiente permitiendo la determinación rápida y colorimétrica de las aminas (Figura 2).⁹

Para conseguir este objetivo el trabajo se va a estructurar del siguiente modo:

1. Búsqueda bibliográfica relacionada, tanto con la obtención y propiedades de las distintas enzimas DAO de diferentes procedencias, como con las características y problemáticas de las aminas biógenas en alimentos y los diferentes tipos de metodologías analíticas existentes para su determinación.
2. Estudio de la reacción enzimática **HRP- H_2O_2 -ABTS**. El uso del colorante ABTS en esta reacción ya se estudió en el grupo N&SB y se pudo comprobar que presenta dos formas oxidadas (ABTS_{ox} y ABTS_{ox2}) de las cuales nos interesa la formación de la primera de ellas, pudiendo resultar la formación de la segunda un inconveniente.⁹
3. Realización de una recta de calibrado para dicha reacción (**HRP- H_2O_2 -ABTS**) a partir de distintas diluciones de una disolución comercial de H_2O_2 . Cálculo de los parámetros analíticos asociados al método.
4. Acoplamiento de esta reacción con la reacción enzimática entre DAO y las diferentes AB (PUT y CAD). Estudio de las variables que influyen en la reacción **HRP-ABTS-DAO-AB**: tratamiento previo del extracto de DAO y pH de la disolución amortiguadora.
5. Estudio del uso del colorante Amplex Red (AR) en la reacción en sustitución del ABTS (**HRP-AR-DAO-AB**).
6. Estudio de la reacción con Cadaverina (**HRP-AR-DAO-CAD**) y optimización de las variables que influyen en ella: pH de la disolución amortiguadora, volumen de enzima DAO y concentración de HRP. Realización de una recta de calibrado para dicha reacción a partir de distintas diluciones de una disolución de cadaverina. Cálculo de los parámetros analíticos asociados al método.

7. Estudio de la reacción con Putrescina (**HRP-AR-DAO-PUT**) y optimización de las variables que influyen en ella: pH de la disolución amortiguadora, volumen de enzima DAO y concentración de HRP. Realización de una recta de calibrado para dicha reacción a partir de distintas diluciones de una disolución de putrescina. Cálculo de los parámetros analíticos asociados al método.
8. Estudio de la reacción HRP-AR-DAO-PUT-CAD para la determinación de mezclas de las dos aminas PUT:CAD (1:1). Realización de una recta de calibrado a partir de distintas diluciones de una disolución de cadaverina y en las condiciones óptimas de determinación de cadaverina en presencia de putrescina. Cálculo de los parámetros analíticos asociados al método.
9. Estudio de la reacción HRP-AR-DAO-CAD(PUT) en la que se estudia la determinación selectiva de cadaverina en presencia de putrescina. Realización de una recta de calibrado para la cuantificación selectiva de cadaverina en presencia de putrescina.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1.1 Reactivos y disoluciones generales

- Disoluciones amortiguadoras $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=6; 6,5; 7; 7,5; y 8. Se prepararon disolviendo 3,55 g de NaH_2PO_4 (Panreac 122018.1211) en 250 mL de agua miliQ y se ajustó a los pH deseados con una disolución de HCl 2M.
- Disolución comercial de peróxido de hidrógeno, H_2O_2 33% (m/V) (Panreac 131077.1211). Las disoluciones de H_2O_2 utilizadas se prepararon por dilución de la disolución comercial en las disoluciones amortiguadoras utilizadas en la medida.
- Disolución de Amplex Red (conservada en congelador), volumen 0,6 mL y concentración $1 \cdot 10^{-3}$ M. De esta disolución de partida se añadieron en la cubeta de medida 20 μL para tener una concentración de $1 \cdot 10^{-5}$ M o el volumen correspondiente según la concentración deseada, teniendo en cuenta que el volumen total en la cubeta es de 2mL.
- 2,2'-Azino-bi (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) diammoniumsalt, 98% (ABTS) 548,68 g/mol. Se prepararon disoluciones de concentración $5 \cdot 10^{-4}$ M, para ello se pesan 11,2 mg y se disuelven en 2 mL, de esta disolución se toman 100 μL para añadirse en la cubeta (volumen total en la cubeta es de 2 mL).

3.1.2 Enzimas

- Peroxidasa (HRP) (EC1.11.1.7) 89,63 u/mg. Se preparó una disolución inicial de 560,19 u/mL pesando 12,5 mg y disolviéndolos en un Eppendorf de 2 mL. Esta disolución inicial se empleó para preparar diariamente disoluciones más diluidas de HRP. Para ello se toman 90 μL de la disolución inicial y se disuelven en 1 mL, para tener una concentración de 50,42 u/mL. De esta dilución se añadirán 20 μL en la cubeta de medida, de tal forma que se obtendrá una concentración de 0,5042 u/mL. Se añaden diferentes volúmenes según la concentración final deseada.
- Extractos de DAO: en el apartado 3.3 se detalla más información tanto de la obtención realizada en la Estación Experimental Aula Dei (EEAD-CSIC) como del tratamiento realizado antes del uso de la enzima.

3.1.3 Aminas

- Cadaverina (Cadaverine dihydrochloride) 175,10 g/mol Sigma C8561 98 % pureza.
- Putrescina (Putrescine dihydrochloride) 161,07 g/mol Sigma P7505 98 % pureza.

Las disoluciones de partida de las dos aminas se prepararon pesando la cantidad exacta de cada amina necesaria en un vial previamente tarado y añadiendo el volumen de disolución amortiguadora necesario para preparar cada disolución. A partir de estas disoluciones de partida, se hicieron diluciones para obtener disoluciones de menor concentración según se necesitó para los diferentes estudios realizados.

3.2 INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL

3.2.1 Instrumentos

- pH metro CRISON, Basic 20, para ajustar los pH de las disoluciones amortiguadoras.
- Balanza analítica de precisión, GR-202-EC (máx. 210 g, mín. 1mg).
- Espectrofotómetro de absorción molecular de fotodiodos UV-vis Analytik Jena Specord 210 Plus. Cuenta con compartimento de muestra multicubeta y termostatzado.

3.2.2 Materiales y aparatos

- Centrifugadora Eppendorf Minispin Plus.
- Ordenador con software Agilent ChemStation para interpretación de datos.
- Agitador magnético.
- Micropipetas de volumen variable (2-20 μ L, 5-50 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L).
- Material desechable: Eppendorf, Falcon, puntas de micropipetas y pipetas Pasteur.
- Cubetas de plástico de 1 cm de paso óptico.
- Vasos de precipitados.
- Botes de plástico de 300 mL para almacenar disoluciones amortiguadoras en nevera.

3.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE DAO (REALIZADA EN EEAD-CSIC)

Los extractos de DAO se obtuvieron gracias a la colaboración con el grupo de investigación del Dr. Alfonso Lozano de La Estación Experimental Aula Dei (CSIC). El Dr. Alfonso nos proporcionó los extractos de DAO con los que se ha realizado el trabajo que se presenta a continuación.

Se germinaron en dos bandejas semillas de soja (*Glycine max* L. Williams) utilizando una mezcla perlita/vermiculita al 50%. Las plantulitas fueron germinadas cubiertas por papel de aluminio para evitar la exposición a la luz (plantas etioladas). Plantulitas germinadas de dos semanas, que mostraban ya un tallo alargado y las primeras hojas verdaderas, fueron recogidas, lavadas en agua destilada para retirar los restos de la perlita/vermiculita y utilizadas para obtener los extractos. Una vez lavadas, se cortaron las raíces de las plantulitas y el resto del material (140-150g) fue triturado en una batidora mediante dos pulsos de 45 segundos en 200 mL de tampón de extracción I (50mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, 0,3 M NaCl, pH: 5,5). El triturado fue filtrado a través de dos capas de papel Miracloth con el objetivo de eliminar material sin triturar y restos fibrosos. El filtrado recogido fue centrifugado a 10.000 x g 2 minutos, descartándose el pellet y recogiendo el sobrenadante. Este sobrenadante fue dializado frente a 5L de tampón 20 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH: 6,5, utilizando una membrana de diálisis con poro de corte de 3,5 kDa. Mediante este procedimiento de diálisis se eliminó el NaCl y proteínas pequeñas presentes en el extracto. La

diálisis se llevó a cabo durante 24 horas en la cámara fría (4 °C) y oscuridad. Los extractos así obtenidos fueron utilizados para realizar los ensayos de actividad.

3.4 ALMACENAMIENTO Y TRATAMIENTO DEL EXTRACTO

Los extractos de DAO recibidos de EEAD-CSIC se almacenaron en el congelador en tubos Falcon de 45 mL. Para trabajar con ellos se descongela uno de los tubos y se fracciona en tres muestras de 15 mL cada una (dos se vuelven a guardar en el congelador). La muestra de 15 mL de DAO descongelada se fracciona de nuevo en muestras más pequeñas de 2 mL, que vuelven a almacenarse en el congelador.

El tratamiento al que se somete a la DAO en todas las medidas es siempre el mismo. Cada muestras de enzima de 2 mL almacenada se descongela y se divide en dos muestras 1 mL cada una de ellas que se guardan en dos Eppendorf de 1,5 mL de capacidad. Estos se llevan a la centrífuga colocando los Eppendorf enfrentados para que el peso quede compensado. Se dejan 20 minutos a 13400 rpm, de manera que se forma un precipitado en el fondo del Eppendorf y un sólido suspendido en la parte superior. De esta muestra, se recoge el sobrenadante, evitando coger tanto el precipitado como el sólido que queda suspendido en la parte superior.

3.5 PROCEDIMIENTO DE MEDIDA

La obtención de la señal de las diferentes medidas se realizó con un espectrofotómetro de absorción molecular de fotodiodos UV-vis. Para llevar a cabo las medidas se utilizaron cubetas de plástico de 1 cm de paso óptico.

La longitud de onda de medida dependerá del colorante utilizado, es decir, si se trabaja con ABTS, la longitud de onda a la que se mide la variación de la absorbancia puede ser 415, 570 o 730 nm, ya que presenta varias especies. Sin embargo, si se utiliza el Amplex Red, la longitud de onda de medida será siempre 572 nm.

Se llevaron a cabo las medidas utilizando el modo cinético del espectrofotómetro y se seleccionó el tiempo total de medida en función de los diferentes experimentos.

Para hacer las medidas, se coloca en la cubeta de referencia 2 mL de disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M del pH correspondiente en los distintos experimentos. Antes de medir las muestras se realizó un blanco añadiendo a la cubeta de medida todos los reactivos, según las condiciones del experimento, a excepción del analito que se quiere determinar. El volumen final en cubeta de todos los ensayos realizados es siempre de 2 mL. En primer lugar, se añade el volumen de tampon de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M del pH correspondiente a cada experimento, a continuación, se añade el volumen de DAO. Después, se añaden los volúmenes de HRP y el colorante correspondiente. Se introduce la cubeta en el espectrofotómetro y se empieza a medir. Trascurridos 50 segundos, para tener la línea base de la medida, se pausa y se adiciona el volumen de analito, después se reanuda la medida. El equipo en todo momento va contando los segundos que pasan en esa pausa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ENSAYOS PREVIOS. ELECCIÓN DEL COLORANTE

4.1.1 Estudio de la reacción HRP-H₂O₂-ABTS.

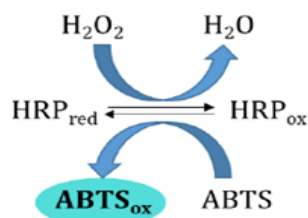


Figura 3. Esquema de la reacción entre la HRP y H₂O₂ en presencia de ABTS.⁹

En primer lugar, se estudió la reacción enzimática entre enzima peroxidasa (HRP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) con el colorante ABTS (2,2'-Azino-bi (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) (Figura 3). Las peroxidasas son un tipo de enzimas que pertenecen a la categoría de las oxidoreductasas, prácticamente todas ellas son hemoproteínas y tienen como sustrato común el H₂O₂. El ABTS es un cromóforo que puede ser oxidado en reacciones enzimáticas que involucren a la enzima HRP. Así pues, cuando la enzima HRP reacciona con el H₂O₂ su centro activo queda oxidado, actuando como oxidante del ABTS

que pasa a su forma radicalaria ABTS_{ox} (ABTS^{•+}), la cual presenta un espectro de absorción con máximos a 430 nm y 730 nm, confiriéndole un color azul verdoso. Estos cambios espectroscópicos son utilizados para la determinación de H₂O₂ mediante métodos colorimétricos enzimáticos. Hay que señalar que lo que buscamos es obtener una señal coloreada que sea estable y se mantenga en el tiempo.

En estudios anteriores realizados en el grupo de investigación “Nanosensores y Sistemas Bioanalíticos” en los que se ha realizado este trabajo, se demostró que las condiciones óptimas de trabajo son en exceso de ABTS.^{3,4,9} Se realizó una calibración con diferentes concentraciones de H₂O₂ para una concentración de HRP de 0,5 u/mL y de ABTS de 5*10⁻⁴ M, midiendo la variación de absorbancia a 730 nm. Se obtuvo la siguiente gráfica.

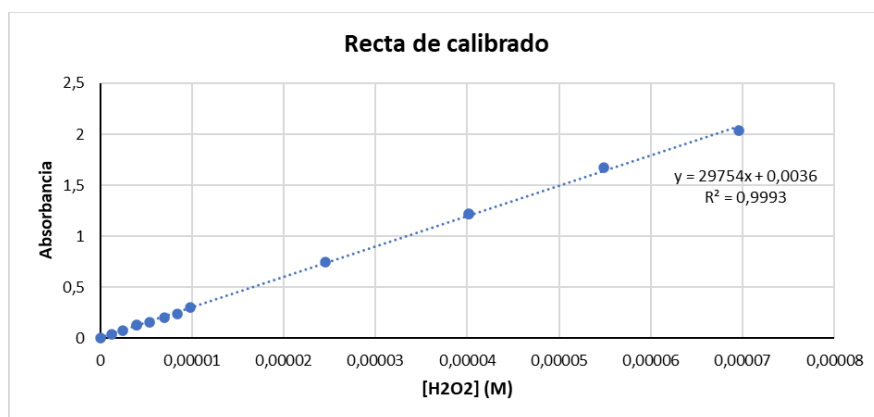


Figura 4. Recta de calibrado para H₂O₂. [ABTS]= 5*10⁻⁴ M, [HRP]=0,5 U/mL, pH=6, λ =730 nm

La repetitividad de las medidas a altas y bajas concentraciones se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3. Resultados de reproducibilidad para altas y bajas concentraciones de H₂O₂, número de réplicas n=9, [ABTS]= 5*10⁻⁴ M, [HRP]=0,5 U/mL, pH=6, λ =730 nm

[H2O2]	Promedio	σ	DSR %
3,97*10 ⁻⁶ M	0,111	0,003	2,650
4,02*10 ⁻⁵ M	1,153	0,042	3,614

4.1.2 Estudio de la reacción HRP-ABTS-DAO-AB

Una vez se había estudiado la reacción HRP-H₂O₂-ABTS (Figura 3) y se recibieron las muestras de extracto de DAO, el siguiente paso fue acoplar a esta reacción la reacción enzimática entre DAO y las diferentes AB: putrescina (PUT) y cadaverina (CAD), Figura 2. Se registró la medida de variación de absorbancia con el tiempo a la longitud de onda de 730 nm. Cuando la señal es estable, se añade el analito (PUT/CAD) y se registra el aumento de absorbancia debido a la formación de la especie oxidada del ABTS_{ox} (azul verdoso).

Se comenzó evaluando como afectaba el tratamiento del extracto de la enzima DAO que había sido proporcionada por la EEAD sobre la cinética de la reacción HRP-ABTS-DAO-AB. Se estudió el comportamiento de la DAO cuando se trabajaba directamente con el extracto recibido y cuando se trabajaba con el extracto después de haber sido centrifugado. También se aprovechó que se tenían dos muestras del extracto de DAO que se habían descongelado la semana anterior y se habían guardado en la nevera, una de ellas fue centrifugada y la otra no. Introduciendo también estos extractos en el estudio se quería ver como afectaba a la actividad de la enzima la manipulación de esta (congelado/descongelado).

Se estudió la cinética de la reacción enzimática HRP-ABTS-DAO-CAD/PUT (Figura 2) midiendo la variación de absorbancia a 730nm y utilizando las siguientes condiciones: [HRP]=0,5 u/mL, [ABTS]= 5×10^{-4} M, [CAD]= $4,5 \times 10^{-5}$ M, [PUT]= $4,5 \times 10^{-5}$ M y tampon H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0,1M pH=7. Para llevar a cabo las medidas se añadió, en todos los casos, 200 µL de DAO (sin centrifugar, centrifugada y descongelada el mismo día del análisis o la semana anterior). Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 5 y 6.

Comparando los resultados obtenidos cuando se trabaja con cadaverina (Figura 5) y con putrescina (Figura 6) se puede observar que, en todos los casos, las señales de variación de absorbancia obtenidas con putrescina son mucho menores que las obtenidas con cadaverina. De lo cual se deduce que la DAO con la que estamos trabajando muestra una clara selectividad hacia la determinación de la cadaverina.

Por otro lado, tanto con cadaverina como con putrescina, los resultados son mejores al trabajar con el extracto de DAO descongelado y centrifugado el mismo día, observándose una clara disminución de la actividad de la enzima que ha sido descongelada la semana anterior dando lugar a cinéticas de reacción más lentas y señales de variación de absorbancia menos estables en el tiempo.

Finalmente, también se puede observar que cuando se trabaja con el extracto de DAO no centrifugado se observa que se obtiene un máximo de variación de absorbancia que no se estabiliza y tiende a caer a lo largo del tiempo. Este comportamiento lo asociamos a la presencia de proteínas en el extracto de DAO sin centrifugar y que están siendo responsables de la estabilización de la forma sobreoxidada del ABTS (ABTS_{ox2}). Al centrifugar el extracto de DAO retiramos la mayor parte de estas proteínas y evitamos este efecto, obteniéndose una señal de variación de absorbancia a 730nm estable en el tiempo y correspondiente a la formación de la especie ABTS_{ox}. En conclusión, las mejores condiciones de trabajo son aquellas en las que se utiliza el extracto de DAO centrifugado y descongelado el mismo día en el que se realiza la medida.

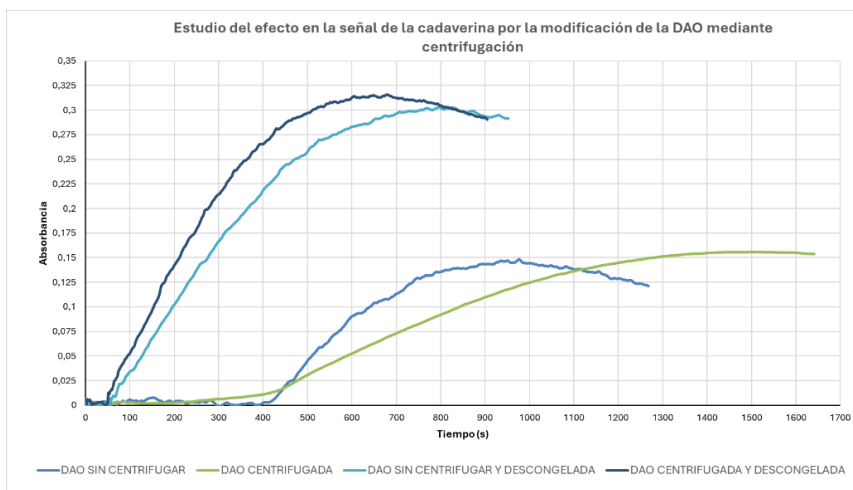


Figura 5. Cinética de reacción en función del tratamiento del extracto de la enzima DAO en la señal de la cadaverina.

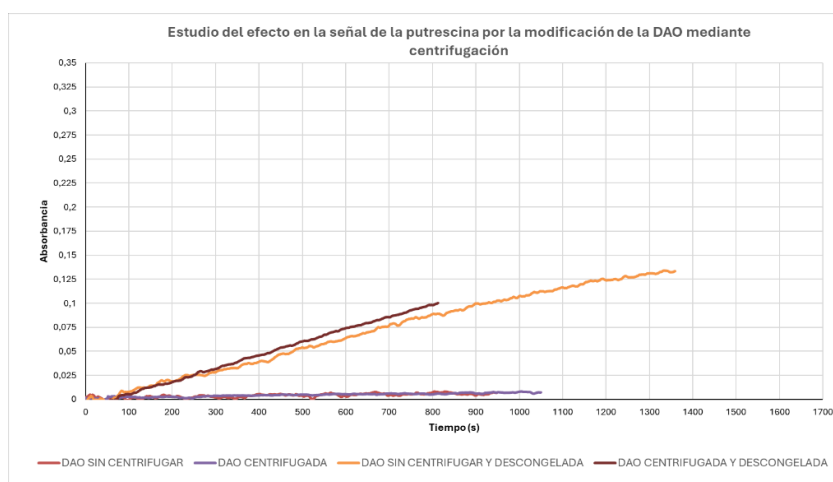


Figura 6. Cinética de reacción en función del tratamiento del extracto de la enzima DAO en la señal de la putrescina.

Seguidamente, y con la intención de ahondar más en el estudio del comportamiento del colorante ABTS, se estudiaron las cinéticas de reacción a las dos longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción de las dos especies oxidadas del ABTS: 730nm (ABTS_{ox}) y 570nm (ABTS_{ox2}). Las condiciones de trabajo para la reacción HRP-ABTS-DAO-CAD fueron las siguientes: [HRP]=0,5 u/mL, 200 μ L DAO centrifugada del día en que se realizó la medida, tampon pH 7 H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0,1M, [CAD]= 5,5*10⁻⁵ M. Se utilizaron diferentes concentraciones de ABTS: [ABTS] = 5*10⁻⁴ M, 1*10⁻⁴ M y 1*10⁻³ M. En la Figura 7 se muestran los resultados de variación de absorbancia obtenidos a las dos longitudes de onda de estudio.

De este estudio concluimos que en las condiciones de trabajo establecidas es posible emplear el estado sobre oxidado de ABTS (ABTS_{ox2}) para estudiar la reacción HRP-ABTS-DAO-CAD, pero no profundizamos en ello debido a los largos tiempos que requiere para la medida por dar lugar a cinéticas de reacción muy lentas.

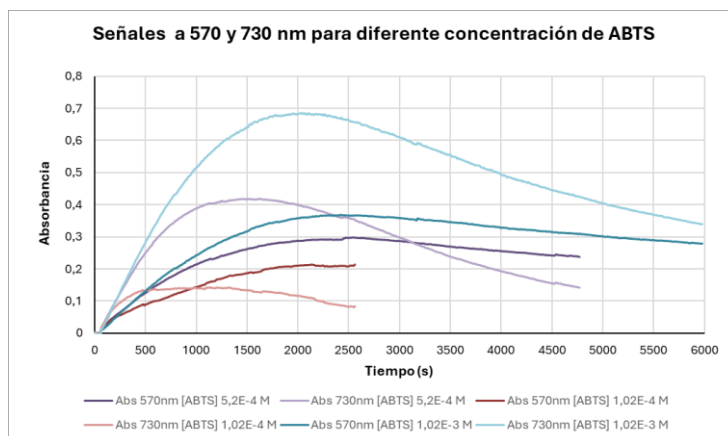


Figura 7. Cinética de la reacción HRP-ABTS-DAO-CAD en función de la concentración de ABTS. Medidas de variación de absorbancia a 570 nm y 730 nm.

Lo siguiente que se estudió fue como afecta el pH de la disolución amortiguadora empleada, $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M, en la cinética de la reacción HRP-ABTS-DAO-CAD/PUT. Para ello se prepararon diferentes disoluciones tampon de pH 6, 6.5, 7, 7.5 y 8. Las condiciones de medida fueron las siguientes: $[\text{ABTS}] = 5 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{HRP}] = 0,5$ u/mL, 200 μL de DAO centrifugada y descongelada el mismo día del experimento y $[\text{CAD}] = 5,5 \cdot 10^{-5}$ M (Figura 8) o $[\text{PUT}] = 5,8 \cdot 10^{-5}$ M. Se midió la variación de absorbancia del ABTS a 730nm (Figura 9).

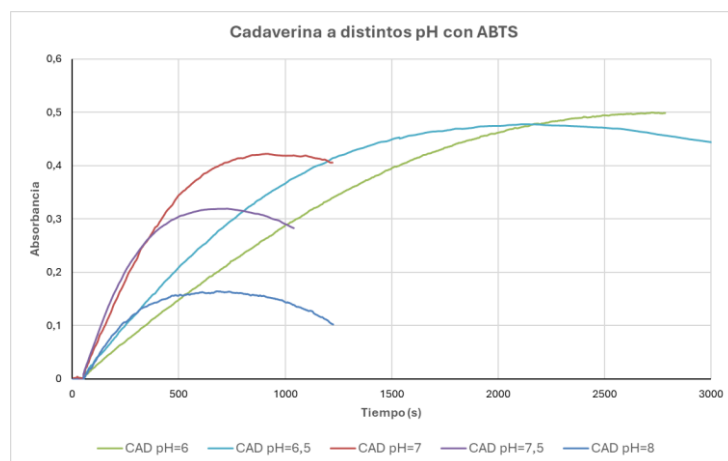


Figura 8. Cinética de la reacción HRP-ABTS-DAO-CAD en función del pH utilizado.

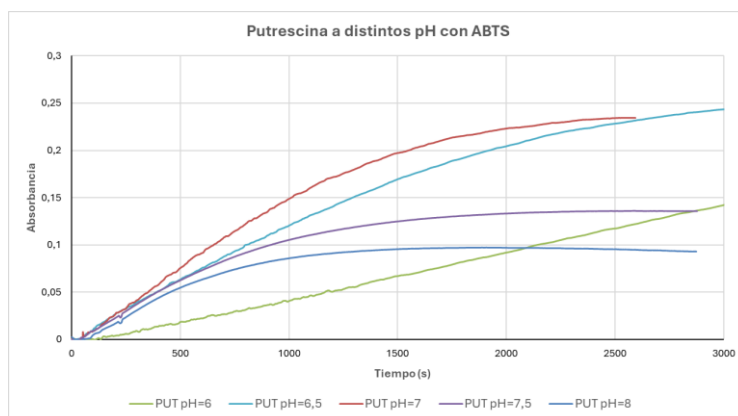


Figura 9. Cinética de la reacción HRP-ABTS-DAO-PUT en función del pH utilizado.

De los resultados obtenidos, y mostrados en las Figuras 8 y 9, podemos deducir claramente que cuando se trabaja con cadaverina (Figura 8) la mejor cinética de reacción se obtiene con tampon a pH 7. Sin embargo, cuando se trabaja con putrescina (Figura 9) no se observa ningún pH adecuado en el que obtenga una buena cinética de reacción con una señal de variación de absorbancia estable en el tiempo, observándose reacciones muy lentas con señales que no se estabilizan.

4.1.3 Estudio de la reacción HRP-AR-DAO-AB

Seguidamente y con el fin de evitar los posibles inconvenientes que pudiera ocasionar el uso de ABTS (posibilidad de obtener la especie sobreoxidación, ABTS_{ox2} por la presencia de proteínas en el extracto de DAO), se decidió evaluar el uso de otro cromóforo, el Amplex Red (AR). Este colorante se encuentra disuelto en DMSO a diferencia del ABTS que estaba disuelto en agua y su longitud de onda de máxima absorción es de 572 nm.

El AR se emplea en concentraciones menores que el ABTS, $1 \cdot 10^{-5}$ M y $5 \cdot 10^{-5}$ M, por lo que hubo que ajustar las concentraciones del resto de reactivos. Así pues, se utilizaron concentraciones de cadaverina y putrescina de $1 \cdot 10^{-5}$ M y se mantuvo la concentración de 0,5 u/mL para HRP, así como 200 μL de DAO centrifugada y tampon pH 7 $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M. Las medidas se realizaron a 572 nm.

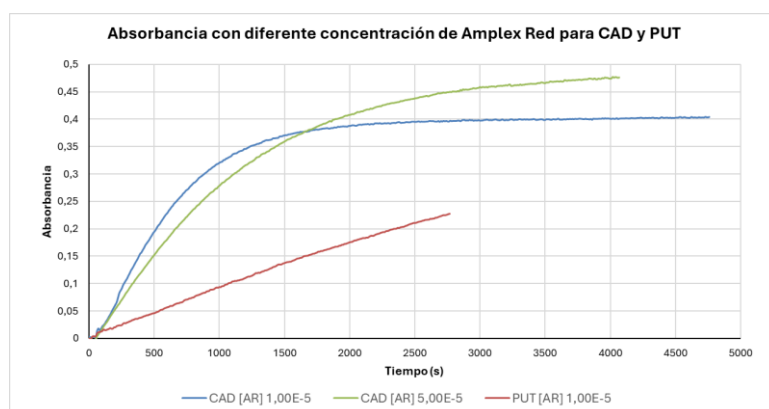


Figura 10. Cinética de la reacción HRP-AR-DAO-CAD/PUT.

En la Figura 10, se observa que cuando se trabaja con una mayor concentración de Amplex Red ($5 \cdot 10^{-5}$ M) la cinética de reacción es más lenta que cuando se trabaja con concentraciones menores de $1 \cdot 10^{-5}$ M, obteniéndose en este caso una señal de variación de absorbancia estable en menor tiempo. Creemos que esto es debido a la mayor presencia del disolvente DMSO en la disolución de Amplex Red concentrada (100 μL) con respecto a la diluida (20 μL). Para comprobar el posible efecto del DMSO sobre la cinética de reacción, se repiten las medidas utilizando una disolución de Amplex Red de concentración $1 \cdot 10^{-5}$ M, pero que contenga la misma cantidad de DMSO (100 μL) que la disolución de Amplex Red concentrada ($5 \cdot 10^{-5}$ M). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11.

En la Figura 11, se ve claramente que la presencia de DMSO está afectando en la cinética de la reacción, obteniéndose los mejores resultados cuando se utiliza una disolución de Amplex Red de $1 \cdot 10^{-5}$ M en 20 μL de DMSO.

Finalmente, también se observa que al trabajar con putrescina (HRP-AR-DAO-PUT) la cinética de reacción es muy lenta para estas condiciones de trabajo estudiadas.

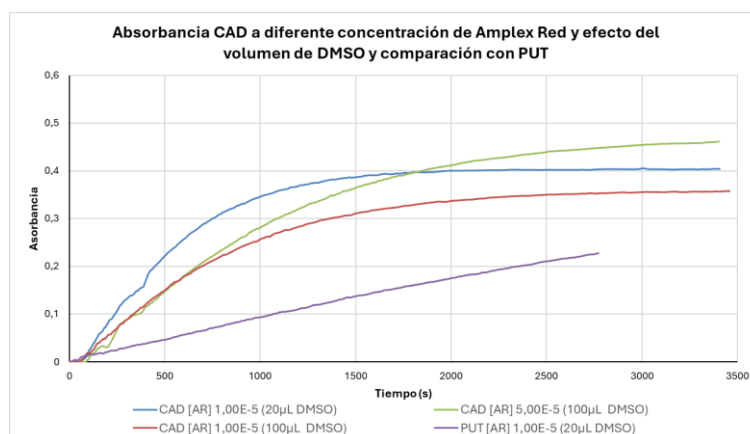


Figura 11. Cinética de la reacción HRP-AR-DAO-CAD/PUT en función de la presencia de DMSO en las disoluciones de Amplex Red de diferentes concentraciones.

4.2 CADAVERINA

Todos los resultados obtenidos hasta el momento nos indican que la cinética de la reacción cuando se utiliza cadaverina como analito es mucho más rápidamente que cuando se usa putrescina, obteniéndose señales de variación de absorbancia estables en el tiempo. Es por esto por lo que empezamos centrando nuestro estudio en la reacción HRP-AR-DAO-CAD, con el fin de obtener las condiciones óptimas para la determinación de cadaverina. Las variables estudiadas fueron el pH de la disolución amortiguadora, el volumen de DAO y la concentración de HRP. Todas las medidas se realizan a la longitud de onda de 572nm.

4.2.1 pH

Para el estudio del pH se utilizaron disoluciones amortiguadoras $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M de pH 6; 6,5; 7; 7,5 y 8. Las condiciones de medida fueron: $[\text{AR}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{HRP}] = 0,5042 \text{ u/mL}$; volumen DAO 300 μL , $[\text{CAD}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ y para ello los volúmenes en cubeta fueron 300 μL DAO, 20 μL HRP, 20 μL AR, 20 μL CAD y 1640 μL disolución tampón $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M de entre pH 6 y 8 como hemos mencionado anteriormente.

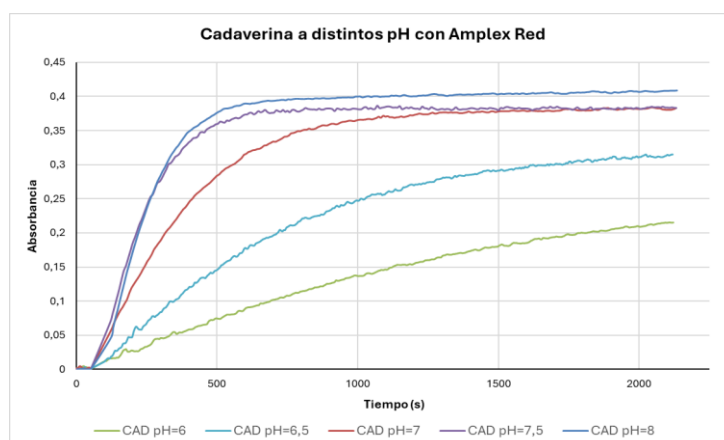


Figura 12. Optimización del pH de la disolución amortiguadora en la reacción HRP-AR-DAO-CAD.

En la Figura 12 se observa que la mejor cinética de reacción, en la que se obtiene una señal estable de variación de absorbancia en el menor tiempo, es la correspondiente a la disolución tampon de pH 8, ya que a 1000 segundos ya se observa una medida estable. Hay que señalar que se observa una ligera tendencia de la señal a seguir aumentando, lo cual se asocia a la deriva propia de la línea base del equipo, esta será corregida mediante la medida de blancos.

4.2.2 DAO

A continuación, se estudió el volumen de DAO óptimo para obtener medidas de variación de absorbancia estables en el menor tiempo. Se probaron volúmenes de DAO de 100, 200, 300 y 400 μL . Las condiciones para realizar las medidas son: $[\text{AR}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{HRP}] = 0,5042 \text{ u/mL}$; volumen DAO entre 100 y 400 μL , $[\text{CAD}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ y para ello los volúmenes en cubeta fueron entre 100-400 μL DAO, 20 μL HRP, 20 μL AR, 20 μL CAD y 1640 μL disolución tampon $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M pH = 8.

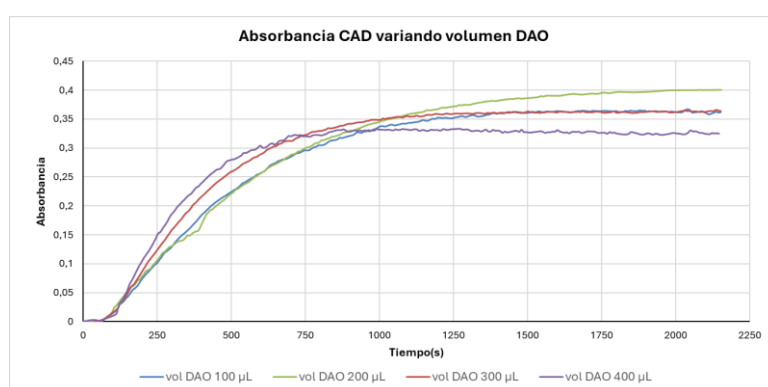


Figura 13. Optimización del volumen de DAO en la reacción HRP-AR-DAO-CAD.

En la Figura 13, se observa que cuando se utiliza el mayor volumen de DAO (400 μL) la señal máxima de variación de la absorbancia es menor que en los casos en los que se utiliza menor volumen de DAO. Esto lo asociamos a la presencia de más proteínas en el medio cuando se utilizan volúmenes mayores de DAO. Para evitar este efecto, se decide considerar como volumen óptimo 300 μL de DAO, ya que da lugar a señales de variación de absorbancia estables en un menor tiempo de reacción.

4.2.3 HRP

Por último, se optimizó la concentración de HRP, estudiando concentraciones de 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 u/mL de peroxidasa. Las condiciones para realizar las medidas fueron: $[\text{AR}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{HRP}] = 0,2541; 0,5042; 0,7623 \text{ y } 1,0164 \text{ u/mL}$; volumen DAO 300 μL , $[\text{CAD}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ y para ello los volúmenes en cubeta fueron entre 300 μL DAO, 20 μL HRP disoluciones de entre 0,25 y 1,00 u/mL, 20 μL AR, 20 μL CAD y 1640 μL disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M pH = 8.

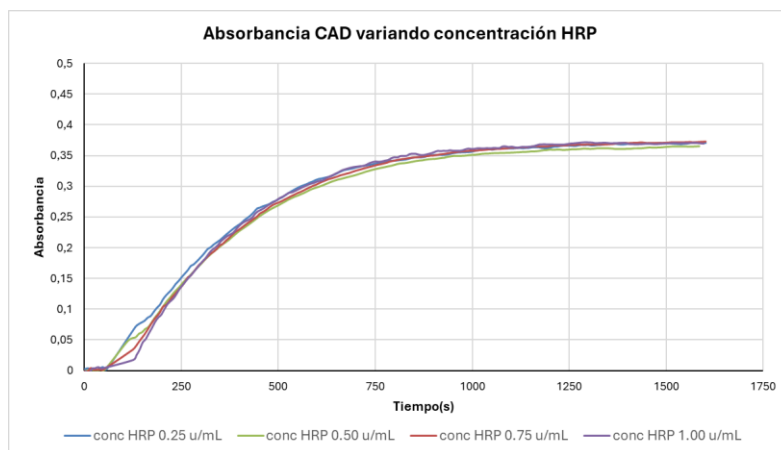


Figura 14 Optimización de la concentración de HRP en la reacción HRP-AR-DAO-CAD.

En la Figura 14, se observa que no afecta apenas la variación de la concentración de HRP en la señal que se obtiene, por lo que se continúa utilizando la que se ha usado hasta ahora 0,5042 u/mL puesto que es de las más bajas y con ella ya tenemos una señal adecuada.

4.2.4 Características analíticas

Utilizando las condiciones óptimas de medida determinadas en los estudios previos, se realizó una recta de calibrado de cadaverina con concentraciones entre $5,14 \times 10^{-7}$ M y $5,14 \times 10^{-5}$ M.

A las medidas de variación de absorbancia obtenidas se les realizó la corrección respecto del cero, con el fin de corregir la deriva que presentan las medidas a causa del equipo. Así en la tabla de la Figura 15 se recogen las medidas de variación de absorbancia máxima tomadas a 1000 segundos para disoluciones de concentración creciente de cadaverina.

La representación de las diferencias de absorbancias frente a la concentración de cadaverina medidas a 572 nm fueron tomadas al mismo tiempo (1000 segundos). En la Figura 11 se muestra la recta de calibrado y la ecuación de dicha recta. Se obtuvo un rango lineal entre $5,14 \times 10^{-7}$ y $8,22 \times 10^{-6}$ M. Se calculó la DSR = 6,96 %, el límite de detección LD = $2,35 \times 10^{-8}$ M y el límite de cuantificación LC = $7,85 \times 10^{-8}$ M. La sensibilidad está asociada a la pendiente, la cual en este caso es de 52234 y la $R^2 = 0,9985$.

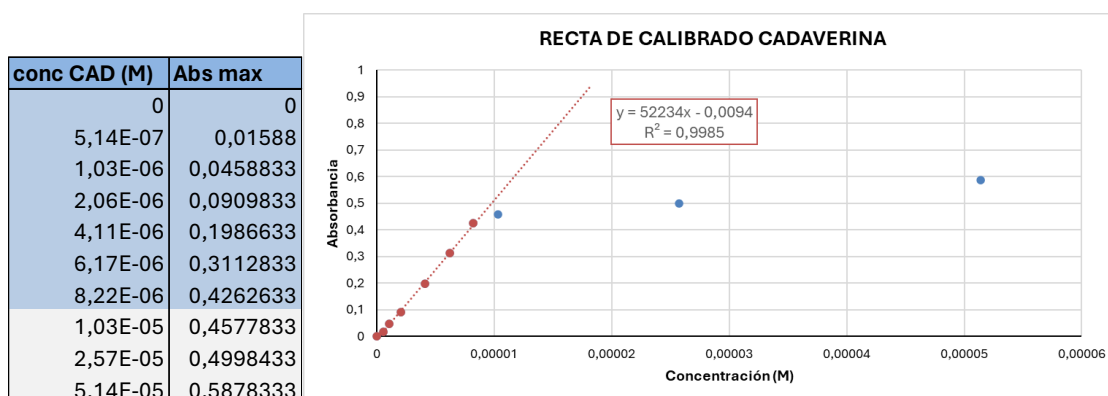


Figura 15. Recta de calibrado para la cadaverina en sus condiciones óptimas: disolución amortiguadora pH = 8, [AR] = 1×10^{-5} M, [HRP] = 0,5042 u/mL y 300 μ L de DAO.

Finalmente, se hizo el estudio de la repetibilidad de las medidas a altas y bajas concentraciones de cadaverina, para ello se seleccionaron las disoluciones de concentración $1,03 \times 10^{-6}$ M (ds 2) y $6,17 \times 10^{-6}$ M (ds 3). Se prepararon 3 disoluciones de cada concentración y se realizaron 3 medidas de cada una de esas disoluciones, para las cuales se calculó la media y la DSR (%). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Repetibilidad de las medidas a altas y bajas concentraciones de cadaverina.

BAJAS CONC				ALTAS CONC			
2.1.1	0,0849833			3.1.1	0,2397333		
2.1.2	0,0778833	media	0,0844722	3.1.2	0,2300833	media	0,2281333
2.1.3	0,09055	DSR%	7,5158226	3.1.3	0,2145833	DSR%	5,5616107
2.2.1	0,08035			3.2.1	0,2460167		
2.2.2	0,0827167	media	0,0781167	3.2.2	0,2384544	media	0,2418626
2.2.3	0,0712833	DSR%	7,725612	3.2.3	0,2411167	DSR%	1,5859976
2.3.1	0,0891833			3.3.1	0,2602167		
2.3.2	0,08785	media	0,0897444	3.3.2	0,2583167	media	0,25525
2.3.3	0,0922	DSR%	2,4832988	3.3.3	0,2472167	DSR%	2,7508847

En conclusión, de estos resultados se puede deducir que tenemos el método optimizado para determinar cadaverina utilizando el extracto de DAO que nos proporcionó la EEAD, siendo las condiciones óptimas de trabajo: disolución amortiguadora pH = 8, [AR] = 1×10^{-5} M, [HRP] = 0,5042 u/mL y 300 μ L de DAO, fijando el tiempo de medida en 1000 segundos.

4.3 PUTRESCINA

Una vez conocidas las condiciones óptimas para trabajar con cadaverina, se prosigue con el estudio de la putrescina (HRP-AR-DAO-PUT). Para ello, se vuelven a estudiar las mismas variables: el pH de la disolución amortiguadora, el volumen de DAO y la concentración de HRP. Todas las medidas se realizan a la longitud de onda de 572nm. Se seleccionarán las mejores condiciones de trabajo que den lugar a una cinética de reacción rápida con una señal de variación de absorbancia estable en el tiempo.

4.3.1 pH

Para el estudio del pH se utilizaron disoluciones amortiguadoras $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M de pH 6; 6,5; 7; 7,5 y 8. Las condiciones de medida fueron: [AR] = 1×10^{-5} M; [HRP] = 0,5042 u/mL; volumen DAO 300 μ L y [PUT] = 1×10^{-5} M. Los volúmenes en cubeta fueron 300 μ L DAO, 20 μ L HRP, 20 μ L AR, 20 μ L PUT y 1640 μ L disolución tampon $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M de entre pH 6 y 8. Se muestran los resultados obtenidos en la Figura 16.

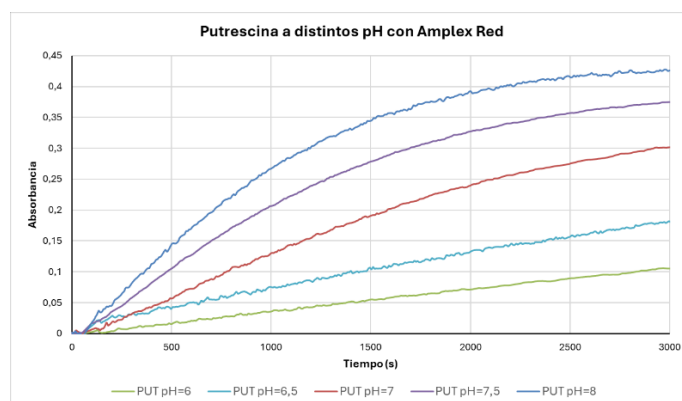


Figura 16. Optimización del pH de la disolución amortiguadora en la reacción HRP-AR-DAO-PUT.

En el Figura 16 se observa que la cinética de la reacción al trabajar con putrescina es considerablemente más lenta que cuando se trabaja con cadaverina. El mejor pH de la disolución amortiguadora al que realizar las medidas vuelve a ser pH 8, ya que a 2500 segundos de haber comenzado la reacción se tendrá una medida de absorbancia que puede considerar estable. Hay que señalar que, como en el caso de la cadaverina, se observa una ligera tendencia de la señal a seguir aumentando asociada a la deriva propia de la línea base del equipo, la cual se corregirá mediante la medida de blancos.

4.3.2 DAO

A continuación, se estudió cuanto volumen de DAO utilizar para obtener la mejor cinética de la reacción HRP-AR-DAO-PUT. Hasta el momento se había visto que cuando se trabajaba con 300 μL de enzima (Figura 16) no teníamos una señal estable aun midiendo durante 3000 segundos.

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron volúmenes de DAO de 200, 300 y 400 μL , descartamos el uso de 100 μL porque en este caso la cinética de la reacción es muy lenta. Las condiciones de medida fueron las siguientes: $[\text{AR}] = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{HRP}] = 0,5042 \text{ u/mL}$; volumen DAO entre 200 y 400 μL , $[\text{PUT}] = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Los volúmenes en cubeta fueron: 200-400 μL DAO, 20 μL HRP, 20 μL AR, 20 μL PUT y 1640 μL disolución tampon $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M pH = 8. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17.

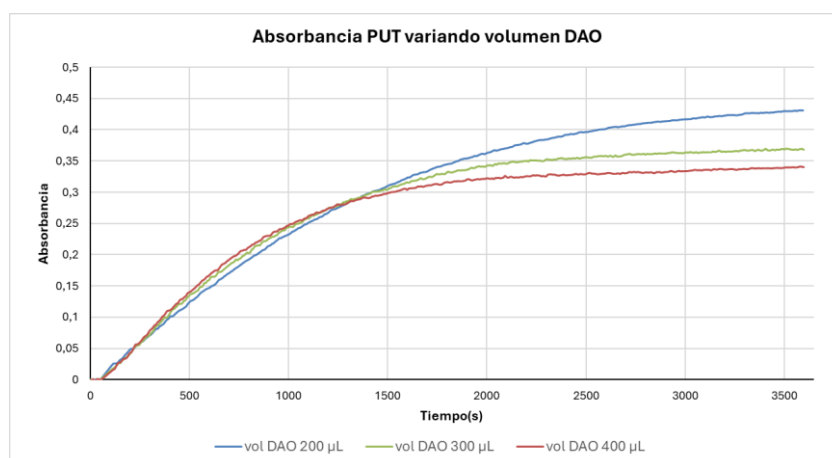


Figura 17. Optimización del volumen de DAO en la reacción HRP-AR-DAO-PUT.

La conclusión que se deriva de los resultados mostrados en la Figura 17 es que el volumen de DAO óptimo es de 400 μL ya que da lugar a señales de absorbancia estables en tiempos de reacción más cortos. Se elige este volumen de DAO mayor a pesar de que, como se comentó en el caso de cadaverina, la presencia de proteínas en el medio será mayor con los problemas que ello acarrea (señal de absorbancia menor que con volúmenes más pequeños de DAO), sin embargo, estamos priorizando cinéticas de reacción más rápidas.

De esta forma, para un tiempo de 2500 segundos la señal de absorbancia obtenida ya es estable, salvando la ligera tendencia de la señal a seguir aumentando que se asocia a la deriva natural de la línea base y que se corrige con el blanco.

4.3.3 HRP

Por último, se estudió la concentración óptima de HRP y cómo afecta a la cinética de la reacción HRP-AR-DAO-PUT. Para ello se evaluaron diferentes concentraciones de HRP de 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 u/mL. Las condiciones de medida fueron: $[AR] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[HRP] = 0,2541; 0,5042; 0,7623 \text{ y } 1,0164 \text{ u/mL}$; volumen DAO 300 μL , $[PUT] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$. Los volúmenes en cubeta fueron: 300 μL DAO, 20 μL HRP, 20 μL AR, 20 μL PUT y 1640 μL disolución tampon $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M pH = 8. Los resultados se muestran en la siguiente figura:

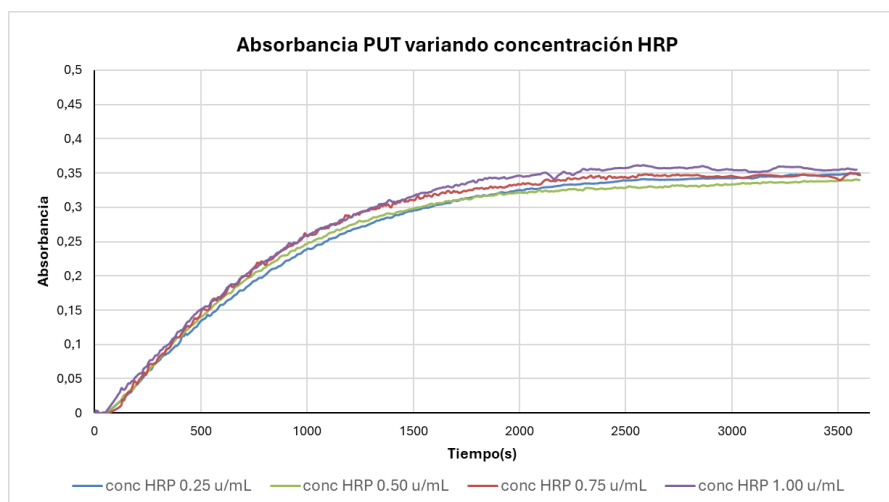


Figura 18. Optimización de la concentración de HRP en la reacción HRP-AR-DAO-PUT.

En la Figura 18, se observa que, al igual que ocurría cuando se trabajaba con cadaverina, la concentración de HRP no afecta apenas a la variación de absorbancia obtenida, es por esto por lo que se continúa utilizando la concentración de HRP de 0,5042 u/mL, puesto que es de las concentraciones más bajas y con ella ya tenemos una señal adecuada.

4.3.4 Características analíticas

Utilizando las condiciones óptimas de trabajo determinadas en los estudios previos, se realizó una recta de calibrado de putrescina con concentraciones entre $9,90 \times 10^{-7} \text{ M}$ y $4,97 \times 10^{-5} \text{ M}$. Al igual que en el caso de la cadaverina, a las medidas de variación de absorbancia obtenidas se les realizó la corrección respecto del cero, con el fin de corregir la deriva que presentan las medidas a causa del equipo. En la tabla de la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos.

La representación de las diferencias de absorbancias frente a la concentración de putrescina medidas a 572nm fueron tomadas al mismo tiempo (2500 segundos). En la Figura 19 se muestra la recta de calibrado y la ecuación de dicha recta. Se obtuvo un rango lineal de concentración de putrescina de $5,14 \times 10^{-7} - 1,49 \times 10^{-5} \text{ M}$, la DSR = 5,41 %, el límite de detección LD = $7,87 \times 10^{-8} \text{ M}$ y el límite de cuantificación LC = $2,62 \times 10^{-7} \text{ M}$. La sensibilidad de la recta es 33585, y la $R^2 = 0,9974$.

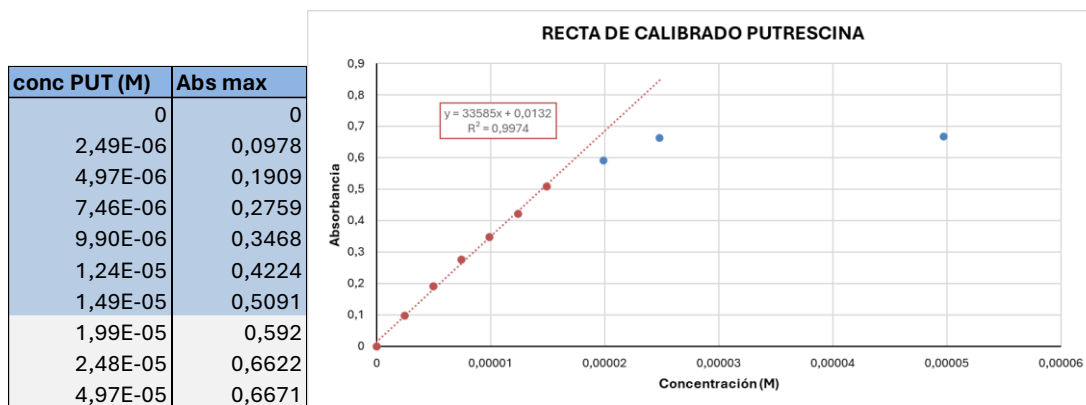


Figura 19. Recta de calibrado para la putrescina en sus condiciones óptimas: disolución amortiguadora pH = 8, [AR] = 1×10^{-5} M, [HRP] = 0,5042 u/mL y 400 μ L de DAO.

Para terminar, se hizo el estudio de la repetibilidad de las medidas a altas y bajas concentraciones de putrescina, seleccionando las disoluciones de concentración $2,49 \times 10^{-6}$ M (ds 2) y $1,24 \times 10^{-5}$ M (ds 3). Para ello se prepararon 3 disoluciones de cada concentración y se realizaron 3 medidas de cada una de esas disoluciones, se calculó la media y la DSR (%).

Tabla 5. Repetibilidad de las medidas a altas y bajas concentraciones de putrescina.

BAJAS CONC				ALTAS CONC			
2.1.1	0,129775			3.1.1	0,54095		
2.1.2	0,1155	media	0,1229833	3.1.2	0,5350583	media	0,5232556
2.1.3	0,123675	DSR%	5,8240338	3.1.3	0,4937583	DSR%	4,9143552
2.2.1	0,095075			3.2.1	0,5598917		
2.2.2	0,10995	media	0,1048167	3.2.2	0,5144583	media	0,5272139
2.2.3	0,109425	DSR%	8,05274	3.2.3	0,5072917	DSR%	5,4106589
2.3.1	0,078225			3.3.1	0,5534917		
2.3.2	0,0873917	media	0,0833139	3.3.2	0,5304583	media	0,5309472
2.3.3	0,084325	DSR%	5,600783	3.3.3	0,5088917	DSR%	4,2007977

Con estos resultados, se puede deducir que las condiciones óptimas para la reacción HRP-AR-DAO-PUT son: disolución amortiguadora pH = 8, [AR] = 1×10^{-5} M, [HRP] = 0,5042 u/mL y 400 μ L de DAO, fijando el tiempo de medida en 2500 segundos.

4.4 MEZCLAS

4.4.1 Pruebas iniciales

El objetivo de este apartado del estudio es encontrar unas condiciones de trabajo en las que se pueda determinar cadaverina en presencia de putrescina, sin que esta suponga una interferencia.

Para ello se comenzó comparando las señales de variación de absorbancia obtenidas en los estudios previos con las dos aminas a los diferentes pHs estudiados (pH=6-8) de la disolución amortiguadora ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M). Los resultados mostrados en las Figuras 12 y 16 se vuelven a mostrar conjuntamente en la Figura 20. Así pues, se deduce que es posible llevar a cabo la determinación de cadaverina en presencia de putrescina, para ello, se escoge el pH 6 de la disolución amortiguadora y se fijó el tiempo de medida en 500 segundos.

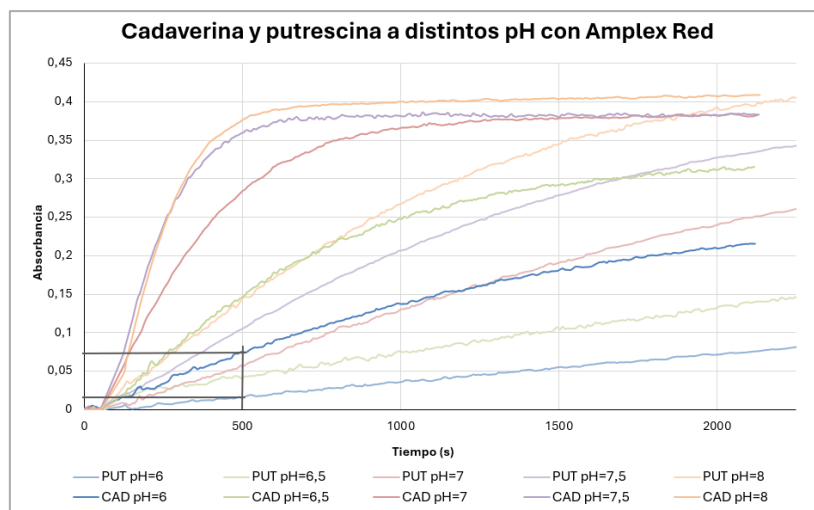


Figura 20. Comparación de las señales recogidas en las figuras 12 y 16.

En estas condiciones, como puede verse en la Figura 20, la cadaverina tiene una señal de absorbancia en torno a 0,75 u.a. para una concentración de $1 \cdot 10^{-5}$ M, y la putrescina, con la misma concentración, muestra una señal de 0,015 u.a. Puesto que la señal de la cadaverina es 50 veces mayor que la de la putrescina y la señal de la putrescina es muy baja, estas se consideran las mejores condiciones para poder determinar cadaverina en presencia de putrescina.

Una vez seleccionadas estas condiciones de trabajo, se procede a hacer las primeras pruebas para comprobar si se cumple lo que esperamos. En todas las pruebas que se realizaron se utilizaron las siguientes condiciones de trabajo: tiempo de medida 500 segundos, disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M de pH 6, 300 μL de DAO, 0,50 u/mL para HRP y $1 \cdot 10^{-5}$ M para Amplex Red (medida de absorbancia a 572nm).

Se quiere estudiar la reacción enzimática HRP-AR-DAO-PUT-CAD, para ellos se trabajó con diferentes disoluciones de analito (PUT/CAD): una disolución “blanco” (sin cadaverina y sin putrescina), una disolución a la que se le añade solo cadaverina de concentración $4,97 \cdot 10^{-5}$ M, otra disolución a la que se le añade solo putrescina de concentración $4,97 \cdot 10^{-5}$ M y una disolución “mezcla” en la que se añade cadaverina y putrescina en la misma proporción (1:1). De todas estas disoluciones se añaden en la cubeta de medida 20 μL . Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21.

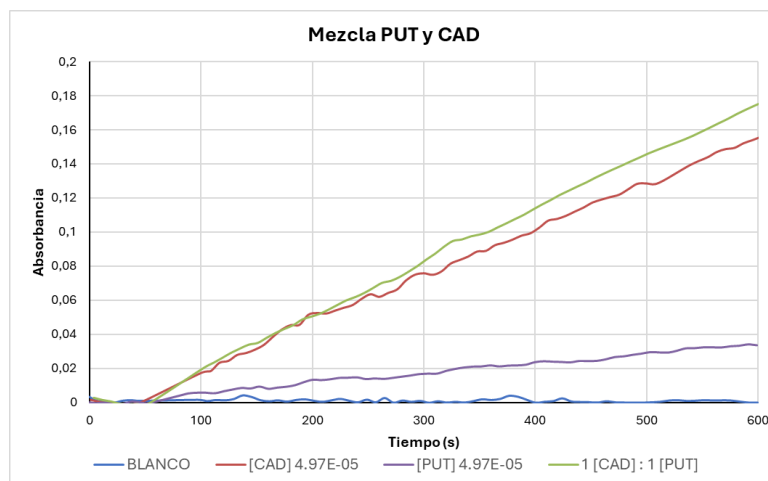


Figura 21. Cinéticas de la reacción HRP-AR-DAO-PUT y/o CAD. $[CAD]=[PUT]= 4,97 \times 10^{-5} M$.

En la Figura 21, se observa que la señal de variación de absorbancia que obtenemos cuando utilizamos como analito la cadaverina es muy similar a la que obtenemos cuando utilizamos como analito la mezcla de putrescina y cadaverina, siendo esta última ligeramente superior ya que, como era de esperar, a la señal de cadaverina se suma la de la putrescina. Para ver si este resultado es coherente se procedió a sumar las señales de absorbancia obtenidas solo con cadaverina y solo con putrescina y al resultado final se le resto la señal de la disolución “blanco”. Como puede verse en los cálculos que se muestran a continuación:

BL	0,0003571		
CAD	0,1279571		
PUT	0,0296	PUT+CAD	0,1575571
MEZCLA	0,1459714	PUT+CAD-BL	0,1572

señales a 500 segundos).

El resultado de absorbancia obtenido es aproximadamente la señal que nos da la mezcla de putrescina y cadaverina (cálculo realizado con las

A continuación, se hizo una prueba con una concentración menor de cadaverina y putrescina, $1 \times 10^{-5} M$, para ver si se mantiene la misma tendencia que en la prueba anterior y saber si se podría trabajar con concentraciones más bajas de las dos aminas biógenas. Siguiendo el mismo esquema anterior y preparando una mezcla 1:1 de cadaverina y putrescina de concentración $1 \times 10^{-5} M$, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22.

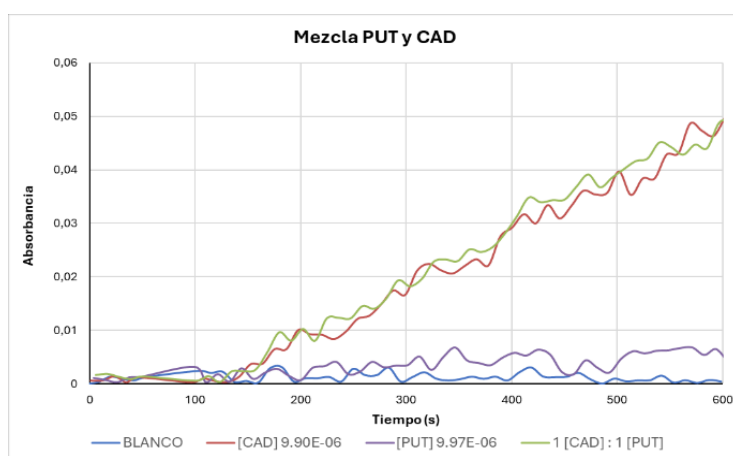


Figura 22. Cinéticas de la reacción HRP-AR-DAO-PUT y/o CAD. $[CAD]=[PUT]= 1 \times 10^{-5} M$.

De nuevo, en la Figura 22, se observa la misma tendencia que en la Figura 21, cuando se trabaja con cadaverina se obtiene aproximadamente la misma señal de absorbancia que cuando se

BL	0,00091667		
CAD	0,035728		
PUT	0,0047	PUT+CAD	0,040428
PUT+CAD	0,039728	PUT+CAD-BL	0,03859467

trabaja con la mezcla de cadaverina y putrescina. De nuevo se vuelve a hacer la comprobación numérica sumando las absorbancias obtenidas con putrescina y cadaverina a un tiempo de reacción de 500 segundos y

tras restar la señal de la disolución “blanco” se comprueba que el valor obtenido es aproximadamente la señal de absorbancia obtenida con la mezcla de putrescina y cadaverina (1:1).

Por último, se hizo una última prueba utilizando otra concentración todavía más baja de putrescina y cadaverina, 5×10^{-6} M. El resultado mostrado en la Figura 23 deja ver que se observa la misma tendencia que en los casos anteriores cuando se trabajaba con concentraciones de aminas mayores. De modo que esto demuestra que podremos hacer una determinación correcta

BL	0,0008		
CAD	0,02302		
PUT	0,00514	PUT+CAD	0,02816
PUT+CAD	0,02638	PUT+CAD-BL	0,02736

de cadaverina en presencia de putrescina incluso cuando estas aminas estuvieran en muy baja concentración en la muestra objeto de estudio.

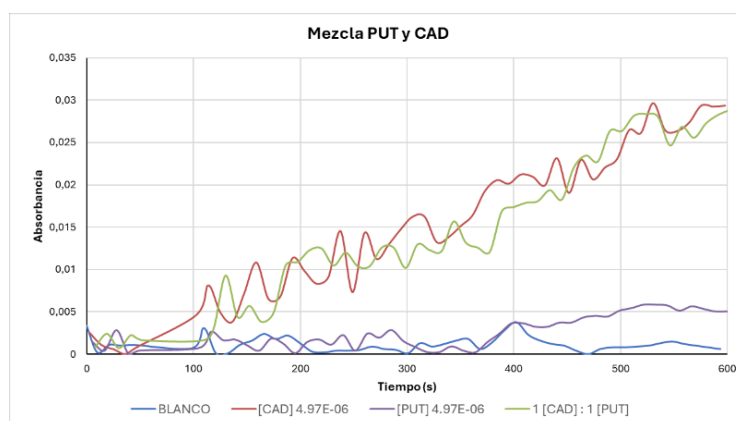


Figura 23. Cinéticas de la reacción HRP-AR-DAO-PUT y/o CAD. $[CAD]=[PUT]=5 \times 10^{-6}$ M.

4.4.2 Estudio cadaverina

Una vez vistos los resultados de las pruebas anteriores, se procede a estudiar la recta de calibrado para cadaverina en las condiciones óptimas para poder determinar cadaverina en presencia de putrescina. Se quiere determinar el rango lineal en el que se podrá realizar esta determinación obteniendo unos buenos resultados.

Las condiciones de medida utilizadas fueron: disolución amortiguadora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,1 M de pH 6, 300 μ L de DAO, 0,50 u/mL de HRP, 1×10^{-5} M de Amplex Red y las disoluciones de diferentes concentraciones de cadaverina. Los volúmenes en cubeta son: 300 μ L DAO, 20 μ L HRP, 20 μ L AR, 20 μ L diferentes disoluciones de CAD y 1640 μ L disolución tampon.

Se prepararon disoluciones de cadaverina de concentraciones entre $5,14 \times 10^{-7}$ y $2,57 \times 10^{-4}$ M, se midió la absorbancia durante 600 segundos y se tomó 500 segundos como tiempo de medida para determinar la absorbancia máxima.

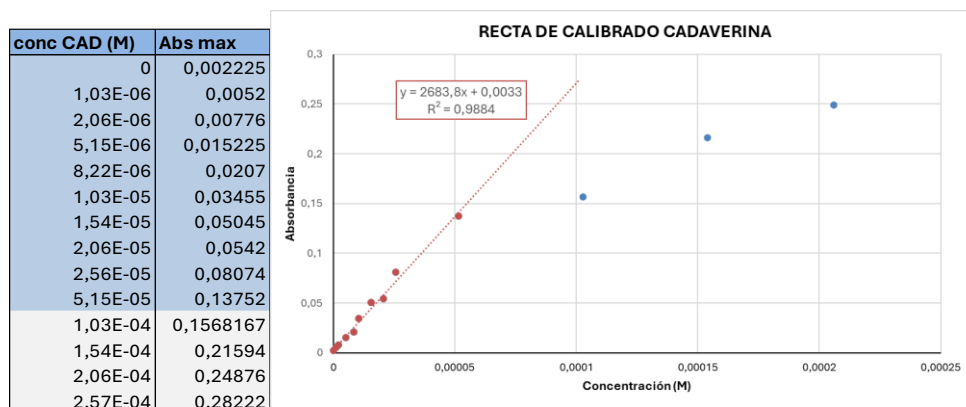


Figura 24. Recta de calibrado para la cadaverina en sus condiciones óptimas: disolución amortiguadora pH = 6, [Amplex Red] = 1×10^{-5} M, [HRP] = 0,5042 u/mL y 300 μ L de DAO.

Se obtuvo la recta de calibrado (Figura 24) con una pendiente de 2683,8 por tanto, la sensibilidad es mucho menor que la que obtenemos en las condiciones óptimas para la determinación de cadaverina (Figura 15). Estamos sacrificando esas condiciones óptimas para poder tener un método en el que determinar la cadaverina cuando hay putrescina en el medio.

Se calculó una DSR = 5,54%, un límite de detección LD = $1,25 \times 10^{-7}$ M y un límite de cuantificación LC = $4,17 \times 10^{-7}$ M. En este caso, el rango lineal será entre $1,03 \times 10^{-6}$ M y $5,14 \times 10^{-5}$ M, se elimina el punto de concentración $5,14 \times 10^{-7}$ M puesto que se encuentra muy cercano al límite de cuantificación.

También se hizo el estudio de la repetibilidad de las medidas a altas y bajas concentraciones de cadaverina, para ello se seleccionaron las disoluciones de concentración $2,06 \times 10^{-6}$ M (ds 2) y $5,15 \times 10^{-5}$ M (ds 3). Se prepararon 3 disoluciones de cada concentración y se realizaron 3 medidas de cada una de esas disoluciones, para las cuales se calculó la media y la DSR (%). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 6. Resultados del estudio de la repetibilidad del método optimizado para la cadaverina.

BAJAS CONC				ALTAS CONC			
2.1.1	0,0203	media	0,0198444	3.1.1	0,134025	media	0,1352083
2.1.2	0,022			3.1.2	0,1332		
2.1.3	0,017233333			3.1.3	0,1384		
2.2.1	0,014575	DSR%	12,173513	3.2.1	0,1008667	DSR%	2,0669399
2.2.2	0,0152			3.2.2	0,1096667		
2.2.3	0,017			3.2.3	0,1208333		
2.3.1	0,017066667	media	0,0155917	3.3.1	0,12715	media	0,1104556
2.3.2	0,018366667			3.3.2	0,1129		
2.3.3	0,0159			3.3.3	0,0968		
		DSR%	8,0751506			DSR%	9,0594655
			7,2113014				13,523284

4.4.3 Comparación señales cadaverina y putrescina

Para ver cómo se comporta la putrescina en las condiciones de trabajo óptimas para determinar cadaverina en presencia de putrescina, se hacen medidas de absorbancia a cuatro concentraciones diferentes de putrescina.

Los valores de absorbancia obtenidos se comparan con los de la cadaverina a las mismas concentraciones. Se representan en un gráfico para ver la diferencia en la señal y obtener las ecuaciones de las rectas y conocer las pendientes.

CAD	Abs
0	0,002225
5,15E-06	0,015225
1,03E-05	0,03255
2,56E-05	0,08074
5,15E-05	0,13752

PUT	Abs
0	0,00155
4,95E-06	0,00365
9,90E-06	0,009325
2,57E-05	0,01595
4,95E-05	0,028125

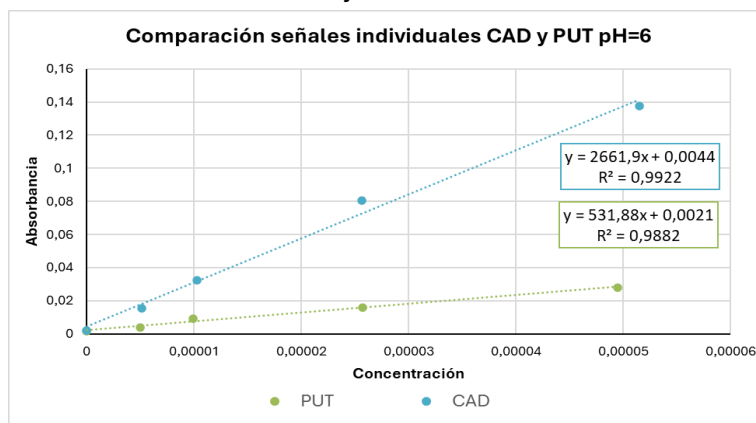


Figura 25. Representación de las señales de putrescina y cadaverina individuales para conocer sus ecuaciones de la recta y sus pendientes.

Conociendo las dos pendientes individuales, se puede realizar ahora la medida de las mezclas, añadiendo a todas ellas la concentración máxima de putrescina del rango lineal en sus condiciones óptimas. Así veremos cómo se comporta la cadaverina cuando hay putrescina a una concentración fija.

4.4.4 Estudio mezclas

Para estudiar las mezclas, se prepararon disoluciones de concentración de cadaverina entre $5,15 \cdot 10^{-6}$ M y $5,14 \cdot 10^{-5}$ M, a las cuales se les añadió putrescina de concentración fija $1,50 \cdot 10^{-5}$ M. Se preparó también una disolución blanco la cual no contenía cadaverina, pero sí putrescina.

Las condiciones de medida fueron las que se han fijado para las mezclas: disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M de pH = 6, 300 μL de DAO, 0,50 u/mL de HRP, $1 \cdot 10^{-5}$ M de Amplex Red. Los volúmenes en cubeta fueron: 300 μL DAO, 20 μL HRP, 20 μL AR, 20 μL disoluciones muestra de cadaverina con putrescina y 1640 μL disolución tampon $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M pH = 6. Las señales de absorbancia máxima tomadas a 500 segundos para las disoluciones de diferente concentración de cadaverina y de concentración fija de putrescina $1,50 \cdot 10^{-5}$ M se muestran en la Figura 26.

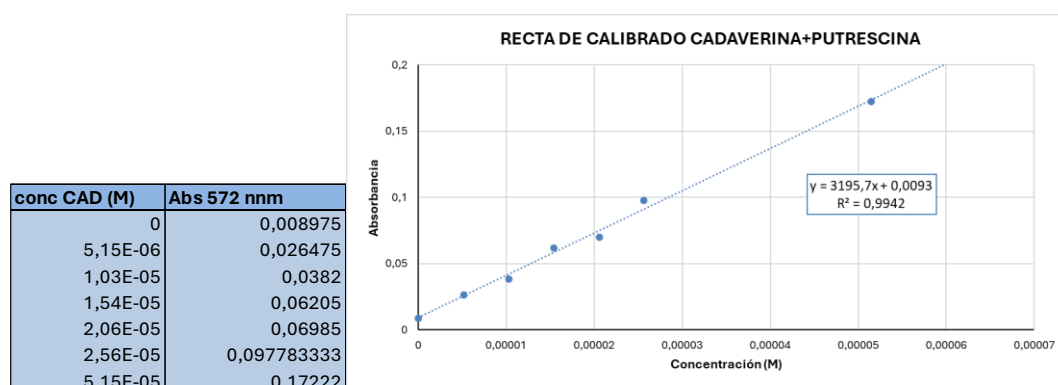


Figura 26. Recta de calibrado para las mezclas en sus condiciones óptimas: disolución amortiguadora pH = 6, [Amplex Red] = $1 \cdot 10^{-5}$ M, [HRP] = 0,5042 u/mL y 300 μL de DAO.

Como se observa en la Figura 26, todas las concentraciones de las mezclas utilizadas entran en el rango lineal, que lo definimos entre $5,15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ – $5,15 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Como cabría esperar, la pendiente de la recta de calibrado de la mezcla PUT:CAD (3195,7) es aproximadamente igual a la suma de las pendientes de las rectas de calibrado de las dos aminos por separado, putrescina y cadaverina (Figura 25: 2661,9 CAD; 531,88 PUT; suma de ambas 3193,78). Al comparar las pendientes, se puede ver que es posible conocer la concentración de cadaverina que habrá en una muestra de concentración desconocida, incluso si la muestra contiene putrescina.

5. CONCLUSIONES

En esta memoria se ha llevado a cabo la caracterización analítica de la DAO procedente de plantulitas de soja (proporcionada por la EEAD-CSIC) para estudiar su actividad y selectividad en la determinación de cadaverina y putrescina. Las conclusiones que se extraen son las siguientes:

1. Se estudió la reacción enzimática HRP-H₂O₂-ABTS encontrando que las condiciones óptimas de trabajo eran: $[ABTS] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[HRP] = 0,5 \text{ U/mL}$ y $pH = 6$. Estas condiciones se tomaron como punto de partida.
2. Se estudió la reacción HRP-ABTS-DAO-(CAD/PUT) evaluando como afectaba a su cinética el tratamiento previo de los extractos de DAO utilizados: (i) extracto de DAO sin tratamiento, (ii) extracto de DAO sometido a centrifugación, (iii) extracto de DAO descongelado la semana anterior conservado en la nevera sin tratamiento y (iv) extracto de DAO descongelado la semana anterior conservado en la nevera y centrifugado. Se concluyó que:
 - Los resultados eran mejores al trabajar con el extracto de DAO descongelado y centrifugado el mismo día, observándose una clara disminución de la actividad de la enzima que había sido descongelada la semana anterior, la cual daba lugar a cinéticas de reacción más lentas y señales de variación de absorbancia menos estable en el tiempo.
 - Cuando se trabajaba con el extracto de DAO no centrifugado se obtenía un máximo de variación de absorbancia que no se estabilizaba y tendía a caer a lo largo del tiempo. Este comportamiento lo asociamos a la presencia de proteínas en el extracto de DAO sin centrifugar y que eran responsables de la estabilización de la forma sobreoxidada del ABTS (ABTS_{ox2}) que no es estable en el tiempo.
 - En todos los casos, las señales de variación de absorbancia obtenidas con putrescina eran mucho menores que las obtenidas con cadaverina. De lo cual se deduce que la DAO con la que estamos trabajando muestra una clara selectividad hacia la determinación de la cadaverina.
3. Se estudió como afectaba el pH de la disolución amortiguadora (H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0,1M) a la cinética de la reacción HRP-ABTS-DAO-(CAD/PUT). Para ello se utilizaron disoluciones tampon de pH 6, 6.5, 7, 7.5 y 8 y se pudo concluir que cuando se trabajaba con cadaverina la mejor cinética de reacción se obtenía con tampon a pH 7. Sin embargo, cuando se trabaja con putrescina no había ningún pH que se pudiera considerar óptimo, ya que en todos los casos se observaban cinéticas de reacción muy lentas, con señales de

absorbancia pequeñas y poco estables. Lo cual confirmaba la selectividad de nuestro extracto de DAO hacía la determinación de cadaverina.

4. Se estudió la reacción HRP-AR-DAO-(CAD/PUT) donde se sustituye el ABTS por el Amplex Red (AR). Al utilizar este colorante en lugar del ABTS evitamos el inconveniente que nos estaba ocasionando la presencia de proteínas en el extracto de DAO que, en ocasiones, estaban dando lugar a la aparición de la forma sobreoxidada y no estable del ABTS (ABTS_{ox2}), incluso en extractos de DAO previamente centrifugados. Se optimizó la concentración de Amplex Red, encontrando que la mejor cinética de reacción se obtenía con concentraciones de AR de $1 \cdot 10^{-5}$ M.
5. Se estudió la reacción HRP-AR-DAO-CAD, optimizando las variables que podían influir en su cinética como eran el PH de la disolución amortiguadora, el volumen de DAO y la concentración de HRP. Se concluyó que las mejores condiciones de trabajo eran: *disolución amortiguadora pH = 8, [AR] = $1 \cdot 10^{-5}$ M, [HRP] = 0,5042 u/mL y 300 μL de DAO.* Se realizó una calibración para cadaverina obteniendo un rango lineal entre $5,14 \cdot 10^{-7}$ y $8,22 \cdot 10^{-6}$ M, DSR = 6,96 %, LD = $2,35 \cdot 10^{-8}$ M y LC = $7,85 \cdot 10^{-8}$ M.
6. Del mismo modo se estudió la reacción HRP-AR-DAO-PUT. Se encontró que las mejores condiciones de trabajo eran: *disolución amortiguadora pH = 8, [AR] = $1 \cdot 10^{-5}$ M, [HRP] = 0,5042 u/mL y 400 μL de DAO.* También se realizó una calibración para la cuantificación de putrescina, obteniéndose un rango lineal entre $5,14 \cdot 10^{-7}$ – $1,49 \cdot 10^{-5}$ M, DSR = 5,41 %, LD = $7,87 \cdot 10^{-8}$ M y LC = $2,62 \cdot 10^{-7}$ M.
7. Se estudió la determinación conjunta de putrescina y cadaverina: HRP-AR-DAO-PUT y/o CAD donde [CAD]=[PUT] y se determinaron las condiciones de trabajo que permitían la determinación selectiva de cadaverina en presencia de putrescina: pH 6, [AR] = $1 \cdot 10^{-5}$ M, [HRP] = 0,5 u/mL y 300 μL de DAO. Se vio que para concentraciones muy bajas de ambas enzimas ($5 \cdot 10^{-6}$ M) era posible hacer una determinación de cadaverina en presencia de putrescina. Partiendo de estas condiciones se realizó una calibración para cadaverina obteniendo un rango lineal entre $1,03 \cdot 10^{-6}$ M y $5,14 \cdot 10^{-5}$ M, DSR = 5,54%, LD = $1,25 \cdot 10^{-7}$ M y LC = $4,17 \cdot 10^{-7}$ M.
8. Finalmente, se estudió la reacción *HRP-AR-DAO-(PUT+CAD)* en la que se determinaba cadaverina en presencia de una cantidad fija de putrescina. Se vio que la determinación era posible, de modo que la presencia de putrescina no interfería en la correcta determinación de cadaverina. Se realizó una calibración para cadaverina (concentración fija de putrescina $1,50 \cdot 10^{-5}$ M) obteniendo un rango lineal entre $5,15 \cdot 10^{-6}$ M – $5,15 \cdot 10^{-5}$ M.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Koolman, J.; Röhm, K.-H. *Bioquímica: Texto y Atlas*, 3a ed., rev. y ampl.; Editorial Médica Panamericana, 2004.
- (2) Florez Duque, A. V.; Moreno Arango, M. A.; Franco Tobón, Y. N. Aminas Biógenas Encontradas En Carnes, Pescado y Productos Cárnicos: Formación y Efectos En La Salud. *Hech Microb.* **2023**, 14 (1), 26–44. <https://doi.org/10.17533/udea.hm.v14n1a04>.
- (3) Cebrián Aznárez, P. A.; Sanz Vicente, M. I. *Desarrollo de tiras reactivas colorimétricas para la determinación de aminas biógenas*; Universidad de Zaragoza: Zaragoza, 2018.
- (4) Lozano Lalaguna, R.; Sanz Vicente, M. I. *Desarrollo de un método analítico enzimático para la determinación de aminas biogénicas*; Universidad de Zaragoza: Zaragoza, 2017.
- (5) Ruiz-Capillas, C.; Herrero, A. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods* **2019**, 8 (2), 62. <https://doi.org/10.3390/foods8020062>.
- (6) Sánchez-Pérez, S.; Comas-Basté, O.; Costa-Catala, J.; Iduriaga-Platero, I.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C.; Latorre-Moratalla, M. L. The Rate of Histamine Degradation by Diamine Oxidase Is Compromised by Other Biogenic Amines. *Front. Nutr.* **2022**, 9, 897028. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.897028>.
- (7) Bóka, B.; Adányi, N.; Virág, D.; Sebela, M.; Kiss, A. Spoilage Detection with Biogenic Amine Biosensors, Comparison of Different Enzyme Electrodes. *Electroanalysis* **2012**, 24 (1), 181–186. <https://doi.org/10.1002/elan.201100419>.
- (8) Medda, R.; Padiglia, A.; Floris, G. Plant Copper-Amine Oxidases. *Phytochemistry* **1995**, 39 (1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00756-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00756-J).
- (9) Navarro Domínguez, J. M.; Galbán Bernal, J.; De Marcos Ruiz, S. 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, Universidad de Zaragoza, Prensas de la Universidad, Zaragoza, 2022.