

# DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS

---

## DEVELOPMENT OF AN ENZYMATIC METHOD OF ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES

[Rebeca Lozano Lalaguna](#)



Directora: Isabel Sanz Vicente  
Departamento de Química Analítica  
Grupo de Biosensores Analíticos (GBA)

Curso 2016/2017



## **RESUMEN**

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método óptico enzimático para determinar aminas biogénicas que posteriormente se pueda implementar en sensores o tiras reactivas. Se basa en la reacción de éstas con la enzima diaminoxidasa (DAO) generando  $H_2O_2$  que a su vez reacciona con la enzima peroxidasa (HRP) produciendo cambios en las propiedades ópticas de la HRP, que permiten la determinación de las aminas.

El método desarrollado es útil para determinar cadaverina, putrescina y histamina, si bien esta última en un orden de magnitud superior. En cuanto a las otras aminas, tiramina y triptamina regeneran a HRP impidiendo la posibilidad de su determinación y la reacción de DAO con feniletilamina es demasiado lenta para poder determinarla.

Por otro lado, si la reacción de HRP con  $H_2O_2$  se realiza en presencia de un colorante (ABTS) este cambia sus propiedades de absorción dando un producto coloreado azul que permite determinar las aminas. Se han optimizado las condiciones encontrando que la relación óptima de ABTS:HRP para obtener una señal estable es 40:1 y de ABTS: $H_2O_2$  es de 20:1, con una concentración de HRP  $1.10^{-6}$  M y de DAO de 1,8 U/mL en cubeta.

Si bien la histamina regenera las señales obtenidas y supone una interferencia se puede determinar cadaverina y putrescina en presencia de tiramina, triptamina, histamina y feniletilamina siempre que todas estas aminas se encuentren en la misma concentración que cadaverina y putrescina o inferior, en las condiciones establecidas.

Finalmente se ha llevado a cabo la determinación de cadaverina y putrescina en una muestra real en que estén presentes el resto de aminas con un error del 8.6%.

## **ABSTRACT**

The main objective of this work is the development of an optical enzymatic method for the determination of biogenic amines that will be later implemented in sensors or strip tests. It is based on the reaction of these amines with the enzyme diaminoxidase (DAO) which produces  $H_2O_2$  and these reacts with the enzyme peroxidase (HRP) that produces changes in the optical properties of HRP that allows the determination of the biogenic amines.

The method developed is useful for determining cadaverine, putrescine and histamine, but when histamine is an order of magnitude higher. As for the other amines, tyramine and tryptamine regenerate at HRP preventing the possibility of its determination and the reaction of DAO with phenylethylamine is too slow to be able to determine it.

On the other hand, if the reaction of HRP with  $H_2O_2$  is performed in the presence of a dye (ABTS), this changes its absorption properties giving a blue coloured product that allows to determine the amines. The conditions have been optimized by finding that the optimal ratio of ABTS: HRP to obtain a stable signal is 40: 1 and ABTS:  $H_2O_2$  is 20:1, with a HRP concentration of  $1.10^{-6}M$  and DAO of 1.8 U / mL in tray.

Although histamine regenerates the signals obtained and supposes an interference, cadaverine and putrescine can be determined in the presence of tyramine, tryptamine, histamine and phenylethylamine provided that all these amines are in the same concentration as cadaverine and putrescine or lower.

Finally, the determination of cadaverine and putrescine was carried out in a real sample in which the remaining amines were present with an error of 8.6%.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ¿Qué son las aminas biogénicas?.....	1
1.2 Importancia de la determinación de aminas biogénicas en alimentos.....	2
1.2.1 Importancia toxicológica.....	2
1.2.2 Indicativo de calidad.....	2
1.3 Legislación.....	3
1.4 Métodos de determinación.....	3
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.....	4
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	5
3.1 Reactivos y disoluciones.....	5
3.1.1 Reactivos y disoluciones generales.....	5
3.1.2 Enzimas.....	5
3.1.3 Aminas.....	5
3.2 Instrumentación y material.....	6
3.2.1 Instrumentos.....	6
3.2.2 Material y aparatos.....	6
3.3 Procedimiento operativo.....	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4.1 Estudio reacción HRP-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	7
4.2 Influencia de la enzima diaminoxidasa (DAO) sobre la reacción HRP- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8
4.3 Estudio de las distintas aminas biogénicas con DAO y HRP.....	9
4.3.1 Estudio con Putrescina.....	9
4.3.2 Estudio con Cadaverina.....	10
4.3.3 Estudio con Histamina.....	10
4.3.4 Estudio con Feniletilamina, Tiramina, Triptamina.....	11
4.4 Influencia de la presencia de aminas en la reacción HRP- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	11
4.5 Estudio de la reacción HRP-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con el colorante ABTS.....	12
4.5.1 Optimización de la concentración de colorante (ABTS).....	13
4.5.2 Estudio de la deriva de señal obtenida.....	14
4.5.3 Optimización de la concentración de enzima peroxidasa (HRP).....	15
4.5.4 Optimización de la concentración de diaminoxidasa (DAO).....	15
4.6 Estudio de la reacción aminas-DAO-HRP con el colorante ABTS.....	16
4.6.1 Ensayos con putrescina y cadaverina.....	16
4.6.2 Ensayos con histamina, feniletilamina, tiramina y triptamina.....	17
4.6.2.1 Señales con histamina.....	17
4.6.2.2 Señales con feniletilamina, tiramina y triptamina.....	19
4.7 Calibración de las distintas aminas con HRP-DAO-ABTS.....	20
4.7.1 Recta de Calibrado Putrescina.....	20
4.7.2 Recta de Calibrado Cadaverina .....	20

5. PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	20
6. INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS AMINAS EN EL MÉTODO ANALÍTICO ENZIMÁTICO DESARROLLADO.....	21
7. PRIMEROS ENSAYOS ED APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DESARROLLADO A UNA MUESTRA REAL.....	23
8. CONCLUSIONES.....	24
9. BIBLIOGRAFÍA.....	25

## 1. INTRODUCCIÓN

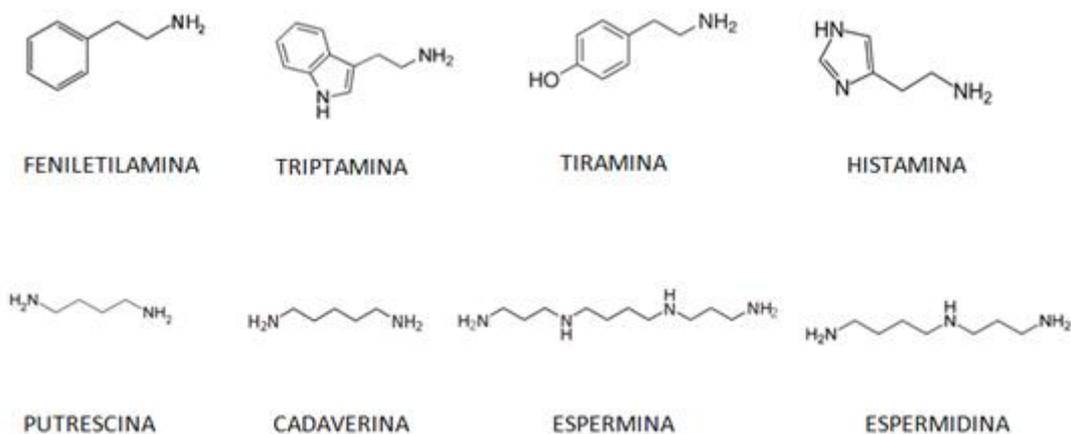
### 1.1 ¿Qué son las aminas biogénicas?

Las aminas biogénicas (AB) son compuestos de bajo peso molecular que poseen en su estructura al menos un grupo amino.

Desde un punto de vista biológico tienen una actividad fisiológica importante para los seres vivos por lo que se encuentran de forma natural en ellos y también en los alimentos. Sin embargo, su concentración puede aumentar hasta niveles que pueden ser tóxicos ya que también se forman por la descarboxilación de sus aminoácidos de origen debido a la acción de microorganismos.

Los factores que influyen en la formación de AB en los alimentos incluyen la disponibilidad de aminoácidos libres, la presencia de microorganismos que puedan descarboxilarlos y las condiciones favorables de dichos microorganismos para el crecimiento y la producción de sus enzimas. En este caso influirán tanto las condiciones de conservación (pH, temperatura...) como las de procesado<sup>1</sup>.

Las más abundantes en alimentos son la histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermina y espermidina. Se muestran en la figura 1.



**Figura 1:** Estructura de las diferentes aminas biogénicas.

Las aminas biogénicas se diferencian entre ellas según su estructura química o en función del número de grupos amino que poseen<sup>2</sup>. Atendiendo al primer criterio pueden ser alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina y triptamina). Teniendo en cuenta el número de grupos amino en la cadena alifática se pueden clasificar en monoaminas (histamina, feniletilamina y tiramina), diaminas (putrescina y cadaverina) o poliaminas (espermidina y espermina).

## 1.2 Importancia de la determinación de aminas biogénicas en alimentos

En los últimos años se ha incrementado el interés en la determinación de las aminas biogénicas presentes en alimentos a causa de dos motivos principales. Por un lado debido a su posible efecto toxicológico en la salud humana y por otro, porque pueden ser empleados como un indicador de calidad y frescura de alimentos o materias primas.

### 1.2.1 Importancia toxicológica

La intoxicación por tiramina se conoce como la reacción al queso (aunque está presente en otros alimentos)<sup>3</sup>. La importancia de la tiramina en los alimentos se debe principalmente a sus implicaciones toxicológicas ya que, aparte de ser ligeramente tóxica por sí misma, reacciona con fármacos inhibidores de la monoamino oxidasa (MAOI) que dan lugar a crisis hipertensivas.

La intoxicación por histamina es la más frecuente y se le conoce como “intoxicación por escómbridos” por estar relacionada con el consumo de pescados de esta familia (bonitos, atunes,...), aunque existen casos aislados de intoxicación por histamina debidos al consumo de otros alimentos.

Cadaverina y putrescina también presentan toxicidad si se ingieren en altas dosis potenciando además la toxicidad de las anteriores. Por otro lado, pueden reaccionar con nitritos dando nitrosamidas<sup>4</sup>, un potencial cancerígeno.

El organismo dispone de mecanismos de desintoxicación por acción de las enzimas amino oxidasas (monoamina oxidasa MAO, diamina oxidasa DAO y poliaminaoxidasa PAO) si bien a veces estos procesos pueden ser deficitarios debido a distintas circunstancias como enfermedades, problemas genéticos o presencia de inhibidores como alcohol o fármacos antidepresivos.

### 1.2.2 Indicativo de calidad

Puesto que el contenido en algunas aminas biogénicas (AB) aumenta en alimentos al mismo tiempo que su degradación, su contenido se ha empleado como un indicativo de calidad y frescura de los mismos. La relación entre las cantidades de AB particulares en un producto alimenticio y el grado de descomposición del mismo, ha sido empleado para estimar un parámetro conocido como BAI (Biogenic Amines Index) para productos marinos que se calcula mediante la siguiente ecuación<sup>5</sup>:

$$BAI = \frac{c \text{ Him} + c \text{ Put} + c \text{ Cad}}{1 + c \text{ Spd} + c \text{ Spm}}$$

Donde Him= histamina, Put = putrescina, Cad=cadaverina, Spd = espermidina, Spm = espermina (c = concentración en mg/kg)

Un valor de BAI por debajo de 1 denota un producto de buena calidad, un valor entre 1 y 10 es considerado mediocre, mientras que un valor mayor a 10 denota descomposición.

### 1.3 Legislación

A pesar de la importancia de las aminas biogénicas, no existe legislación específica para todas ellas y es complicado establecer los niveles de toxicidad, dependientes tanto del tipo de alimento como del individuo.

La histamina es la más estudiada y la única para la que existe legislación (Tabla1); principalmente para la cuantificación de dicha amina en muestras de pescado<sup>6</sup>.

TIPO DE MUESTRA	VALOR LÍMITE DE HISTAMINA
Escómbridos	100 mg/kg
Salmueras	200 mg/kg

**Tabla 1:** Valores límite de concentración de histamina permitidos en productos de la pesca.

### 1.4 Métodos de determinación

Los primeros métodos publicados para la determinación de aminas biogénicas eran para la histamina y se basaban en colorimetría o fluorimetría, previa separación y derivatización, por lo que eran largos y tediosos.

Actualmente existen varios métodos analíticos disponibles para la detección, aislamiento y cuantificación de los niveles de aminas biogénicas en productos alimenticios. Estos incluyen métodos cromatográficos, fluorimétricos y sensores.

Los valores de límite de detección de los métodos utilizados para cuantificar éstas son por lo general a nivel de ppm.

El método más aplicado suele ser la cromatografía HPLC de fase reversa<sup>7</sup>. Se necesita una etapa de derivatización antes del proceso de separación para la detección de este tipo de aminas por UV o fluorescencia. El uso de detectores MS / MS acoplados con HPLC permite eliminar la etapa de derivatización pero encarece el precio de los instrumentos. Actualmente existen novedosas tecnologías para la extracción en fase sólida y líquida con el fin de concentrar las aminas y aumentar su sensibilidad desde los ppm a ppb.

El creciente interés de la industria del sector alimentario por realizar un control de calidad más rápido y económico, demanda métodos analíticos que sean compatibles con sus necesidades y que puedan ser usados en línea. En este contexto, el desarrollo de sensores cumple un papel fundamental. Hasta la fecha los biosensores para aminas biogénicas son electroquímicos y se componen de varias combinaciones de diferentes enzimas aminooxidasas en función de la amina a medir. Por ejemplo con la diaminooxidasa (DAO) se han determinado AB totales, monoaminooxidasa (MAO) se ha usado para tiramina, triptamina y feniletilamina, mientras que putrescinaoxidasa (PAO) se ha usado para la determinación de putrescina<sup>8</sup>.

Están basados en reacciones similares a la que se muestra a continuación, para luego reducir electroquímicamente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado obteniendo una señal analítica.

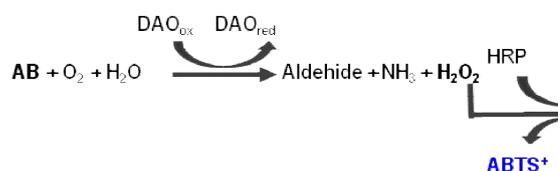


## 2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Como se ha comentado en la introducción, desde el mundo de salud pública y de la industria alimentaria hay un creciente interés en poder disponer de métodos analíticos que permitan, tanto la detección rápida como la monitorización de aminas biogénicas (**AB**).

El grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo este trabajo colabora con el laboratorio de salud pública de la DGA, en el que se ha puesto a punto un método analítico para determinar putrescina, cadaverina, feniletilamina, tiramina, triptamina e histamina en alimentos dirigidos al consumo humano, que ha sido validado por la ANECA. El presente trabajo se va a centrar en esas aminas.

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método óptico enzimático para determinar aminas biogénicas que posteriormente se pueda implementar en sensores o tiras reactivas, y que se basa en el esquema 1. Dichas aminas reaccionan con la diaminooxidasa (DAO) generando  $H_2O_2$  que a su vez reacciona con la enzima peroxidasa (HRP). Durante esta reacción se observan cambios en las propiedades ópticas de la enzima que permiten su seguimiento. Además, si esta reacción se realiza en presencia de un colorante, como 2,2'-azino-bi (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), se obtiene un producto coloreado que también permite la determinación cuantitativa de las AB mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis. Si el color es estable, se podría utilizar para el desarrollo de tiras reactivas para la determinación de presencia o ausencia de estas aminas en muestras de alimentos.



**Esquema 1:** Reacciones de estudio en el desarrollo del método analítico enzimático.

En concreto se propone:

1. Búsqueda previa y consulta de artículos y metodologías ya existentes relacionadas con el tema.
2. Comprobación de los resultados ya existentes en el Grupo de Biosensores Analíticos, grupo de investigación en que se ha realizado el trabajo.
3. Estudio de la reacción enzimática en disolución de peroxidasa (HRP) con peróxido de hidrógeno.
4. Estudio de la reacción de las AB (putrescina, cadaverina...) con la enzima diaminooxidasa (DAO) produciendo  $H_2O_2$  que a su vez reaccionará con la enzima peroxidasa (HRP) produciendo variaciones en sus propiedades de absorción.
5. Estudio de la reacción HRP y peróxido de hidrógeno con el colorante ABTS.
6. Estudio de la reacción de las AB con DAO, HRP y ABTS en el que se optimizarán las condiciones de medida y concentraciones de los diferentes reactivos.

7. Determinación de las características analíticas una vez optimizadas las variables.
8. Una vez caracterizada la reacción, se intentará aplicar a muestras reales suministradas por el Laboratorio de Salud Pública de la DGA.

Todo esto irá acompañado del correspondiente tratamiento de datos estadístico y la correcta presentación de los resultados.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reactivos y disoluciones

##### 3.1.1 Reactivos y disoluciones generales

- Disolución amortiguadora  $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$  0,1M pH=6: se prepara disolviendo 4,84 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Panreac 122018.1211) en 400 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y se ajusta el pH con una disolución de NaOH 2M.
- Disolución comercial de peróxido de hidrógeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% (m/V) (Panreac 131077.1211).

Disoluciones de peróxido de hidrógeno para las rectas de calibrado preparadas por dilución de la disolución comercial en disolución amortiguadora pH=6.

- 2,2'-Azino-bi (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)diammoniumsalt, 98% (ABTS) Para la preparación de una disolución base de ABTS  $4,40 \cdot 10^{-3}$  M se pesan exactamente 2,40 mg en un vial previamente tarado en la balanza analítica y se disuelve en 1 mL de tampon pH=6 añadido con micropipeta.

Disoluciones de ABTS preparadas por dilución de la disolución inicial preparada de concentración  $4,40 \cdot 10^{-3}$  M.

##### 3.1.2 Enzimas

- Peroxidasa (HRP) (EC1.11.1.7)(Peroxidase from Horseradish). Sigma P8125 52 U/mg. Para la preparación de HRP de 594,88 U/mL se pesan 5,72 mg en una balanza analítica de precisión. Este peso se realiza sobre un vial previamente tarado. A continuación se disuelve este contenido en 500 microlitros de disolución amortiguadora pH=6.
- Diamina Oxidasa (DAO).Molirom P021 50 U/mL. La DAO se prepara en viales en los que se introduce 100  $\mu\text{L}$  de DAO (50 U/mL) y se añaden 150  $\mu\text{L}$  de disolución amortiguadora pH=6 (0,1M).

##### 3.1.3 Aminas

- Putrescina(Putrescine dihydrochloride) Sigma P7505 98 % pureza.
- Cadaverina (Cadaverine dihydrochloride) Sigma C8561 98 % pureza.
- Histamina (Histamine dihydrochloride)Sigma 53300 99 % pureza.
- Feniletilamina (2-phenylethylamine hydrochloride) Sigma P6513 98 % pureza.

- Tiramina (Tiramyne hydrochloride) Sigma T287998 % pureza.
- Triptamina (Triptamine hydrochloride) Sigma 246557 99 % pureza.

La preparación de las disoluciones de las distintas aminas se llevó cabo pesando una masa exacta de cada una de ellas en la balanza analítica en un vial previamente tarado. Posteriormente se añadió un volumen de 500 microlitros de disolución amortiguadora con ayuda de una micropipeta. Se prepararon disoluciones de concentración 0,1M.

A partir de las anteriores, se prepararon las diluciones necesarias, para obtener las concentraciones intermedias requeridas para los diferentes estudios.

### 3.2 Instrumentación y material

#### 3.2.1 Instrumentos

- pH-metro CRISON, Basic 20, para la realización de las medidas de pH.
- Balanza analítica de precisión. GR-202-EC (máx. 210g, min. 1mg).
- Espectrofotómetro de absorción molecular de fotodiodos UV-Vis Agilent 8453A, que permite medir entre 190-1100nm.

#### 3.2.2 Material y aparatos

- Vasos de precipitados.
- Agitador Magnético A-01, SBS.
- Micropipetas de volumen variable: Socorex(5-50  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L).
- Material desechable: viales, tubos falcon, pipetas pasteur, puntas de micropipetas.
- Cubetas Hellma de vidrio y cuarzo 1cm de paso óptico

### 3.3 Procedimiento operativo

Se obtuvo la señal de las distintas medidas realizadas con un espectrofotómetro de absorción molecular de fotodiodos UV-Vis.

Para llevar a cabo las medidas en dicho instrumento se utilizaron cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico. Antes de comenzar las medidas se realizó un blanco que solo contenía la disolución amortiguadora  $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$  0,1M pH=6. El volumen final en cubeta de todos los ensayos realizados es de 2mL.

Las determinaciones se llevaron a cabo con el modo cinético del espectrofotómetro. Se seleccionó el tiempo total de medida así como el tiempo de ciclo (si no se quiere realizar las medidas en continuo).

Se añadieron los reactivos iniciales, se introdujo la cubeta en el espectrofotómetro y se empezó a medir. Transcurridos unos segundos para tener la línea base, se adicionó el analito observando la variación de absorbancia. Los reactivos iniciales y el orden de adición dependen del tipo de ensayo.

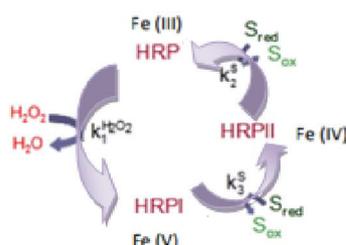
La longitud de onda de medida depende de la especie elegida para seguir la reacción. Si se mide la variación de absorbancia de la HRP a  $\lambda$  es 420nm, aunque hay otras posibles; si se mide la absorbancia del ABTS+, se puede medir a 415, 570 o 730 nm.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Estudio reacción HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se comenzó con el estudio de la reacción enzimática entre HRP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (comercial) a partir de las propiedades espectroscópicas de la enzima.

Las peroxididasas<sup>9</sup> son un tipo de enzimas que pertenecen a la categoría de oxidorreductasas; prácticamente todas ellas son hemoproteínas y tienen como sustrato común el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las peroxididasas (HRP) catalizan la oxidación de diferentes sustratos (S) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acuerdo con el siguiente esquema general:



**Esquema 2:** Mecanismo de reacción de HRP

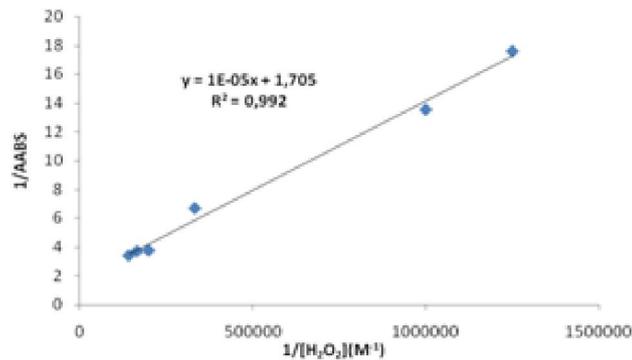
En el estado nativo de la peroxidasa el grupo hemo contiene Fe (III). En la etapa de oxidación HRP reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para generar un intermedio denominado HRPI cuyo grupo hemo presenta un estado de oxidación formal +5. La regeneración de la HRP es llevada a cabo por sustratos reductores: primero HRPI es reducido a HRPII, cuyo grupo hemo presenta un estado de oxidación formal +4, y después HRPII es reducido a HRP. El valor descrito para  $k_1^{H_2O_2}$  es de  $1,0 \cdot 10^7$  a  $1,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , mientras que los valores para  $k_2^S$  y  $k_3^S$  dependen del sustrato. Los valores descritos en la bibliografía para las diferentes constantes cinéticas indican que la última etapa de reducción es la limitante del proceso<sup>10</sup>.

Estudios anteriores<sup>9</sup> demostraron que las condiciones óptimas de trabajo son en exceso de HRP, ya que se obtiene una relación lineal con la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cumpliendo el siguiente modelo matemático.

$$\frac{1}{\Delta \text{Abs}_{t,\lambda}} = \frac{k_a^{\text{HRP}}}{\Delta \epsilon_{\lambda} A} (1 - 10^{-A t}) + \frac{10^{-A t}}{\Delta \epsilon_{\lambda} [H_2O_2]_0}$$

Se realizó una calibración con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para una concentración de HRP ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) midiendo la variación de absorbancia a 420 nm.

Se obtuvieron los datos de la figura 2



**Figura 2** Relación entre la inversa de la variación de Abs a 420nm de una disolución de HRP y la inversa de la concentración de  $H_2O_2$  en disolución amortiguadora  $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$  0,1M pH=6.

Como se puede comprobar, realizando un ajuste lineal por mínimos cuadrados, el método presenta un intervalo de respuesta lineal de  $8 \cdot 10^{-7}$  hasta  $7 \cdot 10^{-6}$  M.

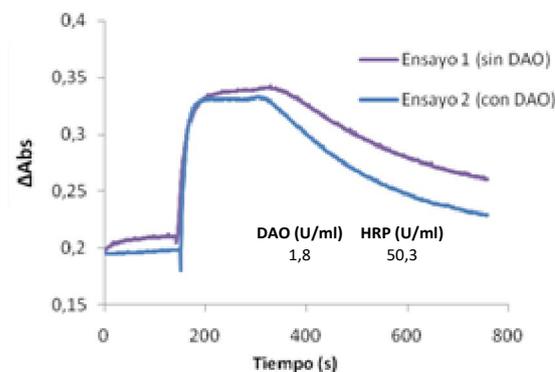
La forma de la señal se muestra en la figura 3 (ensayo1). Como se puede observar hay un aumento de la absorbancia a 420nm que se mantiene estable un tiempo para después volver al origen debido a la regeneración de la enzima.

#### 4.2 Influencia de la enzima diamino oxidasa (DAO) sobre la reacción HRP- $H_2O_2$ .

Puesto que para que se obtenga  $H_2O_2$  de las aminas es necesaria la enzima diamino oxidasa (DAO), se estudió si la presencia de ésta afecta a la reacción de la peroxidasa (HRP) con  $H_2O_2$ .

Para ello, se realizaron dos ensayos. En el primero se llevó a cabo la reacción HRP y  $H_2O_2$  en ausencia de DAO y en el segundo se realizó en presencia de DAO.

La concentración de  $H_2O_2$  es  $2,5 \cdot 10^{-6}$  que corresponde al centro del rango lineal de la recta de calibrado obtenida para la reacción HRP- $H_2O_2$ . Las concentraciones y resultados obtenidos se observan en la figura 3.



**Figura 3** Variación de la señal con el tiempo a 420nm en presencia y ausencia de Diamino oxidasa (DAO).

Con los resultados obtenidos se pudo concluir que la forma de la señal es muy parecida en ausencia o presencia de DAO, lo que pone de manifiesto que se puede determinar peróxidos de hidrógeno. Si bien, prestando atención a la parte derecha de la gráfica en presencia de DAO se produce la regeneración de la HRP a mayor velocidad.

### 4.3 Estudio de las distintas aminas biogénicas con DAO y HRP.

Se estudió la reacción de las diferentes aminas con DAO y HRP observando la variación de absorbancia de la HRP a 420nm. La reacción de putrescina, cadaverina e histamina ya había sido estudiada en el grupo de investigación. Se comenzó comprobando los resultados existentes para posteriormente ampliar el método a las otras aminas. Las condiciones elegidas establecidas previamente en el grupo de investigación: 50U/mL de HRP y 1,8 u/mL de DAO.

#### 4.3.1 Estudio con Putrescina

Se prepararon disoluciones con concentraciones crecientes de putrescina desde  $1,20 \cdot 10^{-6} \text{M}$  hasta  $6,00 \cdot 10^{-6} \text{M}$  en cubeta. La figura 4 muestra la forma de la señal que se obtuvo. Como se puede ver hay también un aumento de señal, si bien es más lento debido a la cinética de reacción entre DAO y amina para formar los peróxidos.

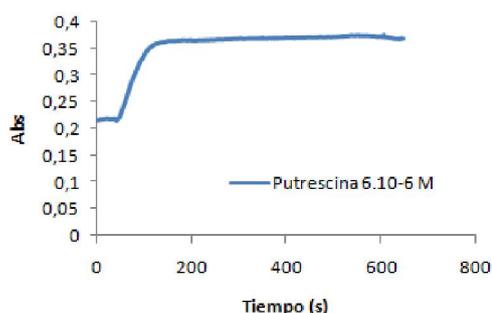


Figura 4. Señal obtenida para putrescina  $6,00 \cdot 10^{-6} \text{M}$

La calibración obtenida se muestra en la figura 5.

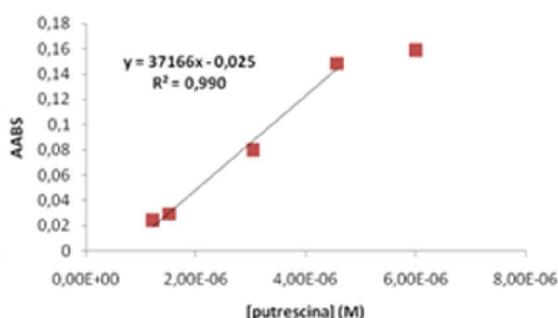
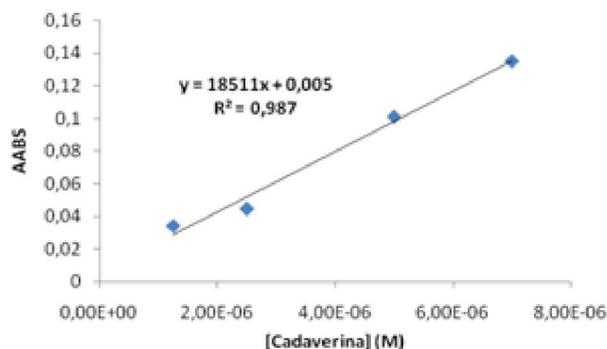


Figura 5 Recta de calibrado para la putrescina representando la variación de absorbancia a 420nm frente a la concentración de amina presente en cada punto.

Se pudo comprobar cómo el rango lineal obtenido para la putrescina va desde  $1,21 \cdot 10^{-6} \text{M}$  hasta  $4,56 \cdot 10^{-6} \text{M}$ , ya que el último punto preparado no entra dentro del rango lineal.

### 4.3.2 Estudio con cadaverina

Se realizó el estudio de manera análoga al realizado con la putrescina. Los resultados obtenidos se muestran a en la figura 6.



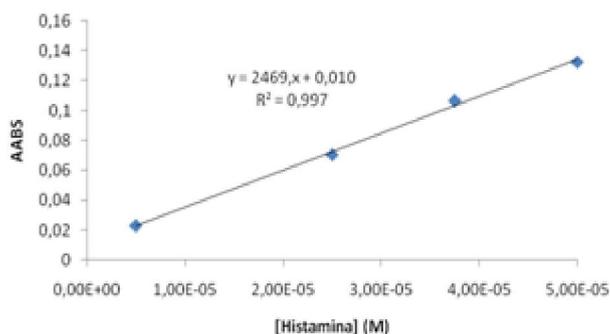
**Figura 6** Recta de calibrado para la cadaverina representando la variación de absorbancia a 420nm frente a la concentración de amina presente en cada punto.

A la vista de los resultados obtenidos se concluyó que los puntos se ajustan a una recta que presenta un rango lineal desde  $1,25 \cdot 10^{-6}$  M hasta  $7 \cdot 10^{-6}$  M.

### 4.3.3 Estudio con Histamina

En este caso las concentraciones que se prepararon de histamina son un orden de magnitud superiores que en el caso de la putrescina y la cadaverina.

Las anteriores tienen una estructura similar de cadena alifática y diaminas. Si nos fijamos en la estructura de la histamina, (que se muestra en la introducción, página 1, figura 1) se ve que es completamente distinta, posee aromaticidad y es una mono amina. Pruebas realizadas con la histamina en concentraciones del mismo orden de magnitud que putrescina y cadaverina no dan una señal perceptible y por ello en este caso las concentraciones que se prepararon se encuentran entre  $5,00 \cdot 10^{-6}$  M hasta  $5,00 \cdot 10^{-5}$  M. La calibración se muestra en la figura 7.



**Figura 7:** Recta de calibrado para la histamina representando la variación de absorbancia a 420nm frente a la concentración de amina presente en cada punto.

A la vista de los resultados obtenidos se pudo concluir que los puntos se ajustan a una recta que presenta un rango lineal desde  $5 \cdot 10^{-6}$  M hasta  $5 \cdot 10^{-5}$  M.

#### 4.3.4 Estudio con Feniletilamina, Tiramina, Triptamina

La estructura de estas 3 aminas es similar a la histamina por lo que se esperaba obtener señales similares a las obtenidas con dicha amina; es decir, reacción más lenta y con menor variación de absorbancia que putrescina y cadaverina sin embargo una vez realizados los ensayos no se obtuvieron los resultados esperados. Para la feniletilamina la reacción era muy lenta y prácticamente incuantificable mientras que para tiramina y triptamina no se obtuvo señal alguna.

Se pensaron dos hipótesis:

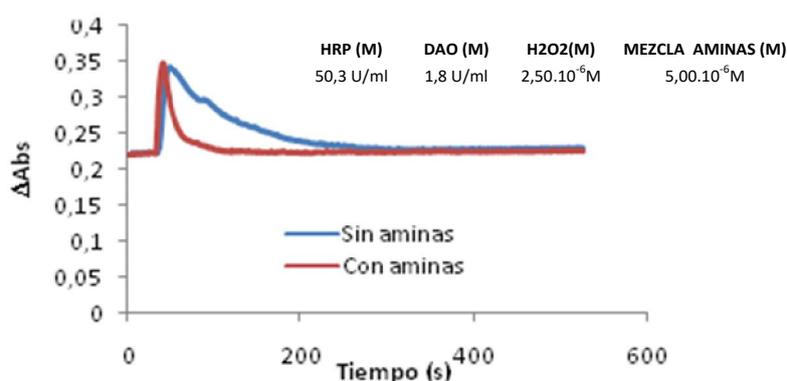
1. Que no reaccionaran con la DAO ya que son monoaminas.
2. Que influyeran en la reacción de HRP regenerándola.

En un estudio paralelo a este trabajo llevado a cabo en el laboratorio se pudo comprobar que las aminas sí que reaccionaban con DAO aunque a menor velocidad que cadaverina y putrescina.

La segunda hipótesis se estudia en detalle en el siguiente apartado.

#### 4.4 Influencia de la presencia de aminas en la reacción HRP- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

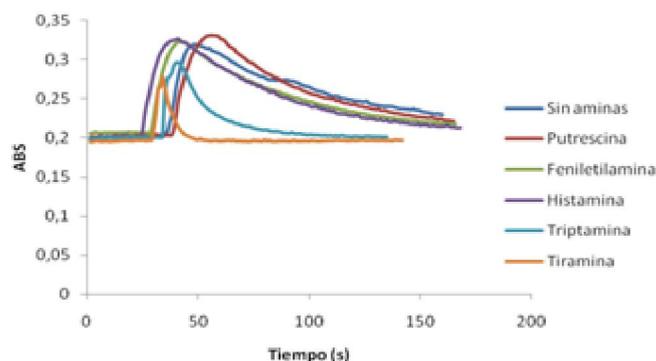
Para estudiar si tiramina y triptamina influyen en la regeneración de HRP se llevaron a cabo dos ensayos. Ambos contienen HRP, tampon pH=6 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La diferencia es que uno de ellos se realiza **en presencia** y otro **en ausencia** de una mezcla de aminas que contiene putrescina, tiramina, triptamina, histamina y feniletilamina. Las concentraciones de los reactivos así como los resultados obtenidos se muestran en la figura 8.



**Figura 8** Espectros obtenidos a 420nm en presencia y ausencia de aminas.

Como se pudo apreciar, la señal cambia significativamente cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de una mezcla de aminas, por lo que se puede concluir que la hipótesis de la regeneración es cierta.

Se procedió al estudio de la influencia de cada una de las aminas por separado para saber cual o cuales de ellas son las que actúan como interferencia. Los resultados se muestran en la figura 9.



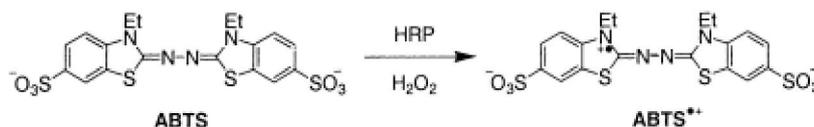
**Figura 9** Espectros obtenidos a 420nm en ausencia de aminas y en presencia de cada una de ellas en concentración  $5 \cdot 10^{-6} M$  por separado.

Se pudo concluir, a la vista de los resultados que la putrescina, la histamina y la feniletilamina no interfieren en la señal, sin embargo tiramina y triptamina actúan regenerando a la enzima. Este resultado es coherente con los resultados experimentales obtenidos anteriormente para la calibración de las distintas aminas con HRP-DAO ya que ni la tiramina ni la triptamina produjeron señal apreciable, debido a que provocan la regeneración de la HRP.

#### 4.5 Estudio de la reacción HRP- $H_2O_2$ con el colorante ABTS.

Puesto que el objetivo final es la aplicación del método en el futuro desarrollo de tiras reactivas, se llevó a cabo la introducción de un colorante. También es importante su estudio para conocer si dicho colorante evita la regeneración por parte de la tiramina y la triptamina.

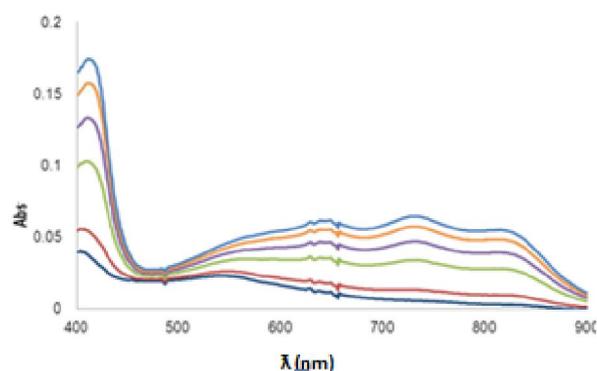
Se eligió una conocida reacción catalizada por la enzima peroxidasa (HRP), que se basa en la oxidación de un electrón desde el 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) conocido como ABTS para dar el correspondiente radical catiónico  $ABTS^{\bullet+}$ .



**Esquema 3:** Reacción de oxidación del ABTS catalizada por HRP.

El producto de la reacción es un compuesto que presenta un color azul. Gracias a esta propiedad, se puede cuantificar la sustancia por espectrofotometría de absorción molecular UV-VIS. Se monitorizó el cambio de absorbancia de las especies ABTS (forma reducida) y  $ABTS^{\bullet+}$  (forma oxidada) con el tiempo. Es importante destacar que se necesita una señal coloreada que se mantenga en el tiempo y no desaparezca rápidamente.

La variación de los espectros del ABTS durante la reacción se muestra en la figura 10.



**Figura 10** Variación de los espectros durante la reacción.

Como se puede observar en el espectro el ABTS presenta absorbancia en la zona de 415nm así como tres máximos en la zona del visible.

Se comenzó estudiando la reacción HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ABTS y posteriormente se introdujo la DAO y aminas sustituyendo al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Partimos de la base que tenemos de la calibración de la putrescina, en la que el rango lineal obtenido fue desde 1,20.10<sup>-6</sup>M hasta 4,50.10<sup>-6</sup>M. Como la putrescina es una diamina, por cada molécula de putrescina hay dos grupos amino y cabe esperar la obtención de dos moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por lo tanto el rango lineal para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> irá desde 2,20.10<sup>-6</sup> M hasta 9,00.10<sup>-6</sup>M.

#### 4.5.1 Optimización de la concentración de colorante (ABTS)

La reacción de estudio presenta estequiometria (1:2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto ABTS.

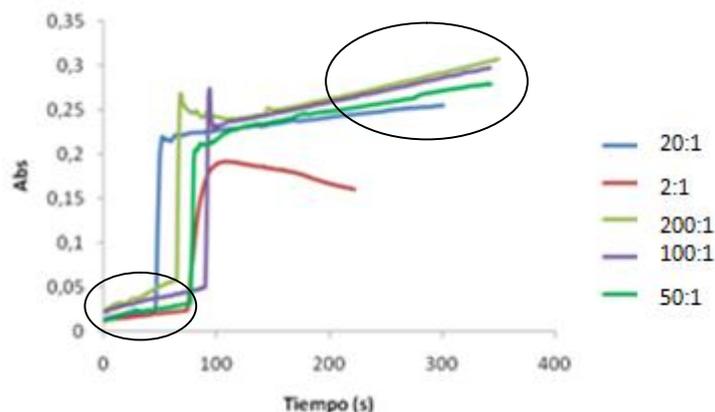


Para optimizar la relación ABTS:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mantuvo fija la concentración de HRP 1,10.10<sup>-6</sup>M, y la de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,20.10<sup>-6</sup>M. La concentración de ABTS se modificó según las relaciones expuestas en la tabla2.

Relación de concentraciones (ABTS:H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Concentración (M)
<b>2:1</b>	4,40.10 <sup>-6</sup>
<b>20:1</b>	4,40.10 <sup>-5</sup>
<b>50:1</b>	1,10. 10 <sup>-4</sup>
<b>100:1</b>	2,20.10 <sup>-4</sup>
<b>200:1</b>	4,40.10 <sup>-4</sup>

**Tabla 2:** Concentraciones de ABTS utilizadas en los diferentes ensayos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11.



**Figura 11** Representación de la variación de absorbancia con el tiempo para las diferentes concentraciones de ABTS a 415nm. Los círculos representan una deriva de la señal cuyas causas se estudian a continuación.

Puesto que se buscaba una señal estable en el tiempo se eligió la relación óptima de ABTS: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20:1) ya que con relaciones superiores no se obtienen señales mayores.

En la figura 11, además de estos resultados comentados, se puede observar una deriva de la señal (marcada con un círculo). La señal alcanza el máximo de absorbancia, pero sigue aumentando poco a poco con el tiempo. Este fenómeno también se ve en la línea base y se va a estudiar a continuación.

#### 4.5.2 Estudio de la deriva de señal obtenida.

Se llevaron a cabo diferentes pruebas experimentales hasta determinar la causa de la deriva.

- Una hipótesis que se barajó era la posible interacción del colorante con HRP. Se llevó a cabo un ensayo de ABTS sólo en cubeta y transcurrido un tiempo, se añadió HRP. Y la deriva existía desde el principio.
- Otra de las hipótesis que se planteó fue una posible interacción entre el colorante y el oxígeno que pudiera oxidar al colorante produciendo la deriva. Para comprobarlo se hicieron dos ensayos. En ambos casos se puso ABTS como reactivo en cubeta pero el primer ensayo se realizó en presencia de O<sub>2</sub> y el segundo ensayo purgando con una corriente de N<sub>2</sub>. La deriva continuaba apareciendo.
- Se pensó que el tampón podía afectar a la señal, por ello se hicieron ensayos preparando las disoluciones con agua mili Q en lugar de la disolución amortiguadora a pH=6. La deriva continuaba.
- Finalmente se pensó que este efecto en la señal podía deberse a un proceso fotoquímico puesto que al ser un equipo de red de diodos toda la luz de la lámpara de deuterio está irradiando la muestra. Para comprobarlo se llevaron a cabo también varias pruebas midiendo en continuo, en ciclos de 30s y se utilizó un filtro que eliminaba a radiación inferior a 400 nm. Se comprobó que cuando se utiliza dicho filtro, no se obtiene deriva en la señal (figura 12) y por lo tanto se puede concluir que el problema era del tipo fotoquímico. A partir de entonces se colocó un filtro entre la muestra y la lámpara para evitar la deriva.

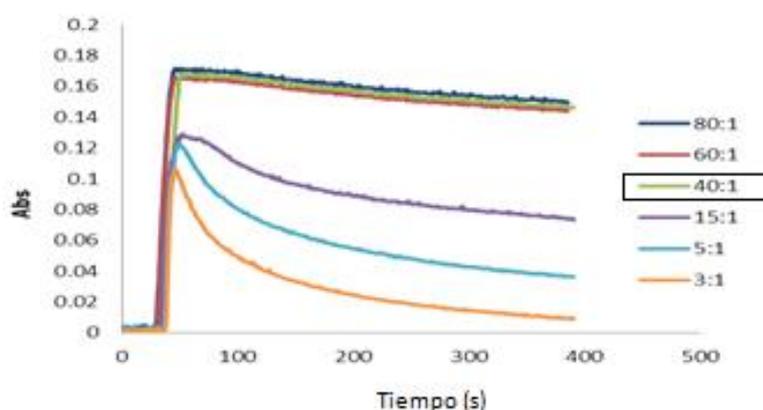
### 4.5.3 Optimización de la concentración de enzima peroxidasa (HRP)

Se optimizó la concentración de HRP, para ello se prepararon disoluciones con distinta concentración de HRP de manera que las relaciones ABTS:HRP sean las de la tabla 3.

Concentración (mol/L)	Relación de concentración (ABTS:HRP)
$2,01 \cdot 10^{-6}$ M	80:1
$1,50 \cdot 10^{-6}$ M	60:1
$1,00 \cdot 10^{-6}$ M	40:1
$3,00 \cdot 10^{-6}$ M	15:1
$1,00 \cdot 10^{-5}$ M	5:1
$2,00 \cdot 10^{-5}$ M	3:1

**Tabla 3:** Concentraciones de HRP utilizadas en los diferentes ensayos.

Los ensayos se llevaron a cabo manteniendo la relación de ABTS: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20:1) optimizada previamente y los resultados se muestran en la figura 12.



**Figura 12:** Representación de la variación de absorbancia con el tiempo para las diferentes concentraciones de HRP a 415nm.

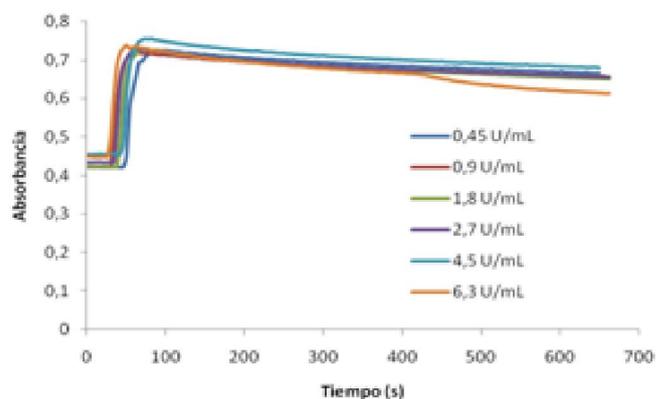
A la vista de los resultados obtenidos, se pudo concluir que para relaciones de concentración ABTS:HRP igual a 40:1 se obtiene la máxima señal y suficientemente estable en el tiempo. Esta es la forma de señal que interesa ya que tras alcanzar el máximo de absorbancia permanece constante en el tiempo y esto permitirá que el color del producto de la reacción no desaparezca de las tiras reactivas.

Como conclusión la concentración óptima de HRP es de  $1 \cdot 10^{-6}$  M, correspondiente a la relación ABTS:HRP(40:1).

### 4.5.4 Optimización de la concentración de diamino oxidasa (DAO)

Se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de DAO para estudiar la posible influencia en la reacción HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ABTS.

Las concentraciones y resultados obtenidos se muestran en la figura 13.



**Figura 13:** Variación de absorbancia frente al tiempo para diferentes concentraciones de DAO a 415nm.

A la vista de la representación de los datos experimentales obtenidos se pudo concluir que la concentración de DAO no afecta a la señal de HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ABTS.

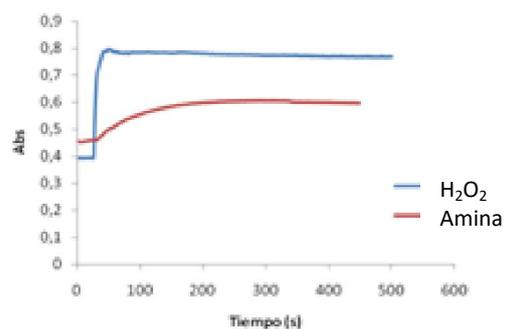
#### 4.6. Estudio de la reacción aminos-DAO-HRP con el colorante ABTS

##### 4.6.1. Ensayos con cadaverina y putrescina

Teniendo en cuenta los estudios realizados anteriormente, se llevó a cabo la reacción de las aminos con DAO+HRP+ABTS en las relaciones de concentración óptimas estudiadas previamente.

Se realizó un primer ensayo con ABTS, HRP y disolución amortiguadora pH=6. Cuando se estabilizó la señal se añadió una concentración  $5,01 \cdot 10^{-6} M$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se realizó un segundo ensayo en las mismas condiciones que el primero pero sustituyendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por una diamina  $2,5 \cdot 10^{-6} M$  + DAO.

Los resultados obtenidos en ambos ensayos se muestran a continuación en la figura 14.



**Figura 14:** Variación de absorbancia producida por la diamina y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en función del tiempo a 420nm

Los ensayos realizados muestran una señal menor con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que con una concentración equivalente de las aminos. Con las aminos el máximo de absorbancia no se alcanza tan rápido como con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a que los peróxidos se están formando al reaccionar éstas con la DAO.

Una de las hipótesis que se planteó para explicar la menor señal fue que el rendimiento de la reacción de la amina con DAO no fuera tan alto como se esperaba. Esto supondría que:

a.- Se ha formado menos  $H_2O_2$ .

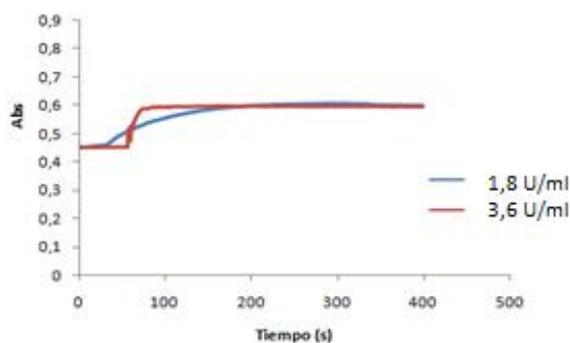
b.- Queda parte de la amina sin oxidar y puede reaccionar con ABTS oxidado, provocando una disminución de la señal.

Para comprobarlo se llevó a cabo un experimento exactamente igual que el primero y cuando la señal se estabilizó en el máximo se añadió amina en la misma concentración que en la segunda prueba. No se observó cambio alguno en la señal. Por lo tanto se puede descartar la segunda opción, que sean restos de la amina sin reaccionar los que reaccionan con el ABTS oxidado.

Con el fin de comprobar si la causa es el rendimiento de la reacción se hicieron dos ensayos.

a.- Se cambió el orden de adición de los reactivos de forma que DAO estuviera un tiempo reaccionando con la amina. Posteriormente se añade a la disolución HRP y ABTS respetando siempre las mismas concentraciones de todas las sustancias que en los estudios anteriores. Se pudo observar que la señal obtenida con incubación o sin incubación es la misma.

b.- Se aumentó la concentración de DAO. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15.



**Figura 15** Variación de absorbancia producida para distintas cantidades de DAO en función del tiempo a 420nm.

La variación de absorbancia que se produce es similar en ambos casos si bien influye en la velocidad de la reacción.

Los ensayos realizados parecen indicar que de los dos grupos amino que hay en la estructura de la cadaverina (o de la putrescina) solo reacciona uno con la DAO.

#### 4.6.2 Ensayos con histamina, feniletilamina, tiramina y triptamina.

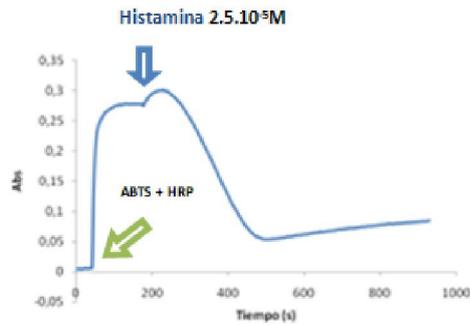
##### 4.6.2.1 Señales con histamina

Para obtener las señales con histamina se probó con concentraciones similares a las estudiadas con HRP-DAO. Se observó que la señal no era la esperada ya que no se mantiene constante en el tiempo, sino que se obtiene un descenso brusco de la señal, parecido al que se observa en la figura 16.

Esto parecía indicar que el  $ABTS_{oxidado}$  una vez formado se estaba regenerando. Llegados a este punto se planteó la hipótesis de que el aldehído formado tras la reacción de la histamina con la DAO era el responsable de esta regeneración.

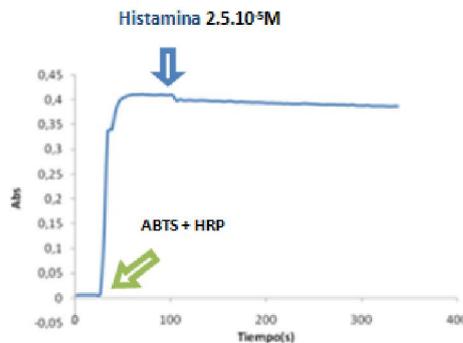
Para comprobarlo se realizaron varios ensayos cuyo proceso experimental así como los posteriores resultados obtenidos se adjuntan a continuación.

- **Primer ensayo:** Inicialmente en cubeta se puso putrescina en concentración  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$  y DAO. Se añadió ABTS+HRP como indica la figura 16 produciendo un aumento de señal y posteriormente se añade histamina observándose un aumento de la absorbancia acompañado de un descenso brusco de la señal, debido a la **regeneración que se produce.**



**Figura 16:** Variación de señal (absorbancia) con el tiempo a 420nm.

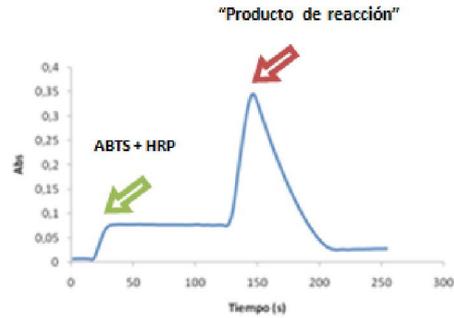
- **Segundo ensayo:** Se procede de manera análoga al primer ensayo. La única diferencia es la sustitución de la putrescina y la DAO inicialmente en cubeta por  $\text{H}_2\text{O}_2$  de concentración equivalente a la esperada teóricamente, como se observa en la figura 17.



**Figura 17:** Variación de señal (absorbancia) con el tiempo a 420nm.

Este ensayo no contenía DAO y se puede observar cómo tras añadir la histamina no existe regeneración de la señal. Por lo tanto no es la histamina, sino un producto de su reacción.

- **Tercer ensayo:** Se preparó una disolución con el “producto” de la reacción. Para ello en un vial se colocó DAO, tampon e histamina en concentración  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ . Inicialmente la cubeta contiene putrescina; como se observa en la figura 18, se añade una mezcla de HRP y ABTS (la señal aumenta porque HRP también absorbe a 420nm) y posteriormente se añade el “producto de la reacción”. Se observa un aumento de señal (debido a que DAO está reaccionando con putrescina y a los peróxidos contenidos en el vial) y posteriormente un descenso brusco de la señal.



**Figura 18:** Variación de señal (absorbancia) con el tiempo a 420nm.

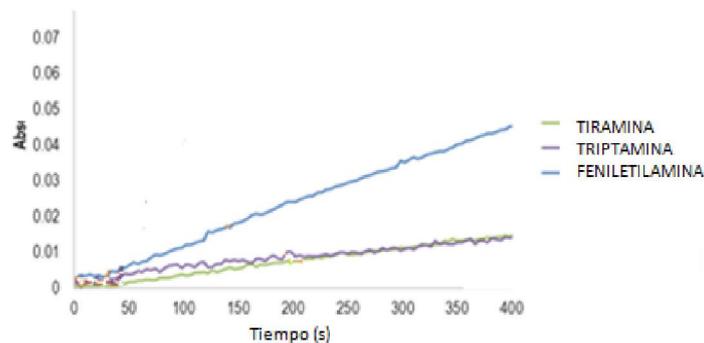
Se puede concluir que la regeneración es debida al aldehído formado a partir de la histamina, si bien hubiera sido interesante disponer del mismo para poder comprobarlo definitivamente.

Esto hace que la histamina no se pueda determinar por esta metodología, ya que su señal no permanece estable y por tanto no se podría utilizar para el diseño de tiras reactivas. Pero además supone un problema añadido porque la histamina va a suponer una interferencia en la determinación de cadaverina y putrescina ya que si está presente regenerará la señal producida por ellas.

#### 4.6.2.2 Señales con feniletilamina, tiramina y triptamina.

Se estudió si el comportamiento de estas 3 aminas era el mismo que el de la histamina y producía la regeneración de la señal.

Se prepararon disoluciones teniendo en cuenta el rango lineal obtenido para estas aminas en la calibración con HRP-DAO y sin el colorante (ABTS). Las concentraciones y resultados obtenidos se muestran en la figura 19. La única diferencia es la amina presente en cada uno de ellos (feniletilamina, tiramina o triptamina).



**Figura 19:** Resultados obtenidos para las aminas "incalibrables" a 420nm.

Se pudo concluir que la tiramina y la triptamina "sí que reaccionan" debido a que la reacción de dichas aminas con el ABTS es más rápida que con la HRP. Sin embargo la reacción es demasiado lenta y casi inapreciable.

En el caso de la feniletilamina sí que se lleva a cabo reacción pero con una cinética muy lenta.

Puesto que el objetivo del presente trabajo se centra en el desarrollo un método de análisis rápido la calibración de estas aminas no resultaría útil.

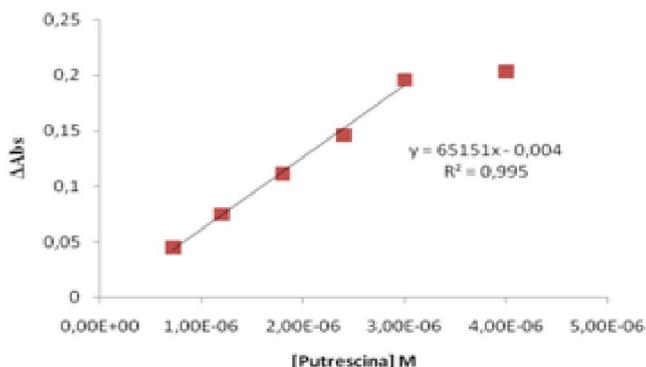
#### 4.7 Calibración de las distintas aminas con HRP-DAO-ABTS.

Las concentraciones de los diferentes reactivos fueron las optimizadas previamente.

##### 4.7.1 Recta de calibrado Putrescina

Se prepararon disoluciones de diferente concentración de putrescina. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20.

[Putrescina]	$\Delta$ abs
4,00E-6	0,2037
3,00E-6	0,1962
2,40E-6	0,1464
1,80E-6	0,1115
1,20E-6	0,0747
7,20E-7	0,0446



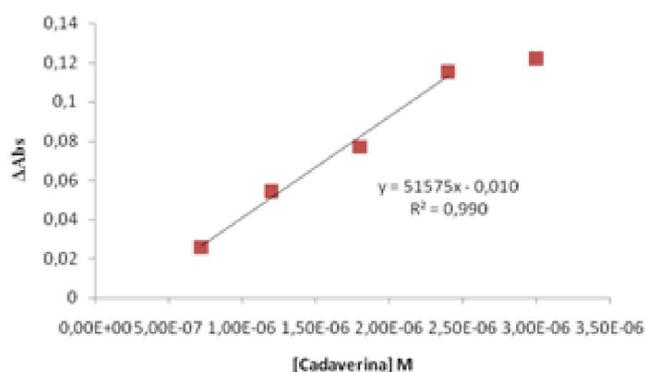
**Figura 20:** Recta de calibrado para la putrescina representando la variación de absorbancia a 420nm frente a la concentración de amina presente en cada punto.

El rango lineal para la calibración de putrescina con ABTS va desde  $7,2 \cdot 10^{-7}$  M hasta  $3 \cdot 10^{-6}$  M

##### 4.7.2 Recta de calibrado Cadaverina

Se realizó un procedimiento experimental análogo al desarrollado para la calibración de la putrescina. Las concentraciones de las disoluciones preparadas así como los resultados experimentales que se obtuvieron se recogen en la figura 21.

[Cadaverina]	$\Delta$ abs
3,00E-6	0,1223
2,40E-6	0,1154
1,80E-6	0,0791
1,20E-6	0,0544
7,20E-7	0,0259



**Figura 21:** Recta de calibrado para la cadaverina representando la variación de absorbancia a 420nm frente a la concentración de amina presente en cada punto.

El rango lineal para cadaverina con ABTS va desde  $7,2 \cdot 10^{-7}$  M hasta  $2,4 \cdot 10^{-6}$  M.

## 5. PRECISIÓN DEL MÉTODO

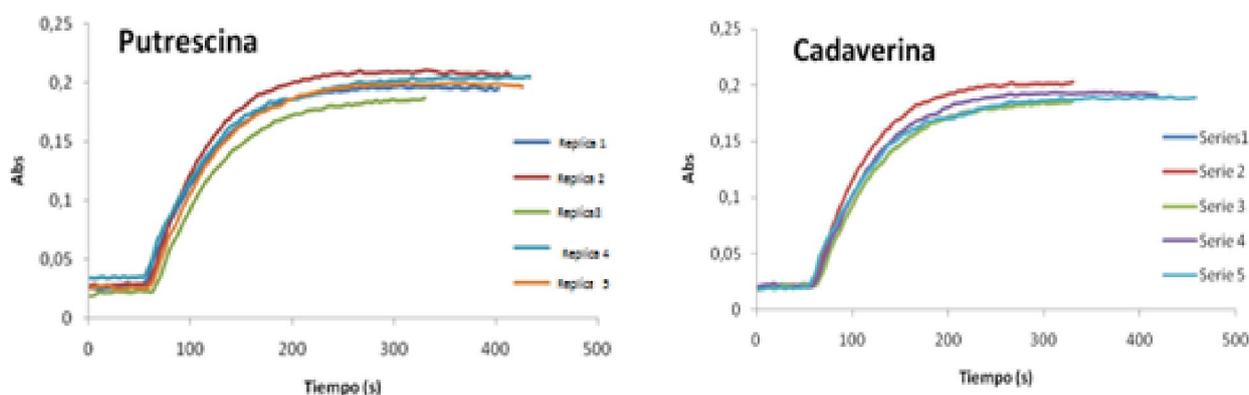
La precisión de un procedimiento analítico indica que varias señales analíticas obtenidas sobre diferentes alícuotas de la misma muestra proporcionan resultados semejantes. Si se trata de

medidas cuantitativas esto se traduce en que la desviación estándar de los resultados es pequeña lo que contribuye a que la incertidumbre específica sea moderada, que es uno de los requisitos para obtener resultados exactos. Según la forma en que se han obtenido los resultados, la desviación estándar de los mismos puede indicar dos conceptos diferentes:

- **Repetibilidad:** cuando los distintos resultados sobre alícuotas de la misma muestra son obtenidos por el mismo operador, en el mismo laboratorio, usando el mismo instrumento y en un intervalo de tiempo corto.
- **Reproducibilidad:** cuando no se cumplen algunos de los requisitos anteriores.

En este caso en concreto las medidas se realizaron en el mismo laboratorio, usando el mismo instrumento, a lo largo del desarrollo del presente trabajo. Se estudió la repetibilidad sobre las dos aminas que podemos determinar de una mezcla por el presente método desarrollado, que son la putrescina y la cadaverina.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 22 para putrescina y cadaverina.



**Figura 22:** Variación de señal (absorbancia) con el tiempo a 420nm, para diferentes réplicas de la misma concentración de putrescina (izquierda) y cadaverina (derecha)

Se expresó la repetibilidad del método como DSR (Desviación Estándar relativa en porcentaje %).

$$DSR (\%) = \frac{s}{x} * 100$$

siendo s la desviación estándar y x la media de los valores de absorbancias obtenidos para las distintas réplicas. Los resultados obtenidos para las diferentes diaminas se muestran a continuación.

	s	DSR (%)
Putrescina	0,012	6.44
Cadaverina	0,009	4.99

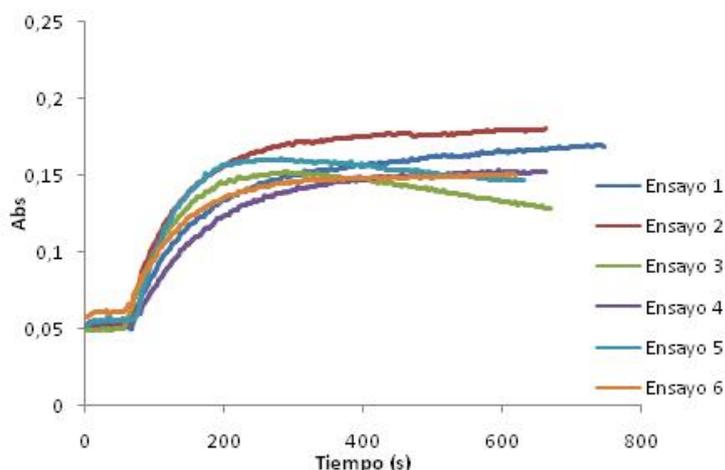
## 6. INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS AMINAS EN EL MÉTODO ANALÍTICO ENZIMÁTICO DESARROLLADO

Se procedió al estudio de la influencia de las distintas aminas en el método desarrollado para saber si permite una primera determinación de cadaverina y putrescina en una muestra en que estén presentes tiramina, triptamina, feniletilamina e histamina.

Las condiciones de reacción de los ensayos así como los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3 y en la figura 23.

<b>Ensayo 1</b>	Putrescina $1.10^{-6}M$ + Cadaverina $1.10^{-6}M$
<b>Ensayo 2</b>	Putrescina $1.10^{-6}M$ + Cadaverina $1.10^{-6}M$ + Histamina $1.10^{-6}M$
<b>Ensayo 3</b>	Putrescina $1.10^{-6}M$ + Cadaverina $1.10^{-6}M$ + Histamina $1.10^{-5}M$
<b>Ensayo 4</b>	Putrescina $1.10^{-6}M$ + Cadaverina $1.10^{-6}M$ + Feniletilamina $1.10^{-6}M$ + Histamina $1.10^{-6}M$ + Tiramina $1.10^{-6}M$ + Triptamina $1.10^{-6}M$
<b>Ensayo 5</b>	Putrescina $1.10^{-6}M$ + Cadaverina $1.10^{-6}M$ + Feniletilamina $1.10^{-5}M$ + Histamina $1.10^{-5}M$ + Tiramina $1.10^{-6}M$ + Triptamina $1.10^{-6}M$
<b>Ensayo 6</b>	Putrescina $1.10^{-6}M$ + Cadaverina $1.10^{-6}M$ + Histamina $1.10^{-5}M$ + (ABTS 10 veces superior a la concentración óptima)

**Tabla 3:** Condiciones de reacción de los diferentes ensayos realizados



**Figura 23:** Señales obtenidas para los distintos ensayos realizados a 420nm.

Se concluyó que la determinación de putrescina y cadaverina en presencia de diferentes aminas es posible siempre y cuando todas ellas se encuentren en la misma concentración (Ensayo 4).

Si la concentración de histamina en una muestra es un orden de magnitud mayor que el de putrescina y cadaverina, no se puede llevar a cabo su determinación (Ensayo 3). Este efecto también se pudo observar en el (Ensayo 5).

Se realizó una prueba con 10 veces más del colorante utilizado en el desarrollo del método (ABTS). Se pudo comprobar cómo en estas condiciones se puede determinar putrescina y cadaverina para una concentración de histamina mayor. (Ensayo 6)

La presencia de tiramina y triptamina no interfiere en la señal puesto que su cinética es lenta.

## 7. PRIMEROS ENSAYOS DE APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DESARROLLADO A UNA MUESTRA REAL.

Se dispone de una muestra de pescado procedente del laboratorio de Salud Pública de Aragón con concentraciones conocidas de las seis aminas biogénicas objeto de estudio determinadas según un procedimiento de análisis desarrollado en dicho laboratorio y validado por la ANECA.

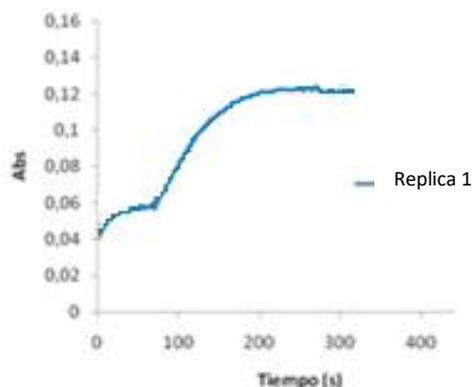
Las concentraciones de las aminas (mol/L) en la muestra suministrada fueron las mostradas en la tabla 4:

Cadaverina	Putrescina	Histamina	Tiramina	Triptamina	feniletilamina
$5,70 \cdot 10^{-5} \text{M}$	$1,86 \cdot 10^{-4} \text{M}$	$4,05 \cdot 10^{-4} \text{M}$	$1,08 \cdot 10^{-4} \text{M}$	$6,25 \cdot 10^{-6} \text{M}$	$2,07 \cdot 10^{-5} \text{M}$

**Tabla 4** Concentraciones de las distintas aminas en la muestra de análisis.

El método desarrollado en el presente trabajo permite cuantificar únicamente putrescina y cadaverina. Como se ha visto en las calibraciones las sensibilidades no son muy distintas. Es por ello que se va a utilizar, para hacer una primera evaluación de las posibilidades de determinación conjunta de ambas aminas en presencia de las otras cuatro en una muestra real.

Para ello sobre una cubeta que tenía ABTS+ HRP+DAO en las concentraciones optimizadas para el método se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de la muestra preparada (el volumen final fue de 2000 $\mu\text{L}$ ) obteniendo la variación de absorbancia debida a las aminas como se muestra en la figura 24.



**Figura 24** Variación de señal (absorbancia) con el tiempo a 420nm, para diferentes réplicas de la misma concentración de muestra.

Se consideró que esa señal era debida a cadaverina y putrescina. Para conocer las concentraciones en la muestra se interpoló la variación de absorbancia en la recta de calibrado de la cadaverina. Se eligió esta porque, como se puede apreciar en la tabla 4, es mayoritaria. El ensayo se hizo por triplicado.

La concentración obtenida una vez corregida la dilución y su desviación estándar ( $n=3$ ), la concentración real así como el error cometido se muestran en la tabla 5.

Concentración calculada de CAD+PUT	Concentración real de CAD+PUT	% error
$2,64 \cdot 10^{-4} \text{ M} (\pm 3.3 \cdot 10^{-5} \text{ M})$	$2,43 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	8,6%

**Tabla 5** Resultados obtenidos para la determinación conjunta de CAD+PUT

Como se puede apreciar los resultados son satisfactorios ya que permiten la determinación de cadaverina + putrescina en una muestra real con un error aceptable utilizando un método bastante más rápido y económico de los existentes hasta la fecha y que permite augurar posibilidades en el desarrollo de tiras reactivas.

## 8. CONCLUSIONES

En esta memoria se ha llevado a cabo el desarrollo de un método analítico enzimático para la determinación de aminas biogénicas. Las conclusiones que se pueden extraer del trabajo realizado son las siguientes:

1. Se ha estudiado en disolución la reacción enzimática de HRP con peróxido de hidrógeno obteniéndose un intervalo de respuesta lineal de  $8 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  -  $7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ .
2. Se ha estudiado la influencia de DAO en la reacción HRP- $\text{H}_2\text{O}_2$ , demostrándose que no producen cambios apreciables, únicamente la DAO permite una ligera regeneración de la HRP una vez que ya se ha obtenido la señal estable.
3. Se han obtenido los rangos lineales para la reacción de distintas aminas con HRP y DAO. Para la diaminas (putrescina y cadaverina) el intervalo de respuesta lineal se encuentra en el orden de  $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ . En el caso de la histamina el orden en el que se encuentra la respuesta línea es de  $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  hasta  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ . En el caso de la feniletilamina la reacción se produce de manera muy lenta y no resulta útil su calibración.
4. La tiramina y la triptamina no presentan reacción aparente con la HRP y la DAO debido a que contribuyen a la regeneración de la enzima peroxidasa (HRP) de manera casi inmediata, lo que hace imperceptible un cambio de señal.
5. Se ha estudiado la reacción HRP- $\text{H}_2\text{O}_2$ -ABTS encontrando que la relación óptima para obtener una señal estable es 40:1 ABTS:HRP y 20:1 ABTS: $\text{H}_2\text{O}_2$ .
6. Se ha optimizado la concentración de enzimas en el presente método siendo la concentración óptima de HRP  $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  y la de DAO de 1,8 U/mL en cubeta.
7. En el caso de la reacción HRP+ $\text{H}_2\text{O}_2$ +ABTS se obtiene una deriva de la señal. que se ha demostrado que es fotoquímica y que se elimina colocando un filtro.
8. Se han obtenido los rangos lineales para las distintas aminas en la reacción con el colorante ABTS. Para las diaminas putrescina y cadaverina la presencia de dicho ABTS nos permiten aumentar la sensibilidad en un orden de magnitud respecto a la calibración de dichas aminas sin el ABTS.
9. En el caso de la histamina no podemos calibrarla por este método ya que el aldehído que se forma como producto de la reacción provoca la regeneración de la señal.

10. En el caso de tiramina y triptamina, los ensayos realizados demuestran que la reacción con el ABTS es más rápida que con la HRP y por ello obtenemos señal sin embargo la reacción es muy lenta y por lo tanto no resulta útil su calibración ya que buscamos un método rápido de análisis.
11. Se puede determinar cadaverina y putrescina en presencia de tiramina, triptamina, histamina y feniletilamina siempre que todas estas aminas se encuentren en la misma concentración o inferior. Si la concentración de histamina es mayor, se podrán determinar aumentando la concentración de ABTS.
12. El método desarrollado ha permitido una primera determinación de cadaverina +putrescina en una muestra real en que estén presentes tiramina, triptamina, feniletilamina e histamina con un error del 8,6 %.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. M. Krizek, F. Vacha, L. Vorlova , J. Lukasova , S.Cupakova, Food Chem. 2004, 88 (2), 185-191.
2. C. Ruiz-Capillas, F. Jimenez-Colmenero, Crit. Rev. Food Sci.Nut. 2004, 4, 489-599.
3. V. Ladero, M. Calles –Enriquez, M. Fernandez, M.A. Alvarez, Curr. Nutr. Food Sci. 2010 6(2), 145-156.
4. I. Al Buushi, S. Poole, H.C. Deeth, G.A. Dykes, Crit. Rev. Food. Sci. Nut. 2009, 49, 369-377.
5. J.L. Mietz, E.J. Karmas, Food Sci. 1977, 42 (1), 155-158.
6. Directiva 91/439/EEC. Directive of 22 July 1991 establishing standards to be applied to the production and commercialization of fishery products. Official Journal of the European Communities L268:15-34
7. F.B. Erim, Trends Anal. Chem. 2013, 52, 239–247.
8. B. Bóka, N. Adányi, D. Virág, M. Sebela, A. Kiss, Electroanalysis 2012, 24, 135-139.
9. V. Sanz, S. de Marcos, J.R. Castillo, J. Galbán. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 1038-1048.
10. J. Galbán , Y. Andreu, J.F. Sierra, S. de Marcos, J.R Castillo, Luminescence 2001, 16, 199-210