



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

CAPÍTULO.....	N ° Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1.¿QUÉ SON LAS AMINAS BIÓGENAS Y CÓMO SE FORMAN?	3
1.2.ALIMENTOS IMPLICADOS.....	4
1.3.MÁXIMOS LEGALES	4
1.4.EFECTOS TÓXICOS	5
1.5.CONTROL INTEGRADO	5
1.6.MÉTODOS DE DETERMINACIÓN EXISTENTES	6
1.7.MÉTODO ENZIMÁTICO	6
1.8.MÉTODO PARA LA MEDICIÓN EN SOPORTE SÓLIDO	7
1.9. ESTABILIZADORES ENZIMÁTICOS.....	7
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	8
3. MATERIAL Y METODOLOGÍA	9
3.1.MATERIAL	9
3.2.METODOLOGÍA.....	11
3.2.1.Medidas en disolución	11
3.2.2.Medidas en soporte de celulosa	12
3.2.2.1. Construcción de los soportes reactivos.....	12
3.2.2.2. Medida del analito.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1.ESTUDIO DE REACCIÓN EN DISOLUCIÓN: HRP+TMB+H ₂ O ₂	14
4.1.2. Optimización TMB	14
4.1.3. Optimización HRP.....	16

4.2.RECTA DE CALIBRACIÓN DE H ₂ O ₂	17
4.3.ESTUDIO DE REACCIÓN EN DISOLUCIÓN: HRP+TMB+DAO+AMINAS BIÓGENAS	18
4.4.ESTUDIO DE LOS ESTABILIZADORES EN DISOLUCIÓN	20
4.5.CONSTRUCCIÓN Y ESTUDIO DEL SOPORTE SÓLIDO.....	21
4.5.1.Estudio influencia de porcentaje de la celulosa	22
4.5.2.Recta de calibración H ₂ O ₂	23
4.6.INMOVILIZACIÓN DE LA DAO	24
4.7.CALIBRACIÓN DE PUTRESCINA Y CADAVERINA	26
4.8.DETERMINACIÓN DE UNA MUESTRA REAL	28
4.9.ESTUDIO VIDA ÚTIL SOPORTES DE CELULOSA.....	29
4.10. ESTUDIO DE LOS ESTABILIZADORES	29
4.10.1 DAO+ estabilizadores antes del secado	29
4.10.2 Estabilizadores antes del secado adicionando la DAO después del mismo.	30
4.10.DAO+ estabilizadores después del secado	34
5. CONCLUSIONES	35
6. CONCLUSIONS	36
7. VALORACIÓN PERSONAL	37
8. BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	41
ANEXO I	41

RESUMEN

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular y una importante actividad biológica. Estas se forman, principalmente, por la degradación de proteínas y aminoácidos libres que en determinadas concentraciones pueden producir intoxicaciones o reacciones alérgicas.

Las aminas biógenas más importantes son la histamina, putrescina, cadaverina y tiramina. De éstas, la histamina es la que mayor poder toxicológico presenta, no obstante, por la acción de otras aminas como la putrescina y la cadaverina, este poder toxicológico puede verse aumentado. La elevada ingesta estas aminas biógenas puede producir intoxicaciones, cuyo cuadro clínico se desarrolla, entre otros, con dolores de cabeza, cólicos, erupciones, etc

Es por ello que es importante disponer de métodos rápidos para su determinación, "in situ", en la industria alimentaria, que puedan ser utilizados como indicativo de calidad y herramienta de seguridad en la misma.

La determinación de cadaverina y putrescina propuesta en este trabajo, se basa en su reacción con la enzima diaminoxidasa (DAO) produciendo peróxido de hidrógeno que reacciona con la enzima peroxidasa (HRP) en presencia de un colorante, cuyas propiedades ópticas cambian durante la reacción. Este método semicuantitativo, permite el análisis de putrescina y cadaverina, usando para ello estas tiras reactivas y una aplicación móvil.

La inmovilización de los reactivos en un soporte de celulosa ha permitido el desarrollo de tiras reactivas con buenos resultados, pero corto tiempo de uso. Este trabajo se centra en el desarrollo de tiras reactivas de larga vida útil, utilizando para ello estabilizantes enzimáticos.

ABSTRACT

Biogenic amines are nitrogen compounds of low molecular weight and an important biological activity. These are formed, mainly, by the degradation of the proteins and the free amino acids that in certain can contain intoxications or allergic reactions.

The most important biogenic amines are histamine, putrescine, cadaverine and tyramine. Similarly, histamine is the one with the highest toxicological power, however, due to the action of other amines such as putrescine and cadaverine, this toxicological power can increase verses. The high intake of these biogenic amines can cause poisoning, our clinical picture develops, among others, with headaches, cramps, rashes, etc.

That is why it is important to use rapid methods for its determination, "in situ", in the food industry, which can be used as an indication of quality and safety tool in it.

The determination of cadaverine and putrescine proposed in this work is based on its reaction with the enzyme diaminoxidase (DAO) producing hydrogen peroxide that reacts with the enzyme peroxidase (HRP) in the presence of a dye, whose optical properties change during the reaction. This semi-quantitative method allows the analysis of putrescine and cadaverine, using these test strips and a mobile application.

The immobilization of the reagents in a cellulose support has allowed the development of test strips with good results, but short time of use. This work will focus on the development of long life test strips, using enzymatic stabilizers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ¿QUÉ SON LAS AMINAS BIÓGENAS Y CÓMO SE FORMAN?

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que en su estructura tienen al menos un grupo amino.

Pueden ser sintetizados por células vegetales o animales. Su acción en las plantas se relaciona con el envejecimiento y con el estrés oxidativo. En los animales (Sánchez, 2016) intervienen en la división celular y transmisión nerviosa.

También pueden ser formados por la descarboxilación de proteínas y aminoácidos libres, por acción de determinados microorganismos (*B. cereus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus*, *Lactobacillus*). (Shalaby, 1996)

Atendiendo a su estructura química, pueden agruparse en (Silla, 1996): aminas alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aminas aromáticas (tiramina, feniletilamina) o aminas heterocíclicas (histamina, triptamina).

Este trabajo se va a centrar en la determinación de dos diaminas biógenas, como son la cadaverina y putrescina.

La cadaverina se obtiene por la descarboxilación del aminoácido lisina, cuya reacción es catalizada por la enzima lisina descarboxilasa (Díaz, 2014). La reacción se puede observar en la figura 1.



Figura 1. Reacción para la formación de cadaverina (Ledeam, Rodríguez y Morales, 2012).

La putrescina es producida por la acción de la ornitina descarboxilasa sobre la ornitina, y por la acción de la arginina oxidasas sobre la arginina. (Pegg, 1988). La reacción se puede observar en la figura 2.



Figura 2. Reacción para la formación de putrescina (Ledeam, Rodríguez y Morales, 2012).

1.2. ALIMENTOS IMPLICADOS

La aminas biógenas pueden desarrollarse en una gran cantidad de alimentos. Cabe destacar los alimentos con un alto contenido proteico, lo que se corresponde con una gran cantidad de aminoácidos libres. La cantidad de aminas biógenas depende de múltiples factores relacionados a la materia prima: naturaleza del producto microorganismos que se desarrollen y las condiciones a las que se somete (EFSA, 2011). Con todo ello, las aminas biógenas, afectan a los siguientes productos:

- Los alimentos fermentados y/o madurados: queso curado, productos cárnicos, vino, cerveza (Lonvaud, 2001).
- Alimentos con relativa facilidad para sufrir procesos de descomposición y/o deterioro: pescado y carne (Rawles, Flick y Martin, 1996).
- Alimentos que contienen ciertas cantidades de aminas biógenas preformada: frutos secos, plátano, piña, tomate, espinacas, aguacate... (Pons, 2005).

1.3. MÁXIMOS LEGALES

La Unión Europea tiene fijados los siguientes límites de histamina, en pescado fresco con un alto contenido en histidina: m=100 mg/kg; M=200 mg/kg; n=9; c=2 en el Reglamento (CE) nº 2073/2005. La FDA ha establecido el límite máximo en 50 mg/kg. (Ruiz y Jiménez, 2010). El resto de aminas biógenas no tienen límite legal.

Algunos estudios recalcan la importancia de disponer de límites legales de aminas biológicas. Según el estudio realizado por Ladero et al., 2018, se deberían de adoptar límites de “m” y “M” de 200 y 500 mg de estas bioaminas por kg para alimentos que a menudo tienen altas concentraciones (alimentos fermentados, pescado, carne...).

1.4. EFECTOS TÓXICOS

El organismo del ser humano tiene mecanismos para la eliminación de aminas biógenas a través de las enzimas diaminooxidasa (DAO), monoaminooxidasa (MAO) e histaminometiltransferasa (HNMT) (Callejón, 2016). La capacidad toxica de estas sustancias depende de la ingesta de medicamentos y de la sensibilidad de los consumidores.

En individuos con los sistemas de detoxificación alterados (déficit de MAO) puede producir efectos de evolución crónica: síntomas gastrointestinales, cutáneos, neurológicos, circulatorios. (Bover et al., 2005)

Desde un punto de vista toxicológico, las más estudiadas son histamina y tiramina, sin embargo, el estudio de algunas poliaminas (cadaverina y putrescina) tiene un creciente interés debido a que su presencia potencia la toxicidad de la histamina y tiramina, ya que compiten con DAO (Cebrián, A., 2018). A demás, tienen la capacidad para reaccionar con nitritos y formar nitrosaminas, sustancias potencialmente cancerígenas (Al Bulushi et al., 2009).

1.5. CONTROL INTEGRADO

En la industria alimentaria este peligro químico se controla reduciendo y evitando la multiplicación de los microorganismos asociados a su producción, con la siguientes medidas higiénicas:

- Mantenimiento de la cadena de frío en toda la cadena de producción.
- En el plan de control de materias primas y proveedores se debe de exigir materias primas de calidad (por ejemplo, exigir un grado de frescura del pescado óptimo).
- En el plan de formación de personal se debe de contemplar una manipulación cuidadosa e higiénica de la materia prima.

El uso de las tiras reactivas la determinación de aminas biógenas, en materias primas o en productos finales, podría suponer una medida de verificación extra, de las anteriores descritas. Pueden ser utilizadas como indicativo de calidad y herramienta de seguridad alimentaria.

1.6. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN EXISTENTES

Actualmente existen diferentes procedimientos analíticos para la determinación y cuantificación de aminas biógenas en alimentos. Fundamentalmente son electroquímicos, espectrofotométricos y cromatográficos (Fernández y Álvarez, 2005).

Los métodos cromatográficos son los más utilizados; determinan varias aminas biógenas, de manera simultánea y con mayor precisión, exactitud y especificidad. Dentro de este tipo de técnicas destaca la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector UV-Visible, en el cual hay que realizar una derivatización de la muestra. (Fuentes, Fernández y García, 2017; Baliño, 2016).

En la industria alimentaria, se necesitan métodos rápidos para determinar aminas biógenas de manera fácil y fiable.

En el grupo de investigación de biosensores analíticos de la Universidad de Zaragoza se están desarrollando procedimientos para la determinación de aminas biógenas en alimentos, entre los que se encuentran tiras reactivas basadas en reacciones enzimáticas (Lozano, 2017).

1.7. MÉTODO ENZIMÁTICO

Este trabajo se centra en el desarrollo de tiras reactivas para determinar cadaverina y putrescina basándose en el siguiente esquema de reacción enzimática (Figura 3).

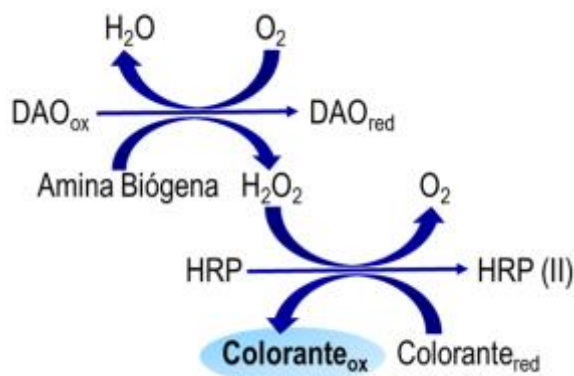


Figura 3. Reacción principal de estudio. (Cebrian, 2018).

En la primera reacción, el oxígeno reacciona con la amina biógena, catalizado por la enzima diamino oxidasa (DAO) produciendo agua y peróxido de hidrógeno.

En la segunda reacción, el peróxido producido reacciona con el colorante, catalizado por la enzima peroxidasa (HRP), generando un cambio de color (al pasar este a una forma oxidada) y produciendo oxígeno. Existen otros subproductos (aldehído y NH_3) generados en estas reacciones, sin embargo no se han señalado en el esquema por simplificar).

Esta metodología se ha estudiado en el grupo de investigación con tres colorantes diferentes: Amplex Red, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y Tetrametilbenzidina (TMB), con buenos resultados (Lozano, 2017; Rivero, 2017; Cebrián, P., 2018).

Para este trabajo se decidió emplear TMB. Este se oxida a TMB^{2+} , el cual genera color a 450 nm (amarillo). Cuando hay exceso de TMB, al pH adecuado, se forma un complejo de transferencia de carga que absorbe a 650 nm (azul) (Rivero, 2017).

1.8. MÉTODO PARA LA MEDICIÓN EN SOPORTE SÓLIDO

Para la construcción de las tiras, los reactivos se deben inmovilizar en un soporte sólido. En trabajos previos se empleó celulosa como soporte permitiendo inmovilizar tanto al colorante (TMB) como las enzimas DAO y HRP.

En cuanto a la forma de medir el color formado en los soportes, se puede hacer visualmente, con una cámara de fotos o mediante un teléfono móvil y una aplicación comercial, para la descomposición del color, en código RGB.

El código RGB se basa en la mezcla de tres colores (rojo-verde-azul) para conseguir toda la gama colores. Cada uno de los colores toma un valor entre 0 y 255 (Roncagliolo, 2007) para cada una de las tres coordenadas.

En este trabajo, sólo se tendrá en cuenta los valores de la coordenada R, ya que en un estudio previo (Cebrián, P., 2018) se pudo observar que la coordenada R es la única que presenta una relación lineal entre señal y concentración.

Esta metodología se ha aplicado a la determinación tanto de H_2O_2 como de cadaverina y putrescina con buenos resultados si bien los soportes tenían un tiempo de vida muy corto, de dos o tres días debido a que las enzimas perdían actividad al estar inmovilizadas. En este trabajo se estudiará si el uso de sustancias empleadas como estabilizadores de enzimas podría mejorar el tiempo de vida de los soportes.

1.9. ESTABILIZADORES ENZIMÁTICOS

Se estudiará el efecto de algunos estabilizantes comerciales de enzimas como: StabilCoat Immuniassay Stabilizer, StabilGuard Immunoassay Stabilizer, StabilZyme Select Stabilizer y StabilZyme Protein-Free. Además se estudiará el efecto de otras sustancias como sacarosa y gelatina (Silvia, 2018).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha comentado en la introducción, para la industria alimentaria y para la administración sería muy interesante el disponer de métodos rápidos para el control de aminos biógenos en alimentos. Este trabajo se orienta a la elaboración de tiras reactivas capaces de medir, de manera rápida y eficiente la cantidad de aminos biógenos presentes en los productos de la industria alimentaria.

El objetivo principal de este trabajo es mejorar el procedimiento de fabricación de las tiras para alargar su periodo de vida útil, usando para ello, distintos estabilizadores enzimáticos. Este se puede concretar con los siguientes subobjetivos:

- Comprobación de los resultados obtenidos por el grupo de Biosensores Analíticos en disolución, usando para ello espectroscopía de absorción molecular UV-Vis:
 - Estudio de la reacción HRP-TMB- H_2O_2 .
 - Estudio de la reacción HRP-TMB-DAO-Aminas.
- Estudio de la influencia de los estabilizadores en disolución, usando para ello espectroscopía de absorción molecular UV-Vis:
 - Estudio de la reacción HRP-TMB- H_2O_2 -Estabilizadores.
 - Estudio de la reacción HRP-TMB-DAO-Aminas-Estabilizadores.

- Estudio del soporte de celulosa en el que se van a inmovilizar los reactivos: tipo, condiciones de secado, concentración, etc.
- Estudio de cantidades de reactivos inmovilizados en el soporte: HRP, TMB, DAO, estabilizadores.
- Estudio de la influencia del tiempo, en función de los estabilizadores añadidos.
- Realización de las correspondientes rectas de calibrado estableciendo los parámetros analíticos.

3. MATERIAL Y METODOLOGÍA

3.1. MATERIAL

Instrumentos utilizados:

- pH-metro CRISON, Basic 20
- Teléfono móvil Xiaomi mi A1, con una cámara integrada de 12 Megapíxeles y sistema operativo Android 9.0 con aplicación Color Grab®, del equipo Loomatix, capaz de recoger, capturar y reconocer colores en código RGB
- Espectrofotómetro de absorción molecular de fotodiodos UV-vis Agilent 8453A, con lámpara de deuterio

En el desarrollo del método experimental, se utilizaron los siguientes materiales:

- Balanza analítica de precisión. GR-202-EC de precisión $\pm 0,01$ mg
- Agitador magnético
- Micropipetas de volumen variable (5-50 μ L, 10-100 μ L y 100-100 μ L)
- Material desechables: eppendorf, tubos falcon, puntas de micropipetas...
- Cubeta de vidrio de 1cm de paso óptico
- Vasos de precipitado
- Placas de pocillos
- Filtro óptico
- Incubadora OVAN modelo OM10E

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

(Las disoluciones utilizadas se prepararon en el mismo día de su utilización).

- Estabilizantes:
 - o Sacarosa. ~99%, (Sigma-Aldrich 102019112), (342,30 g/mol). Se pesó una cantidad aproximada de 2 mg de sacarosa, y se prepararon las disoluciones oportunas disolviendo en tampón.
 - o Gelatina. ~98%, (Sigma-Aldrich 48723). Se pesó una cantidad aproximada de 2 mg de gelatina, y se prepararon las disoluciones oportunas disolviendo en tampón.
 - o StabilCoat Immuniassay Stabilizer. Surmodics. Product (SCIS) N° SG01-0050
 - o StabilGuard Immunoassay Stabilizer. Product (SGIS) N° SC01-0050.
 - o StabilZyme Select Stabilizer. Product (SZSS) N° SZ03-CF02-00508.
 - o StabilZyme Protein-Free. Product (SZPF) N° SZPF-CF01-0050.
- En el caso de la gelatina y sacarosa, se pesaron las cantidades estimadas y se disolvió en la disolución tampón. Con el resto de estabilizadores líquidos, se midieron los volúmenes oportunos y se disolvieron en la disolución tampón.
- Putrescina (Putrescine Dihydrochloride) ~98%, (Sigma-Aldrich P7505), (161,07 g/mol). Se pesó una cantidad aproximada de 2 mg de cadaverina, y se prepararon las disoluciones oportunas disolviendo en tampón.
- Cadaverina (Cadaverine Dihydrochloride) ~98%, (Sigma-Aldrich C8561), (175,10 g/mol). Se pesó una cantidad aproximada de 2 mg de cadaverina, y se prepararon las disoluciones oportunas disolviendo en tampón.
- Peroxidasa de rábano (146 U/mg), (Sigma-Aldrich EC 1.11.1.7). Las disoluciones se prepararon por dilución de una disolución concentrada, preparada anteriormente, disolviendo en tampón.
- Diamino oxidasa de Lathirus cicera (150 U/mL), (Molirom EC 1.4.3.22). Se realizaron las disoluciones oportunas, con la disolución tampón, y se trabajaran con estas disoluciones directamente.
- Celulosa. Se trabajó con celulosa microcristalina de 20 µm, elaboradas por el propio departamento.
- Ácido clorhídrico (35-38%). Disolución 1 M, preparada a partir de la disolución concentrada.

- Hidróxido de sodio (40 g/mol). Su disolución, NaOH 1 M, fue preparada a partir del compuesto sólido.
- Peróxido de hidrógeno, H₂O₂ (Panreac 131077.1211). Las disoluciones de se prepararon por dilución de la anterior en disolución amortiguadora pH=6
- Tampón H₂PO₄⁻ /HPO₄²⁻, pH=6.0 y pH=7, preparado a partir de NaH₂PO₄· H₂O. La disolución tamponada fue preparada a partir de la sal NaH₂PO₄·H₂O (Panreac 131679.1211) y disolviéndolos en 200 mL de agua mili Q. El ajuste del pH se realizó mediante disoluciones HCl y NaOH 1 M hasta el pH indicado.
- Disolución de colorante TMB (Tetrametilbenzidina) ≥ 98%,(Sigma-Aldrich 860336), (240,35 g/mol). Las disoluciones se prepararon por dilución de una disolución concentrada, disolviéndose en dimetil sulfóxido,
- Muestra de atún aportada por el Laboratorio de Salud Pública de Aragón (LSPA) con concentración conocida de 6 aminas biógenas según el método validado de HPLC-MS. En resumen 2,5 gramos de atún se trataron y diluyeron con 50 mL de una disolución al 5 % de tricloroacético. Esta muestra se diluyó posteriormente 1/3, con la disolución tampón pH=7, para las medidas de este trabajo.

3.2. METODOLOGÍA

Este trabajo está dividido en dos partes:

- Primero se estudiaron las reacciones en disolución para comprender como afectaban los diferentes reactivos, y sus concentraciones, a la señal producida..
- La segunda parte consiste en el estudio de estos reactivos en el soporte de celulosa. Se estudió la interacción entre los mismos y las señales que proporcionaba con distintas concentraciones de aminas biógenas.

3.2.1. Medidas en disolución

Para las medidas en disolución se utilizó un espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis de diodos en línea, el cual permite medidas cinéticas. Se mide la variación de absorbancia durante la reacción enzimática a la longitud de onda adecuada (450 ó 650 nm.) tomando medidas cada 5 segundos.

En una cubeta de medida se coloca la disolución tampón $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ a pH=6.0, que hace de blanco de medida, y se añaden los siguientes reactivos:

- HRP y TMB si se quiere determinar H_2O_2
- HRP, TMB y DAO si se quieren determinar aminos

Cuando la señal es estable, se añade el analito y se registra el aumento de absorbancia debido a la formación de la especie oxidada del TMB. El volumen final en la cubeta de vidrio de 1cm de paso óptico utilizada, son 2 mL. Como el colorante es inestable fotoquímicamente, se debe colocar un filtro que elimine la radiación ultravioleta.

3.2.2. Medidas en soporte de celulosa

3.2.2.1. Construcción de los soportes reactivos

Sobre una dispersión de celulosa, que hace de soporte de medida, se añaden los reactivos necesarios:

- HRP y TMB tanto para determinar H_2O_2 como aminos biógenos
- En el caso del estudio de los estabilizadores, estos se deben de inyectar en la concentración a estudiar (menos de un 10%).

Esta dispersión se inyecta en los pocillos de la placa que hace de molde (se inyectan 75 μL por pocillo). En la figura 4 se muestra una placa preparada para el secado. A continuación se seca la placa a 37 °C durante una hora y media. Cuando la placa está seca, se inyectan 10 μL de DAO, si se quieren determinar aminos, para determinar H_2O_2 esto no será necesario.

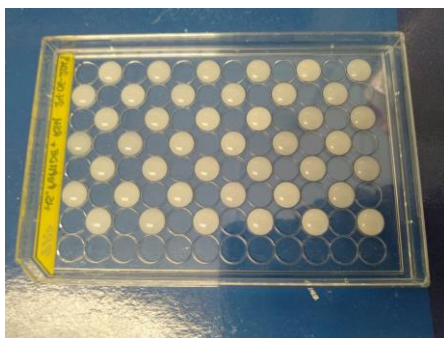


Figura 4. Ejemplo de una placa lista para secado.

3.2.2.2. Medida del analito

Después se inyectan 10 μL del analito a determinar y cuando el color formado es estable (generación del color) se registra la coordenada de cada pocillo. Para la obtención de la señal se debe de realizar una primera medida al pocillo (R_0) y restarle el valor medido al inyectar el analito (R_i). Esta diferencia será la señal de cada medida.

Para la medición de las placas se utilizó la cámara de fotos del teléfono móvil, Xiaomi mi A1, el cual se coloca, por medio de una pinza, a 10 centímetros de la placa, tal y como se muestra en la figura 5. En esta figura se puede observar la placa con los soportes reactivos ya secos (para la construcción de las tiras, dichos soportes se deben de pegar en una tira de plástico). Se utilizó la aplicación Color Grab®, del equipo Loomatix.



Figura 5. Dispositivo utilizado para la toma de medida

La placa se sitúa sobre una superficie de color blanco, de modo que no influyese en la medida obtenida. Para la medición de sucesivos pocillos, se desplaza la placa con respecto al móvil. El dispositivo se localizó en el mismo lugar durante todo el estudio. La luz siempre permanecía encendida, sin que pudiera producir ningún tipo de reflejo. De este modo, no se cambió las condiciones de luz ajenas al método.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera parte del trabajo se centró en el estudio de las reacciones en disolución. El objetivo era doble. Primero conocer todas las variables que podían afectar al procedimiento y por otro aprender a manejar adecuadamente el material, y sobre todo las enzimas, para poder conseguir medidas reproducibles.

4.1. ESTUDIO DE REACCIÓN EN DISOLUCIÓN: HRP+TMB+H₂O₂

En la figura 6 se puede observar, a modo de ejemplo, como se obtiene la absorbancia producida por una concentración de H₂O₂ de $3 \cdot 10^{-6}$ M.

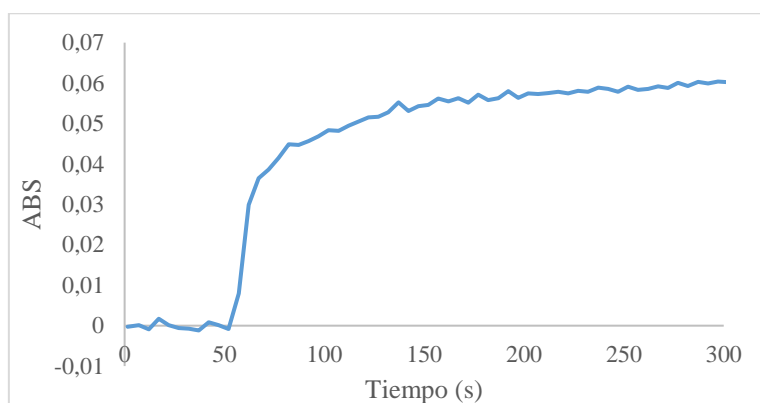


Figura 6. Ejemplo cinética de reacción de H₂O₂. [H₂O₂]= $3 \cdot 10^{-6}$ M, [TMB]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]= 0,6 U/mL, pH=6, λ =650 nm.

Primero se inyecta en la cubeta una disolución formada por TMB, HRP y el tampón de fosfato, a pH 6. A continuación se mide la absorbancia, a 650 nm durante 50 segundos para obtener la línea base de la medida. A los 50 segundos se inyecta el analito, en este caso la concentración de H₂O₂ de $3 \cdot 10^{-6}$ M. Cuando la medida se estabilice, se toma el valor correspondiente al máximo de absorbancia.

La señal del analito corresponde a la diferencia entre el valor del máximo de absorbancia con el valor de la línea base. Se estudiaron las condiciones ideales de la reacción para obtener una variación de absorbancia estable en el tiempo. Se estudió la influencia de TMB y HRP.

4.1.2. Optimización TMB

Para optimizar la concentración de TMB, se optó por mantener constante la concentración de HRP (2 u/ml) y de H₂O₂ ($2 \cdot 10^{-6}$ M). Se modificó la concentración de TMB en relación a la concentración de H₂O₂, desde 1:1 a 100:1. Se utilizó un tampón de fosfato a pH 6.

En la figura 7 se muestran los espectros recogidos en el espectro visible (400 - 800 nm).

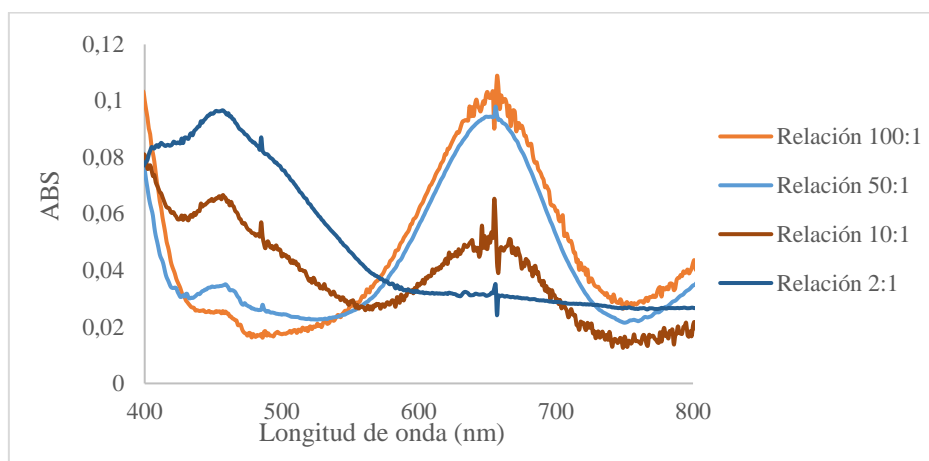


Figura 7. Espectros entre 400 y 800 nm estudiados en relación a la concentración TMB:H₂O₂. [HRP]=2 U/mL, [H₂O₂]=2·10⁻⁶ M, pH=6.

Se puede observar cómo a medida que aumenta la relación TMB:H₂O₂ el espectro varía, de forma que disminuye la absorbancia a la longitud de onda a 450 nm (color amarillo) y aumenta la absorbancia a 650 nm (color azul). Esto es debido a que a bajas concentraciones de TMB, este se oxida todo, y no hay TMB sin oxidar, por lo que no se puede formar el complejo y producir color azul, tal y como se ha explicado en la introducción.

De la gráfica anterior, se seleccionaron las máximas longitudes de onda correspondientes al color azul (longitud de onda=650 nm) y al color amarillo (longitud de onda=450 nm). Estos datos se pueden observar en la figura 8.

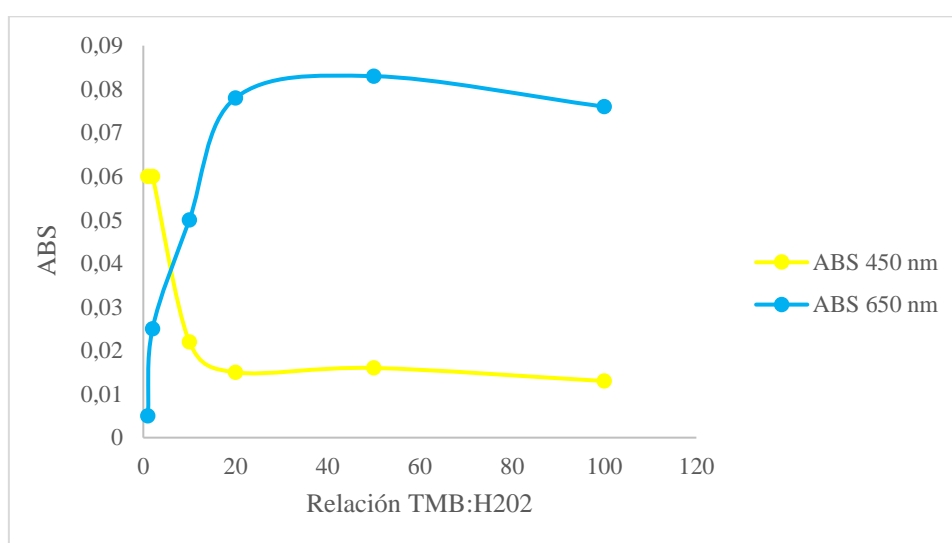


Figura 8. Representación de los espectros máximos a 450 nm y 650 nm, en función de la relación TMB:H₂O₂. [HRP]=2 U/mL, [H₂O₂]=2·10⁻⁶ M, pH=6.

Cómo se puede observar, a partir de la relación TMB 10: H₂O₂ 1 los colores de la reacción se invierten, ya que para obtener un color azul estable se necesita un exceso de TMB con respecto a la cantidad de H₂O₂. Es por ello que se decidió trabajar a concentraciones superiores ($2 \cdot 10^{-5}$ M). Se decidió trabajar en concentraciones cercanas a la relación 20: 1 (TMB: H₂O₂), ya que, como se puede observar en la figura 8, en este punto se encuentra el máximo de señal.

4.1.3. Optimización HRP

Una vez elegida esta concentración de TMB, se optimizó la concentración de HRP, manteniendo las condiciones antes descritas. Se varió la concentración de HRP, desde 0,1 u/ml hasta 2,0 u/ml. Se midió a una longitud de onda de 650 nm, a partir de 50 segundos. Los resultados se pueden observar en la figura 9.

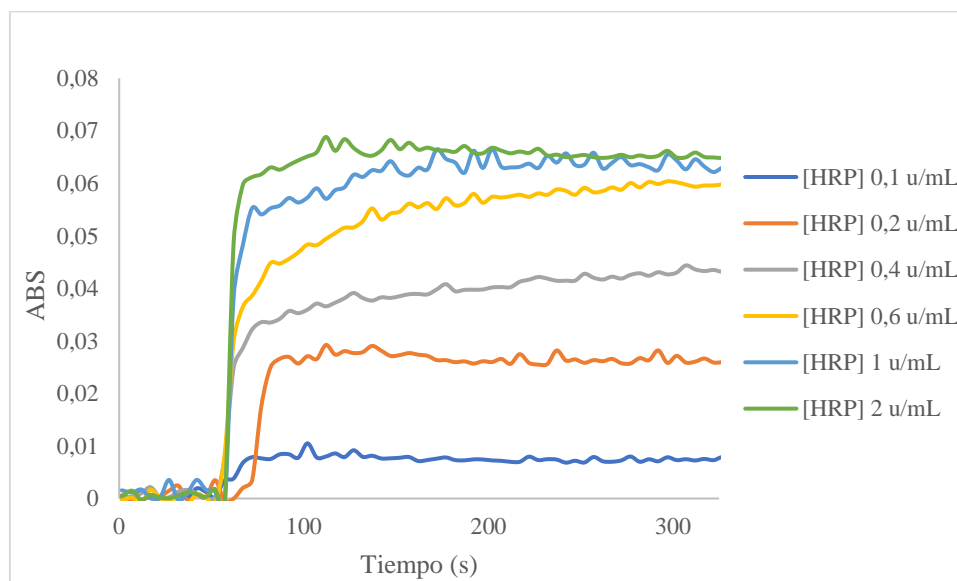


Figura 9. Cinética de reacción en función de la concentración de HRP. [TMB]= $2 \cdot 10^{-5}$ M, [H₂O₂]= $2 \cdot 10^{-6}$ M, pH=6, λ =650 nm

Cómo se puede observar en la figura 8, a medida que aumentamos la concentración de HRP, la cinética de la reacción aumenta de manera proporcional, haciendo que la señal se estabilice en un periodo de tiempo menor. A partir de 0.2 U/mL no influye en la cinética.

Se calcularon las diferencias entre la máxima absorbancia y la línea base, para cada una de las concentraciones de HRP utilizadas, elaborándose la figura 10.

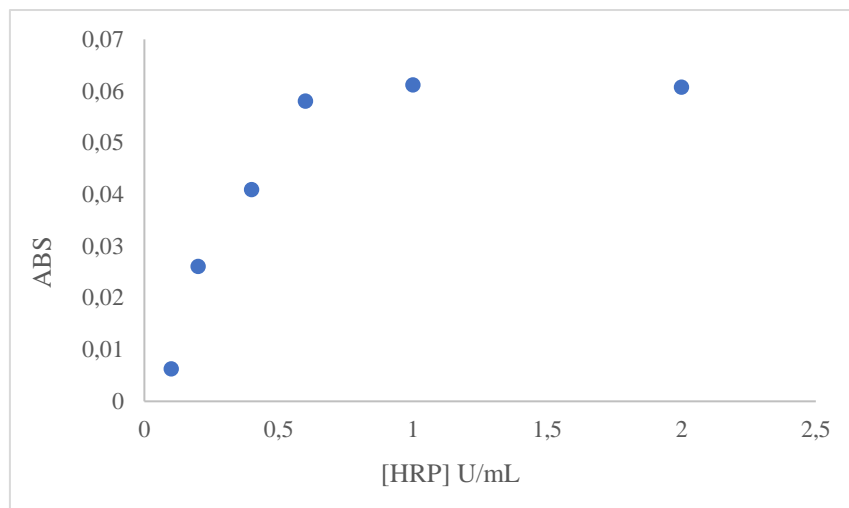


Figura 10. Optimización HRP. [TMB]= $2 \cdot 10^{-5}$ M, $[H_2O_2]=2 \cdot 10^{-6}$ M, pH=6, $\lambda=650$ nm.

Como se puede observar, se obtiene un máximo de variación de absorbancia a partir de 0,6 U/mL de HRP.

4.2. RECTA DE CALIBRACIÓN DE H_2O_2

Una vez estudiadas las mejores condiciones de HRP y TMB se procedió a realizar calibración de H_2O_2 . Las señales se muestran en la figura 11. La representación de las diferencias de absorbancias frente a la concentración de H_2O_2 medidas a 650 nm fueron tomadas al mismo tiempo (50 segundos).

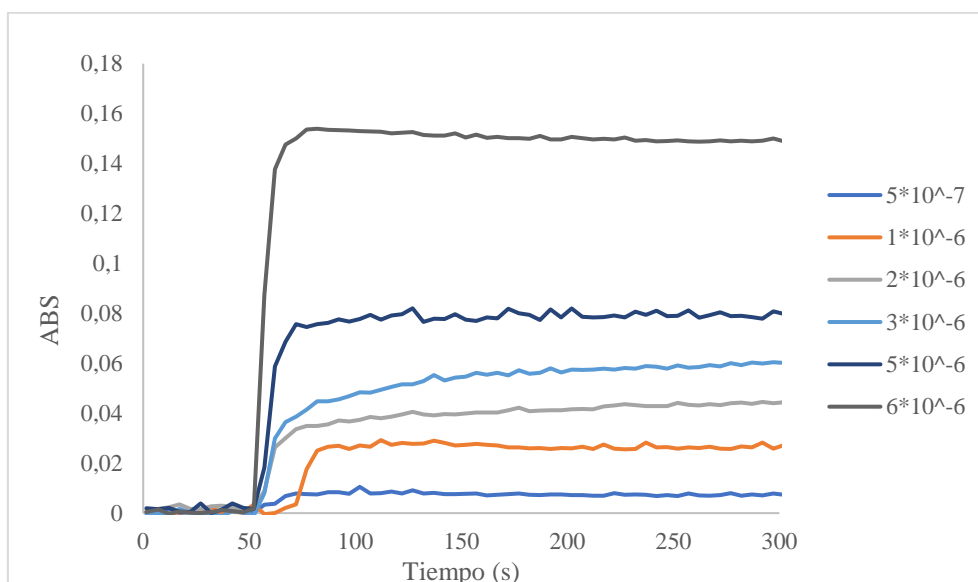


Figura 11. Cinética de reacción en función de la concentración de H_2O_2 . [TMB]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]= 0,6 U/mL, pH=6, $\lambda=650$ nm, n=2.

La recta de calibrado se puede observar en la figura 12. El rango lineal se obtuvo entre las concentraciones $5 \cdot 10^{-7}$ y $6 \cdot 10^{-6}$ M. En cuanto a la repetitividad, se obtuvo para una concentración de $2 \cdot 10^{-6}$ M de H_2O_2 , una desviación estándar relativa (DER) de 8% (n=5).

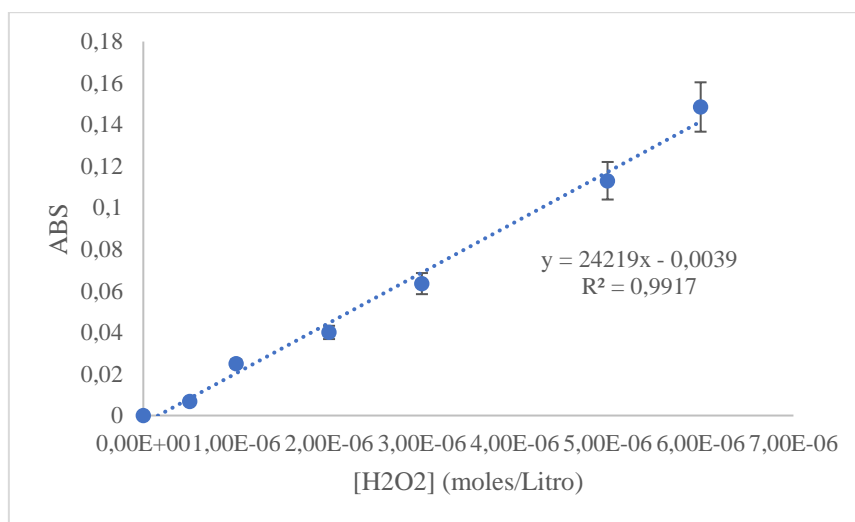


Figura 12. Recta de calibración para H_2O_2 . $[\text{TMB}] = 1 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{HRP}] = 0,6$ U/mL, pH=6, $\lambda = 650$ nm, n=2.

El siguiente paso fue sustituir el H_2O_2 comercial por el formado en la reacción de las aminas biógenas con DAO.

4.3. ESTUDIO DE REACCIÓN EN DISOLUCIÓN: HRP+TMB+DAO+AMINAS BIÓGENAS

En la figura 13 se puede observar, a modo de ejemplo, como se obtiene la absorbancia producida por una concentración de putrescina de $5 \cdot 10^{-4}$ M.

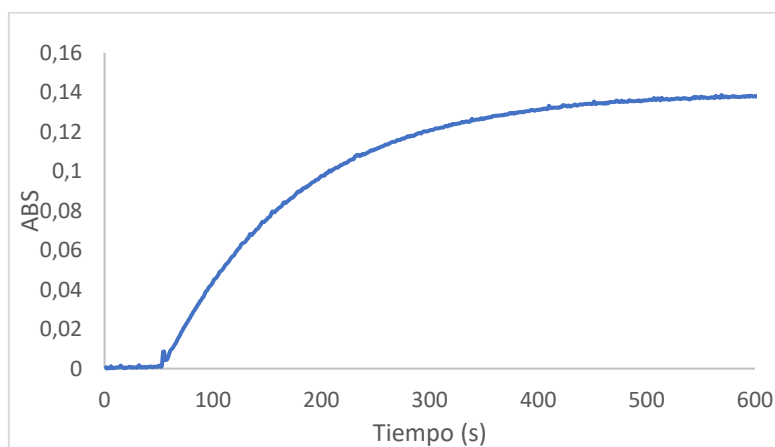


Figura 13. Ejemplo de cinética de reacción de putrescina. $[\text{TMB}] = 1 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{HRP}] = 0,2$ U/ML, $[\text{DAO}] = 1,8$ U/ML, $[\text{putrescina}] = 5 \cdot 10^{-4}$ M, Ph=6, $\lambda = 650$ nm.

Se procede de manera idéntica a las medidas realizadas con H_2O_2 . Como se puede observar la señal tarda más, en estabilizarse, a la hora de analizar aminas biógenas que a la hora de analizar H_2O_2 . Esto es debido a la doble reacción enzimática producida en el caso de la putrescina.

Para el estudio de aminas biógenas, se decidió trabajar con putrescina. Se realizó una calibración de putrescina entre $6,25 \cdot 10^{-6}$ y $4 \cdot 10^{-5}$ M. Se trabajó con una concentración de DAO de 1,8 U/mL (se añadió esta cantidad por los estudios previos realizados por el grupo Analítico de Biosensores) y una concentración de TMB $1 \cdot 10^{-4}$. Como se puede observar la señal aumenta con la concentración de putrescina. Se trabajó a una longitud de onda de 650 nm.

En la figura 14 se muestra dicha recta de calibrado, elaborada a partir de las diferencias de absorbancias entre los máximos de absorbancia y la línea base, para cada una de las concentraciones. En cuanto a la repetitividad, se obtuvo para una concentración de $8 \cdot 10^{-6}$ M de putrescina, una desviación estándar relativa (DER) de 4% (n=6). Se obtuvo un rango lineal situado entre $6,25 \cdot 10^{-6}$ y $1 \cdot 10^{-5}$ M.

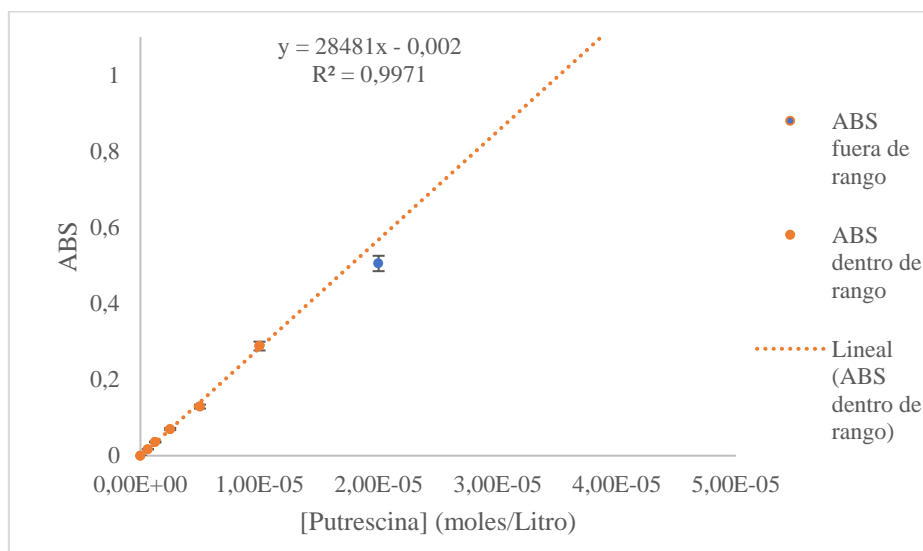


Figura 14. Recta de calibración para putrescina. [TMB]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,2 U/mL, [DAO]=1,8 U/mL, pH=6, λ =650 nm, n=3.

Uno de los objetivos del trabajo es estudiar si el uso de los estabilizadores mejora el tiempo de vida de los sopores de celulosa sensibles a aminas. Por ello se estudió primero si dichos estabilizadores tenían alguna influencia en las reacciones en disolución.

4.4. ESTUDIO DE LOS ESTABILIZADORES EN DISOLUCIÓN

Para ello se añadieron en proporciones de 1% y 5 % de los estabilizadores descritos en el apartado 3.1. Material , utilizando para ello las mejores condiciones estudiadas hasta el momento.

Se preparó una disolución, sin estabilizadores, para comparar la señal producida, con la posible interferencia que pudiera ocasionar la concentración de los estabilizadores estudiados. Para este estudio se eligió una concentración de putrescina de $1 \cdot 10^{-5}$ M. Se midió a 650 nm, durante 600 segundos. Los resultados se pueden observar en la figuras 15 y 16.

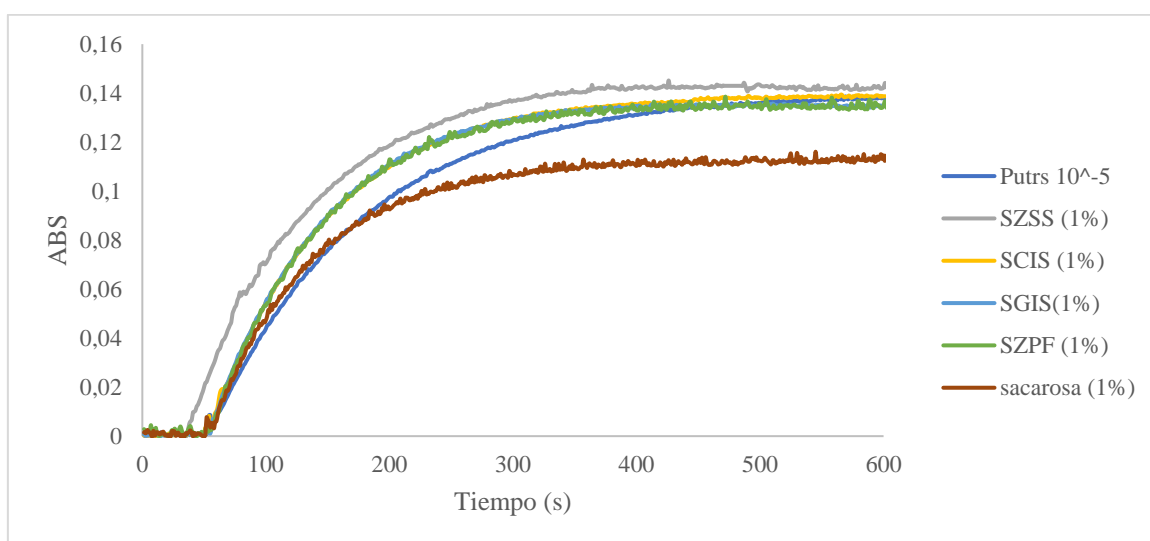


Figura 15. Estudio estabilizadores a concentración 1%. [TMB]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,2 U/mL, [DAO]=1,8 U/mL, [putrescina]= $5 \cdot 10^{-4}$ M, pH=6, λ =650 nm.

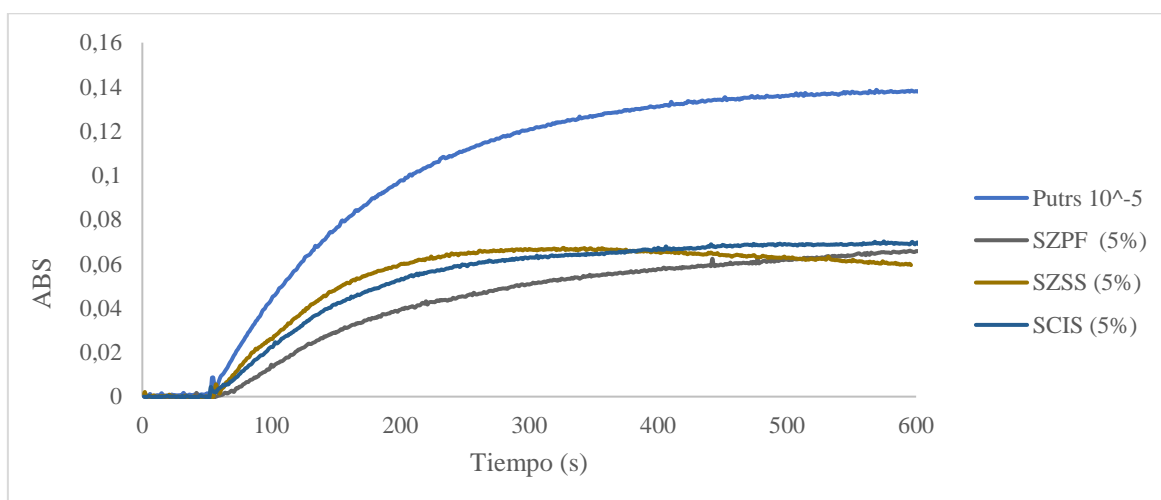


Figura 16. Estudio estabilizadores a concentraciones 5%. [TMB]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,2 U/mL, [DAO]=1,8 U/mL, [putrescina]= $5 \cdot 10^{-4}$ M, pH=6, λ =650 nm.

En la figuras 15 y 16 se puede observar como el máximo de absorbancia presentado por la disolución sin estabilizadores es de 0,14 unidades absorbancia.

Se comenzó estudiando todos los estabilizantes a la concentración 1 %. Como se puede observar en la figura 15.

- Los estabilizantes SZPF, SCIS y SGIS produjeron una señal semejante a la disolución de referencia, sin embargo la señal se estabilizaba en un tiempo más breve que esta.
- La sacarosa disminuyó bastante la señal generada, llegando a dar una señal de 0,11 unidades de absorbancia. Atendiendo a esto resultados, se decidió no aumentar la cantidad de sacarosa.
- Los resultados de la gelatina no fueron satisfactorios. No se observó señal, y debido a la elevada turbidez de la disolución, había mucha dispersión de radiación. La gelatina impedía la agitación producida por el núcleo magnético. Es por ello que se decidió no trabajar a concentraciones más elevadas.

En la figura 16 se puede observar cómo los estabilizantes SZPF, SCIS y SZSS, al 5%, generaban una señal inferior, dando valores que se situaban en torno al 0,065 unidades de absorbancia. Con el estabilizante SZSS se observa que las señal tiene tendencia a descender. En base a estos resultados se decidió no trabajar a concentraciones superiores.

Con esto se puede concluir que con los estabilizadores se obtiene señal, si bien al aumentar la concentración de los mismos se disminuye la cinética de la reacción, al igual que la variación de absorbancia. Es por ello que, en las futuras experiencias, se utilizará en bajas concentraciones en el soporte sólido.

4.5. CONSTRUCCIÓN Y ESTUDIO DEL SOPORTE SÓLIDO

Tras el estudio de la reacción en disolución, se estudió inmovilizar los reactivos en un soporte sólido. Se trabajó con celulosa microcristalina de 20 μm , paralelamente a este trabajo se estaban estudiando diferentes tipos de celulosa y esta fue la que mejores resultados estaba dando.

4.5.1. Estudio influencia de porcentaje de la celulosa

Se estudió la influencia l porcentaje de celulosa en la intensidad de la señal. Para ello se prepararon distintos viales con una 2,5; 5; 7,5 y 10% de celulosa. En esta dispersión se introducían los reactivos.

Para cada uno de los viales se utilizaron una concentración óptimas del estudio en disolución, es decir, 0,60 U/mL de HRP y una concentración de TMB de $6 \cdot 10^{-4}$ M (esta concentración tan elevada de TMB es debida a que el colorante tiene que estar en exceso, con lo que se adiciono la máxima cantidad posible que nos permite su solubilidad).

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos, desde la concentración más baja de celulosa (2,5 % a la izquierda de la serie) a la concentración más elevada (10 % a la derecha de la misma).

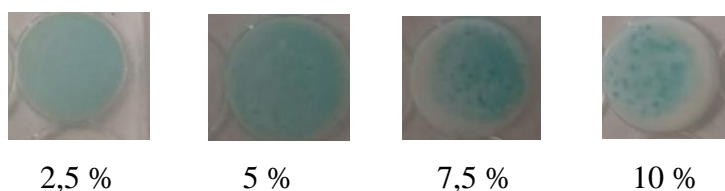


Figura 17. Imágenes de los pocillos del estudio de la influencia de la concentración de celulosa . [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [H₂O₂]= $6 \cdot 10^{-5}$ M, pH=6

Para la formación de la señal se utilizó una concentración de H₂O₂ de $6 \cdot 10^{-5}$ M. Se midió la variación de la coordenada R con el dispositivo móvil, según se ha comentado en metodología. Con estas condiciones se obtuvo los resultados de la tabla 1.

% Celulosa	2,5	5	7,5	10
Señal R ₀ -R _i	46,67	40,33	18,67	16,33

Tabla 1. Estudio de la influencia de la concentración de celulosa. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [H₂O₂]= $6 \cdot 10^{-5}$ M, pH=6, n=3.

Como se puede observar la señal producida descende a partir del 5% de celulosa, probablemente debido a que con cantidades superiores existe demasiada rigidez en el soporte. La señal es, a su vez, menos uniforme a medida que aumenta la concentración de la celulosa. Así mismo, se puede observar cómo se genera un cerco alrededor del pocillo a medida que aumenta la concentración.

Se decidió trabajar a porcentajes inferiores al 5%, más concretamente al 3%, ya que presenta una buena señal, se pipetea de manera sencilla y el pocillo queda homogéneo en toda su extensión.

4.5.2. Recta de calibración H_2O_2

Con estas condiciones se estudió si existe relación lineal entre la señal y la concentración de H_2O_2 . La señal representada se corresponde a los valores obtenidos de la coordenada R del código RGB. A cada medida obtenida se le restó el blanco obtenido por el tampón de fosfatos utilizado.

En la figura 18 se puede observar cómo quedan coloreados los pocillos tras la adición del H_2O_2 .



Figura 18. Placa con la recta de calibración. $[\text{TMB}] = 6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{HRP}] = 0,6 \text{ U/mL}$,
 $[\text{Cel}] = 3\%$, $\text{pH} = 6$

A la izquierda de la imagen se dispone el pocillo en el cual se ha inyectado el tampón, es decir, el blanco de la disolución. A medida que avanzamos hacia la derecha de la imagen podemos ver como aumenta la coloración de los soportes, debido al aumento de concentración de H_2O_2 inyectado.

La recta de calibrado se representa en la figura 19. En cuanto a la repetitividad, se obtuvo para una concentración de $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de H_2O_2 , una desviación estándar relativa (DER) de 3,2 % ($n=4$). Se realizaron tres medidas por cada una de las concentraciones de H_2O_2 .

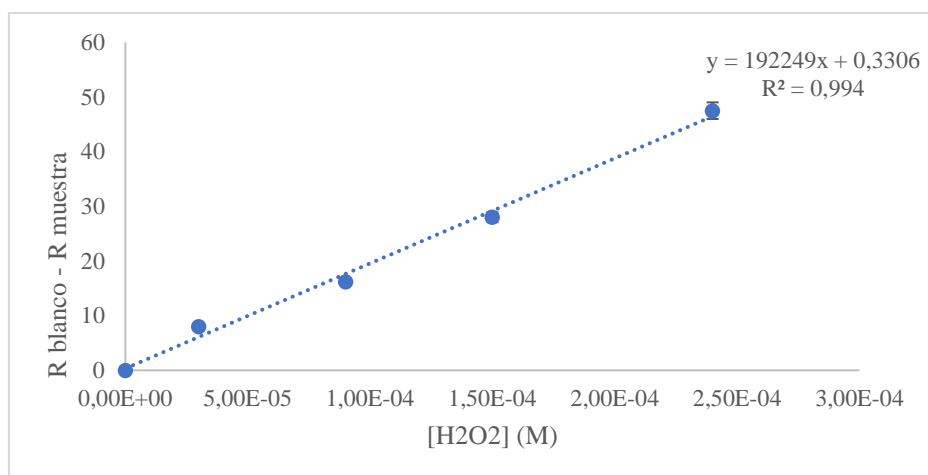


Figura 19. Recta de calibración de H₂O₂. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [Cel]= 3%, pH=6, n=3.

Se pudo comprobar, con esta experiencia, que existe una relación lineal entre la coordenada R y la concentración de H₂O₂. El rango lineal de esta recta se encuentra entre las concentraciones $3 \cdot 10^{-5}$ y $2,4 \cdot 10^{-4}$ M.

4.6. INMOVILIZACIÓN DE LA DAO

El siguiente paso fue inmovilizar la DAO en el soporte de celulosa para hacerlos reactivos a las aminas biógenas. Se estudió la influencia del momento de inyección y la cantidad de la DAO. Se estudió la señal producida por la DAO al adicionarla antes del secado, junto con la mezcla de los reactivos necesarios, o después del secado, una vez que el soporte está hecho.

Para cada una de las experiencias se destinaron tres pocillos, uno para cada concentración de DAO adicionada (0,25; 0,5 y 1 U/pocillo). Para producir la señal, se adicionó $1 \cdot 10^{-4}$ M de putrescina. Las medidas se tomaron durante 3 minutos. En ninguno de los casos se apreció color visualmente. En la tabla 2, se pueden observar los resultados de las medidas con el teléfono de los pocillos en los que se adicionó la DAO antes de su secado.

DAO (U /pocillo)/ Tiempo (s)	30	60	120	180
0,25	4	6	7	7
0,5	7	9	10	12
1	9	11	12	13

Tabla 2. Estudio de la intensidad de señal en el tiempo, en función de la [DAO], adicionada antes del secado. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [putrescina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [Cel]= 3%, pH=7

Como se puede observar, la señal producida es muy baja, incluso con la cantidad más alta de DAO, probablemente debido a que la DAO pierde actividad durante la inmovilización.

Esta placa se guardó en un lugar seco, observándose que la señal se producía a los 10 minutos. Es por ello que se decidió adicionar después del secado, pues este método debe de ser rápido y generar señal en menos de dos minutos.

En la figura 20 se puede observar la señal obtenida por los tres pocillos, con distintas concentraciones de DAO, adicionándose después del secado.

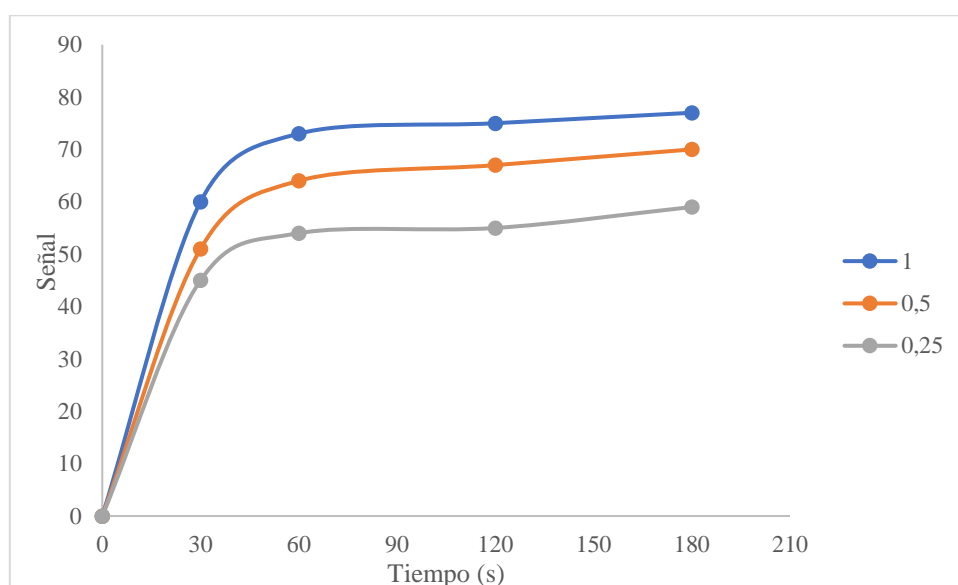


Figura 20. Estudio de la intensidad de señal en el tiempo, en función de la [DAO], adicionada después del secado. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [putrescina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [Cel]= 3%, pH=7.

Con las tres concentraciones de DAO se obtiene señal. A partir del segundo 60, la reacción se estabiliza, dando, en los tres casos, una señal estable y bastante alta. Para la continuidad de este estudio, se eligió la cantidad más pequeña de DAO (0,25 unidades/soporte) para reducir el gasto de reactivo.

Puesto que la reacción se estabiliza a partir del segundo 60, en lo que resta del estudio, las medidas se tomarán a este tiempo.

4.7. CALIBRACIÓN DE PUTRESCINA Y CADAVERINA

Para ver si había dependencia lineal con la concentración se realizó una calibración de putrescina en la mejores condiciones obtenidas. De este modo, se obtuvo la figura 21. El rango lineal obtenido fue desde $2 \cdot 10^{-5}$ M hasta $4 \cdot 10^{-4}$ M. En cuanto a la repetitividad, se obtuvo para una concentración de $2 \cdot 10^{-4}$ M de putrescina, una desviación estándar relativa (DER) de 3,9 % (n=6).

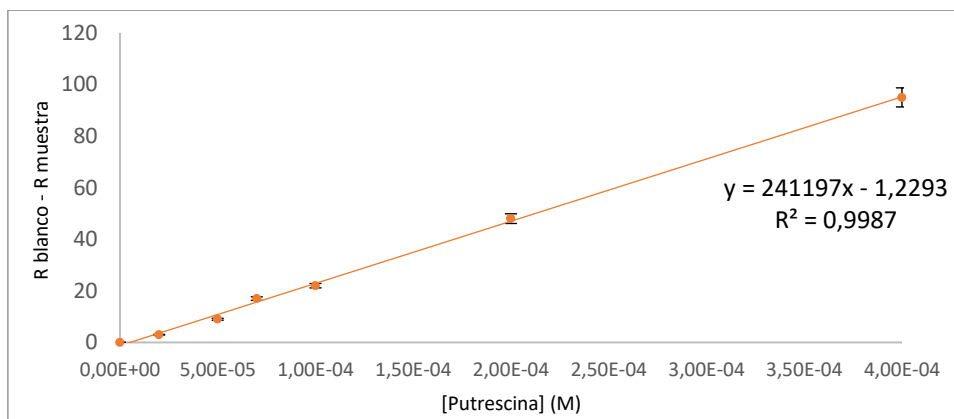


Figura 21. Recta de calibración de putrescina. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [DAO]=0,2 U/soporte [Cel]= 3%, pH=7, n=2

Puesto que se pretende determinar putrescina y cadaverina con los soportes desarrollados, se realizó una calibración de cadaverina para comprobar si generaba una recta de calibrado de pendiente similar. Se trabajó con las mismas concentraciones, en las mejores condiciones estudiadas, y se obtuvo la figura 22. En cuanto a la repetitividad, se obtuvo para una concentración de $2 \cdot 10^{-4}$ M de cadaverina, una desviación estándar relativa (DER) de 4,6 % (n=6).

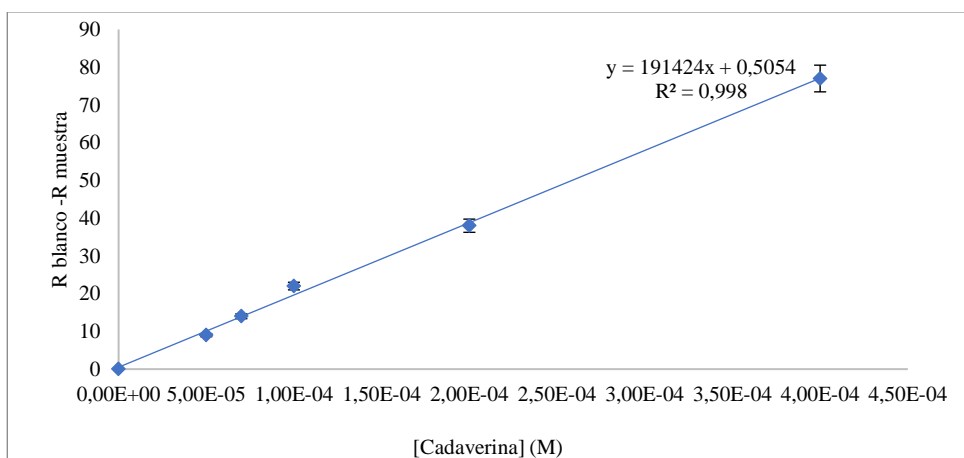


Figura 22. Recta de calibración de cadaverina. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [DAO]=0,2 U/soporte [Cel]= 3%, pH=7, n=2.

Se realizó una comparación estadística de las pendientes (ANEXO I) y se comprobó que existían diferencias significativas entre ambas rectas, por lo que se decidió realizar una calibración de una mezcla de cadaverina y putrescina, relación 50:50 molar, que permitiría la estimación de ambas en una muestra real.

Para ello se prepararon distintos viales con una mezcla al 50% molar de cadaverina y putrescina. Se prepararon 4 disoluciones entre las concentraciones $2 \cdot 10^{-5}$ M y $1 \cdot 10^{-4}$ M, lo que corresponde al rango lineal la recta de calibración. La calibración se puede observar en la figura 23. El rango lineal obtenido fue desde $2 \cdot 10^{-5}$ M hasta $1 \cdot 10^{-4}$ M. En cuanto a la repetitividad, se obtuvo para una concentración de $1 \cdot 10^{-4}$ M de putrescina y cadaverina (relación 50:50), una desviación estándar relativa (DER) de 5,8 % (n=4).

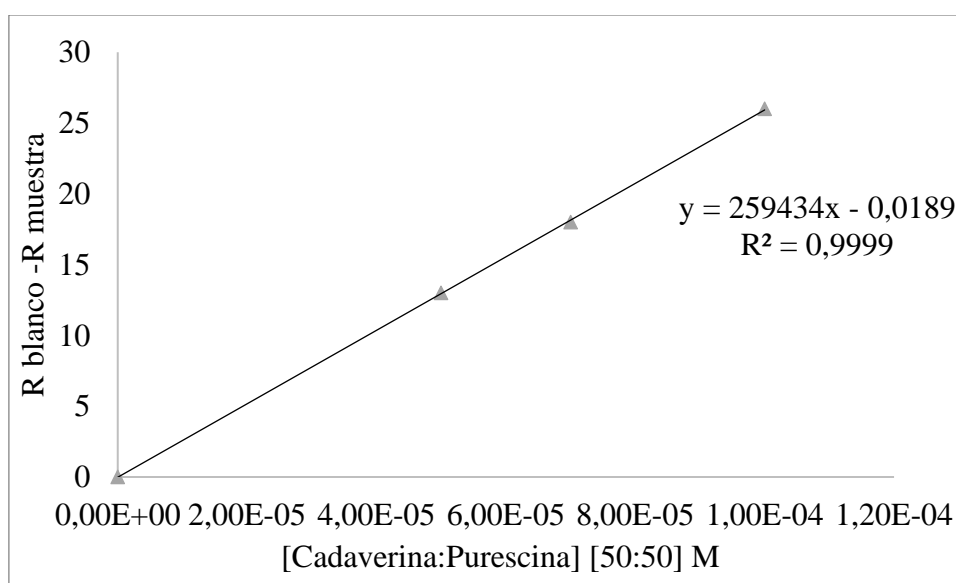


Figura 23. Recta de calibración de intermedia [cadaverina 50:putrescina 50] . [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [DAO]=0,2 U/soporte, [Cel]= 3%, pH=7.

En esta figura se puede observar como la recta intermedia obtenida, se sitúa en el medio de las recta de cadaverina y putrescina, acercándose más a la recta de calibración de putrescina. La pendiente es, a su vez, intermedia entre ambas rectas.

4.8. DETERMINACIÓN DE UNA MUESTRA REAL

Este método se aplicó a la determinación de cadaverina y putrescina en una muestra real. El Laboratorio de Salud Pública de Aragón (LSPA), con el que el grupo de investigación colabora, aportó un extracto de una muestra de atún (2,5g en 50 mL de ácido tricloroacético al 5%) con concentración conocida en seis aminas biógenas. La concentración de aminas presentes en la muestra se puede observar en la tabla 3.

Amina Biógena	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Triptamina	Feniletilamina
mg/Kg	100.0	380.0	900.0	300.0	2.2	5.6

Tabla 3. Cantidad (mg/Kg) de aminas presentes en una muestra de atún analizada en el LSPA por HPLC-MS.

La muestra proporcionada se diluyó tres veces con tampón de fosfato con el fin de obtener un pH adecuado, y que la señal producida por esta muestra se encontrase en el rango lineal obtenido en la mezcla de cadaverina y putrescina elaborada en el apartado anterior. Esta muestra se midió por triplicado. Los resultados se pueden observar en la tabla 4.

Muestra diluida 1/3		
M1	M2	M3
15	14	15

Tabla 4. Señales obtenidas por las tiras reactivas de la muestra de atún analizada en el LSPA.

Al interpolar y corregir la dilución se obtuvo un resultado de concentración de cadaverina y putrescina de 460, 43+-23,25 mg/Kg.. Como se puede observar los resultados son muy satisfactorios permitiendo hacer una estimación de la concentración total de cadaverina y putrescina en presencia de otras aminas biógenas (previamente se había comprobado en el grupo de investigación que el resto de aminas no interfería en la determinación en las concentraciones presentes).

4.9. ESTUDIO VIDA ÚTIL SOPORTES DE CELULOSA

Para estudiar la vida útil de los soportes de celulosa se preparó una placa con 18 soportes y se midieron diariamente por triplicado. Se utilizó una concentración de $2 \cdot 10^{-4}$ M de putrescina. Los resultados se muestran en la figura 24.

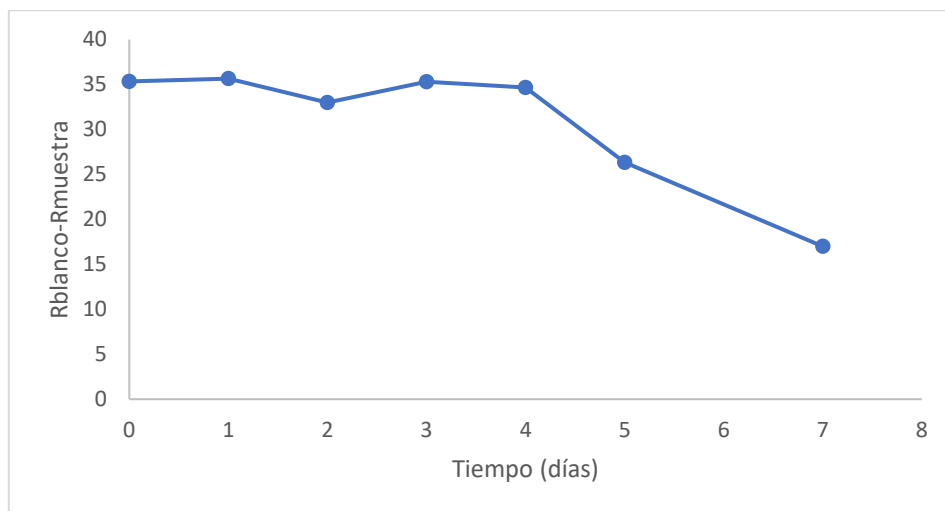


Figura 24. Resultados del estudio de la durabilidad tiras reactivas. [putrescina]= $2 \cdot 10^{-4}$ M. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [DAO]=0,2 U/soporte, [Cel]= 3%, pH=7, n=3.

Como se puede observar, la señal baja a partir del 4 día. Es por ello que se decidió utilizar estabilizadores enzimáticos en la construcción de los soportes, con el fin de alargar su vida útil el mayor tiempo posible.

4.10. ESTUDIO DE LOS ESTABILIZADORES

Este estudio se centró en elegir cual sería el mejor de los estabilizadores ensayados, qué concentración utilizar y en qué momento del proceso añadirlo.

4.10.1. DAO+ estabilizadores antes del secado

Se decidió añadir los estabilizadores junto con la DAO antes del secado, con la hipótesis de que estos evitarían la inactivación de las enzimas durante el proceso.

Para esta experiencia se trabajó con todos los estabilizadores descritos anteriormente. Se adicionaron en concentraciones de 0,2; 0,5; 1 y 2,5% a la mezcla de reactivos. La señal se produjo inyectando una concentración de putrescina de $2 \cdot 10^{-4}$ M por triplicado.

Se diseñó la experiencia para poder medir durante varios días, sin embargo no se produjo señal en ninguno de los casos descritos. A la vista de estos resultados se decidió trabajar adicionando la DAO después del secado.

4.10.2. Estabilizadores antes del secado adicionando la DAO después del mismo.

Para comenzar, se decidió comprobar si estos influían en la señal generada. Para ello se elaboró una placa con varios soportes en los que se inmovilizaron TMB y HRP. Cada uno contenía una concentración del 2,5% de cada estabilizante estudiado. Para valorar la señal se eligió una concentración de H_2O_2 de $3 \cdot 10^{-4}$ M, se obtuvieron los valores representados en la tabla 5.

Estabilizante (2,5%)	-	SZPF	SZSS	SCIS	SGIS	Sacarosa	Gelatina
R ₀ -R _i	42	38	36	38	40	39	36

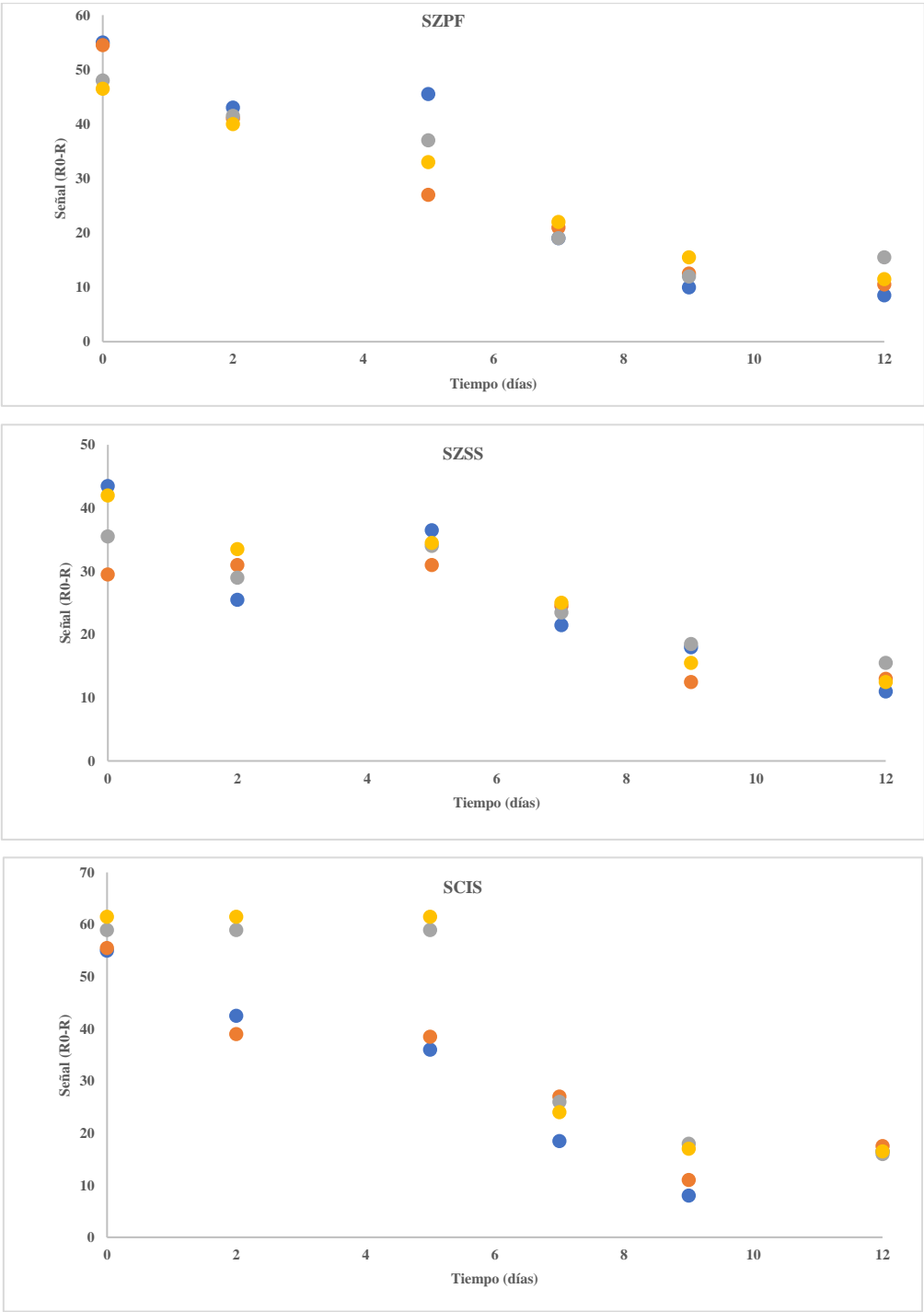
Tabla 5. Resultados del estudio de la señal, adicionando los estabilizadores antes del secado, y la DAO después del mismo. $[H_2O_2] = 3 \cdot 10^{-4}$ M. $[TMB] = 6 \cdot 10^{-4}$ M, $[HRP] = 0,6$ U/mL, $[Cel] = 3\%$, pH=7.

Como se puede observar en la tabla, con todos ellos se obtiene señal de peróxido y del mismo orden que la obtenida sin el uso de estabilizadores.

Una vez demostrado que los estabilizadores no afectan a la señal de detección, se estudió si mejoraban el tiempo de vida de los soportes. Se ensayaron a concentraciones de 0,2; 0,5; 1 y 2,5%. Se prepararon dos placas para cada estabilizador, con el fin de medir en el tiempo la estabilidad de la señal producida por una concentración conocida de putrescina ($2 \cdot 10^{-4}$ M). Se elaboró en el mismo día:

- Una placa con celulosa, HRP, TMB, DAO, para estudiar el tiempo que tardan las tiras reactivas en dejar de dar señal.
- Placas con celulosa, HRP, TMB, DAO y los distintos estabilizantes.

Cada placa contenía 24 soportes, a cada concentración de estabilizante se le dedicó 12 pocillos. Se midieron dos soportes de cada concentración por día. Estas medidas se realizaron cada 2/3 días. Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 25.



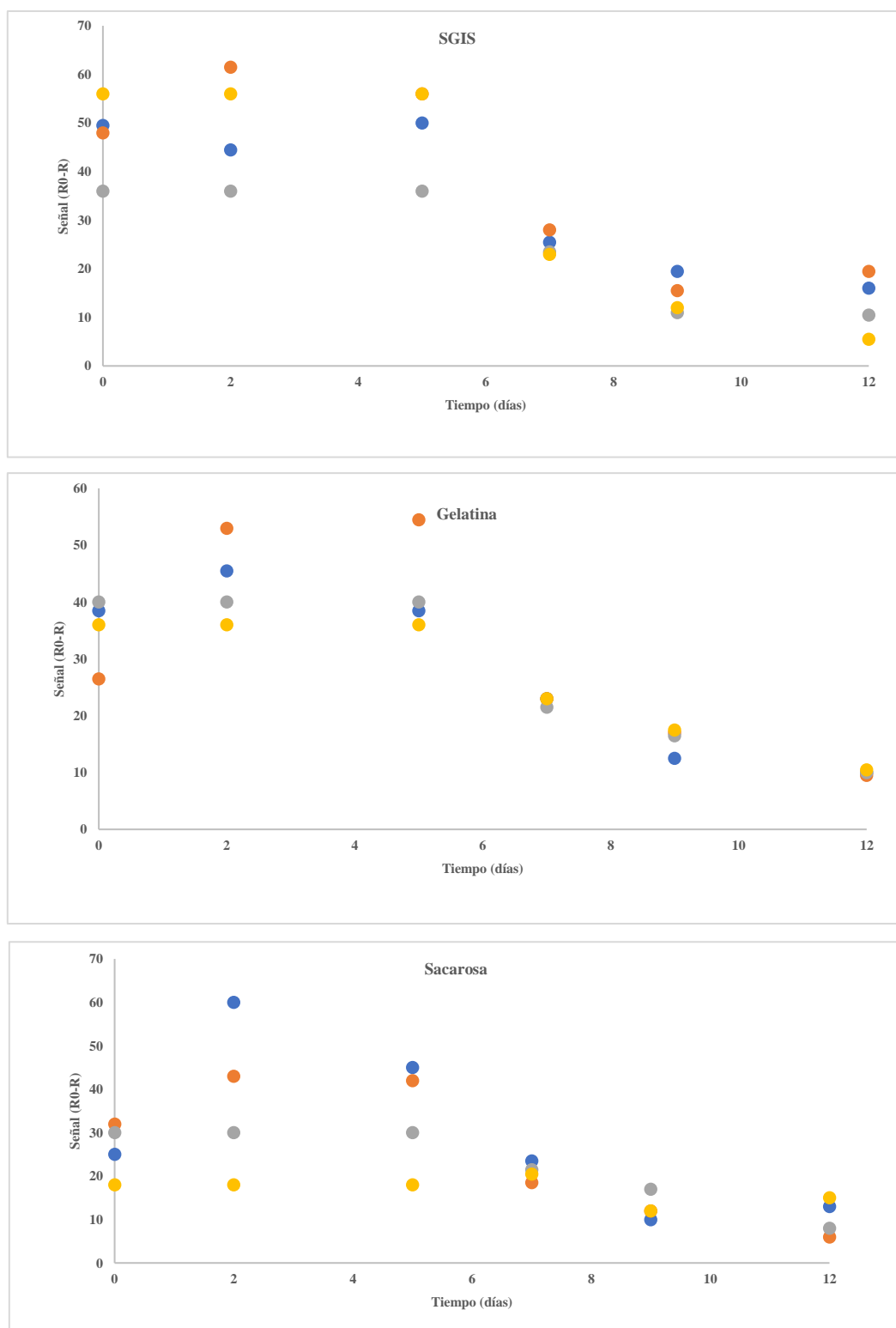


Figura 25. Estudio durabilidad tiras reactivas con los distintos estabilizadores. [putrescina]= $2 \cdot 10^{-4}$ M. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [DAO]=0,2 U/soprote, [Cel]= 3%, pH=7, n=2.

Concentración del estabilizante en tanto por ciento: ● 0,2 ● 0,5 ● 1 ● 2,5

A pesar de la gran variabilidad en los valores obtenidos, se puede concluir que con ninguno de los estabilizadores se producían mejoras, ya que a cualquier concentración de todos los estabilizadores se producía una caída en la intensidad de la señal a partir del sexto día.

En el caso de sacarosa, se puede observar como la señal obtenida, desde los primeros instantes, es la mitad que el resto de estabilizadores para esa concentración. Esto puede ser debido al carácter reductor de la sacarosa, lo que afecta al complejo formado por el TMB reducido y el TMB en exceso.

Tras doce días del comienzo de esta experiencia se añadió peroxidasa a tres pocillos por estabilizador, con el fin de saber si era la enzima DAO la que delimitaba la reacción. Se obtuvieron los datos de la tabla 6 al añadir putrescina de concentración $2 \cdot 10^{-4}$ M.

Estabilizadores	M.1	M. 2	M. 3	Media	σ
SZPF	44	36	47	42,33	5,68
SZSS	40	46	42	42,67	3,05
SCIS	37	42	43	40,67	3,21
SGIS	41	36	44	40,33	4,04
Gelatina	25	27	28	26,67	1,52
Sacarosa	22	30	28	26,67	4,16

Tabla 6. Resultados de la adición de la peroxidasa tras 12 días de la preparación de los soportes de celulosa elaborados mediante la adición de los distintos estabilizadores antes del secado y la DAO después del mismo. [putrescina]= $2 \cdot 10^{-4}$ M, [DAO]=0,2 U/soporte [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [Cel]= 3%, pH=7, n=3.

Cómo se puede observar, se obtiene señal, lo que pone de manifiesto que la DAO sigue activa y es la enzima HRP la que se inactiva (los soportes con el estabilizador sacarosa y gelatina dieron una señal más baja). Con el resto de estabilizantes la señal seguía teniendo la intensidad deseada, es por ello que se decidió añadir los estabilizantes, junto con la DAO y la HRP después del secado.

4.10.3. DAO+ estabilizadores después del secado

Se realizó un último ensayo en el que se hicieron soportes, sólo con celulosa y TMB. Una vez secos, se inyectó HRP, DAO e inmediatamente después 10 μL de los estabilizantes SGIS, SCIS, SZSS y SZPF al 100%. Las cantidades de HRP y DAO en los soportes una vez secos fueron las mismas que en los ensayos anteriores.

Se midió a lo largo del tiempo durante 45 días, para lo que se inyectó 10 μL de una concentración de putrescina ($2 \cdot 10^{-4}$ M), el cual se preparaba el mismo día de medida. En la tabla 7 se muestra los resultados obtenidos en el primer y últimos días de la experiencia.

Estabilizador	Día 1	Día 39	Día 42	Día 45	Media	Desviación
SGIS	42	46	46	45	45,2	2,8
SCIS	44	54	49	55	48,7	4,9
SZSS	33	39	38	45	37,6	5,2
SZPF	31	28	28	25	29,0	3,4

Tabla 7. Resultados de la duración de los soportes de celulosa adicionando los distintos estabilizadores con la DAO después del secado. [putrescina]= $2 \cdot 10^{-4}$ M. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,6 U/mL, [DAO]=0,2 U/soporte [Cel]= 3%, pH=7.

Como se puede observar, con los 4 estabilizantes se obtienen señales después de 45 días de preparación de los soportes, si bien las más altas son con SGIS y SCIS. Es aconsejable, por tanto, cambiar el procedimiento de preparación de los soportes para alargar su vida útil.

5. CONCLUSIONES

- La reacción enzimática de las aminas biógenas con DAO (0,2 U) y HRP (0,6 U/mL) produce la oxidación del colorante TMB ($6 \cdot 10^{-4}$ M) en disolución, por lo que permite la determinación de putrescina y cadaverina.
- Existe una relación lineal entre la concentración de aminas biógenas y la señal R del código RGB, del color obtenido en los soportes reactivos desarrollados. Se ha comprobado, mediante el análisis de una muestra real, que las tiras reactivas sirven para obtener un resultado semicuantitativo, sobre la concentración conjunta de putrescina y cadaverina.
- El tiempo óptimo para las medidas en las tiras reactivas es de 60 segundos, dando una señal estable y alta, para concentraciones, de cadaverina y putrescina, situadas entre las concentraciones $2 \cdot 10^{-5}$ M y $4 \cdot 10^{-4}$ M.
- Los estabilizadores se deben de añadir junto con la DAO y la HRP tras el secado de la tira reactiva, en la cual se encuentra: celulosa microcristalina al 3%, DAO (0,2 U), HRP (0,6 U/mL) y un exceso de TMB ($6 \cdot 10^{-4}$ M).
- El uso de estabilizadores alargó la vida útil de las tiras reactivas. Al inicio del estudio las tiras reactivas duraban 5 días, el estabilizante SZSS, SCIS y SGIS alargó la vida útil hasta el mes y medio.

6. CONCLUSIONS

- The enzymatic reaction of biogenic amines with DAO (0.2 U) and HRP (0.6 U / mL) causes oxidation of the TMB dye ($6 \cdot 10^{-4}$ M) in contamination, thus allowing the determination of putrescine and cadaverine.
- There is a linear relationship between the concentration of biogenic amines and the R signal of the RGB code, of the color obtained in the reactive supports developed. It has been proven, by analyzing a real sample, that the test strips serve to obtain a semi-quantitative result, on the joint concentration of putrescine and cadaverine.
- The optimal time for the measurements in the test strips is 60 seconds, giving a stable and high signal, for the factors of cadaverine and putrescine, located between the concentrations $2 \cdot 10^{-5}$ M and $4 \cdot 10^{-4}$ M.
- The stabilizers must be added together with the DAO and HRP after drying the test strip, in which it is: 3% microcrystalline cellulose, DAO (0.2 U), HRP (0.6 U / mL) and an excess of TMB ($6 \cdot 10^{-4}$ M).
- The use of stabilizers lengthens the life of the test strips. At the beginning of the study the test strips lasted 5 days, the SZSS, SCIS and SGIS stabilizer extended the shelf life up to a month and a half.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Este Trabajo de Fin de Grado me ha servido para ahondar mis conocimientos en Química Analítica, y sobre todo poder desarrollar un método científico de manera guiada. Mas concretamente, me ha servido para conocer la reacción descrita a lo largo del trabajo, y poder aumentar mi conocimiento en cuanto a las aminas biógenas y sus métodos de detección.

Las prácticas desarrolladas en el laboratorio siempre tuvieron un ambiente agradable. En ningún momento hubo problemas o presiones, siendo la confianza total. En todo momento me explicaron las actividades que allí se realizan, el manejo de los equipos y los protocolos y me resolvían las dudas al instante. Este ambiente hizo bastante llevadero el trabajo experimental allí desarrollado.

Las tiras desarrolladas pueden implementarse en la industria alimentaria, pudiendo ser un elemento extra para la verificación de los procesos llevados a cabo en la industria. Personalmente, me ha hecho mejorar y perfeccionar mi técnica en el laboratorio, pudiendo generar resultados precisos y fiables.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Al Bulushi, I., Poole, S., Deeth, H. C. y Dykes, G. A. (2009). “Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49 (4), pp. 369-377. DOI:10. 1080/10408390802067514
- Baliño Zuazo, L. (2016). *Nuevas metodologías para la evaluación de la calidad de productos pesqueros*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
- Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla M. L., Garriga, M. y Vidal-Carou, C. (2005). “Aminas biógenas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control”. *Eurocarne*, 141, pp.1-5. Disponible en: <http://www1.clermont.inra.fr/tradisausage/Publi/Spain/Eurocarne%20141.pdf> [Consultado 13-04-2019].
- Callejón Salinas, S. (2016). *Degradación de aminas biógenas mediante sistemas microbianos. Identificación y caracterización de las enzimas responsables*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Cebrián Aznarez, P. (2018). *Desarrollo de tiras reactivas colorimétricas para la determinación de aminas biógenas*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
- Cebrián Fernández, A.. (2018). *Papel de la histamina en la alimentación: revisión bibliográfica de las distintas patologías que puede ocasionar su exceso en el organismo*. Trabajo Final de Máster. Universidad Oberta de Cataluña.
- Díaz González, A.I. (2014). *Presencia de aminas biógenas en los alimentos. Diseño de un laboratorio para su detección y uso en el control de la calidad alimentaria*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Oviedo.
- EFSA. (2011). “Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods”. *EFSA Journal*, 9(10) 2391:2393. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393.
- Fernández, M. y Álvarez, M. A. (2005). “Las aminas biógenas en los alimentos”. *Agrocsic*, pp. 1-7. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/5771/1/IPLA_AGROCSIC_2.pdf [Consultado 15-04-2019].
- Fuentes López, A., Fernández Segovia, I., García Martínez, E. (2017). *Determinación de aminas biógenas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. Disponible en:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/83318/Fuentes%3bFern%c3%a1ndez%3bGarc%c3%ada%20-%20DETERMINACI%c3%93N%20DE%20AMINAS%20BI%c3%93GENAS%20MEDIANTE%20CROMATOGRAF%c3%8dA%20L%c3%8dQUIDA%20DE%20ALT...pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Consultado 15-03-2019].

- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M. y Álvarez, M. A. (2010). “Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines”. *Current Nutrition & Food Science*, 2, pp. 145-156. DOI: 10.2174/157340110791233256
- Ledeam Rodríguez, J. L., Rodríguez Corales, M., y Morales Torres, G. (2012). *Aminas y toxicidad*. Universidad de Granma.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). “Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria”. *FEMS Microbiology Letters*, 199, pp. 9-13. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10643.x
- Lozano Lalaguna, R. (2017). *Desarrollo de un método analítico enzimático para la determinación de aminas biógenas*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
- Pegg, A.E. (1988). “Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy”. *Cancer Res.* Vol.48 (4), pp.759-774.
- Pons Sánchez-Cascado, S. (2005). *Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (Engraulis encrasicolus) y sus derivados*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Rawles, D.D., Flick, G.J. y Martin, R.E. (1996). “Biogenic Amines in Fish and Shellfish”. *Elsevier*, 39, pp. 329-365. DOI: doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60076-5.
- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (DOUE L338, de 22 de diciembre de 2005).
- Rivero Trullen, I. (2017). *Aminas biógenas: Estudio de nuevos colorantes para su determinación enzimática*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
- Roncagliolo, B. P. (2007). *Procesamiento digital de imágenes*. Disponible en: http://www2.elo.utfsm.cl/~elo328/pdf1dpp/PDI13_Color_1dpp [Consultado 3-5-2019].
- Ruiz-Capillas Pérez, C. y Jiménez-Colmenero, F. (2010). “Aminas biógenas: Importancia toxicológica”. *Electron Biomed*, 3, pp.58-60. Disponible en: <https://biomed.uninet.edu/2010/n3/ruiz-capillas.html> [Consultado 19-03-2019].
- Sánchez Jiménez, F. (2016). “Aminas biogénicas: un ejemplo de poder del metabolismo secundario de mamíferos”. *Sebbm divulgación*, pp. 1-2. DOI: 10.18567/sebbmdiv_ANC.2016.12.1

- Shalaby, A.R. (1996). "Significance of biogenic amines to food safety and human health". *Food Research International*, Vol.29, Nr 7, pp.675-690
- Silla Santos, M.H. (1996). "Biogenic amines: their importance in foods". *Food Microbiology*, vol. 29, pp.213-231
- Silvia, C., Martins, M., Jing, S., Fu, J. y Cavaco Paulo, A. (2018). "Practical insights on enzyme stabilization". *Taylor and Francis*, 38, pp. 335-350. DOI: 10.1080/07388551.2017.1355294

ANEXOS

ANEXO I

Se realizó un ensayo estadístico para la comparación de las pendientes de dos rectas de calibrado.

Se comparó la varianza de ambas pendientes para averiguar si estas eran homogéneas o no y poder seguir con el análisis de regresión.

Se realizó un análisis de la regresión de ambas rectas de calibrado para conocer su error típico.

Putrescina

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999311325
Coefficiente de determinación R ²	0.998623123
R ² ajustado	0.998278904
Error típico	1.449383326
Observaciones	6

Cadaverina

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99467067
Coefficiente de determinación R ²	0.98936974
R ² ajustado	0.98671218
Error típico	2.75732626
Observaciones	6

Se realizó un nuevo análisis de regresión considerando el **rango x** de entrada como los valores de señal de la recta con menor error típico y el **rango y** de entrada como los valores de señal de la recta de calibrado con mayor error típico.

Comparación entre las varianzas de las rectas

	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	3.16628888	1.67096019	1.89489187	0.13100869	-1.47304035	7.80561812
Variable X 1	0.68064014	0.03708212	18.3549393	5.1832E-05	0.57768366	0.78359662

Para poder establecer el criterio de homogeneidad entre las varianzas de ambas pendientes, el valor de intercepción inferior y superior al 95,0% debe incluir el valor de 0 y el valor de la variable X_1 inferior y superior al 95,0% debe incluir el valor de 1.