



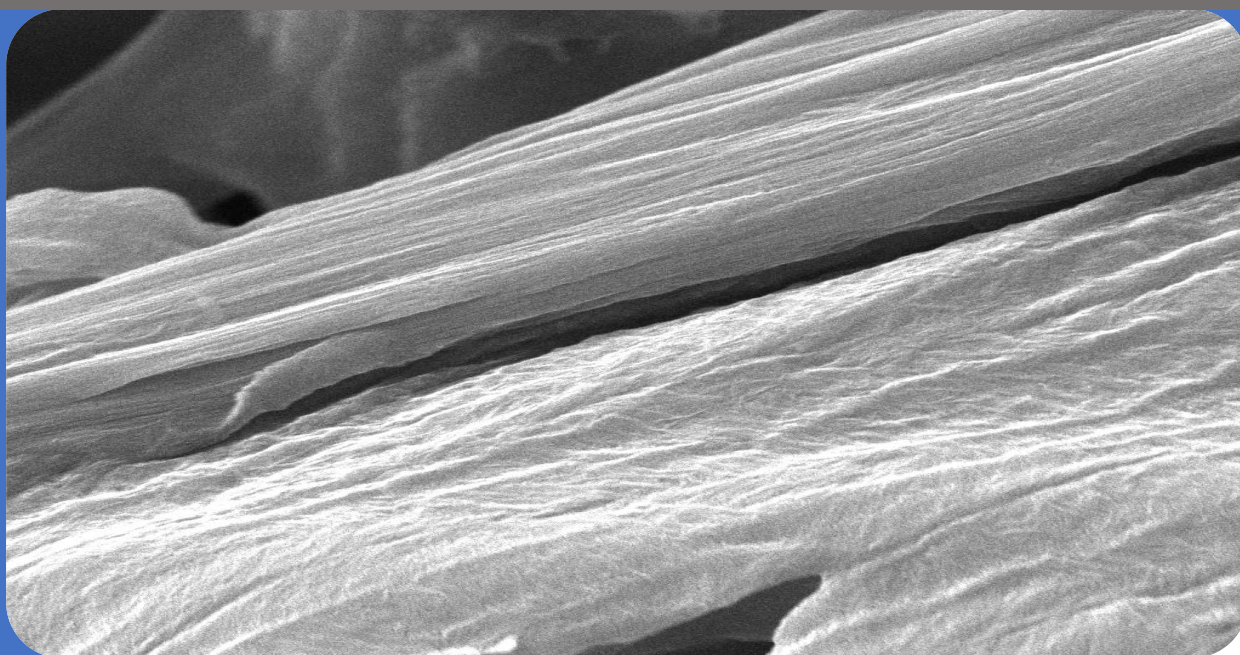
Universidad Zaragoza

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Desarrollo de test enzimático para la determinación de aminas biógenas

“Development of enzymatic test to the determination of biogenic amines”



Pablo Cebrián Aznárez
Directores: Javier Galbán Bernal

Isabel Sanz Vicente

Grupo de Biosensores Analíticos (GBA)

Curso 2018/2019

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO de España (proyecto CTQ2016-76846R) y DGA-FEDER (Grupo E25_17R)

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tutores, Isabel y Javier, por la dedicación y formación que han invertido en mí y en este trabajo, por la libertad permitida a la hora de desarrollar e investigar las ideas que me han surgido para este trabajo y sobre todo por la confianza depositada en mí.

De igual manera agradecer a Susana De Marcos Ruiz, Ángel Lopez Molinero y Josefina Pérez Arantegui por todas las ideas y facilidades aportadas durante la realización del trabajo, así como a mis compañer@s de laboratorio.

Mención especial a mi familia, por su apoyo incondicional y por todo el ánimo que me han dado para sacar adelante trabajos como este y muchos tantos otros.

Por último, agradecer a Oscar Castejón Musulén su implicación indirecta en este trabajo aportando en más de una ocasión una perspectiva diferente a los problemas que han ido apareciendo en este trabajo.

A tod@s vosotr@s, muchas gracias.

Glosario

AB – Aminoácidos Biogénicos

AGU - Anhidroglucopiranososa

CI –Caja de Iluminación/ Dispositivo para las medidas de color

DAO – Enzima Diaminoxidasa

GBA – Grupo de Investigación de Biosensores Analíticos

GW- Grays World

HRP – Enzima Peroxidasa

NC – Nanocelulosa

MCC – Celulosa Microcristalina

SEM – Scanning Electron Microscopy/Microscopio electrónico de barrido

TMB – 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine/
3,3',5,5'-Tetrametil Benzidina

%wt – Porcentaje en peso

Indice

1.	Introducción	1
1.1.	¿Qué son las aminos biógenas?.....	1
1.2.	Aminos Biógenas en alimentos y efectos toxicológico	2
1.3.	Niveles permitidos de AB y porqué determinarlas	2
1.4.	Metodología para la determinación de aminos biógenas	2
1.4.1.	Reacción enzimática colorimétrica.....	3
1.5.	Síntesis de Nanocelulosa a partir de Celulosa.....	4
1.6.	Estudio del color	5
1.7.	Medidas de color sobre el soporte de reacción.....	5
1.7.1.	Caja de iluminación para la determinación de color.....	6
2.	Objetivos.....	6
2.1.	Objetivos y finalidad de este trabajo	6
3.	Experimental	7
3.1.	Reactivos y disoluciones.....	7
3.1.1.	Reactivos generales	7
3.1.2.	Enzimas	8
3.1.3.	Aminos biógenas	8
3.2.	Instrumentación y material	8
3.2.1.	Instrumentos generales.....	8
3.2.2.	Materiales y aparatos.....	8
3.3.	Procedimiento operativo	9
3.3.1.	Preparación, optimización y caracterización de NC	9
3.3.2.	Dispositivo para las medidas de color.....	9
3.3.3.	Corrección del color mediante una Carta de colores RAL ®.....	10
3.3.4.	Medidas en Nanocelulosa.....	10
4.	Resultados y discusión	11
4.1.	Síntesis y Caracterización de la Nanocelulosa	11
4.1.1.	Optimización de la síntesis de NC por vía química.....	11
4.1.1.1.	Orden de mezcla de los reactivos.....	11
4.1.1.2.	Optimización de la reacción de hidrólisis	12
4.1.1.3.	Tratamientos y lavados sobre la NC	12
4.1.1.4.	Temperatura/tiempo de secado de la NC	13
4.1.2.	Caracterización de la Nanocelulosa.....	13

4.1.2.1.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	13
4.1.2.2.	Tamaño de las fibras de NC	13
4.2.	Desarrollo de soporte portátil para las medidas de color	13
4.2.1.	Estudios de color realizados con la CI	14
4.2.2.	Estudio de los modelos de caja de iluminación.....	15
4.2.2.1.	Primer modelo de CI	15
4.2.2.2.	Segundo modelo de CI	16
4.2.2.3.	Tercer modelo de caja de iluminación.....	16
4.2.2.4.	Modelo de caja de iluminación para la reacción enzimática	17
4.3.	Caracterización, comparación y tratamiento matemático de los colores de una Carta RAL Classic® estandarizada	17
4.3.1.	Comparación de colores RAL® bajo distintas fuentes lumínicas	17
4.3.2.	Comparación entre móviles bajo una única fuente lumínica	18
4.4.	Resultados en soporte sólido de Nanocelulosa	19
4.4.1.	Estudio de reacción HRP+TMB+H ₂ O ₂	19
4.4.1.1.	Estudio de orden de inmovilización de los reactivos	19
4.4.1.2.	Estudio de las cantidades óptimas de HRP	20
4.4.1.3.	Estudio de calibración de H ₂ O ₂ en Nanocelulosa 10% con todos los parámetros optimizados.....	20
4.4.2.	Estudio de reacción AB+DAO+HRP+TMB.....	20
4.4.2.1.	Inmovilización de la DAO.....	20
4.4.2.2.	Calibración de putrescina y cadaverina	21
5.	Conclusiones	22
6.	Bibliografía.....	22

ABSTRACT

Biogenic amines (BA) are defined as nitrogenated compounds formed as the result of the decarboxylation of amino acids and proteins. These compounds are involved in many essential physiological functions within our body such as the regulation of brain activity or inflammatory systems. BA are found in a wide range of foods and when consumed by healthy people are eliminated by enzymatic detoxification systems, found in the liver and the internal side of the small intestine. However, when consumed in high concentrations or when people have reduced detoxification capacity, they can trigger toxicological processes. In this work, the development of a rapid determination methodology for BA will be proposed, based on the generation of color in an enzymatic reaction carried out on a solid support which uses Nanocellulose synthesized in the laboratory. To achieve this objective, a mobile device is proposed as a color measuring instrument capable of reading color according to three components: Red, Green and Blue. Color measurements are evaluated and compared against different illuminants and mobile devices in order to prove the variability of the measurements under these conditions and the need for a correction with a mathematical model called "Grays World". Using this color correction methodology, the use of a device for color measurements is justified. This device, called Light Box, allows controlled and homogeneous color measurement conditions. Once the measurement methodology has been corrected, solid reaction supports are developed which allow the integration of reactives (Diamine oxidase, Peroxidase and dye) for the direct determination of the BA putrescine and cadaverine.

RESUMEN

Las aminas biógenas (AB) se definen como compuestos nitrogenados formados como resultado de la descarboxilación de aminoácidos y proteínas. Estos intervienen en funciones fisiológicas esenciales dentro de nuestro organismo como la regulación de la actividad cerebral o de los sistemas inflamatorios. Estas AB se encuentran en una gran variedad de alimentos y al ser consumidas por personas sanas son eliminada por varios sistemas enzimáticos de desintoxicación, en el hígado e interior del intestino delgado. Sin embargo, cuando se consumen en grandes concentraciones o cuando las personas tienen reducida su capacidad de desintoxicación, puede desencadenar procesos toxicológicos. En este trabajo se propone el desarrollo de una metodología de determinación rápida de AB basada en la generación de color en una reacción enzimática llevada a cabo en un soporte sólido que utiliza Nanocelulosa sintetizada en el propio laboratorio. Para alcanzar este objetivo, se propone como instrumento de medida del color un dispositivo móvil, capaz de leer el color según tres componentes: Rojo, Verde y Azul. Las medidas de color se evalúan y comparan frente a distintos iluminantes y dispositivos móviles con el fin de demostrar la variabilidad de las medidas bajo estas condiciones y la necesidad de una corrección con un modelo matemático denominado "Grays World". Utilizando esta metodología de corrección de color se justifica el uso de un dispositivo para las medidas de color, denominado Caja de iluminación, que permita tener unas condiciones de medida de color controladas y homogéneas. Una vez corregida la metodología de medida, se desarrollan los soportes sólidos de reacción que permiten integrar los reactivos (Diamino oxidasa, Peroxidasa y colorante) para la determinación directa de las AB putrescina y cadaverina.

1. Introducción

1.1. ¿Qué son las aminas biógenas?

Las aminas biógenas (AB) son una serie de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular formados principalmente por la descarboxilación de proteínas y aminoácidos.^[1] Estos compuestos se encargan de desempeñar distintas funciones fisiológicas esenciales dentro del organismo como, por ejemplo, regular la actividad cerebral o desencadenar respuestas inflamatorias.^[2]

Atendiendo a su estructura química, se pueden clasificar en: alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina y espermidina), aromáticas (tiramina y feniletilamina) o heterocíclicas (triptamina e histamina).^[3] La estructura química de algunas aminas biógenas se muestran en la Figura 1.

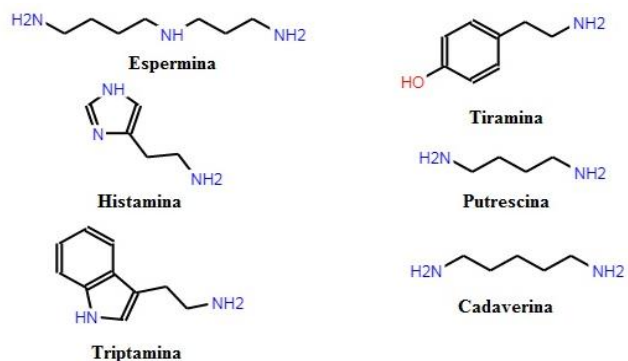


Figura 1. Estructura de algunas aminas biógenas

Las AB son degradadas en el hígado y en el interior del intestino delgado, según una serie de procesos de oxidación, en los que participan varios sistemas enzimáticos o sistemas formados por enzimas, macromoléculas de origen biológico que aceleran la velocidad de ciertas reacciones químicas. Estos actúan como sistemas de desintoxicación de estas aminas para su posterior secreción del organismo a través de la orina. Estos sistemas están formados por las enzimas monoamino oxidasas (MAO, EC 1.4.3.21^[4]), diamino oxidasas (DAO, EC 1.4.3.22^[4]) y poliamino oxidasa (PAO, EC 1.5.3.13^[4]).^{[5], [6]}

Debido a que las AB intervienen en distintos procesos esenciales del organismo, su formación, catabolismo, absorción y secreción están perfectamente regulados; sin embargo, cierto tipo de bacterias/hongos presentes en alimentos también puede generar estas AB, por lo que la ingesta de alimentos con altas concentraciones de AB o el malfuncionamiento de los sistemas enzimáticos, debido a cierto medicamentos o factores genéticos, pueden alterar este equilibrio, provocando una saturación de los sistemas de desintoxicación y provocando graves problemas en la salud.^{[5], [6], [7], [8]}

1.2. Aminas Biógenas en alimentos y efectos toxicológico

Las intoxicaciones más frecuentes por AB son las causadas por histamina y tiramina, conocidas como “intoxicación escombrosidea” e “intoxicación por quesos”, respectivamente. Si bien la histamina y la tiramina son las AB con mayor potencial tóxico, la presencia de otras AB, como la putrescina o la cadaverina, puede potenciar sus efectos tóxicos. Además del efecto directo de las AB, éstas pueden reaccionar con otros compuestos generando compuestos más tóxicos con efectos carcinogénicos, mutagénicos o teratogénicos.^{[6]. [8]}

1.3. Niveles permitidos de AB y porqué determinarlas

Aunque los riesgos toxicológicos asociados a la ingesta de AB ya están perfectamente estudiados, no hay todavía una legislación específica que establezca los niveles máximos de concentración permitidos en los alimentos con el fin de asegurar la salud de los consumidores. De las distintas AB, sólo están regulados los niveles máximos de histamina en pescados y estos son, según la legislación europea (Directiva 91/439/CEE), de 100 mg/kg para pescado crudo y 200 mg/kg para pescado salado^[6].

1.4. Metodología para la determinación de aminas biógenas

Entre las técnicas más utilizadas para la determinación de AB están las cromatográficas, más concretamente, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la de ultra alta presión (UHPLC). Los métodos tradicionales de HPLC, aunque permiten obtener buenos resultados en cuanto a la detección y cuantificación de las AB conllevan tiempos de análisis, entre 20 y 60 minutos por muestra. Por otra parte, la UHPLC, que utiliza presiones más altas ha permitido reducir notablemente el tiempo de análisis aumentando la resolución y la sensibilidad de este tipo de compuestos.^{[1],[8],[9]}

Estas técnicas generan muy buenos resultados en cuanto a selectividad y sensibilidad, sin embargo, son lentas y no adecuadas para establecerlas como técnicas de análisis rápido y de control. Para metodologías rápidas se suelen utilizar métodos colorimétricos y electroquímicos basados en reacciones enzimáticas. Esta primera metodología es la que ha sido utilizada hasta ahora por el GBA para la determinación de AB y en la que se enfocará este trabajo.

1.4.1. Reacción enzimática colorimétrica

Las reacciones enzimáticas para la determinación de AB utilizadas en este trabajo se basan en una serie de procesos redox, en las que la señal analítica se debe al cambio del estado de oxidación de una de las sustancias (colorante) la cual, genera un cambio de color fácilmente detectable, que permite relacionar de manera directa la concentración inicial de AB en la muestra con dicho color.^{[9], [10], [11]}. Estas reacciones estarán guiadas por las enzimas diamino oxidasa (DAO, EC 1.4.3.22^[4]) y peroxidasa (HRP, EC 1.11.1.7^[4]) las cuales catalizan la transferencia de electrones entre moléculas. La reacción enzimática global estudiada se divide en dos reacciones en serie que son:

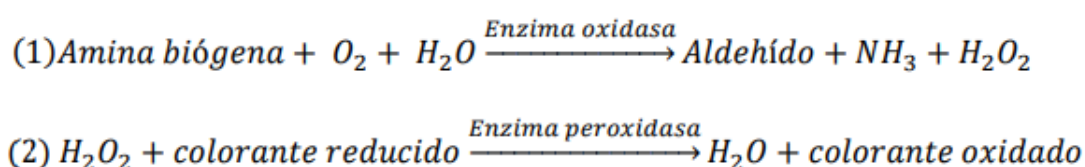


Figura 2. Reacción enzimática

- **Primera reacción:** La enzima oxidasa, en nuestro caso DAO, cataliza la reacción entre el oxígeno y la amina biógena, generándose un aldehído y peróxido de hidrógeno.
- **Segunda reacción:** La enzima peroxidasa, en nuestro caso HRP, cataliza la reacción entre el peróxido producido en la primera reacción y el colorante en su forma reducida, generando oxígeno y la oxidación del colorante, lo que produce un cambio de color en el colorante.

Para este trabajo se ha utilizado el colorante 3,3',5,5'-Tetrametil Benzidina (TMB), el cual en su forma reducida es incoloro y que, una vez oxidado, produce un color azulado cuyos máximos de absorbancias son detectables espectrofotométricamente a 370 y 655 nm. Este color será utilizado como señal analítica para la detección de las AB. También puede ser medido a 450 nm en disoluciones ácidas generando un color amarillo.^[12]

En este trabajo se utilizarán soportes sólidos para el estudio de dichas reacciones, aunque estas también han sido estudiadas en disolución. Estos soportes estarán constituidos, a diferencia de en otros trabajos del GBA, por un nuevo material denominado Nanocelulosa (NC) sobre el que se integrarán los reactivos de la reacción. La elección de dicho material se debió a que en los soportes utilizados en otros trabajos anteriores, se había utilizado como material de soporte Celulosa y se había observado que la generación de color sobre su superficie no era homogénea, formándose el denominado “halo de café”, y dificultando la toma de medidas de color (Figura 3.A).

Según varios artículos, este problema se podía solucionar con la utilización de NC como soporte, obteniendo una mejor señal de color y más concentrada debida a una retención más eficiente de los reactivos en el interior de esta (Figura 3.B).^[13]

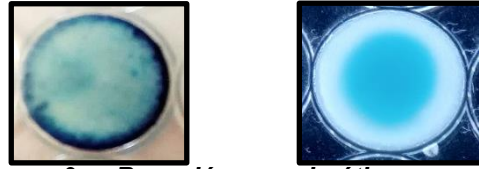


Figura 3. Reacción enzimática para la determinación de AB. A) “Halo de café” generado en Celulosa. B) Señal generada en NC.

1.5. Síntesis de Nanocelulosa a partir de Celulosa

La celulosa es un biopolímero de tipo lineal homopolisacárido con estructura en forma de fibras, las cuales presentan regiones cristalinas y no-cristalinas. Estas fibras están constituidas por unidades de D-anhidroglucopiranosas (AGU) unidas por enlaces covalentes entre los carbonos 1 y 4 de AGU (Figura 4). La unión de dos AGU consecutivas forma una unidad de celobiosa, la unidad de repetición más pequeña en el polímero. El valor de n en la Figura 4 hace referencia al número de unidades repetitivas de celobiosa que tiene la macromolécula.^[14]

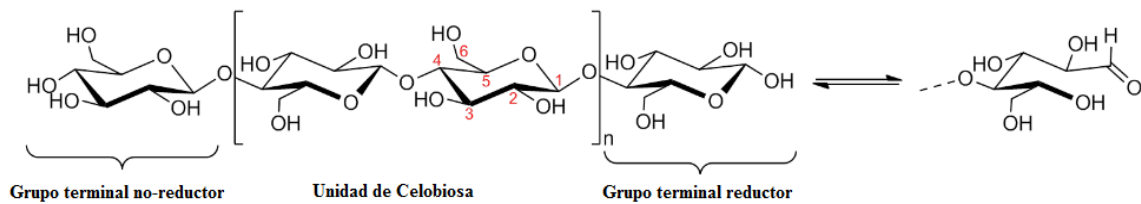


Figura 4. Estructura polimérica de celulosa ^[16]

Cuando se habla de NC se hace referencia al cristal o fibra formada a partir de celulosa que tiene al menos una dimensión dentro del rango de tamaño nanométrico. En la Figura 5 se puede observar diversas fibras de celulosa con sus respectivas regiones cristalinas y no-cristalinas. A partir de esta estructura explicaremos como se generan los cristales o fibras de NC, ya que dependerá de si la celulosa inicial se somete a un proceso químico o mecánico.

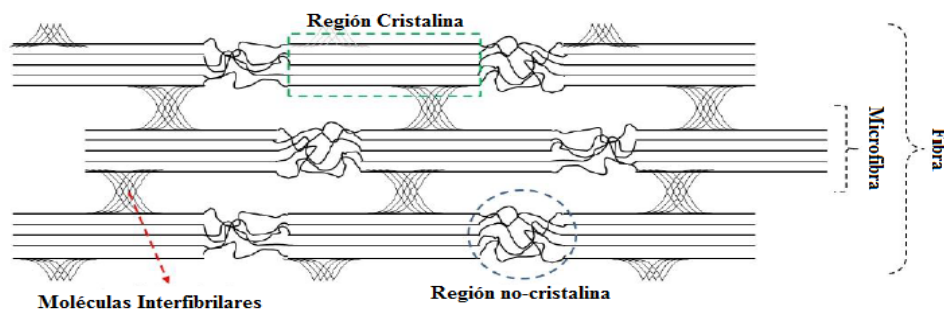


Figura 5. Estructura interna de una fibra de celulosa ^[15]

Mediante un tratamiento químico con ácido o de hidrólisis se eliminarán las regiones no-cristalinas y únicamente permanecerán las regiones cristalinas, lo que generará nanocristales de celulosa (CNC). En cambio, gracias al tratamiento mecánico se produce una rotura de los enlaces entre fibrillas formándose nanofibras de celulosa (CNF), manteniendo la región cristalina y no-cristalina. [15]. En este trabajo la NC se preparará a través de la vía ácida., utilizando Celulosa Microcristalina como base de la síntesis. Una vez finalizado este proceso, se procederá al estudio de las mejores condiciones para medir el color generado sobre la NC.

1.6. Estudio del color

Cuando hablamos de color, nos referimos a la interpretación que hace nuestro cerebro de una serie de estímulos generados en la retina del ojo a causa de las distintas longitudes de onda que le llegan de la parte visible del espectro electromagnético (entre 380 y 780 nm). Todo cuerpo iluminado absorbe una parte de las ondas electromagnéticas y refleja las restantes. Estas últimas son las que generan el color.[17],[18]

1.7. Medidas de color sobre el soporte de reacción

Las medidas de color se realizaron a través de fotografías tomadas con distintos dispositivos móviles, utilizando la aplicación Color Grab® a través de lo que se denomina un modelo de color. Un modelo de color es un modelo matemático que permite representar los colores de forma numérica, utilizando habitualmente tres valores. A partir de estos tres valores se genera un sistema de interpretación del color a través de una figura geométrica tridimensional denominado espacio de color. Para este trabajo se hará uso de los espacios de color RGB y CIE Lab, ya que son los más utilizados para expresar el color en imágenes fotográficas.

Los tres valores a partir de los cuales se define un color en estos espacios son:

- **RGB:** componente roja (R), verde (G) y azul (B)
- **CIE Lab:** Luminancia (L), componente verde al rojo (a) y componente azul al amarillo (b)

Esta manera de medir se ve condicionada por una serie de factores que afectan a la interpretación de los colores, por lo que no controlarlos puede llevar a conclusiones erróneas acerca de un mismo color. Para comunicar siempre la misma información acerca de un color hay que procurar mantener unas condiciones de media constantes y controladas. Los factores que pueden afectar a la interpretación del color se muestran en la Tabla 1 [17]:

<i>Tabla 1. Factores que afectan a la interpretación del color</i>
<i>Diferencias en las fuentes de iluminación</i>
<i>Diferencias en el escenario o contraste</i>
<i>Diferencias de reflexión direccionales causadas por la superficie de un objeto</i>
<i>Diferencias de observador o cámara del teléfono móvil (sensibilidad)</i>
<i>Diferencias del tamaño del color en el objeto (distancia de medida)</i>

Es por eso que para este trabajo se propone el desarrollo de una caja de iluminación, la cual permitirá controlar todos estos factores a excepción de las diferencias entre teléfonos móviles (sensibilidad), ya que es única de cada teléfono. La sensibilidad de cada móvil se estudiará y estandarizará según un algoritmo matemático de corrección denominado “Grays World”, que se explicará más adelante.

1.7.1. Caja de iluminación para la determinación de color

Una caja de iluminación (CI) o “Light Box” es un dispositivo cerrado con sólo dos aberturas al exterior: la de introducción de muestra y la de colocación del instrumento de medida, en nuestro caso, el dispositivo móvil (Figura 6). Esta CI presentará una fuente de iluminación LED D₆₅ interna que permitirá iluminar la muestra de una manera homogénea y ajena a cualquier otra iluminación externa. La parte interna estará pintada o fabricada con



Figura 6. Caja de iluminación

materiales de color negro para evitar la reflexión de la luz dentro de la CI, de tal manera que el detector solo obtenga información de la luz reflejada por la muestra.^[16]

2. Objetivos

2.1. Objetivos y finalidad de este trabajo

Como se ha comentado en la introducción, existe un gran interés por disponer de métodos para el análisis de AB. El objeto principal del trabajo es el desarrollar una metodología sencilla que permita la determinación semicuantitativa de las AB putrescina y cadaverina. Para ello: 1) Se desarrollarán soportes de reacción basados en NC a partir de Celulosa Microcristalina, 2) Se diseñarán, fabricarán y mejorarán varios modelos de caja de iluminación que permita iluminar y medir de una manera homogénea las muestras, 3) Se estudiarán y optimizarán las mejores condiciones para generar color en la reacción colorimétrica de estudio y 4) Se realizará un estudio matemático de los valores digitales de una serie de colores de una Carta RAL® bajo la influencia de varios iluminantes, así como de los colores generados por la reacción enzimática. Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de la reacción enzimática:
 - Estudio y caracterización de la NC como soporte de inmovilización de los reactivos
 - Estudio de cantidades de reactivos inmovilizados en el soporte: HRP, TMB, DAO

- Realización de las correspondientes rectas de calibrado estableciendo los parámetros analíticos.
- Interpretación y estandarización de las medidas de color:
 - Diseño de una caja de iluminación portátil para la medida homogénea del color utilizando una iluminación estándar tipo LED D₆₅.
 - Estudio de distintos colores de una Carta RAL Classic® bajo la influencia de distintos iluminantes y teléfonos móviles
 - Estudio de las mejores condiciones para la detección del color mediante la cámara de fotos del Smartphone.
 - Digitalización y corrección matemática del color bajo un iluminante estandarizado en formato fotográfico JPEG

Desde un punto de vista más académico se pretende:

- Conocer y aplicar las diferentes etapas del Método Científico para la resolución de un problema en Química Analítica.
- Utilizar de forma integrada los conocimientos que se han adquirido en Química Analítica a lo largo del Grado y del Máster:
 - Correcta utilización del material e instrumentos.
 - Desarrollo de un protocolo de trabajo detallado.
 - Evaluación de los parámetros de calidad de un método analítico (sensibilidad, rango de aplicación, precisión, selectividad y los derivados de ellos).
 - Tratamiento estadístico y correcta presentación de los resultados.

3. Experimental

3.1. Reactivos y disoluciones

3.1.1. Reactivos generales

- Disolución de colorante TMB (3,3'.5,5' - Tetrametilbenzidina) ≥ 98%, (Sigma-Aldrich 860336), (240,35 g/mol). Las disoluciones se prepararon por dilución en agua de una disolución $7,9 \cdot 10^{-3}$ M preparada pesando 1,9 mg y disolviendo en 1 mL de dimetil sulfóxido.
- Peróxido de hidrógeno, H₂O₂ 33% (m/V) en agua, (Panreac 131077.1211). Las disoluciones de peróxido de hidrógeno para las rectas de calibrado se prepararon por dilución de la anterior en disolución amortiguadora pH=6.
- Hidróxido de sodio (VWR Chemicals 28245.265), (40 g/mol). Disolución de hidróxido de sodio, NaOH 0,1 M, preparada a partir del compuesto sólido.

- Celulosa Microcristalina en polvo 20 μm , pH: 5-7 (11 wt. %) (Sigma-Aldrich 310697-50G). La celulosa microcristalina se utilizará como base para la preparación de Nanocelulosa. En adelante se denominará MCC.
- Ácido clorhídrico 35-38% (Poch 575283115). Disolución de ácido clorhídrico 1 M, preparada a partir de la disolución concentrada.
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 >95 %wt, $\rho=1,83$ g/mL (Fisher Scientific 7664939). Las disoluciones al 80 y 60%wt se prepararon por dilución en agua destilada a partir de la de >95%wt.

3.1.2. Enzimas

- Peroxidasa de rábano picante (HRP-Horseradish Peroxidase) (146 U/mg), (Sigma-Aldrich EC 1.11.1.7^[19]). Se preparó una disolución concentrada de 248,2 U/mL preparada pesando 1,7 mg y disolviendo en 1 mL de disolución tampón. A partir de esta, se prepararon disoluciones más diluidas para la reacción de estudio.
- Diamino oxidasa de *Lathirus cicera* (150 U/mL) en agua, (Molirom EC 1.4.3.22^[4]). Se tomará una fracción del vial anterior y se trabajará directamente con él.

3.1.3. Aminas biógenas

- Putrescina (Putrescine Dihydrochloride) ~98%, (Sigma-Aldrich P7505), (161,07 g/mol). Las disoluciones se prepararon por dilución de una disolución $1,24 \cdot 10^{-2}$ M preparada pesando 2,00 mg y disolviendo en 1 mL de disolución tampón.
- Cadaverina (Cadaverine Dihydrochloride) ~98%, (Sigma-Aldrich C8561), (175,10 g/mol). Las disoluciones se prepararon por dilución de una disolución $1,11 \cdot 10^{-2}$ M preparada pesando 2,00 mg y disolviendo en 1 mL de disolución tampón.

3.2. Instrumentación y material

3.2.1. Instrumentos generales

- pH-metro CRISON, Basic 20
- Microscopio electrónico de barrido CSEM-FEG INSPECT F50
- Balanza analítica de precisión. GR-202-EC de precisión $\pm 0,01$ mg
- Reflectómetro portátil CM-2600d KONICA MINOLTA con iluminación Flash Xenon y detector de fotodiodo array.
- Espectrometro QE65000 Ocean Optics con detector CCD-array acoplado a una fibra óptica.
- Teléfonos móvil Xiaomi Redmi 6a / Huawei P10 Lite / Xiaomi Redmi 5 plus

3.2.2. Materiales y aparatos

- Ordenador con el software SpectraMagic NX para interpretar distintos colores.

- Centrifugadora Hermle Z 3000 de Labortechnik
- Agitador magnético A-01, SBS
- Micropipetas Socorex de volumen variable (5-50 μ L, 10-100 μ L y 100-100 μ L)
- Material desechable: eppendorf, tubos falcon, puntas de micropipetas
- Vasos de precipitado
- Placas de pocillos Nunc para la deposición de Nanocelulosa
- Incubadora OVAN modelo OM10E
- Caja de Iluminación con Tira LED RGB/ Safety RGB LED Strip Combo 12/24V SMD 3538/5050 LED Strip con iluminación blanca (D_{65}) e regulable a distintas intensidades por IR
- Piezas de construcción Lego ® para la construcción de las CI
- Mortero y mano de cerámica de 130 mm de Diámetro con una capacidad de 284 mL
- Carta de colores RAL Classic® – Sistema tintométrico universal de URKI System
- Estufa de secado Heraeus para temperaturas regulables desde 10°C hasta 250°C.
- Baño de ultrasonidos analógico Ultrasons, sin calefacción de la marca SELECTA®

3.3. Procedimiento operativo

3.3.1. Preparación, optimización y caracterización de NC

La primera parte de este trabajo consistió en la síntesis de NC vía ácida tomando como referencia varios artículos. La NC se preparó a partir de la mezcla de Microcelulosa Cristalina de 20 μ m (MCC), agua destilada y ácido sulfúrico al 80%wt, diluyendo la mezcla hasta alcanzar una concentración de 60%wt en ácido y consiguiendo una relación MCC/ácido de 1:10. La reacción se dejó durante 3 horas a 50°C con agitación en un baño de agua. Una vez finalizada, la dispersión de NC se lavó con NaOH 0,1 M y se ajustó a pH 6 con agua destilada. Tras un secado del sedimento de la dispersión a 50°C en un horno termostatzado, esta se molió y se utilizó para la preparación de los soportes de reacción, mezclándola con los reactivos de la reacción enzimática. Este procedimiento tuvo que ser optimizado en varias etapas. La NC se caracterizó mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) que se basa en la información contenida en los electrones que rebotan sobre la superficie de un material al hacer incidir un haz electrónico concentrado y a gran velocidad.

3.3.2. Dispositivo para las medidas de color

La segunda parte de este trabajo se enfocó en el desarrollo y optimización de una CI para la medida del color. Para ello se propusieron y desarrollaron varios modelos de CI construidos con piezas de LEGO ®, las cuales utilizaban tiras LED como fuente de iluminación. Cada modelo fue

comparado con el anterior, explicando las ventajas y desventajas observadas del mismo a través de imágenes fotográficas de una plantilla de colores de referencia. Una vez optimizados todos los parámetros, se desarrolló mediante impresión 3D un último modelo que serviría de presentación para este trabajo.

3.3.3. Corrección del color mediante una Carta de colores RAL®

La tercera parte de este trabajo consistió en la caracterización de una Carta de colores RAL® mediante sus espectros de reflectancia y sus valores digitalizados en los espacios de color RGB y CIE LAB mediante fotografía. Primero, se tomaron aleatoriamente 13 colores de una Carta de colores RAL® y se obtuvieron sus espectros y valores digitales mediante un reflectómetro portátil CM-2600d KONICA MINOLTA. Segundo, se tomaron medidas de dichos colores bajo distintos iluminantes y con distintos teléfonos móviles fuera y dentro de la CI. Los valores obtenidos se compararon, trataron y corrigieron mediante el algoritmo matemático de “Grays World”, comparándolos con los valores obtenidos por el reflectómetro.

3.3.4. Medidas en Nanocelulosa

La última parte de este trabajo se enfocó en la preparación de los soportes de medida. Estos soportes estaban compuestos por una dispersión de NC 10% y TMB $6 \cdot 10^{-4}$ M, la cual se inyectó sobre la tapa de una placa de pocillos que hacen de molde y se dejó secar a 30°C durante una hora y media hasta la evaporación completa del agua presente. Una vez seco, se le añadió a cada pocillo 10µl de HRP 250 U/mL (para el estudio de H₂O₂) o 10µl de HRP 250 U/mL y 10µl de DAO 100 U/mL (para el estudio de AB). Dicho soporte se volvió a dejar a 30°C durante una media hora hasta su secado completo. Una vez finalizado el segundo secado, el soporte se introdujo en la CI y se le inyectó a cada pocillo 10 µl de H₂O₂ o AB de distintas concentraciones, dependiendo del estudio que se quisiese realizar. La CI se cerró y se esperó 30 s hasta la estabilización del color. En ese momento se tomó una fotografía del soporte.

La fotografía se interpretó con la app Color Grab® de Loomatix y se tomaron los valores de color en código RGB. Estos valores se pasaron a una hoja Excel y se corrigieron con los resultados obtenidos de la Carta de colores RAL®. En esta última parte se realizaron varias rectas de calibrado con todos los reactivos de la reacción ya optimizados. Los reactivos optimizados fueron HRP y DAO. Una vez optimizados los reactivos, se procedió a la realización de rectas de calibrado de H₂O₂ y AB respectivamente para relacionar la concentración de dichos compuestos con sus colores específicos. También se realizó un estudio de repetividad con AB.

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis y Caracterización de la Nanocelulosa

La elección de NC para este trabajo se debió a que este material proporcionaba mejoras significativas como soporte de reacción con respecto a otros materiales utilizados por el GBA. Para la síntesis de NC, se eligió el procedimiento vía ácida ya que esta disponía de una mayor cantidad de referencias bibliográficas.^{[19],[20],[21]} De estas referencias se eligió el estudio de loelovich, M. (2012). Se escogió dicho procedimiento experimental ya que, en comparación con los demás estudios analizados, éste se llevaba a cabo en condiciones experimentales menos energéticas gracias a la utilización de hielo para reducir la temperatura de mezcla, así como menores tiempos de tratamiento ácido y sonicación de las muestras.

En dicho trabajo se usa como material de partida Celulosa Microcristalina (MCC) en forma de polvo o fibrilada, la cual se mezcla con agua en un vaso de precipitado puesto en baño de hielo y a la que se le va adicionando lentamente ácido sulfúrico al 80%wt con agitación hasta alcanzar una disolución con un 60%wt de ácido sulfúrico y una proporción de MCC/Ácido de 1:10. Una vez realizada la mezcla, el vaso de precipitado se pone en un baño de agua con agitación durante 1 hora a 45°C. Finalizado el tratamiento ácido, la dispersión de NC se mezcla con agua destilada en una proporción 1:10. El sedimento de NC se separa por centrifugación y se lava con agua destilada hasta alcanzar pH 6. Para finalizar, se trata esta dispersión por sonicación y se separará el sedimento, dejándolo secar a 60°C.

Para comprobar si se el procedimiento mencionado en el artículo había sido bien replicado se realizaron varios procedimientos de caracterización mediante microscopía electrónica (SEM) de la NC seca obtenida. Esta caracterización fue llevada a cabo por el Servicio de Microscopía electrónica de materiales de la Universidad de Zaragoza. Los resultados obtenidos no fueron los que se esperaban según demostraron los procedimientos de caracterización, por lo que varias condiciones de síntesis tuvieron que ser optimizadas.

4.1.1. Optimización de la síntesis de NC por vía química

4.1.1.1. Orden de mezcla de los reactivos

En el primero caso, nombrado como SA, se mezcló MCC con ácido sulfúrico al 80%wt con agitación manual en un vaso de precipitado puesto en baño de hielo. A continuación, se fue adicionando lentamente agua sobre ésta con mezclado manual hasta alcanzar un contenido de ácido del 60%wt. En el segundo caso, nombrado como AS se replicó el procedimiento, pero utilizando como primer reactivo el agua destilada.

De estos dos métodos de mezclado **se eligió el segundo**, ya que en el primer caso la mezcla de MCC se tornó marrón a causa de lo que se cree un proceso de carbonización, lo que hacía que el proceso de síntesis de NC fuera totalmente inservible.

4.1.1.2. Optimización de la reacción de hidrólisis

Siguiendo con el procedimiento de síntesis, se dispuso la mezcla en un baño termostatzado con agitación a 50°C. En este punto del proceso se realizó un estudio de las mejores condiciones para la reacción ácida o de hidrólisis, atendiendo a la concentración de ácido sulfúrico utilizada, así como al tiempo de contacto del ácido en la reacción. Para estos estudios se prepararon un total de ocho disoluciones, catalogadas según la concentración final de ácido sulfúrico en la mezcla y el tiempo de contacto de este con la muestra. Las concentraciones finales de ácido fueron del 60 y 70%wt y los tiempos estaban comprendidos de 1-4 horas. La nomenclatura para identificar las muestras se expone en el ANEXO II junto a las fotografías tomadas por el SEM.

Los resultados mostraron que **no había diferencias entre utilizar ácido sulfúrico al 60% o al 70%**, por lo que **se eligió** para el resto de preparaciones de síntesis aquella que utilizaba una cantidad menor de reactivo, es decir, **ácido sulfúrico al 60%**. En cuanto a los tiempos de reacción, se observó todas las muestras tenían NC, la única diferencia que se apreciaba era la menor o mayor ruptura de fibras de celulosa. En base a estos resultados las muestras que **mejor proporción de ruptura de fibras/tiempo** fueron aquellas sometidas a una reacción de **3 horas**, es decir, la **muestra NC₆₀-3**. Estos resultados se obtuvieron de las fotografías del SEM mostradas en el ANEXO II.

Una vez concluidas las 3 horas de reacción, la disolución de NC se trasvasó a un matraz al que se le adicionó agua destilada. La relación de la disolución de NC y el agua adicionada debe ser de 1:10. Esta disolución final se dejó 24 horas en reposo para que precipitase la NC.

4.1.1.3. Tratamientos y lavados sobre la NC

Al día siguiente, se procederá a la eliminación de los restos de ácido sulfúrico presente en la dispersión de NC ya que la presencia de restos de ácido sulfúrico produce su carbonización. Para evitar los procesos de carbonización se procederá al lavado de la NC por centrifugación, primero con una disolución de NaOH 0.1 M, seguido de lavados con agua destilada hasta que las aguas de lavado tuviesen un pH de 6. Ambos procesos se intercalarán con tratamientos por sonicación en un baño de ultrasonido para mejorar la disgregación y mezclado de la NC en la dispersión, como se puede apreciar en el ANEXO III.

Se realizaron un total de 10 lavados-sonicación-centrifugados de la NC: 2 lavados con NaOH 0,1M y 8 con agua destilada. Los ciclos de centrifugación fueron de 2 minutos a 13000 rpm. Una vez comprobado que el pH se ajustaba a 6, se procedió al proceso de secado de la NC.

4.1.1.4. Temperatura/tiempo de secado de la NC

Para el secado de la NC, se vertió la dispersión sobre una bandeja de vidrio y a continuación, se introdujo ésta en un horno termostatzado a una temperatura de 50°C. Esta dispersión se dejó secar hasta peso constante. La NC resultante se recogió y se pesó sobre un vidrio de reloj para calcular el rendimiento de la preparación, obteniéndose un rendimiento promedio del 60-70%. Finalmente, la NC se molió con un mortero.

4.1.2. Caracterización de la Nanocelulosa

4.1.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El análisis mediante microscopía electrónica o SEM sirvió para evaluar: 1) Reproducibilidad del procedimiento operativo mencionado en el artículo. 2) Concentración óptima de ácido sulfúrico para la ruptura de la MCC. 3) Tiempo óptimo de contacto entre el ácido sulfúrico y la MCC. 4) Presencia de restos de ácido sulfúrico tras los lavados con NaOH y agua. 5) Disgregación de NC por sonicación. 6) Diferencias en la morfología entre MCC y NC. 7) Tamaño de las fibras de NC

4.1.2.2. Tamaño de las fibras de NC

Los nanocristales generados en el proceso de síntesis de NC están formados por fibras de tamaño nanométrico, por lo que una vez optimizado todo el proceso de síntesis de NC se realizó un estudio del tamaño promedio de estas fibras mediante SEM. Para el estudio se tomaron un total de 24 fibras seleccionadas aleatoriamente dentro de las imágenes del SEM tomadas con una escala de 500 nm, tal y como se muestra en el ANEXO IV. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Medidas de tamaño de fibras de NC - Procedimiento de síntesis optimizado n=24. Intervalo de confianza para el estudio del 95%

<i>Tamaño promedio de fibras de NC</i>			
Promedio	26,26 nm	Desviación Estándar	3,73
DSR%	14,20 %	Resultado	26,26 ± 7,71 nm

4.2. Desarrollo de soporte portátil para las medidas de color

El siguiente paso en este trabajo se enfocó en el desarrollo de un dispositivo para las medidas de color o Caja de Iluminación (CI) que mejorase y resolviese los problemas de reproducibilidad de medidas de color, sobre soportes sólidos, observados en trabajos anteriores del GBA.

Para ello se plantearon un total de cuatro diseños propios de CI tomando como base de estudio el modelo planteado por Oscar Castejón Musulén en su Trabajo de Fin de Grado apartado 3.4 sobre la “*Determinación de compuestos activos para la reducción de riesgos toxicológicos por consumo de drogas*” de la Universidad de Zaragoza.^[22] Para la construcción de estas CIs se hará uso de piezas de LEGO ® como estructura de las cajas, tiras LED de 6500 K como fuente de iluminación y cartón pluma de color negro para forrar internamente los dispositivos de medida evitando así la reflexión de la luz en el interior de la CI.

4.2.1. Estudios de color realizados con la CI

Se tomaron dos artículos de referencia para el estudio de las medidas de color dentro de la CI. Estos se basaban en la corrección de los valores de color tomados con distintas fuentes de iluminación y distintos dispositivos de medida (Zapryanov, G., Ivanova, D., & Nikolova, I. (2012) ^[23]) y la determinación de tolerancias o diferencias numéricas entre colores (Mokrzycki, WS y Tatol, M. (2011) ^[24]).

El primer artículo se centra en la captura de imágenes digitales mediante distintos dispositivos digitales y como los colores captados en estas se pueden ver afectadas por distintos iluminantes, no reproduciendo fielmente los colores presentes en la escena.

Para corregir dichas diferencias de color, se propone una corrección matemática denominada “*Grays World*” (GW) basada en la corrección de valores RGB de la propia imagen a través de una matriz (Figura 7), obteniendo unos nuevos valores R`G`B`.

$$\begin{bmatrix} R' \\ G' \\ B' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{K}{R_{acc}} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{K}{G_{acc}} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{K}{B_{acc}} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix}$$

Figura 7. Matriz de corrección GW

Esta corrección se basa en asumir que toda imagen se ilumina con un iluminante estándar de 5000K y que, por tanto, los valores RGB de un color gris de referencia deberían ser iguales en valor (R=G=B=K). Al medir ese mismo color gris con otro iluminante o dispositivo, sus valores RGB habrán cambiado, denominándose ahora como R_{acc}, G_{acc} y B_{acc}. Al sustituir los valores dentro de la matriz conseguimos una corrección propia para cada iluminante y dispositivo. Por tanto, para nuestras correcciones en una imagen sólo necesitaremos un color gris de referencia.

El segundo artículo expone la posibilidad de comparar distintos colores en una imagen digital según una aproximación matemática aplicada en el espacio de color CIE Lab. La diferencia existente entre dos colores se evalúa mediante lo que se conoce como “*Delta E 2000*” o ΔE₂₀₀₀, que es diferencia mínima que debe haber entre dos colores para considerarse iguales.

Para este modelo esa diferencia debe ser inferior al 5%, ya que en caso contrario se consideran que son colores diferentes. Por tanto, para evaluar los distintos modelos de caja habrá que:

- 1) Tomar los valores RGB de una plantilla de colores de referencia
- 2) Corregir dichos valores utilizando un color gris de referencia
- 3) Transformar matemáticamente los valores corregidos de RGB a CIE Lab
- 4) Evaluar ΔE entre los distintos colores de la plantilla

A lo largo de este trabajo se hará uso un dispositivo móvil Xiaomi Redmi 6a para la toma de fotografías y de datos de los valores RGB. Las transformaciones matemáticas entre los espacios de color RGB y CIE Lab se exponen en el ANEXO V. La evaluación de los distintos modelos de caja se realizó con plantillas de color impresas ajustadas a la estructura de cada modelo y caracterizadas con un reflectómetro portátil CM-2600d KONICA MINOLTA, tal y como muestra el ANEXO VI.

4.2.2. Estudio de los modelos de caja de iluminación

4.2.2.1. Primer modelo de CI

El primer modelo planteado de CI para las medidas de color se enfocó en un modelo con forma de prisma rectangular con una iluminación LED interna dispuesta paralelamente sobre las paredes internas de la caja (Figura 8). Las dimensiones externas de esta caja eran de 12/16/12 cm e internas de 9/13/10 cm. A continuación, se explican las ventajas y desventajas del primer modelo de CI (Tabla 3) derivadas de la evaluación de la plantilla de color (Tabla 1. ANEXO VII)



Figura 8. Primer modelo

Tabla 3. Ventajas y desventajas del primer modelo de caja de iluminación

Ventajas	Desventajas
<i>Reducción de tamaño con respecto al modelo nombrado en el apartado "4.2 Desarrollo de soporte portátil para las medidas de color"</i>	<i>Gran tamaño</i>
	<i>Tiempo de construcción elevado</i>
	<i>Irreproducibilidad de las medidas en gran parte de la caja</i>
	<i>Distribución lumínica heterogénea</i>

Debido a estos problemas se planteó un segundo modelo de caja de iluminación que mejorase la distribución lumínica y que presentase un mejor acceso para la muestra.

4.2.2.2. Segundo modelo de CI

Se propuso un segundo modelo de CI con forma cúbica e iluminación LED interna dispuesta de forma circular sobre las paredes de la propia caja (Figura 9). Las dimensiones externas de esta caja eran de 25,5/25,5/25,5 cm e internas de 22,5/22,5/22,5. A continuación, se explican las ventajas y desventajas del primer modelo de CI (Tabla 4) derivadas de la evaluación de la plantilla de color (Tabla 2. ANEXO VII).



Figura 9. Segundo modelo

Tabla 4. Ventajas y desventajas del segundo modelo de caja de iluminación

Ventajas	Desventajas
<i>Escala del área sobre la que se consiguen medidas reproducibles dentro de la caja</i>	<i>Mayor tamaño con respecto al modelo anterior</i>
<i>Mejor acceso para la colocación de muestras</i>	<i>Tiempo de construcción elevado</i>
<i>Mejor distribución lumínica</i>	

Debido a estos problemas se planteó un tercer modelo de caja de iluminación que plantease menor tiempo de construcción y menor tamaño con respecto a este modelo.

4.2.2.3. Tercer modelo de caja de iluminación

En este tercer modelo se planteó una reducción de altura con respecto al modelo anterior (Figura 10). Las dimensiones externas de esta caja eran de 25,5/25,5/8,5 cm e internas de 22,5/22,5/7,5 cm. A continuación, se explican las ventajas y desventajas del primer modelo de CI (Tabla 5) derivadas de la evaluación de la plantilla de color (Tabla 3. ANEXO VII).



Figura 10. Tercer modelo

Tabla 5. Ventajas y desventajas del tercer modelo de caja de iluminación

Ventajas	Desventajas
<i>Mejora en la resolución de las fotografías</i>	<i>Gran tamaño</i>
<i>Menor tamaño con respecto al modelo anterior</i>	<i>Tiempo de construcción elevado</i>

Este tercer modelo fue el que se utilizó para el resto de estudios de medidas de color del trabajo. Sin embargo, se desarrolló un último modelo que solventaba los inconvenientes de este tercer modelo y que se espera, en un futuro, poder utilizar específicamente para el estudio de reacciones colorimétricas basadas en soportes sólidos.

4.2.2.4. Modelo de caja de iluminación para la reacción enzimática

Este último modelo de caja se diseñó exclusivamente para la toma de medidas de color en soportes de reacción sólidos y está constituida por ácido poliláctico (PLA). Ésta fue fabricada por el Servicio general de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Zaragoza mediante una impresora 3D (Figura 11). EL soporte donde se inyectará la NC también estará hecha de este material. Las dimensiones externas de esta caja eran de 8/12/6 cm e internas de 5/5/3 cm. A continuación, se explican las ventajas y desventajas del primer modelo de CI (Tabla 6) de la evaluación de la plantilla de color (Tabla 4. ANEXO VII).

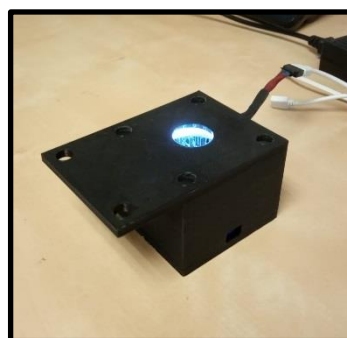


Figura 11. Modelo definitivo

Tabla 6. Ventajas y desventajas del cuarto modelo de caja de iluminación

Ventajas	Desventajas
<i>Tiempo de construcción reducido</i>	<i>Soporte de medida exclusivo para la caja</i>
<i>Menor tamaño con respecto al modelo anterior</i>	
<i>Distribución Lumínica Homogénea</i>	
<i>Elevada Reproducibilidad</i>	

Mediante este modelo se ha desarrollado un dispositivo de medidas de color de tamaño portátil y que presenta todas las ventajas de los modelos nombrados.

4.3. Caracterización, comparación y tratamiento matemático de los colores de una Carta RAL Classic® estandarizada

Una Carta RAL ® es un sistema estandarizado de combinación de tonalidades que define colores para pinturas, plásticos y recubrimientos.^[25] Se caracterizaron un total de 13 colores dentro de la Carta RAL ® mediante un reflectómetro e iluminación D₅₀, obteniéndose sus espectros de reflectancia, valores RGB y CIE Lab. Los resultados de esta caracterización (ANEXO VIII) se utilizarán como referencia para estudiar la dependencia de las medidas de color con respecto a la utilización de distintas fuentes lumínicas y distintos dispositivos instrumentales.

4.3.1. **Comparación de colores RAL® bajo distintas fuentes lumínicas**

Para este primer estudio se utilizaron cuatro iluminantes diferentes: un iluminante D₅₀ de referencia, utilizado para la caracterización de los 13 colores, y otros tres iluminantes distintos de tipo D₆₅, D₅₅ y F₁₁. Los iluminantes fueron caracterizados con su espectro de emisión utilizando un Espectrómetro QE65000 de Ocean Optics (ANEXO IX).

En este estudio se compararán los resultados de los 13 colores caracterizados frente a los obtenidos con los distintos iluminantes haciendo uso de ΔE_{2000} , como se muestra en las Tablas 1-4 del ANEXO X. En la Tabla 6 se exponen dichos resultados en función de cada iluminante, según el promedio de las diferencias de las tres componentes del espacio CIE Lab y de ΔE_{2000} . El valor RAL 7004 obtenido con cada iluminante se utilizará para la corrección GW.

Tabla 6. ΔE_{2000} promedio de 13 colores sometidos a distintas fuentes lumínicas				
Iluminación	ΔL	Δa	Δb	ΔE_{2000}
<i>D₆₅, correspondiente a una tira LED</i>	3,17	4,24	4,68	4,42
<i>D₅₅, correspondiente al Flash de un móvil</i>	4,52	4,80	5,86	5,63
<i>F₁₁, correspondiente a un tubo fluorescente</i>	3,41	6,06	7,41	5,58
<i>A, correspondiente a una bombilla de tungsteno</i>	4,95	7,15	12,92	9,25

Los resultados de la Tabla 6 muestran que hay una dependencia directa de las medidas de color con el iluminante utilizado por lo que, si se quiere estandarizar un método de medida colorimétrico se deberá en todo momento especificar las condiciones lumínicas en las que se tomaron dichas medidas ya que si no dejarán de ser reproducibles.

4.3.2. Comparación entre móviles bajo una única fuente lumínica

Para este segundo estudio se utilizaron tres dispositivos móviles para las medidas de color: un dispositivo Xiaomi Redmi 6a, que servirá como referencia, y otros dos que serán un Xiaomi Redmi 5 Plus y un Huawei P10 Lite. Para ello se compararán los resultados de los 13 colores medidos con el teléfono móvil Xiaomi Redmi 6a obtenidos con el iluminante D_{65} , frente a los obtenidos con los otros teléfonos móviles, haciendo uso de ΔE_{2000} como se muestra en las Tablas 1 y 2 del ANEXO XI. En la Tabla 7 se exponen dichos resultados El valor RAL 7004 obtenido con cada teléfono se utilizará para la corrección GW.

Tabla 7. ΔE_{2000} promedio de 13 colores medidos con distintos dispositivos móviles				
Dispositivo móvil	ΔL	Δa	Δb	ΔE_{2000}
<i>Xiaomi Redmi 5 Plus antes de la corrección</i>	6,85	19,09	30,31	18,64
<i>Xiaomi Redmi 5 Plus después de la corrección</i>	2,96	6,15	5,78	5,31
<i>Huawei P10 Lite antes de la corrección</i>	4,75	6,60	11,37	7,69
<i>Huawei P10 Lite después de la corrección</i>	2,26	6,07	7,31	4,91

Los resultados en la Tabla 7 demuestra que hay una dependencia directa de las medidas de color con el dispositivo de medida, ya que la sensibilidad de cada cámara de cada es única. Para corregir esa variabilidad habrá que aplicar una corrección mediante GW, lo que permitirá la repetividad de las medidas entre dispositivos.

4.4. Resultados en soporte sólido de Nanocelulosa

La parte final de este trabajo se orientó en los ensayos de generación de color sobre soportes sólidos basados en NC, estudiando las mejores condiciones para la inmovilización de los reactivos involucrados, así como estudios de calibración y repetividad. Los soportes sólidos se prepararán a partir de una dispersión de NC 10% junto con los reactivos de reacción. La mezcla se inyectará sobre los orificios de la tapa de una placa de pocillos y se dejará secar durante 1 hora y media a 30°C en una incubadora. Una vez seca, se estudiarán las reacciones correspondientes de generación de color. Para estos estudios se utilizará el modelo 3 de CI y el protocolo de medida explicado hasta ahora. Las fotografías tomadas de los soportes para cada estudio se mostrarán en el ANEXO XII.

4.4.1. **Estudio de reacción HRP+TMB+H₂O₂**

4.4.1.1. Estudio de orden de inmovilización de los reactivos

En este estudio se plantearon cuatro procedimientos, según el momento en el que se incorporaban los reactivos de reacción a la NC. Cada orificio de la tapa de una placa con pocillos tenía $4,5 \cdot 10^{-8}$ moles de TMB y 1 Unidad de HRP finales. Para la generación de color se inyectaron 10 μ l de una disolución de H₂O₂ ($5,88 \cdot 10^{-5}$ M) sobre cada orificio. La cantidad de moles de TMB ($4,5 \cdot 10^{-8}$ moles) en cada orificio ya había sido optimizada en otros trabajos desarrollados por el GBA. Estos procedimientos fueron:

- 1) Inyección 10 μ l de TMB $4,5 \cdot 10^{-3}$ M. y HRP 100 U/mL sobre cada orificio después del secado de la dispersión de NC 10%.
- 2) Inyección de 10 μ l de HRP 100 U/mL sobre cada orificio después del secado de una dispersión de NC 10% con una concentración de TMB $6 \cdot 10^{-4}$.
- 3) Inyección de una dispersión de NC 10% con una concentración de TMB $6 \cdot 10^{-4}$ M y HRP 13,33 U/mL sobre cada orificio vacío.
- 4) Inyección de 10 μ l de TMB $4,5 \cdot 10^{-3}$ M sobre cada orificio después del secado de una dispersión de NC 10% con una cantidad de HRP 13,33 U/mL.

En base a los resultados, **se eligió el procedimiento en el que se incorporaba la HRP después del secado de los soportes formados por la dispersión de NC 10% con una concentración de TMB $6 \cdot 10^{-4}$ M**, ya que era el único procedimiento en el que la generación de color solo se daba en la zona central de cada orificio. La imagen de este estudio se muestra en el ANEXO XII (Imagen A).

4.4.1.2. Estudio de las cantidades óptimas de HRP

En este estudio se preparó una dispersión de NC 10% con una concentración de TMB de $6 \cdot 10^{-4}$ M. Una vez secos los soportes preparados con esta dispersión, se inyectar cantidades variables de HRP (0,5 a 7,5 U) en distintos orificios. Se midió la coordenada R de cada soporte formado (R_{blanco}) y se inyectaron 10 μL de H_2O_2 ($5,88 \cdot 10^{-5}$ M).

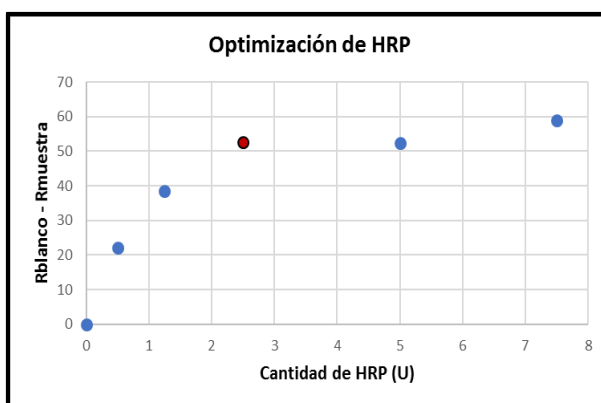


Figura 12. Optimización de HRP.
 $[\text{TMB}] = 6 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5,88 \cdot 10^{-5}$ M

Tras 30 segundos se mide la componente R del color formado (R_{muestra}). La señal se corresponde a la diferencia de ambos valores ($R_{\text{blanco}} - R_{\text{muestra}}$). En la Figura 12 se muestran los resultados expresados gráficamente. **La mejor señal se obtuvo para 2,5 U**, ya que cantidades más altas generaban la misma señal, pero con un mayor gasto de reactivo.

4.4.1.3. Estudio de calibración de H_2O_2 en Nanocelulosa 10% con todos los parámetros optimizados

Se hizo un estudio de calibración de H_2O_2 usando Nanocelulosa al 10% con todos los parámetros previamente optimizados, en un rango de H_2O_2 de $1,47 \cdot 10^{-5}$ a $4,12 \cdot 10^{-4}$ M. En la Figura 13 se muestran los resultados.

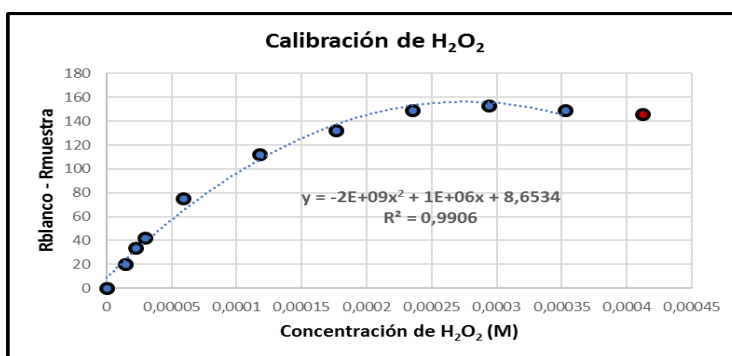


Figura 13. Calibración de H_2O_2 en Nanocelulosa 10%.
 $[\text{TMB}] = 6 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{HRP}] = 2,5$ U

Estos mostraron que la **calibración tiene una tendencia polinómica de grado 2**, la cual se cumple **hasta una concentración de H_2O_2 de $3,53 \cdot 10^{-4}$ M**.

4.4.2. Estudio de reacción AB+DAO+HRP+TMB

Este parte del trabajo se centró en el estudio de la reacción global enzimática para la determinación de aminas biógenas. Para ello se comenzó investigando la mejor manera de incorporar la enzima DAO en los soportes de NC.

4.4.2.1. Inmovilización de la DAO

Se realizó un estudio sobre el momento óptimo de inyección de la DAO, utilizando una cantidad de 1 unidad en pocillo, que es el valor óptimo según varios estudios realizados por el GBA.

Para ello se realizaron dos calibraciones de putrescina. En la primera se inyectó la DAO antes del secado de la Nanocelulosa y en la otra se inyectó después. El estudio se realizó con concentraciones de putrescina de $2,5 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-4}$ M. Como se puede observar en la

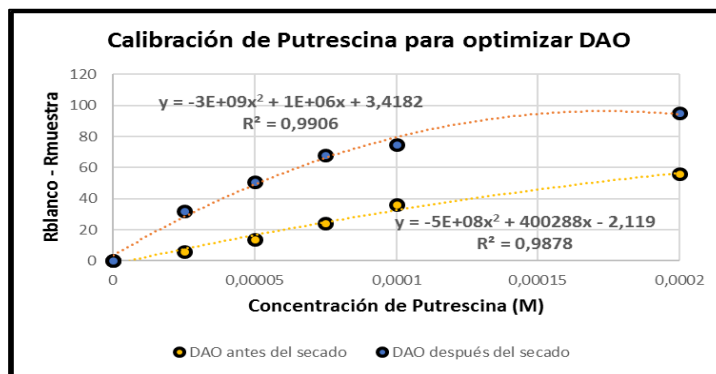


Figura 14. Calibración de Putrescina en NC 10%. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=2,5 U. [DAO]=1 U

Figura 14, la inyección de DAO antes del secado genera señales menos intensas, lo que se traduce en una pérdida de sensibilidad. Por tanto, la manera óptima de incorporar la DAO al soporte de NC es después del secado de esta.

4.4.2.2. Calibración de putrescina y cadaverina

Para ello se prepararon una serie de disoluciones de putrescina y cadaverina y se inyectaron 10 μ L de cada una respectivamente en soportes de Nanocelulosa preparados en las condiciones consideradas óptimas. Dichas calibraciones de putrescina y cadaverina se muestran en las Figuras 15 y 16 respectivamente. Además, se realizó un estudio de repetitividad de 12 medidas de putrescina 10^{-4} M que se muestra en la Tabla 8.

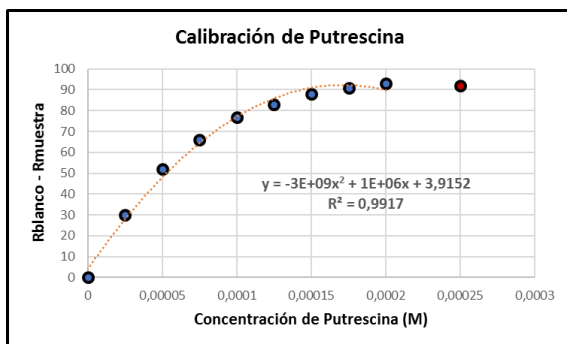


Figura 15. Calibración de Putrescina en Nanocelulosa 10%. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=2,5 U, [DAO]=1 U

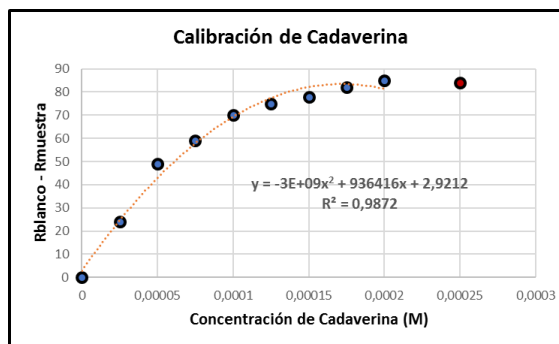


Figura 16. Calibración de Cadaverina en Nanocelulosa 10%. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=2,5 U, [DAO]=1 U

En vista a los resultados obtenidos, la metodología desarrollada sirve para la determinación conjunta de putrescina y cadaverina, ya que ambas AB proporcionan la misma señal ante la misma concentración de amina. La repetitividad de las medidas se muestra en la Tabla 8:

Tabla 8. Putrescina $1 \cdot 10^{-4}$ M en Nanocelulosa 10%, n=12, t= 30 s				
Analito	Promedio	σ	DER	Resultado
Putrescina	128,75	2,80	2,17	128,75 \pm 6,16
[TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=2,5 U/mL, [DAO]=1 U/mL				

5. Conclusiones

En el desarrollo de este método colorimétrico para la determinación de aminas biógenas a través de reacciones enzimáticas en soportes de reacción basados en Nanocelulosa se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- El soporte sólido basado en Nanocelulosa permite una generación de color concentrada y localizada sobre su superficie permitiendo la determinación de aminas biógenas (putrescina y cadaverina) de una manera sencilla y rápida mediante un dispositivo móvil.
- El método Grays World ha demostrado ser muy eficaz a la hora de corregir diferencias de medidas entre teléfonos móviles, lo que más versatilidad el sistema de medida.
- Las medidas de color bajo distintos iluminantes no son reproducibles por lo que si se quiere establecer una metodología basada en reacciones colorimétricas se necesita utilizar una Caja de Iluminación que permita tener unas condiciones lumínicas controladas y homogéneas.
- La Caja de Iluminación podría utilizarse para determinaciones basada en las medidas de otros colores distintos a los generados en este trabajo, o lo que es lo mismo, a la utilización de otros colorantes.
- El sistema desarrollado permite la determinación de Putrescina o Cadaverina en el rango de concentraciones que va desde $2,5 \cdot 10^{-5}$ hasta $2 \cdot 10^{-4}$ M.
- Por último, se ha concluido que la determinación tanto de putrescina como de cadaverina generan señales similares, por lo que se podría esperar poder determinar estas dos aminas de una manera conjunta cuando estas se encuentren en muestras reales.

6. Bibliografía

- [1]. de la Torre, C. A. L., & Conte-Júnior, C. A. (2013). Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin. 430-446.
- [2]. Koolman, J., & Röhm, K. H. (2005). *Bioquímica: texto y atlas*. Ed. Médica Panamericana. 52,72-76
- [3]. Ferreira, I. M., & Pinho, O. (2006). Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines. *Journal of food protection*, 69(9), 2293-2303.
- [4]. "Enzyme nomenclature database". Autor/a:ExPASy. Bioinformatics Resource Portal. Disponible: <https://enzyme.expasy.org>. Consultado: 05/11/2019
- [5]. Bover-Cid, S. A. R. A., Latorre-Moratalla, M. L., Garriga, M. A. R. G. A. R. I. T. A., & Vidal-Carou, M. C. (2005). Aminas biógenas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control. *Eurocarne*, nº141, 1-3
- [6]. 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. 8-10
- [7]. Lonvaud-Funel, A. (2001). Aminas biogénicas en vinos: papel de las bacterias del ácido

- láctico. *FEMS Microbiology Letters* , 199 (1), 1-2
- [8]. Fernández García, M., & Álvarez González, M. Á. (2005). Las aminas biógenas en los alimentos. Pp.2-6
- [9]. Triki, M. (2013). *Aminas biógenas en productos cárnicos más saludables en base a su contenido lipídico*. Universidad Complutense de Madrid. 23
- [10] Leng, P. Q., Zhao, F. L., Yin, B. C., & Ye, B. C. (2015). A novel, colorimetric method for biogenic amine detection based on arylalkylamine N-acetyltransferase. *Chemical Communications*, 51(41), 8712-8714.
- [11] Patange, SB, Mukundan, MK y Kumar, KA (2005). Un método simple y rápido para la determinación colorimétrica de histamina en la carne de pescado. *Control de alimentos*, 16 (5), 465-472.
- [12] "3,3', 5,5'-tetrametilbencidina". Autor/a: Sigma-Aldrich. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/860336?lang=es®ion=ES>. Consultado: 06/11/2019
- [13] Dufresne, A. (2013). Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Materials today*, 16(6), Pp.220-227.
- [14] Muñoz Bartolomé, B. (2018). Síntesis y caracterización de nanocelulosas de orígenes diversos (Bachelor's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya). 11-13/23-28
- [15] Börjesson, M., & Westman, G. (2015). Crystalline nanocellulose—preparation, modification, and properties. *Cellulose-fundamental aspects and current trends*, 159-191.
- [16] "Como utilizar una caja de luz o cubo de luz". Disponible en: <https://foto321.com/blog/tutoriales/como-utilizar-una-caja-de-luz-o-cubo-de-luz/>. Consultado: 07/11/2019
- [17] Sensing, K. M., & PCC, I. (2007). Precise color communication: color control from perception to instrumentation. *Manual notes*, 16-44
- [18] "Modo de color". Autor: EcuRed. Disponible en: https://www.ecured.cu/Modo_de_color. Consultado: 14/11/19.
- [19] Shahabi-Ghahafarrokhi, I., Khodaiyan, F., Mousavi, M. y Yousefi, H. (2015). Preparación y caracterización de nanocelulosa a partir de residuos industriales de cerveza utilizando hidrólisis ácida / ultrasonido. *Fibras y polímeros* , 16 (3), 529-536.
- [20] loelovich, M. (2012). Study of cellulose interaction with concentrated solutions of sulfuric acid. *ISRN Chemical Engineering*, 2012.1-8
- [21] Li, Q. Q. (2012). *Nanocellulose: Preparation, characterization, supramolecular modeling, and its life cycle assessment* (Doctoral dissertation, Virginia Tech). 1-186
- [22] Castejón Musulén, Oscar. Determinación de compuestos activos para la reducción de riesgos toxicológicos por consumo de drogas. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza. Departamento de Química Analítica/ConsumoConCiencia. Junio de 2018
- [23] Zapryanov, G., Ivanova, D., & Nikolova, I. (2012). Automatic White Balance Algorithms for Digital Still Cameras—a Comparative Study. 1-22
- [24] Mokrzycki, WS y Tatol, M. (2011). Diferencia de color Δ Encuesta EA. *Machine Graphics and Vision*, 20 (4), 383-411.
- [25] "Acerca de los colores RAL". Disponible en: <https://www.coloresral.com.es/acerca-de-los-colores-ral> Consultado: 12 de noviembre de 2019.

