



Universidad
Zaragoza

Detección y diferenciación de aminas biógenas con
técnicas espectroscópicas y de imagen digital.

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA
TRABAJO FIN DE GRADO

Detection and differentiation of biogenic amines by
spectroscopic and digital image *techniques*.

MARIA SUBERVIOLA SAINZ

DIRECTOR: ÁNGEL LOPEZ MOLINERO

FACULTAD DE CIENCIAS
Convocatoria de Junio de 2019

ABSTRACT

The analytical determination of NH_3 , putrescine and cadaverine is carried out using digital colorimetry techniques.

Initial studies are carried out that allow us to obtain the best analysis conditions. Analytical experiments are performed in the best conditions and they are based on the reaction of NH_3 with Nessler reagent. Optimum reactions conditions are obtained at a higher concentration of Nessler reagent and PVA with more sensitive detection bB. From these conditions, the determination of NH_3 is carried out by means of DIC, obtaining better results for wB and bB.

In the determination of putrescine and cadaverine by this procedure, the best results are obtained with wB. Putrescine has a higher linear range but a higher calibration error than cadaverine.

On the other hand, experiments are carried out for the differentiation of both amines by reaction with 2-aminobenzaldehyde, obtaining better results with a greater linear range and lower calibration error in wB conditions.

Differentiation studies for mixtures containing both amines show that the pH of the phosphate buffer and the concentration of DAO influence putrescine in different ways than in cadaverine, which makes it possible to differentiate one from the other.

By means of multivariate calibration it has been possible to determine the concentration of the ABs by measuring the BRG colors. The best results are shown on one side with illuminant 'b' and reflected colors BRG and on the other with wB, gB and bB.

RESUMEN

Se lleva a cabo la determinación de NH_3 , putrescina y cadaverina mediante técnicas de colorimetría digital.

En un primer lugar, se realizan estudios que nos permitan obtener las mejores condiciones de análisis: el tipo de cámara empleada, el mejor formato de imagen y la iluminación.

Los primeros experimentos realizados están basados en la reacción de NH_3 con reactivo Nessler. Se obtienen condiciones óptimas a mayor concentración de reactivo Nessler y de PVA con detección más sensible bB. A partir de esas condiciones se lleva a cabo la determinación de NH_3 mediante DIC obteniendo mejores resultados para wB y bB.

En la determinación de putrescina y cadaverina mediante este procedimiento, los mejores resultados se obtienen con wB. Se tiene que la putrescina tiene mayor rango lineal aunque superior error de calibración que la cadaverina.

Por otra parte se realizan experimentos para la diferenciación de ambas aminas mediante reacción con 2-aminobenzaldehído, obteniéndose mejores resultados con mayor rango lineal y menor error de calibración en condiciones wB.

Los estudios de diferenciación para mezclas que contienen ambas aminas, muestran que el pH del tampón fosfato y la concentración de la DAO influyen en la putrescina de diferente manera que en la cadaverina, lo que permite diferenciar una de otra.

Mediante calibración multivariada se ha podido determinar la concentración de las ABs realizando la medida de los colores BRG. Los mejores resultados se muestran por un lado con iluminante 'b' y colores reflejados BRG y por el otro con wB, gB y bB.

INDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
1. INTRODUCCIÓN:	3
1.1. Aminas biógenas-ABs-	3
1.2. Aminas biógenas en alimentos: importancia.	3
1.3. Determinación de las aminas biógenas.	3
1.4. Colorimetría de imágenes digitales. ¹¹	4
1.5. Planteamiento del TFG.	5
2.- OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO	6
CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL	7
1. INSTRUMENTACION	7
1.1. Cámaras digitales	7
1.2. Materiales de laboratorio: destacados en el método	7
2.-REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS	8
2.1. Preparación de disoluciones	8
2.2. Procedimientos experimentales	9
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
1.- METODOS BASADOS EN LA DETECCION DE AMONIACO.	10
1.1. Procedimiento de Nessler con alcohol Polivinilico.	10
1.2. Determinación de Putrescina en disolución.	12
1.3. Determinación de Putrescina con tiras reactivas.	13
1.4. Aplicación a la cadaverina.	14
2.- METODOS BASADOS EN LA REACCION CON 2-AMINOBENZALDEHIDO.	15
2.1. Condiciones de Reacción y detección en DIC.	15
2.2. Prestaciones analíticas del método DIC hacia la Putrescina	16
2.3. Características analíticas de las medidas en EAM uv- vis	18
2.4. Prestaciones analíticas de los métodos DIC y EAM con la cadaverina.	18
2.5. Robustez de los métodos con oabz.	20
2.6. Estudios de diferenciación.	21
2.7. Calibración multivariada y cálculo de las diferencias.	23
2.8. Comparación entre los resultados de las diversas metodologías	24
2.9. Justificación de las medidas de reflectancia: iluminantes-absorbente-detección por la cámara.	25
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA	26
1. CONCLUSIÓN:	26
2. BIBLIOGRAFÍA:	26

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Aminas biógenas-ABs-

Son biomoléculas de peso molecular bajo que poseen un grupo amino como mínimo. Se producen como resultados de procesos naturales de descarboxilación-degradación de aminoácidos proteicos. Y son especialmente relevantes en la calidad y olor de alimentos, como pescados, y otros.

Se clasifican, según su estructura, en ABs :

i-alifáticas: putrescina, espermita, cadaverina,

ii-Aromáticas: tiramina, feniletilamina

iii- heterocíclicas: histamina, triptamina.

Y en función del número de grupos amino:

i-monoaminas: histamina, feniletilamina, tiramina;

ii- diaminas: putrescina, cadaverina o

iii- poliaminas: espermina, espermidina¹.

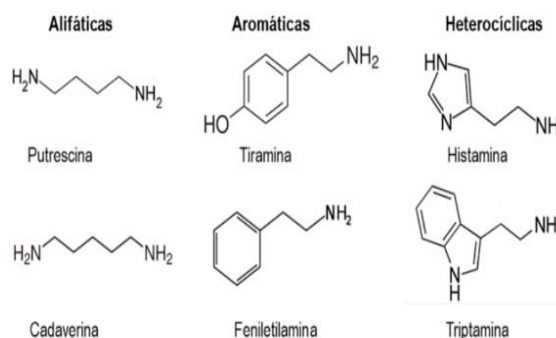


Figura 1: clasificación de las aminas biógenas según su estructura².

1.2. Aminas biógenas en alimentos: importancia.

En condiciones normales, las ABs presentes en los alimentos se pueden degradar por el organismo. Pero si hay un gran contenido, su consumo puede provocar intoxicaciones, con episodios hipertensivos, migrañas, picor, enrojecimiento, dolor de cabeza y náuseas. Siendo la histamina y la tiramina las que producen un mayor número de intoxicaciones.

Existen factores que aumentan la formación de aminas biógenas en los alimentos como una alta temperatura, un pH elevado y un bajo contenido en sal.

En el caso de productos frescos y cocidos solo deberían estar presentes la espermidina y la espermina, sin embargo pueden aparecer cadaverina, putrescina e histamina si ha habido alguna alteración³. Como la ocurrida en lotes de atun fresco en Málaga, en 2017⁴. Por otro lado, los productos crudos y curados cuando se someten a procesamiento pueden favorecer la formación de aminas biógenas, por lo que su nivel puede ser mayor que en los anteriores.

Toda esta gran problemática esta regulada por reglamentos Europeos que recogen los niveles maximos permitidos de aminas biógenas tanto en productos frescos como procesados. Valores maximos en productos frescos estan en el nivel 100 mg/kg.¹ Y en procesados se permiten rangos entre 200-400 mg/Kg de producto (según el producto).

1.3. Determinación de las aminas biógenas.

Ya hemos visto los riesgos en la salud de las ABs, por tanto, se deriva la necesidad de su control. Además de lo anterior los niveles de ABs en alimentos son indicadores de calidad o degradación.

Es decir, las determinaciones de ABs en alimentos son de gran interés.⁵ Para llevarlas a cabo se pueden aplicar diferentes procedimientos analíticos. Los más frecuentes son técnicas cromatográficas que permiten la medida simultánea de varias aminos con una buena precisión y exactitud. Pero también se pueden emplear métodos biológicos, ópticos y enzimáticos.

La Cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC, es la técnica más utilizada para la detección de aminos biogénicos en alimentos. La metodología típica se lleva a cabo con separación en fase reversa, RP, en columnas C18. Antes de la separación tienen lugar etapas de preparación de muestra y/o derivatización. Esto permite concentrar los analitos y eliminar compuestos que interfieran, además con la derivatización se puede reducir la polaridad de los compuestos originales⁶.

Un procedimiento típico se basa en el uso de elución por gradiente con fases móviles compuestas por disoluciones de acetato de sodio en tetrahidrofurano al 1% a pH 6.60, con metanol o acetonitrilo, en diferentes proporciones y flujos. La detección sencilla puede llevarse a cabo en UV a 254 nm. Los tiempos de separación están en el orden de 9-15 min⁷. Otra fase móvil que se puede utilizar es la formada por acetato de sodio 100 mmol/l, pH 4,80 con acetonitrilo a 35°C y flujo de 1,0 ml/min con detección UV a 249 nm. En este caso el tiempo de separación es de 9 min (total 12 min)⁸.

La electroforesis capilar (CE) es la segunda técnica más empleada, aunque presenta baja sensibilidad frente a otros métodos. Es una técnica simple y rápida, lo que hace que sea muy útil para el cribado de un gran número de muestras en un tiempo corto. Además, es eficiente -bajo coste- con bajo consumo de reactivos. Aunque también necesita una etapa previa de derivatización. Finalmente, la detección se realiza mediante medidas conductimétricas⁹.

La cromatografía de gases, GC, no se utiliza tanto como las anteriores. Requiere una derivatización previa en las muestras para aumentar las propiedades volátiles y disminuir las polaridades de las aminos. Típicas determinaciones se basan en el uso del acoplamiento GC-MS. La separación analítica se puede llevar a cabo en columnas capilares como DB-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interior, 0,25 mm de espesor de película). Se usa como gas portador el helio a caudales de 1 ml/min. Y con volúmenes de inyección de muestra del orden de 1 µl, bien en inyección automática, con Split o sin división, a temperaturas del inyector de 280°C. Se suele usar gradiente de T^a, con valores de horno: 85°C durante 1-2 min, aumentada a 160°C a 10°C/min; luego aumentada a 280°C a 25°C/min y mantenida durante 6,5 min. La detección MS se realiza con una cámara de ionización de impacto electrónico y separador de cuadrupolos. El tiempo total es del orden de 20 minutos¹⁰.

Finalmente existen técnicas no cromatográficas basadas en métodos enzimáticos e inmuno-enzimáticos, implementadas como formatos de ensayo rápido, kits de ensayo, como los utilizados para la detección y determinación de histamina, la más frecuente AB determinada. Son utilizados como análisis de rutina en determinaciones semi-cuantitativas y cuantitativas⁹.

1.4. Colorimetría de imágenes digitales.¹¹

Un análisis químico se puede llevar a cabo mediante el estudio del color, proporcionando información cualitativa, semi-cuantitativa y cuantitativa. Estos procedimientos se basan en la comparación del color obtenido frente a experiencias de calibración o referencia. Hoy en día la medida del color puede llevarse a cabo de manera muy eficiente a partir de imágenes digitales capturadas por sistemas de visión, como cámaras digitales, etc.

Los sistemas analíticos basados en esta tecnología de visión artificial (CVAC) pueden ser muy distintos, pero tienen una serie de elementos comunes:

- Fuente de iluminación
- Dispositivo analítico con sus características de color en contacto con la muestra
- Dispositivo de imagen: Cámara digital, escaner, teléfono inteligente...
- Ordenador

- Software para el procesamiento de los datos

Se destaca entre los componentes la utilización de sensores de radiación como los dispositivos de acoplamiento de carga CCD, o CMOS.

En el caso de la colorimetría de imágenes digitales, basada en medida del color producida por reflexión se utilizan diferentes escalas o espacios de color. El más utilizado es el espacio RGB, debido a su parecido con la visión humana, y significa: rojo, verde y azul (red, green and blue). Pero también existen otros como el espacio CIE XYZ o el espacio HSV y espacio CIELAB.

La información química se adquiere de imágenes tomadas directamente de las muestras que son colocadas en pocillos o cubetas con una iluminación seleccionada. En los procedimientos CVAC es suficiente utilizar LEDs como sistemas de iluminación, que son de bajo coste y presentan una amplia gama de longitudes de onda. Además son estables y de bajo consumo. Los más utilizados en este tipo de experimentos son: LED blanco, LED azul, LED rojo y LED verde.

Una vez tomada la imagen, esta se guarda en diferentes formatos como "raw" o "JPEG" y se procesa con programas como Photoshop, imageJ, Matlab, java...

El procesamiento más típico es la segmentación en píxeles. Esto requiere la selección de una zona de la imagen (ROI) y retener los píxeles. En el caso de realizar el estudio con un Smartphone, el detector forma parte de la cámara y el procesamiento se lleva a cabo con una aplicación para Android o iOS, dependiendo del tipo de Smartphone.

En estos sistemas se toma la información colorimétrica de los canales B, R, G de los píxeles y se correlaciona matemáticamente con la presencia, concentración, de analito. Esto ha permitido implementar una nueva técnica conocida como Digital Image Based Methods, DIBM, o Digital Image Colorimetry, DIC.

1.5. Planteamiento del TFG.

Determinación y diferenciación Aminas biógenas, AB, Putrescina-put y Cadaverina-CAD, basado en reacciones enzimáticas que aportan selectividad a la metodología.



Reacciones empleadas:

- 'AB' oxidación (por oxígeno atmosférico). El proceso está catalizado por la enzima di amino-oxidasa, según la reacción

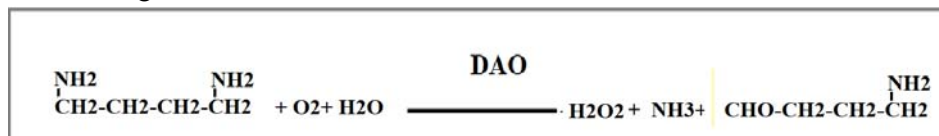
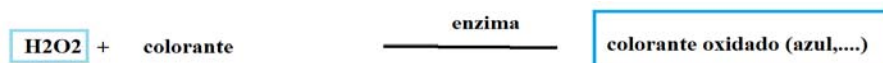


Figura 2: Reacción de oxidación de la Putrescina catalizada por la DAO¹²

- La reacción da lugar a los productos: => **H₂O₂ (HP)** + **NH₃** + **γ-aminobutaraldehído**.
- i- Los tres productos pueden ser medidos y por tanto relacionados a la concentración inicial de AB. Metodología analítica ya ha sido desarrollada para:

- **HP** que puede ser medido a través de la reacción:



Como se ve el ‘Colorante’ se oxida catalizado por HRP=>la especie oxidada presenta una coloración fácilmente perceptible.

Un típico colorante es el compuesto TMB, que oxidado da color ‘azul’. Proceso ampliamente estudiado.

En este TFG se estudian nuevos métodos analíticos basados en las reacciones de los productos:

- ‘butaraldehído, con 2-aminobenzaldehio (OABz-oabz) → producto cromogenico, ‘amarillo’, según la reacción:

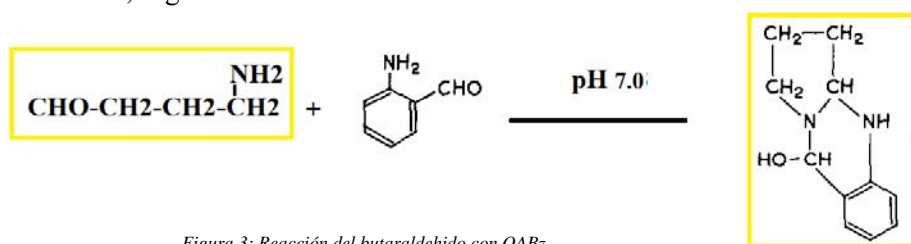




Figura 3: Reacción del butaraldehido con OABz

Se destacan otras características importantes en las reacciones como:¹³

<p>i-Oxidación de la Putrescina →butaraldehido (4).</p>  <p>Este se cicla y es parcialmente volátil. Su reacción con oabz no tiene una cinética larga... 400 s (5 min..</p>	<p>i-oxidación de la cadaverina=>> aminopentaldehido (5)</p>  <p>Que tambien cicla a y es volátil La reaccion con oabz →producto color naranja.</p>
---	--

- NH_3 con reactivo de Nessler → precipitado de color marrón. Su reacción se da a continuación. Este procedimiento también permite la detección y medida mediante imagen digital-DIC.

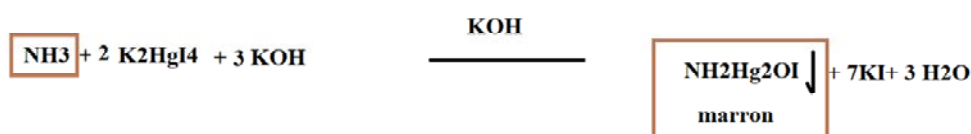


Figura 4: Reacción del NH_3 con Nessler¹⁴







2.- OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO

- ✓ Estudiar las determinaciones de Putrescina y Cadaverina a través de la medida del NH_3 y de los aldehídos generados en sus oxidaciones catalizadas por la DAO.
- ✓ Poner de manifiesto las distintas influencias en las determinaciones de las dos ABs y evaluar las posibilidades para su medida analítica diferenciada
- ✓ Utilizar metodología basada en desarrollos cromogénicos y por tanto implementables en DIC.
- ✓ Validar las determinaciones en DIC frente a métodos espectroscópicos de EAM uv-vis.

CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL

1. INSTRUMENTACION

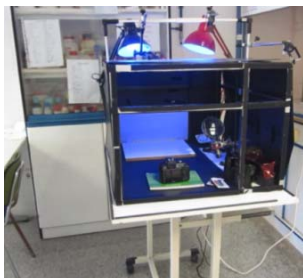
1.1. Cámaras digitales

Cámara réflex NIKON:D3400			
<ul style="list-style-type: none"> ○ Resolución: 24,2megapíxeles, $24,2 \times 10^6$ píxeles -Mp ○ Conversor analógico digital de 12 bits. ○ Sensor CMOS: 23.5x15,6 mm ○ ISO 100- 25600. ○ Lente objetivo: AF P 18-55 mm. ○ Formatos: JPEG y RAW. 			
Web-cam : Logitech C920 HD Pro			
<ul style="list-style-type: none"> ○ Resolución en 'foto': 15 Mp ○ Formatos: JPEG. 			
<ul style="list-style-type: none"> ○ Monochromador Ocean Optics QE65000. ○ Y fibra óptica QP600-1-sR, De alta Transmitancia en la zona visible. ○ Equipado con software : Ocean Optics Spectra Suite. Sobre PC en Windows ○ Lectura: tº integración 100 ms, scans: 4. Rango lambda 340-730 nm 			
Medida de la resolución de los canales de la cámara			
<ul style="list-style-type: none"> ○ Espectrómetro PE LS-50B ○ Lámpara xenón 200-800 nm. ○ Resolución Banda espectral 2,5 nm ○ Sistema de fibra óptica de alta Transmitancia en la zona visible. ○ Cámara Nikon ○ Lectura : cada 5 nm 			

1.2. Materiales de laboratorio: destacados en el método

1. Micropipetas Pipet-Lite 'RAININ' 5-50 μ l, 20-200 μ l, 100 μ l – 1 ml y 0,5-5 ml.
2. Placa de toques: cerámica de 6 pocillos, volumen 3 ml.
3. Placa calefactora y de agitación BIBBY
4. Tubos eppendorf de 2 ml.
5. Cubetas espectrofotométricas de pleexiglass de 3,5 ml

“Camara de iluminacion”:



ILUMINANTES: Lámparas LED

LED Colours EGLO
RGB E27 : REGULABLE A 16 COLORES

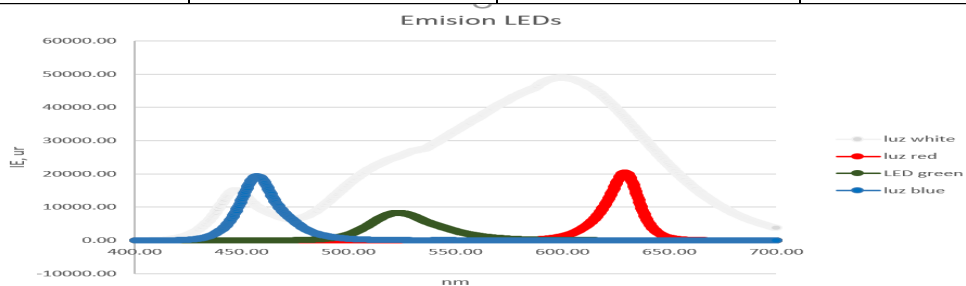
Características LED:
6 WATT, 3000K, WARM WHITE

Panchromatic Warm White

**Monochrome- Red
emission**

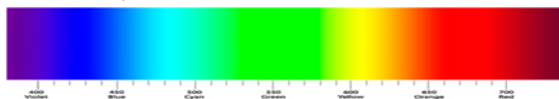
Monochrome- Green

Monochrome- Blue



Espectros de emisión de iluminantes LEDs

Espectro de la zona visible, con el reconocimiento de las bandas-canales de color.



2.-REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS

2.1. Preparación de disoluciones

Todos los reactivos fueron de grado analítico. El agua desionizada fue obtenida de un sistema convencional de purificación de agua destilada.

- Disolución patrón de $\text{NH}_4\text{Cl-N}$:- Se toman 0,4 g de NH_4Cl anhidro y se disuelve en 100 ml de agua desionizada. Producto Sigma: Ammonium chloride, número CAS [12125-02-9], peso molecular 53,49 g/mol.
- Disolución PVA: 0,05 g del agente dispersante en 50 ml de agua desionizada. Producto sigma: Poly(vinyl alcohol), $[-\text{CH}_2\text{CHOH-}]_n$, número CAS [9002-89-5], peso molecular 89,000-98,000 g/mol.
- Disolución patrón Putrescina 1000 mg/l: Se disuelven 0,05 g de Putrescina en 50 ml de tampón fosfato a pH 7. Una vez obtenida la disolución de 1000 mg/l se realiza una dilución 1:10. Producto Sigma: Putrescinedihydrochloride>98% (TLC), $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$, número CAS [333-93-7], peso molecular 161,07 g/mol.

- Disolución patrón de cadaverina 1000 mg/l: Se disuelven 0,05 g de producto en 50 ml de tampón fosfato y a partir de esta se realiza una dilución 1:10. Producto Sigma: Cadaverinedihydrochloride, $C_5H_{14}N_2 \cdot 2HCl$, número CAS [1476-39-7], peso molecular 175,10 g/mol.
- Disolución tampón fosfato pH 7: Se pesan 1,5 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ y se disuelven en 100 ml de agua desionizada. Se adiciona cantidades crecientes de la disolución de HCl 0,1 M hasta que el electrodo de pH marca un valor constante de pH=7. Producto Panreac. Peso molecular 137,99 g/mol. Número CAS [7558-79-4]
- Disolución HCl: Se toman 0,2 ml de HCl concentrado y se diluye a 25 ml con agua desionizada.
- Disolución de OABz: Se pesan 0,02 g de 2-AminoBenzaldehido y se disuelven en 5 ml de tampón fosfato a pH 7. Producto Sigma: 2-aminobenzaldehyde, C_7H_7NO , número CAS [529-23-7], peso molecular 121,14 g/mol.
- Disolución enzima DAO¹⁵: Se filtra la disolución de enzima comercial y se determina su actividad enzimática. Actividad enzimática: 163 U/ml.
- Tiras Macherey-Nagel 91315, para la determinación de amonio-amoniaco. Están basadas en la reacción de Berthelot con indofenol.

2.2. Procedimientos experimentales

2.2.1-Experiencia tipo

Se llevan a cabo con planes y diseños experimentales. En ellos se seleccionan las concentraciones y condiciones de reacción. Se proponen matrices de experiencias como las que aparecen en la siguiente tabla. Y se preparan con volúmenes adecuados de disoluciones patrón-referencia que se vierten sobre cubetas o pocillos de placas de ensayos. Siempre se usan micropipetas para las medidas de volumen.

Expto	Putrescina μl	Tampón μl	DAO μl		OABz μl	Vol. total μl
Blanco	0	905	5	Esperar 1 minuto	90	1000
1	90	815	5		90	1000
2	110	795	5		90	1000
3	200	705	5		90	1000
4	300	605	5		90	1000
5	400	505	5		90	1000
6	500	405	5		90	1000
7	650	255	5		90	1000
8	750	155	5		90	1000

Tabla 1: Experimento tipo para evaluar las prestaciones del método

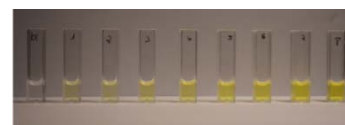


Figura 5: Ejemplo de experimento

2.2.2.- Captura de imágenes

Se colocan las diferentes cubetas-placas en el interior de la 'Lighting-box'. Que deja la selección de una iluminación artificial e indirecta para evitar reflejos en las imágenes. Se toman fotos con cámara digital en modo automático y sin flash.

2.2.3.-Lectura de colores

Las imágenes obtenidas se pasan al ordenador en formatos "raw y jpg" y mediante un programa desarrollado por Matlab se miden las intensidades BRG. La lectura final es el resultado de la medida de 150 pixeles en la región de interés (ROI).

Medida colores	'programa': lectura color', en MatLab 2011b
'ROI'	'líneas de lectura', sobre las cubetas-pocillos
Archivos: Matriz de datos RGB:	Patrones: , 150 puntos'x 3 intensidad(RGB). Muestras: 150 puntos'x 3 intensidad(RGB).
Tratamiento de datos	Mediante Excel 2010

Tabla 2: Procedimiento para la medida y tratamiento de datos en la imagen digital

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- METODOS BASADOS EN LA DETECCION DE AMONIACO.

1.1. Procedimiento de Nessler con alcohol Polivinilico.

El amoniaco produce con el reactivo Nessler un precipitado marrón que permitiría su determinación mediante DIC. Según el esquema siguiente



Figura 6: Reacción del amoniaco con reactivo Nessler

El Método tradicional¹⁶ se puede mejorar mediante adición de Alcohol Poli-vinílico, PVA, como medio dispersante para dar estabilidad al precipitado y a la coloración.

Así se ha llevado a cabo un estudio de influencia de las variables del nuevo procedimiento con PVA. Siempre con Nessler, en medio alcalino fuerte y detección colorimétrica con cámara digital.

Se aplica un diseño de experimentos, DOE, factorial de dos niveles. Con 2+1 variables.

En la tabla 3 se dan los factores, los niveles, y las concentraciones finales.

Siempre trabajando a volumen de 1 ml.

Se presenta la imagen del experimento sobre placas de toques con iluminación 'w' y captura con cámara Nikon D3400, en formatos jpp y raw. También se han usado iluminantes de colores 'r', 'g', 'b'.

dis 2^3 exptos 8	3 varbis 2 nivls		NH4 (N),mg/l	PVA, mg/l	Nessler,Hg mmol/l		
		+	3	0.5	0.4 (40ul)		
		-	1	0.15	0.2(20ul)		
		NH4-N		PVA	Water	Nessler	vol tot, ul
disol=> vols		mg/l	mol/l	mmol/l	mg/l	mmol/l	vol tot
		conc N		PVA	ul	Nessler, Hg	ul
1	3.141	2.24E-05	0.57	25	40	0.4	1000
2	3.141	2.24E-05	0.57	25	20	0.2	1000
3	3.141	2.24E-05	0.23	10	40	0.4	1000
4	3.141	2.24E-05	0.23	10	20	0.2	1000
5	1.047	7.48E-06	0.57	25	40	0.4	1000
6	1.047	7.48E-06	0.57	25	20	0.2	1000
7	1.047	conc N	0.23	10	40	0.4	1000
8	1.047	7.48E-06	0.23	10	20	0.2	1000
9 b1	3.141	2.24E-05	0.00	0	40	0.4	1000
10 b2	3.141	2.24E-05	0.00	0	20	0.2	1000
11 b3	1.047	7.48E-06	0.00	0	40	0.4	1000
12 b4	1.047	7.48E-06	0.00	0	20	0.2	1000

Tabla 3:Diseño experimentos del procedimiento con Nessler



Figura 7: captura imagen del procedimiento con Nessler

La medida de colores reflejados RGB y su tratamiento se ofrecen en las tablas. Se presentan solo los mejores resultados obtenidos con iluminación 'w' y 'b'.

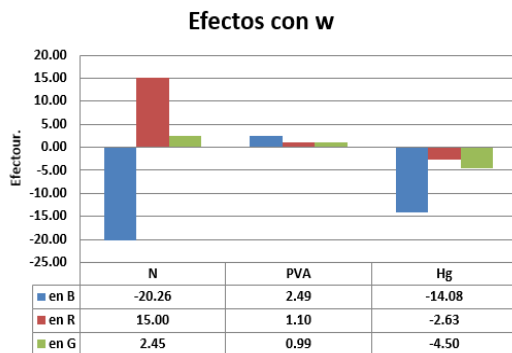


Figura 8: influencia de las variables con iluminante "w"

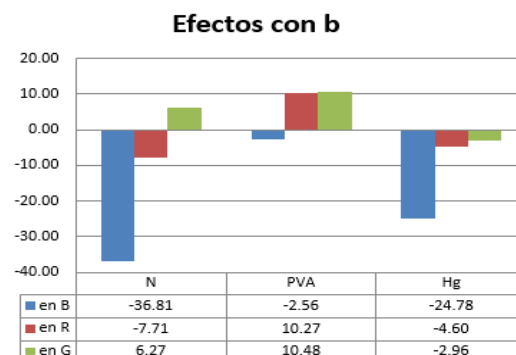


Figura 9: influencia de las variables con iluminante "b"

La influencia de las variables, N, PVA y Nessler (Hg) se presenta para cada uno de los colores reflejados, siempre con iluminaciones 'w' y 'b'.

Se demuestra que hay una respuesta muy sensible, sentido negativo, al contenido de N. Es decir, si aumenta [N] disminuye el color reflejado B. Siendo 1,8 veces más sensible con iluminante b que con w. Por el contrario, la adición de PVA apenas afecta. Es 10 veces menos influyente, aunque es positiva con iluminación w y negativa con la iluminación b.

Como resumen, el experimento sobre NH₃ presenta condiciones óptimas de reacción con: mayor concentración de reactivo Nessler y mayor concentración PVA, siempre dentro el intervalo estudiado. La detección es más sensible con iluminación b y midiendo el canal B.

Según los resultados y condiciones anteriores se estudia la aplicación del procedimiento como método DIC para la determinación de NH₃-N.

Se evalúan sus prestaciones a partir de un diseño de regresión lineal. Se preparan patrones de NH₃-N en pocillos de una placa, se toman imágenes digitales y se miden los canales BRG.

Los mejores datos de la regresión lineal con el color reflejado B e iluminantes w, b, se dan en la Gráfico 1.

Se observa que la recta con b-B es más sensible pero satura la respuesta del canal y se acortan los rangos analíticos.

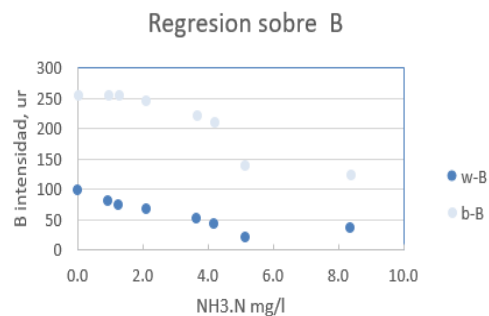


Gráfico 1: Regresión lineal para "wB" y "bB"

Como alternativa, la opción w-B es menos sensible, pero produce un mayor rango lineal.

En estas condiciones el método produce un valor de LQ= 0,94 mg/l. El rango lineal se mantiene hasta 5,1 mg/l, con alta sensibilidad, en valor negativo, de -13,7 l/mg de NH₃-N.

w-B	Regresion lineal simple: Y señal vs X conc		
	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.	
pendiente	-13.652	96.440	O. Origen
desvest	1.105	3.343	desvest
r ²	0.968	5.126	error tipico
F	152.668	5.000	gdl (n-2)
ss reg	4011.689	131.386	ss res,PRESS
r	0.984	4.332	RMSPE, calib
min-LQ	0.940	1.757	RMSEPE/c
max-LML	5.130		
centroide	2.466		

Tabla 4: Coeficientes del modelo lineal

1.2. Determinación de Putrescina en disolución.

Se propone un nuevo método para la determinación de Putrescina en base a la medida del amoniaco producido tras su oxidación, que tiene lugar según las reacciones siguientes:

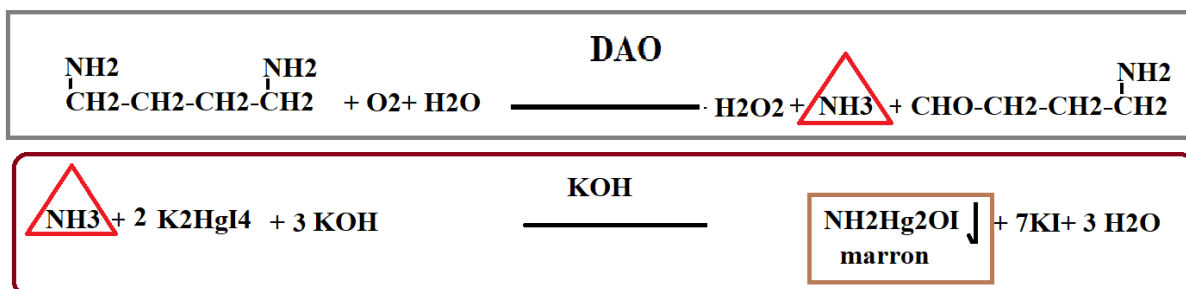


Figura 10: Reacciones para la determinación de putrescina en disolución

Las relaciones estequiométricas son :

1 mol ABs produce → 1 mol H₂O₂ + 1 mol NH₃ + 1 mol Butaraldehido

El procedimiento requiere una primera etapa de oxidación de la Putrescina, en tubo eppendorf. Y la segunda de detección del amoniaco, en placa de toques con reactivo Nessler y PVA como estabilizante.

A continuación, se ofrecen los datos del diseño de los patrones experimentales y las imágenes del proceso.

CONDICIONES REACCION						
Putrescina		tampon, pH 7	DAO	vol inic, ul	1 min	NH ₃ -N teor
mg/l	mmol/l	ul	u.i./ml	ul		mmol/l
0.00	0.000	995	2	1000		0.0000
11.74	0.073	895	2	1000		0.0729
23.48	0.146	795	2	1000		0.1458
35.22	0.219	695	2	1000		0.2187
46.96	0.292	595	2	1000		0.2916
58.70	0.364	495	2	1000		0.3644
70.44	0.437	395	2	1000		0.4373
82.18	0.510	295	2	1000		0.5102

Tabla 5: Condiciones de reacción para la putrescina en disolución

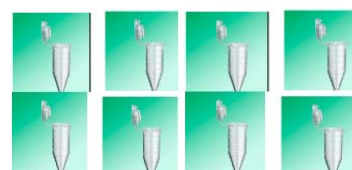


Figura 11: Tubos eppendorf donde ocurre la reacción

CONDICIONES DETECCION					
Sample, Putr	conc Put	PVA	Agua	Nessler	vol tot, ul
ul	mg/l	ul	ul	ul	ul
800	0.00	25.0	135.0	40	1000
800.0	9.39	25.0	135.0	40	1000
800.0	18.78	25.0	135.0	40	1000
800.0	28.18	25.0	135.0	40	1000
800.0	37.57	25.0	135.0	40	1000
800.0	46.96	25.0	135.0	40	1000
800.0	56.35	25.0	135.0	40	1000
800.0	65.74	25.0	135.0	40	1000

Tabla 6: Condiciones de detección de putrescina en disolución



Figura 12: Captura imagen del procedimiento de determinación de putrescina en disolución

La lectura de los canales RGB en los pocillos de la placa de toques y el estudio de la regresión lineal da los siguientes valores:

Putrescina				
	mg/l, inicial	mg/L final	w-B	b-B
1	0.000	0.000	87.720	223.687
2	11.740	9.390	79.433	209.640
3	23.480	18.780	75.760	210.427
4	35.220	28.180	70.747	216.200
6	58.700	46.960	60.000	208.460
7	70.440	56.350	54.893	184.293
8	82.180	65.740	56.493	183.260

Tabla 7: Respuesta cromática para "wB" y "bB"

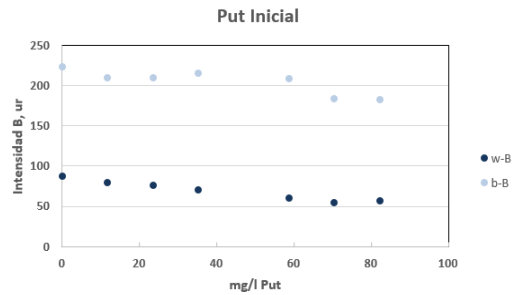


Gráfico 2: Regresión lineal para la putrescina con "wB" y "bB"

Se observa una mejor respuesta analítica en las condiciones w-B. Mientras que con iluminante b y detección B se reduce el rango de respuesta. Los principales valores de las prestaciones, con wB, ofrecen: respuesta lineal en el rango, 0 – 70,4 mg/l de Putrescina. El LD (calculado sobre 'error típico' de los residuales que es una mejor estimación pues incluye toda la recta) es 4,8mg/l y LQ 11,7 mg/l .

El error de calibración, obtenido en calculo con calibración inversa, es 5,1 mg/l.

wB señal	Regresion lineal simple: Y señal vs X conc		
put=inicial	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.	
pendiente	-0.450	86.386	O.Origen
desvest	0.018	0.736	desvest
r^2	0.994	1.079	error tipico
F	642.505	4.000	gdl (n-2)
ss reg	748.082	4.657	ss res,PRESS
r	0.997	0.881	RMSPE, calib
min-LQ	11.740	0.021	RMSEPE/c
max-LML	70.440	4.8	LD=2xerror tipico/pdte
centroide	41.090		

Tabla 8: Coeficientes del modelo lineal para "wB"

1.3. Determinación de Putrescina con tiras reactivas.

Una alternativa de interés es la determinación de amoniaco mediante tiras reactivas. Es decir, producir la oxidación en disolución y de la misma tomar una fracción que se impregna en una tira reactiva colorimétrica. El color desarrollado pasa a compararse frente a una escala colorimétrica o bien se mide en una imagen digital. En el primer caso el método tiene una aplicación semi-cuantitativa. Mientras que la imagen digital proporciona una medida cuantitativa.

En este trabajo se han evaluado las tiras Macherey-Nagel, MN 93135, que están basadas en la reacción del amoniaco con indofenol. Son aplicables en el rango 0-7 mg/l NH₃.

Esquema de la reacción:¹⁷

Reacción de Berthelot:

- 1- amoniaco con hipoclorito =>mono cloro-amina
 - 2- momo cloro-amina + timol =>imina.
- Catalizador: nitroprusiato
 3-imina + timol =>indotimol (color azul)
 máximo absorción:675 nm.

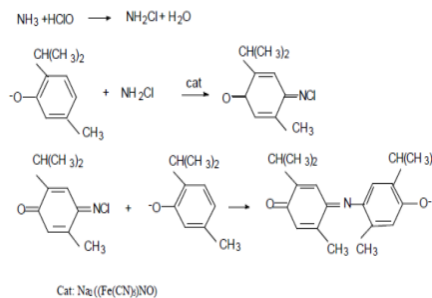


Figura 13: Esquema de la reacción de Berthelot

Nuestro procedimiento consta de dos etapas: La primera es la oxidación de las ABs y segunda la detección. En esta se toman 30 µl de disolución de oxidación y se inyectan sobre la 'almohadilla reactiva' de una tira de papel. El NH₃ produce color azulado que se captura con cámara digital. En la Tabla 9 se muestra el diseño de experimento para la Putrescina y la figura 9, las imágenes del procedimiento.

concentration		mol put:mol NH3		vol tot		t ^o		tira reactiva	
concentration	u.i./ml	concentration	mg/L	vol tot	ul	t ^o	1 min	tira reactiva	inyect ul
mg/l	mol/l	DAO	mg/L	ul	ul	1 min	1 min	inyect ul	inyect ul
0.000	0.00E+00	2.00	0.000	1000				30	
11.740	7.29E-05	2.00	1.239	1000				30	
19.958	1.24E-04	2.00	2.106	1000				30	
29.350	1.82E-04	2.00	3.098	1000				30	
35.220	2.19E-04	2.00	3.717	1000				30	
41.090	2.55E-04	2.00	4.337	1000				30	
49.308	3.06E-04	2.00	5.204	1000				30	

Tabla 9: Diseño experimental para la determinación de putrescina con tiras reactivas

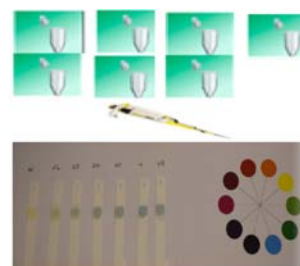


Figura 14: Procedimiento con tiras reactivas

La medida de todos los canales de la cámara digital en las diferentes iluminaciones, permite caracterizar la respuesta analítica en las mejores prestaciones.

Se presentan los resultados de regresión obtenidos con iluminación 'w' y 'b', en el canal B.

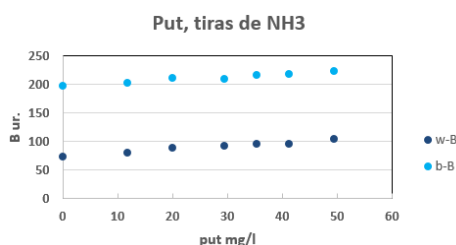


Gráfico 3: Regresión lineal de putrescina con tiras reactivas

Se observa que en este caso la iluminación 'b' no satura el detector. El método es algo más sensible que en disolución, con una pendiente positiva.

Prestaciones: LD 8,0 mg/l de Putrescina y LML en el orden de 50 mg/l.

La regresión tiene sensibilidad positiva, un menor error de residuales y en consecuencia mejora las prestaciones.

Este método además tiene la ventaja de ser más sencillo pues evita la preparación de una segunda dilución.

1.4. Aplicación a la cadaverina.

El método enzimático de oxidación de la cadaverina con medida del NH₃ mediante el reactivo Nessler, por tanto, en disolución, se expone en las siguientes tablas y figuras.

w-B Regresión lineal simple: Y señal vs X conc			
=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)			
	b	O.O.	
pendiente	0.593	73.605	O.Origen
desvest	0.041	1.264	desvest
r ²	0.977	1.716	error tipico
F	212.375	5.000	gdl (n-2)
ss reg	625.184	14.719	ss res,PRESS
r	0.988	1.450	RMSPE, calib
min-LQ	11.740	0.054	RMSEPE/c
max-LML	49.308	5.8	LD=2xerror tipico/pdte
centroide	26.667		

Tabla 10: Coeficientes del modelo lineal para "wB"

b-B Regresión lineal simple: Y señal vs X conc			
=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)			
	b	O.O.	
pendiente	0.501	197.483	O.Origen
desvest	0.048	1.483	desvest
r ²	0.957	2.014	error tipico
F	110.205	5.000	gdl (n-2)
ss reg	447.021	20.281	ss res,PRESS
r	0.978	1.702	RMSPE, calib
min-LQ	11.740	0.064	RMSEPE/c
max-LML	49.308	8.04	LD=2xerror tipico/pdte
centroide	26.667		

Tabla 11: Coeficientes del modelo lineal para "bB"

	mg/L cadav in	mg/L cadav fin	w-B	b-B
1	0.00	0.00	106.33	192.47
2	11.74	9.39	80.00	187.56
3	23.48	18.78	70.00	175.08
4	35.22	28.18	63.06	172.00
5	46.96	37.57	58.00	165.00
6	58.70	46.96	50.00	160.00
7	70.44	56.35	44.87	144.08
8	82.18	65.74	46.79	136.93
9	93.92	75.14	38.73	135.29

Tabla 12: Respuesta cromática de la cadaverina con "wB" y "bB"

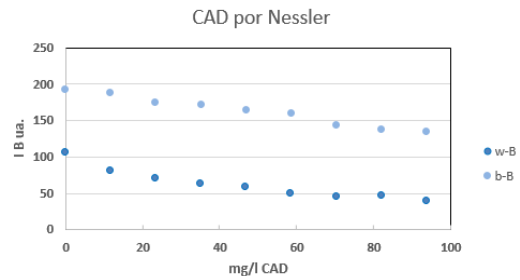


Gráfico 4: Regresión lineal de cadaverina con Nessler

La respuesta analítica en las condiciones w-B muestra LD de 5,0 mg/l. El error de calibración es de 2,04 mg/l. El rango lineal se reduce al intervalo 11,74-70,40 mg/l.

En iluminación b-B no se satura el canal. Y se obtiene rango lineal hasta los 93,92 mg/l. El LD en estas condiciones está en el rango de 10 mg/l.

w-B señal	Regresión lineal simple: Y señal vs X conc		
CAD inicial	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.	
pendiente	-0.5859	85.0604	O.Origen
desvest	0.0300	1.3713	desvest
r^2	0.9896	1.4731	error típico
F	381.5139	4.0000	gdl (n-2)
ss reg	827.8475	8.6796	ss res,PRESS
r	0.9948	1.2027	RMSPE, calib
min-LQ	11.7400	0.0293	RMSEPE/c
max-LML	70.4400	5.03	LD=2x error típico/pdte
centroide	41.0900		

Tabla 13: Coeficientes del modelo lineal con "wB"

b-B señal	Regresión lineal simple: Y señal vs X conc		
CAD inicial	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.	
pendiente	-0.6454	193.4650	O.Origen
desvest	0.0354	1.9762	desvest
r^2	0.9794	3.2152	error típico
F	333.2117	7.0000	gdl (n-2)
ss reg	3444.6557	72.3642	ss res,PRESS
r	0.9897	2.8356	RMSPE, calib
min-LQ	11.7400	0.0537	RMSEPE/c
max-LML	93.9200	9.96	LD=2x error típico/pdte
centroide	52.8300		

Tabla 14: Coeficientes del modelo lineal con "bB"

2.- METODOS BASADOS EN LA REACCION CON 2-AMINOBENZALDEHIDO.

2.1. Condiciones de Reacción y detección en DIC.

La actividad de la DAO ha sido estudiada por un procedimiento espectrofotométrico¹⁸. En él se oxida una concentración conocida de Putrescina por una disolución de DAO. Finalmente se hace reaccionar con 2-aminobenzaldehído -oabz- para dar un producto de condensación con absorbancia máximo a 424 nm.

Este procedimiento se ha modificado para medir la concentración de la Putrescina, manteniendo una DAO constante.

En la figura 14 se ven los pasos del procedimiento: i-oxidación de la Putrescina a butaraldehído, y ii- reacción subsiguiente con 'oabz':

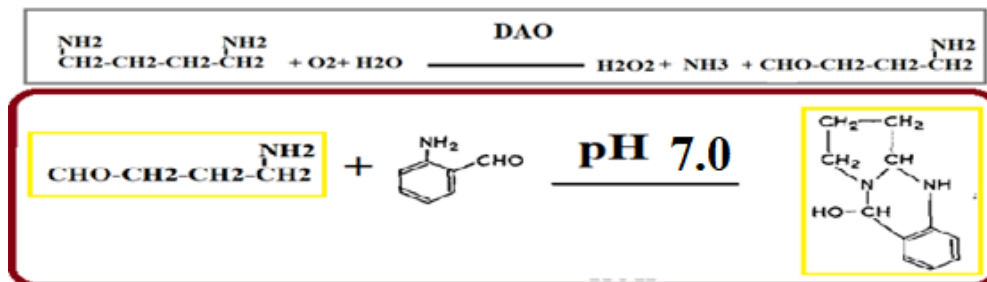


Figura 15: Reacciones para la determinación de putrescina con 2-Aminobenzaldehído

Se ha evaluado inicialmente las posibilidades del procedimiento de la bibliografía.

Se prepara el diseño del experimento según la Tabla 15. Se miden los espectros EAM uv-vis (vs. disolución de blanco) y, de las imágenes digitales, las medidas de reflectancia RGB con iluminación 'w' y 'b'. Las condiciones de iluminación 'r' y 'g' tiene respuestas menos favorables.

conctr	tampon	DAO	tº	conc 'oabz'	vol tot
1) mg/l	mol/l	2) pH=7	3) u.i./ml	4) 1 min	5) mol/l
0.000	0.00E+00	v	1.82	2.50E-03	1100
10.673	6.63E-05	v	1.82	2.50E-03	1100
32.018	1.99E-04	v	1.82	2.50E-03	1100
42.691	2.65E-04	v	1.82	2.50E-03	1100

secuencia de inyecciones del proceso: 1),...2),...5)

Tabla 15: Diseño de experimentos para la determinación de las condiciones

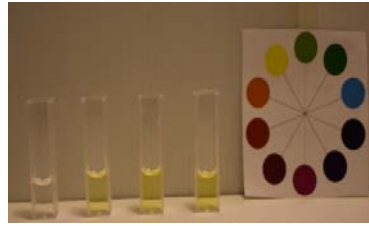


Figura 16: Captura imágenes con iluminante w

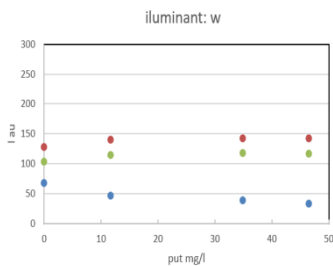


Gráfico 5: Regresión lineal con iluminante w

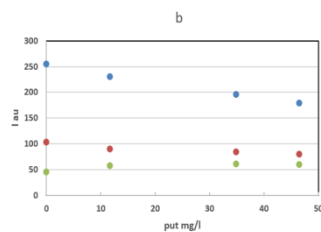


Gráfico 6: Regresión lineal con iluminante b

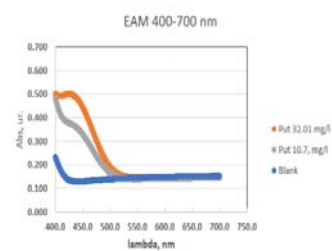


Figura 17: Espectro de absorción de Putrescina a diferentes concentraciones

Los resultados confirman la respuesta cromática RGB como función de la Putrescina. Es más sensible en el color B y aun más con iluminante 'b'. Los espectros EAM presentan correlación con la medida DIC.

De la misma manera se estudia el procedimiento con Cadaverina. El resultado muestra una coloración naranja. Y su máximo de absorción presenta un desplazamiento batocrómico hacia el rojo. La bibliografía justifica las diferencias entre las dos ABs por formación de un producto de adición al oabz con anillo de 6 enlaces.

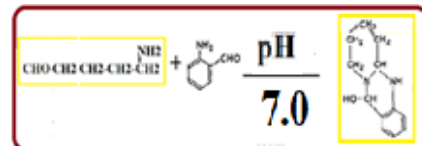


Figura 18: Reacción cadaverina con 2- aminobenzaldehido

En la Figura 18 se comparan y diferencian los espectros de ambas ABs, para concentraciones de 35 mg/l, a pH 7,0 .

Putrescina: lambda max= 435 nm

Cadaverina: lambda max=460 nm

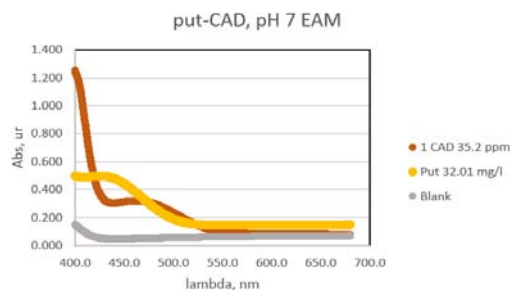


Figura 19: Espectro de absorción de putrescina y de cadaverina

2.2. Prestaciones analíticas del método DIC hacia la Putrescina

Se ha llevado a cabo un estudio analítico detallado de las reacciones anteriores mediante colorimetría DIC y también por EAM-uv-vis.

Se ha preparado una experiencia de calibración para la Putrescina según los datos de la Tabla 15. Las imágenes digitales del experimento con iluminación 'w' y 'b', y los valores de varianza cromática obtenida se dan a continuación.

	Put		tampon	DAO	t ^e	oabz'	vol tot
	1) mg/l	mol/l					
disol=>			2) pH	3) u.i./ml	4) 1 min	5) mol/l	ul
bl	0	0	6,8	0,82		2,48E-03	1000,0
1	9,63	5,98E-05	6,8	0,82		2,48E-03	1000,0
2	11,77	7,31E-05	6,8	0,82		2,48E-03	1000,0
3	21,4	1,33E-04	6,8	0,82		2,48E-03	1000,0
4	32,1	1,99E-04	6,8	0,82		2,48E-03	1000,0
5	42,8	2,66E-04	6,8	0,82		2,48E-03	1000,0
6	53,5	3,32E-04	6,8	0,82		2,48E-03	1000,0
7	69,6	4,32E-04	6,8	0,82		2,48E-03	1000,0
8	80,3	4,98E-04	6,8	0,82		2,48E-03	1000,0

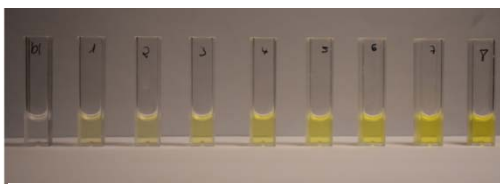


Figura 20: Captura imagen con iluminante "w"

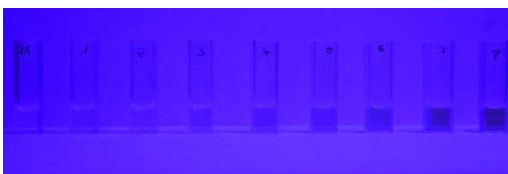


Figura 21: Captura imagen con iluminante "b"

Tabla 15: Diseño experimental de putrescina para la determinación de las prestaciones analíticas

Varianza cromática

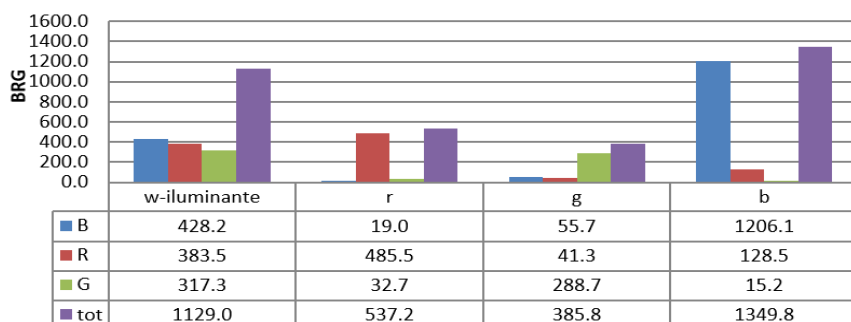


Figura 22: Varianza cromática para la determinación de las prestaciones analíticas con putrescina

Los valores de varianza cromática identifican el color B con la mayor influencia y por tanto potencialidad analítica. Además, la respuesta del color B mejora con iluminación b.

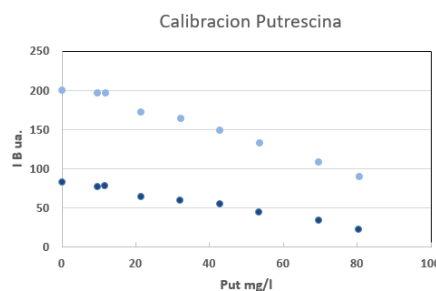


Gráfico 7: Regresión lineal de putrescina con wB y bB

El estudio estadístico de la regresión en condiciones wB da un valor de sensibilidad de 0,75 l/mg de Putrescina, con LD de 6,85 y LML 80,5 mg/l.

El error de calibración en mg/l, calculado en calibración inversa, es 2,87. Mientras que el error de validación mediante CV-LOO es de 3,41 mg/l.

w-B señal	Regresión lineal simple: Y señal vs X conc		
Put	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.	
pendiente	-0.7471	83.8461	O. Origen
desvest	0.0417	2.0919	desvest
r ²	0.9847	2.5577	error típico
F	321.4096	5.0000	gdl (n-2)
ss reg	2102.6537	32.7099	ss res, PRESS
r	0.9923	2.1617	RMSPE, calib
min-LQ	11.7700	0.0468	RMSEPE/c
max-LML	80.5200	6.85	LD=2 x error típico/pdte
centroide	46.1450		

Tabla 16: Coeficientes del modelo lineal de putrescina con "wB"

Para la regresión con bB se presenta una sensibilidad que duplica la anterior. Y menor LD, con 4,6mg/l. Los rangos de linealidad se mantienen. Y los errores de calibración y Validación CV-LOO son de 1,95 y 3,6mg/l

b-B señal		Regresion lineal simple: Y señal vs X conc	
Put	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.	
pendiente	-1.4843	210.7537	O.Origem
desvest	0.0561	2.8174	desvest
r ²	0.9929	3.4448	error tipico
F	699.5041	5.0000	gdl (n-2)
ss reg	8300.5496	59.3317	ss res,PRESS
r	0.9964	2.9113	RMSPE, calib
min-LQ	11.7700	0.0631	RMSEPE/c
max-LML	80.5200	4.6	LD=2 x error tipico/pdte
centroide	46.1450		

Tabla 17: Coeficientes del modelo lineal con "bB"

2.3. Características analíticas de las medidas en EAM uv- vis

De acuerdo con el experimento de calibración se han obtenido los espectros de absorción EAM-uv vis de las disoluciones. Los resultados de la calibración del método, a partir de las absorbancias, a la longitud de onda del máximo de absorción, a 435 nm, se dan en la tabla e imágenes siguientes:

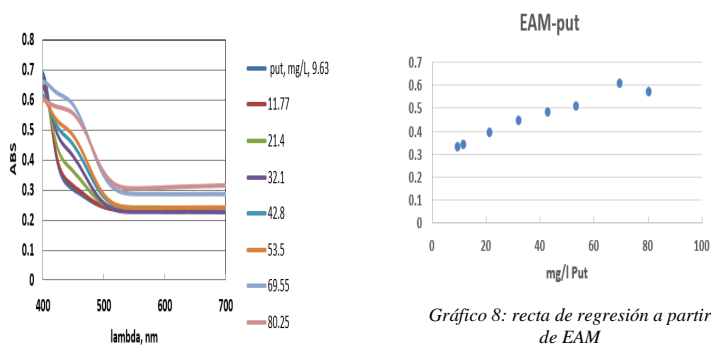


Figura 23: Espectros de absorción de putrescina

Gráfico 8: recta de regresión a partir de EAM

put		Regresion lineal simple: Y señal vs X conc	
4	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.	
pendiente	0.0042	0.2721	O.Origem
desvest	0.0002	0.0077	desvest
r ²	0.9876	0.0093	error tipico
F	317.9013	4.0000	gdl (n-2)
ss reg	0.0272	0.0003	ss res,PRESS
r	0.9938	0.0076	RMSPE, calib
LQ	9.6300	0.0002	RMSEPE/c
LML	53.5000	4.3859	LDO 2x desvest / pdte
centroide	31.5650		

Tabla 18: Coeficientes del modelo lineal mediante EAM

El método EAM uv-vis presenta un LD en torno a 3 mg/l que es inferior al obtenido en DIC por bB. El error de calibración deducido en proceso inverso es 1,3 mg/l que está en el orden de 1,95 mg/l mediante DIC y bB.

Como tendencia general el método EAM tiene rango lineal más corto que mediante DIC, menor valor de LD y similar valor de error en calibración.

2.4. Prestaciones analíticas de los métodos DIC y EAM con la cadaverina.

Se ha realizado un estudio analítico para la cadaverina mediante la aplicación de un diseño similar y con medidas por DIC y EAM.

CADAVERINA		Tampon	DAO	tº	oabz'	vol tot
1) mg/l	mol/l	2) pH	3) u.i./ml	1 min	5) mol/l	ul
0	0	7.0	0.82		2.48E-03	1000.0
10.1	6.258E-05	7.0	0.82		2.48E-03	1000.0
12.3	7.649E-05	7.0	0.82		2.48E-03	1000.0
22.4	0.0001391	7.0	0.82		2.48E-03	1000.0
33.6	0.0002086	7.0	0.82		2.48E-03	1000.0
44.8	0.0002781	7.0	0.82		2.48E-03	1000.0
56.0	0.0003477	7.0	0.82		2.48E-03	1000.0
72.8	0.000452	7.0	0.82		2.48E-03	1000.0
84.0	0.0005215	7.0	0.82		2.48E-03	1000.0

Tabla 19: Diseño de experimento para las prestaciones analíticas de la cadaverina

La varianza cromática del estudio muestra la mayor influencia del color B y de nuevo se aumenta con iluminación b. Este efecto es más importante en la cadaverina que en lo visto anteriormente con la Putrescina. Así la varianza en condiciones máximas presenta una relación: 1,9 veces (2500/1350) superior en CAD respecto a la put.

Varianza-CAD

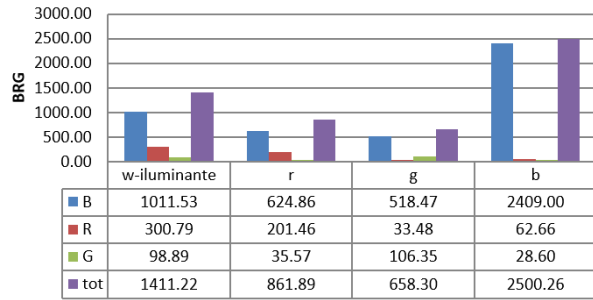


Figura 24: Varianza cromática para la determinación de las prestaciones analíticas con cadaverina

Las regresiones con iluminación 'w' y 'b' son las que presentan mejores prestaciones analíticas. Las diferencias se identifican sobre la gráfica 9. Es la iluminación 'b' la que produce un mayor rango de linealidad. Mientras que 'w' acorta el rango. El estudio estadístico de la calibración se da en las siguientes tablas.

Cad prestaciones

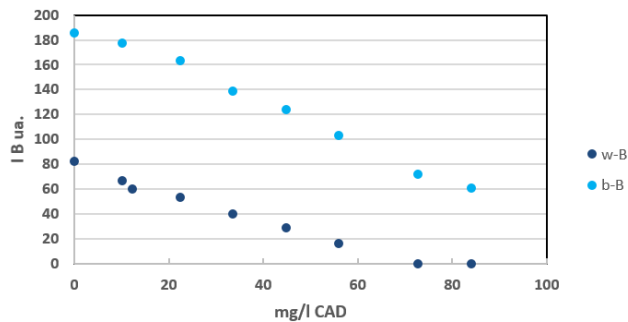


Gráfico 9: Regresión lineal cadaverina con wB y bB

La calibración en wB tiene una gran pendiente, pero el rango lineal se acorta hasta 73 mg/l. El LD está en el orden de 5 mg/l. Los errores de calibración, en inversa, es de 2,1 mg/l y el de validación 7,51 mg/l.

La calibración con bB aumenta el rango lineal a 84 mg/l y el LD a 8,9 mg/l.

El error de la calibración, en inversa, es de 3,8 mg/l y el de la validación CV-LOO 4,74 mg/l.

wB señal	Regresión lineal simple: Y señal vs X conc		
	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.	
pendiente	-1.093	77.773	O. Origen
desvest	0.039	1.549	desvest
r ²	0.992	2.614	error típico
F	767.468	6.000	gdl (n-2)
ss reg	5242.915	40.989	ss res, PRESS
r	0.996	2.264	RMSPE, calib
min-LQ	10.080	0.055	RMSEPE/c
max-LML	72.800	4.8	LD=2xerror típico/pdte
centroide	41.440		

Tabla 20: Coeficientes del modelo lineal con "wB"

bB señal	Regresión lineal simple: Y señal vs X conc		
	=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.	
pendiente	-0.625	120.542	O. Origen
desvest	0.021	2.918	desvest
r ²	0.992	2.743	error típico
F	901.844	7.000	gdl (n-2)
ss reg	6786.314	52.675	ss res, PRESS
r	0.996	2.419	RMSPE, calib
min-LQ	10.080	0.051	RMSEPE/c
max-LML	84.000	8.8	LD=2xerror típico/pdte
centroide	47.040		

Tabla 21: Coeficientes del modelo lineal con "bB"

El estudio mediante EAM uv-vis en el rango 400-700 nm se expone en las figuras.

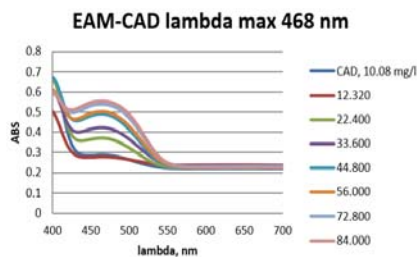


Figura 25: Espectro de absorción de la cadaverina

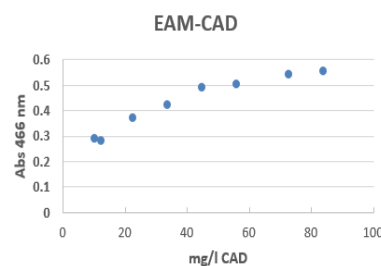


Gráfico 10: recta de regresión de cadaverina a lambda 468 nm

La recta de regresión para la absorbancia a la λ máxima da los siguientes valores y presenta un error de calibración de 0,87 mg/l. La principal característica es el acortamiento del rango lineal respecto a los resultados en DIC.

CAD		Regresión lineal simple: Y señal vs X conc		
468 nm		=ESTIMACION.LINEAL(Y;X;0=0;0=0)		
	b	O.O.		
pendiente	0.0058	0.2319	O. Origen	
desvest	0.0002	0.0062	desvest	
r ²	0.9956	0.0065	error típico	
F	681.5573	3.0000	gdl (n-2)	
ss reg	0.0286	0.0001	ss res,PRESS	
r	0.9978	0.0050	RMSPE, calib	
LQ	10.0800	0.0002	RMSEPE/c	
LML	44.8000	2.2407	LDO 2x desvest / p dte	
centroide	27.4400			

Tabla 25: Coeficientes del modelo lineal a 468 nm

2.5. Robustez de los métodos con oabz.

Como parte de la validación del método se ha estudiado la robustez, o influencia de pequeños cambios en las condiciones de reactividad, sobre la respuesta, su ‘desviación’.

Se ha aplicado un diseño de Youden-Steiner sobre la Putrescina y cadaverina.

En las siguientes tablas se ofrece el diseño experimental, las variables, los valores óptimos, los rangos de estudio y los resultados. Este estudio proporciona la influencia de los parámetros y la clasificación del método como robusto o no.

Esquema Youden-Steiner: variables y variaciones $\pm 7\%$ y tabla de experimentos (2^7) fraccionada.

factor	factor	Val Optimo	Variacion, $\pm 7\%$
1	A-Tampon, pH	6.8	6.5
2	B-vol tampon, ul	580	550
3	C-DAO, ul	90.00	110.00
4	D-1° calto Mw,sg	15	14.0
5	E-Pot MW, wat	baja-1	media-3
6	F-DAO, ul	5.00	10.00
7	G-1° estalitzar	20	40

Tabla 23: Variables con valores óptimos y su variación

exptos	factor A(1)	B	C	D	E	F	factor G(7)
num 1	A	B	C	D	E	F	G
2	A	B	c	D	e	f	g
3	A	b	C	d	E	f	g
4	A	b	c	d	e	F	G
5	a	B	C	d	e	F	g
6	a	B	c	d	E	f	G
7	a	b	C	D	e	f	G
8	a	b	c	D	E	F	g

Tabla 24: tabla de experimentos Youden-Steiner

Diseño experimental:

CONDICIONES EXPERIMENTO									
27/03/2019 Se cambia el orden de adición de reactivos. Y se aumenta la conc de ABz Al que se había aplicado en la primera determinación									
exptos	Putr	A-Tampon	B-vol tampo	C-oABz	D-1° Mw	E-Pot MW	F-DAO	G-1° estalitzar	+ water
	ul	pH	ul	ul	sg	wat	ul	sg	ul
1	300.0	6.8	580.0	90.0	15.0	3.0	5.0	20.0	25.0
2	300.0	6.8	580.0	110.0	15.0	1.0	10.0	40.0	0.0
3	300.0	6.8	550.0	90.0	14.0	3.0	10.0	40.0	50.0
4	300.0	6.8	550.0	110.0	14.0	1.0	5.0	20.0	35.0
5	300.0	6.5	580.0	110.0	14.0	1.0	5.0	40.0	5.0
6	300.0	6.5	580.0	90.0	14.0	3.0	10.0	20.0	20.0
7	300.0	6.5	550.0	110.0	15.0	1.0	10.0	20.0	30.0
8	300.0	6.5	550.0	90.0	15.0	3.0	5.0	40.0	55.0

Tabla 25: Diseño experimental de la robustez para la Putrescina

conc putr		conc OABz	DAO	vol final
mg/l	mol/l	mol/l	u.i./ml	ul
35.2	2.19E-04	2.48E-03	2.00	1000
35.2	2.19E-04	3.03E-03	4.00	1000
35.2	2.19E-04	2.48E-03	4.00	1000
35.2	2.19E-04	3.03E-03	2.00	1000
35.2	2.19E-04	3.03E-03	2.00	1000
35.2	2.19E-04	2.48E-03	4.00	1000
35.2	2.19E-04	3.03E-03	4.00	1000
35.2	2.19E-04	2.48E-03	2.00	1000
0.0	0.00E+00	2.48E-03	2.00	1000

Tabla 26: En concentraciones

Calculo de efectos:

Sobre la señal de B. Se deduce la desviación estándar, valor S_{di}, como experimental y se compara frente al valor S_d de referencia del método.

RESULTADOS	Efectos	significación		
Diferencias	Diferencias	Dif ²	factor	
A-a	efecto = (SUMA(F2:F5;J4) - (SUMA(F6:F9;J4)) / 4)	1.31	1.725	A-Tampon
B-b		-0.37	0.139	B-vol tampon, ul
C-c		0.79	0.624	C-oABz, ul
D-d		-4.62	21.314	D-1° calto Mw,sg
E-e		-1.97	3.868	E-Pot MW, wat
F-f		-1.58	2.496	F-DAO, ul
G-g		-0.27	0.073	G-1° estalitzar

S_{di} = S

Desviación estándar de las diferencias D_i (S_{di})
 $S_{di} = \sqrt{2^2 \cdot S_d^2 / 7}$

desvest	S _{di}	2.939	=RAIZ(2*SUMA(F16:F22)/CONTAR(F16:F22))
diferencia			
desvest	S intralab:	xxxx.xxxx	S intralab: P.0.15, (1/6 68575
intralab	determinado en el lab		ivel % (1-0.15)x100

S_{di} > S intralab las condiciones influyen

comparar El método no es robusto

S_{di} < S intralab las condiciones no influyen

metodo robusto

Tabla 27: Cálculo de la desviación del método e influencia de las variables

PUTRESCINA

factor	efecto
A-Tampon	1.31
B-vol tampon, ul	-0.37
C-oABz, ul	0.79
D-t° calto Mw,sg	-4.62
E-Pot MW, wat	-1.97
F-DAO, ul	-1.58
G-t° estailizar	-0.27
RESULS w illuminant	B
Sdi	2,940
SD ref.= 15%, mean sig	6.68
comaprison	robusto

Tabla 28: Efectos obtenidos para la Putrescina con

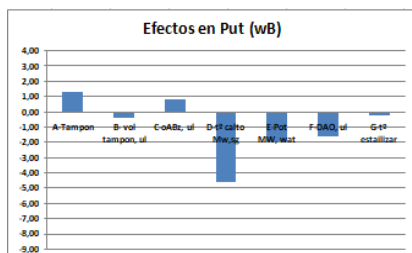


Gráfico 11: Efectos en putrescina con "wB"

CADAVERINA

factor	efecto
A-Tampon	3,54
B-vol tampon, ul	2,16
C-oABz, ul	-0,28
D-t° calto Mw,sg	-8,33
E-Pot MW, wat	-2,79
F-DAO, ul	-0,41
G-t° estailizar	0,72
RESULS w illuminant	B
Sdi	5,21
SD ref.= 15%, mean sig	6,217625
comaprison	robusto

Tabla 29: Efectos obtenidos para la cadaverina con

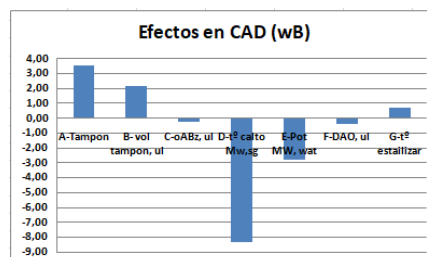


Gráfico 12: Efectos en cadaverina con "wB"

Los resultados muestran que el método es robusto, tanto para Putrescina como cadaverina. En la Putrescina el método presenta un valor SDi de 2,9 frente a un valor de referencia de 6,68 como varianza intralab. Para la Cadaverina, de modo similar, el método se dice robusto ya que SDi es inferior al valor de referencia.

Como variable más influyente: el pH del tampón. En la Putrescina la modificación del tampón, de un pH 7,0 a 6,5, incrementa el color B con un efecto de 1,31. En el caso de la Cadaverina este efecto es de 3,5. Es decir, el cambio de pH le afecta 2,7 veces más que a la Putrescina.

2.6. Estudios de diferenciación.

Se ha llevado a cabo un estudio de las diferencias analíticas entre las ABs. En este sentido se evalúan las influencias de los principales factores sobre la señal cromática. Se han elegido las variables tampón-pH y DAO-concentración, sobre los colores más significativos wB y bB.

En las tablas se da el diseño del experimento, DOE factorial completo, 2^2 : dos variables (tampón, y DAO) a dos niveles (+,-).

exptos	conc put		Tampon	DAO	t°	conc OABz	vol tot
	mg/l	mol/l	pH	u.i./ml	1 min	mol/l	ul
bl	0,0	0	6,5	2,00		2,48E-03	1000,0
1	35,2	2,19E-04	6,8	4,00		2,48E-03	1000,0
2	35,2	2,19E-04	6,8	2,00		2,48E-03	1000,0
3	35,2	2,19E-04	6,5	4,00		2,48E-03	1000,0
4	35,2	2,19E-04	6,5	2,00		2,48E-03	1000,0

Tabla 30: Diseño de experimentos para la putrescina

exptos	conc CAD		Tampon	DAO	t°	conc OABz	vol tot
	mg/l	mol/l	pH	u.i./ml	1 min	mol/l	ul
5	35,2	2,19E-04	6,8	4,00		2,48E-03	1000,0
6	35,2	2,19E-04	6,8	2,00		2,48E-03	1000,0
7	35,2	2,19E-04	6,5	4,00		2,48E-03	1000,0
8	35,2	2,19E-04	6,5	2,00		2,48E-03	1000,0

Tabla 31: Diseño de experimentos para la cadaverina

Los resultados de la influencia de las variables son los siguientes:

Sobre la colorimetría de la determinación de Putrescina en wB se pone de manifiesto que el tampón (-7,84) y la DAO (-5,44) afectan negativamente. Por tanto, a pH alto le corresponde menor color B. Y también a concentración alta de DAO se obtiene menor color. Es decir, un aumento de las variables disminuye los colores.

Con la medida en bB, el tampón (-20,93) y la DAO (-11,22) tienen una influencia más intensa.

Sin embargo en la Cadaverina se muestra que el tampón (1,22 en wB y 5,81 en bB) tiene una influencia marcadamente diferente, es decir, si aumenta el pH aumenta la coloración. Pero la influencia de la DAO (-1,95 en wB y -3,71 en bB) es negativa aunque de poca magnitud.

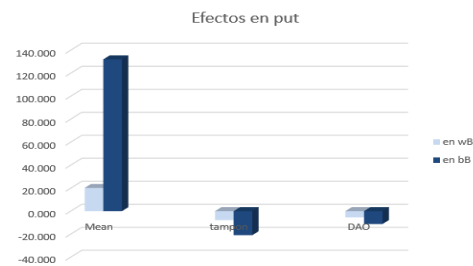


Figura 27: Efectos del tampón y DAO sobre la putrescina

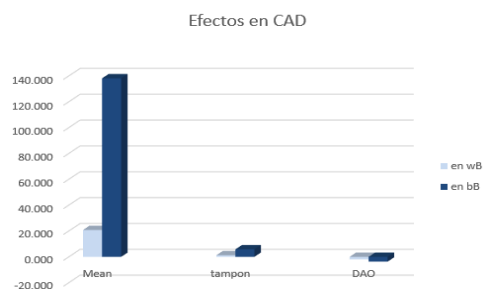


Figura 28: Efectos del tampón y DAO sobre cadaverina

Se demuestra un comportamiento diferente: a pH 'bajo' se favorece, aumenta la sensibilidad, en la putrescina mientras que la cadaverina disminuye ligeramente. El efecto es más evidente con medidas en bB.

Por otra parte, los modelos lineales que se deducen del DOE permiten evaluar la calidad del método.

Así el modelo lineal para putrescina, y color bB responde a la ecuación : $Y = 130 - 20,93 \text{ pH} - 11,22 \text{ DAO}$.

Presenta un coeficiente de correlación r, de 0.9666 como relación entre la varianza de los datos experimentales a la varianza predicha por el modelo.

La putrescina presenta correlaciones altas mientras que son menores para la cadaverina. Y mejor sobre el color bB que para wB.

Es decir, el modelo de Putrescina es fácilmente justificable pero en el caso de la cadaverina es menos predecible. Esto es, el modelo lineal puede establecerse en rango menor o también puede justificarse porque faltan efectos de interacción.

Calidad			
prediccion			
calcular r ²			
r ² = varianza datos iniciales / varianza datos predichos			
wB var inicial	31.5395963		
varianza results predichos:		30.323563	
r ² =	0.961444233	r	0.980532627
bB var inicial	201.1119852		
varianza results predichos:		187.93793	
r ² =	0.934493913	r	0.966692253

Tabla 32: Resultados de la calidad del modelo de ajuste para putrescina

wB var inicial	5.195540741		
varianza results predichos:		0.6497729	
r ² =	0.125063578	r	0.353643293
bB var inicial	29.92807407		
varianza results predichos:		15.844741	
r ² =	0.529427343	r	0.72761758

Tabla 33: Resultados de la calidad del modelo de ajuste para cadaverina

2.7. Calibración multivariada y cálculo de las diferencias.

Se lleva a cabo un estudio para la determinación de la concentración de dos ABs en disoluciones mezclas mediante calibración multivariable utilizando valores cromáticos como señales.

Para ello se prepara el diseño experimental de patrones divididos en dos tipos:

Experimentos 1-10: de calibración. Siguen un diseño ‘ccd’, diseño central compuesto.

conc putr		conc CAD		put+CAD		tampon	DAO	t ²	conc 'oabz'	vol tot
1) mg/l	mol/l	1) mg/l	mol/l	mg/l	mol/l	2) pH 7	3) u.i./ml	4) 1 min	5) mol/l	ul
0.000	0E+00	0.000	0E+00	0.0	0.00	v	0.88		1.90E-03	1300.0
18.931	1E-04	18.965	1E-04	37.9	2E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
40.331	3E-04	18.965	1E-04	59.3	4E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
18.931	1E-04	40.638	2E-04	59.6	3E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
40.331	3E-04	40.638	2E-04	81.0	5E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
36.215	2E-04	36.123	2E-04	72.3	4E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
11.523	7E-05	36.123	2E-04	47.6	3E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
36.215	2E-04	11.740	7E-05	48.0	3E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
36.215	2E-04	36.123	2E-04	72.3	4E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
36.215	2E-04	40.638	2E-04	76.9	5E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0

Tabla 34: Diseño experimentos de calibración (1-10)

Experimentos 11-14: de validación.

Con los primeros se obtienen los coeficientes de calibración mediante un método generalizado de mínimos cuadrados. Que se aplica mediante programa de cálculo desarrollado en nuestro grupo.

conc putr		conc CAD		put+CAD		tampon	DAO	t ²	conc 'oabz'	vol tot
1) mg/l	mol/l	1) mg/l	mol/l	mg/l	mol/l	2) pH 7	3) u.i./ml	4) 1 min	5) mol/l	ul
15.638	1E-04	27.092	2E-04	42.7	3E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
32.923	2E-04	36.123	2E-04	69.0	4E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
40.331	3E-04	22.577	1E-04	62.9	4E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0
20.577	1E-04	36.123	2E-04	56.7	3E-04	v	0.88		1.90E-03	1300.0

Tabla 35: Diseño experimentos de validación (11-14)

Con los segundos se verifica la calidad de la calibración mediante test de validación-predicción.

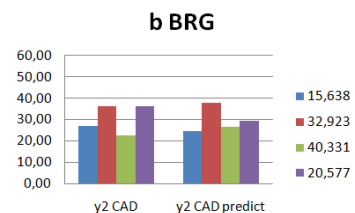
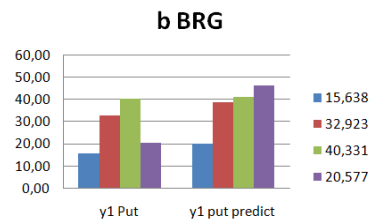
Para la toma de variables, se han aplicado diferentes condiciones de iluminación -w, r, g, b- y se han medido diversos colores reflejados BRG. De las diferentes combinaciones que se han estudiado las que han proporcionado menor error de validación han sido las de la tabla.	Iluminación	Colores reflejados
	‘b’	BRG
	‘w’, ‘g’, ‘b’	Siempre B-B-B
	w	BRG
	W, b	B B

Tabla 36: Mejores combinaciones para el estudio de la calibración multivariada

Los mejores resultados se muestran :

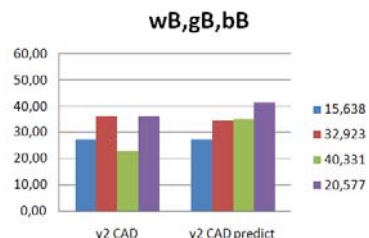
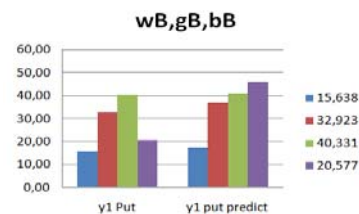
b BRG		r ²	F	p	MSE				
MLR, calib	stats, sobre Put	0,7649	6,5064	0,0258	70,1997				
	stats2, sobre CAD	0,7995	7,9727	0,0163	63,1311				
patrones test	y1 Put	y1 put predict	dif	dif ²	y2 CAD	y2 CAD predict	dif	dif ²	
	15,638	15,64	20,08	-4,44	19,72	27,09	24,64	2,45	6,00
	32,923	32,92	38,69	-5,77	33,30	36,12	37,84	-1,72	2,94
	40,331	40,33	41,24	-0,91	0,82	22,58	26,70	-4,12	16,96
	20,577	20,58	46,27	-25,69	660,10	36,12	29,53	6,59	43,43
			suma	26,72	Press		suma	8,33	Press
				6,68	RMSE			2,08	RMSE
variable	independ	bB	bR	bG	variable	independ	bB	bR	bG
coef	73,622	-0,354	-0,690	1,016	coef	16,477	-0,607	2,091	-1,052
LQ	11,523				LQ	11,740			
LD	3,4569				LD	3,522			
LML	40,331				LML	40,638			

Tabla 37: Resultados de la calibración multivariada para bBRG



wB,gB,bB		r ²	F	p	MSE					
MLR, calib	stats, sobre Put	0,7788	7,0432	0,0216	66,0326					
	stats2, sobre CAD	0,6427	3,5982	0,0853	112,4631					
patrones test	y1 Put	y1 put predict	dif	dif ²		y2 CAD	y2 CAD predict	dif	dif ²	
	15,638	17,39	-1,75	3,05		27,09	27,25	-0,16	0,02	
	32,923	36,91	-3,98	15,86		36,12	34,21	1,91	3,66	
	40,331	40,93	-0,60	0,36		22,58	35,13	-12,55	157,61	
	20,577	45,93	-25,35	642,66		36,12	41,37	-5,25	27,51	
		suma		25,73	Press		suma		13,74	Press
				6,43	RMSE				3,44	RMSE
variable	independ	wB	gB	bB		variable	independ	wB	gB	bB
coef	100,646	0,373	1,149	-0,826		coef	32,764	-1,465	1,433	0,072
LQ	11,523					LQ	11,74			
LD	3,457					LD	3,522			
LML	40,331					LML	40,638			

Tabla 38: Resultados de la calibración multivariada para wB, gB, bB



Los resultados ofrecen los valores de la calidad de la calibración. Y posteriormente su aplicación a la predicción de los test.

Como resultado se demuestra que la determinación conjunta de las dos aminas en disolución con lleva:

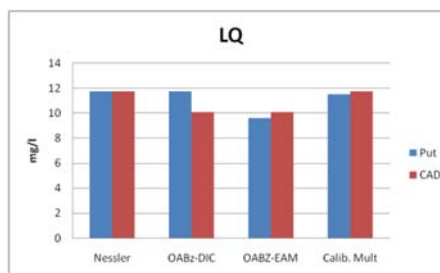
Error medio para la putrescina de 6,68 mg/l y de 2,08 para la cadaverina, usando 'b BRG'.

Mientras que son de 6,43 y 3,44 mg/l usando 'wB, gB, bB'.

2.8. Comparación entre los resultados de las diversas metodologías

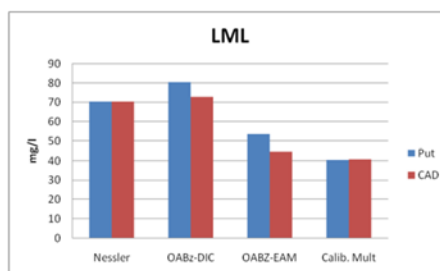
En las siguientes tablas y gráficas se muestran los resultados de los diferentes métodos, para putrescina y cadaverina, con los parámetros más importantes de la calibración.

	LQ (mg/l)	
	Put	CAD
Nessler	11,74	11,74
OABz-DIC	11,77	10,08
OABz-EAM	9,63	10,08
Calib. Mult.	11,52	11,74



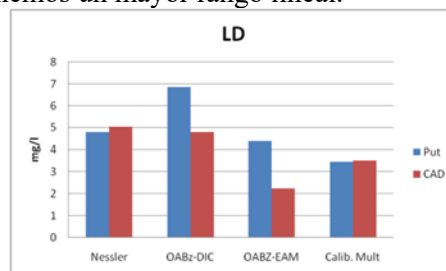
El LQ presenta valores en un rango de 9-12 mg/l para la Putrescina y de 10-12 mg/l para Cadaverina. El método DIC con oabz, es el de menor LQ.

	LML (mg/l)	
	Put	CAD
Nessler	70,44	70,44
OABz-DIC	80,52	72,80
OABz-EAM	53,50	44,80
Calib. Mult.	40,33	40,64



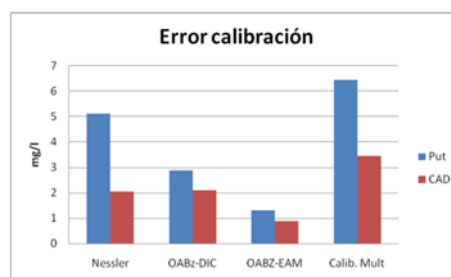
El método que presenta mayor LML es el DIC, tanto para Putrescina (80,52 mg/l) como para cadaverina (72,80 mg/l). Lo que indica que obtenemos un mayor rango lineal.

LD (mg/l)		
	Put	CAD
Nessler	4,80	5,03
OABz-DIC	6,85	4,80
OABz-EAM	4,39	2,24
Calib. Mult.	3,46	3,52



El menor LD se obtiene con los métodos de EAM uv-vis, con OABz. DIC con determinación de NH₃ presenta LD similar al anterior de EAM. DIC proporciona valores superiores.

Error calibración (mg/l)		
	Put	CAD
Nessler	5,10	2,04
OABz-DIC	2,87	2,10
OABz-EAM	1,30	0,87
Calib. Mult.	6,43	3,44



Los mayores errores de calibración se dan en calibración multivariable. Y es indicativo de que se deben de reajustar los rangos de calibración. Los métodos con oabz, tanto DIC como EAM presentan los menores errores.

2.9. Justificación de las medidas de reflectancia: iluminantes-absorbente-detección por la cámara.

En las siguientes Figuras se presentan los espectros de los iluminantes, de la especie absorbente y de la respuesta espectral de los canales RGB de la cámara Nikon.

La convolución de los espectros permite simular el mecanismo de los procesos de reflectancia y respuesta de la cámara digital, y con ello la respuesta obtenida en la cámara.

Se presentan los resultados para las iluminaciones 'w' y 'b'. ver en anexos: Figura: Iluminación 'w' y Figura: Iluminación 'b'

Las gráficas simulan el proceso de medida y justifican los resultados experimentales. Así con iluminación blanca se produce la absorción en un amplio rango de lambdas. La convolución –en amarillo– demuestra una mayor intensidad en el rango donde absorbe el analito pero también es importante la inespecífica-interferente en un gran intervalo en el que no hay analito.

La cámara presenta respuesta en todos los canales, con el canal B mas sensible.

Sin embargo, se evidencia que la respuesta que corresponde a la absorción del analito es solo una fracción reducida de la luz reflejada total. Y consecuentemente es una medida de poca sensibilidad hacia el analito.

Con la iluminación b la convolución –en amarillo– del iluminante-absorbente se reduce a la zona de absorción del analito. De modo que ahora la medida en los canales de la cámara responde a una menor radiación inespecífica. En estas condiciones, el canal B presenta una gran sensibilidad.

Es decir, se demuestra que la reducción del paso de banda espectral favorece la señal del analito y reduce la señal inespecífica. El resultado es coherente con que la iluminación LED b produzca mejores sensibilidades en las determinaciones por DIC.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA

1. CONCLUSIÓN:

Como conclusiones se destaca:

- Se ha determinado un método para la determinación de putrescina a partir de la medida de NH₃, tanto en disolución mediante reactivo Nessler como con tiras reactivas basadas en la reacción de Berthelot. Se realiza el mismo procedimiento para la Cadaverina. Siendo más sensible para la putrescina.
 - Se lleva a cabo un método para la detección de ambas aminas con 2-aminobenzaldehído. El rango lineal se establece entre 4-80 mg/l para putrescina mientras que para la cadaverina es de 5-92 mg/l. Es decir, la putrescina es más sensible.
 - Se realiza un estudio de diferenciación entre ambas aminas. Obteniéndose diferencias en la influencia de dos variables, tampón y DAO, lo que permite su distinción.
 - Se lleva a cabo una calibración multivariada que permite calcular la concentración de las aminas en una mezcla, utilizando colorimetría de imágenes digitales.
- **AGRADECIMIENTOS:**
 - Este trabajo ha sido realizado con cargo al Proyecto CTQ2016-76846R (MINECO) y las ayudas a grupos de investigación DGA-FEDER (E25_17R).

2. BIBLIOGRAFÍA:

¹ Bayo Rodríguez, F. (2014) *Aminas biógenas y seguridad alimentaria*. Zaragoza: .

² Navarro, J., Sanz-Vicente, I., Lozano, R., Rivero, I., López, A., De Marcos, S. y Galbán, J. (2017). "Hacia la determinación in situ de aminas biógenas".

³ Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M.L., Garriga, M. y Vidal-Carou, M.C. (2005). "Aminas biógenas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control". *Eurocarne*, (141).

⁴ Europa press (2017). *Las autoridades sanitarias retiran los lotes de atún procedente de Almería sospechosos de provocar intoxicaciones*.

⁵ Si-Jin Liu, Juan-Juan Xu, Chang-Lu Ma y Chun-Feng Guo (2018). "A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC". *Food Chemistry*, 266, pp. 275-283.

⁶ Önal, A. (2007). "A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods". *Food Chemistry*, 103(4), pp. 1475-1486.

⁷ Mayer, H.K., Fischer, E. y Fiechter, G. (2010). "A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese". *Journal of Chromatography A*, 1217(19), pp. 3251-3257.

- ⁸ Fiechter, G., Sivec, G. y Mayer, H.K. (2013). "Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses". *Journal of Chromatography B*, 927, pp. 191-200.
- ⁹ Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Klodzinska, E., Namiesnik, J. y Plotka-Wasyłka, J. (2018). "Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98, pp. 128-142.
- ¹⁰ Cunha, S.C., Lopes, R. y Fernandes, J.O. (2017). "Biogenic amines in liqueurs: Influence of processing and composition". *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, pp. 147-155.
- ¹¹ Capitán-Vallvey, L.F., López-Ruiz, N., Martínez-Olmos, A., Erenas, M.M. y Palma, A.J. (2015). "Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review". *Analytica Chimica Acta*, 899, pp. 23-56.
- ¹² Punakivi, K., Smolander, M., Niku-Paavola, M., Mattinen, J. y Buchert, J. (2006). "Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase". *Talanta*, 68(3), pp. 1040-1045.
- ¹³ Macholán, L., Rozprimová, L. y Sediácková, E. (1967). "Oxidative deamination of 2-hydroxy derivatives of putrescine and cadaverine by pea-seedling and pig-kidney diamine oxidase". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 136(2), pp. 258-264.
- ¹⁴ Zhou, L. y Boyd, C.E. (2016). "Comparison of Nessler, phenate, salicylate and ion selective electrode procedures for determination of total ammonia nitrogen in aquaculture". *Aquaculture*, 450, pp. 187-193.
- ¹⁵ Cogoni, A., Farci, R., Medda, R., Rinaldi, A. y Floris, G. (1989). "Amine Oxidase from *Lathyrus Cicera* and *Phaseolus Vulgaris*: Purification and properties". *Preparative Biochemistry*, 19:2, 95-112, DOI: 10.1080/10826068908544901
- ¹⁶ Molins-Legua, C., Meseguer-Lloret, S., Moliner-Martinez, Y. y Campíns-Falcó, P. (2006). "A guide for selecting the most appropriate method for ammonium determination in water analysis". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(3), pp. 282-290.
- ¹⁷ Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R. y Campíns-Falcó, P. (2005). "Improved detection limit for ammonium/ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy". *Analytica Chimica Acta*, 534(2), pp. 327-334.
- ¹⁸ Holmstedt, B., Larsson, L. y Tham, R. (1961). "Further studies of a spectrophotometric method for the determination of diamine oxidase activity". *Biochimica et Biophysica Acta*, 48(1), pp. 182-186.

ANEXO: 1

Figura: Iluminación 'a' →

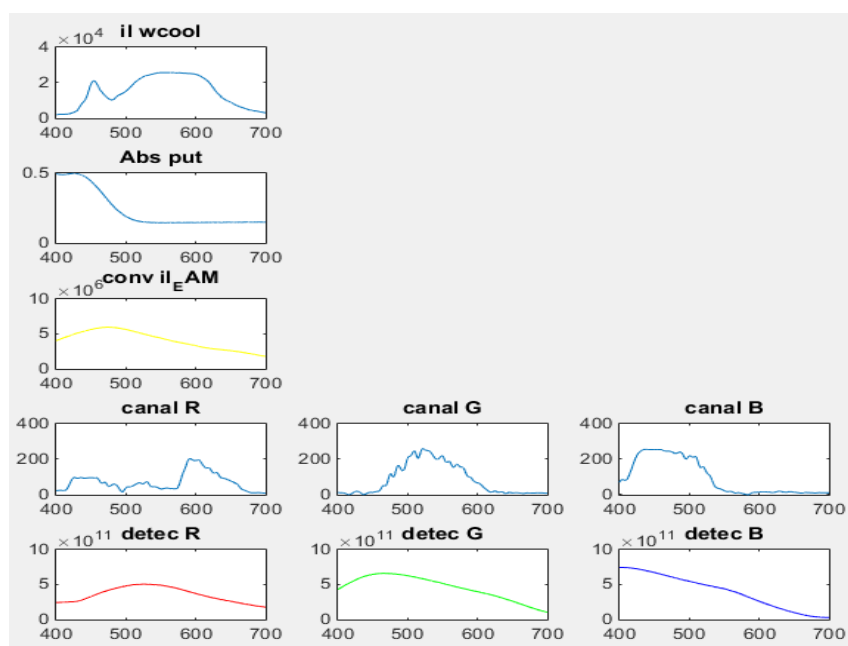
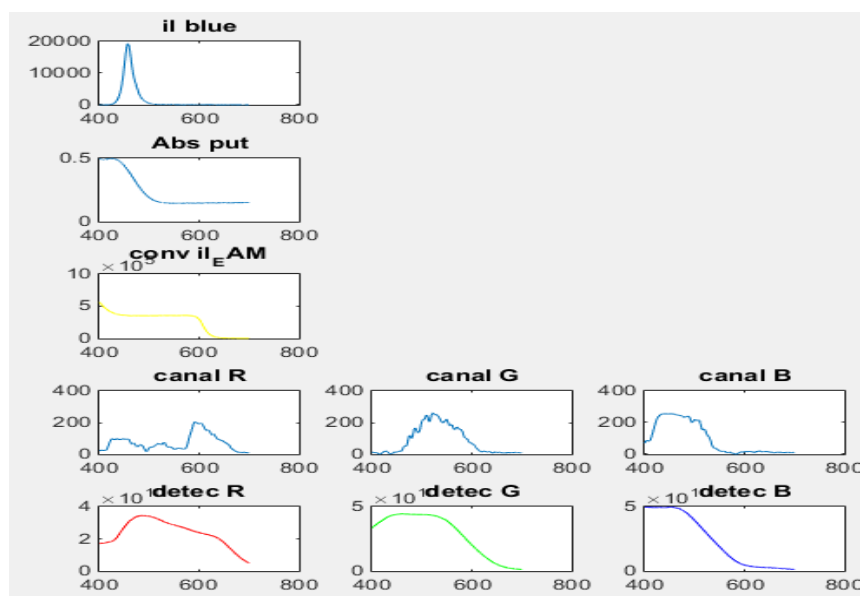


Figura: Iluminación 'b' →



Condiciones: Disolución cromática oABZ-Put a pH 7,0. Concentraciones: 1.99×10^{-4} mol/l Put (32.02 mg/l) y 2.50×10^{-3} mol/l oAbz. Disolución blanco: tampón fosfato a pH 7.
 Cámara digital Nikon 3400: sensibilidad en espacio de color Srgb.