



**Universidad Zaragoza**



## Desarrollo de tiras reactivas colorimétricas para la determinación de aminas biógenas

*“Development of colorimetric strip test to the determination of biogenic amines”*

Pablo Cebrián Aznárez

Directora: Isabel Sanz Vicente  
Departamento de Química Analítica  
Grupo de Biosensores Analíticos (GBA)  
Curso 2017/2018

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. ¿Qué son las aminas biógenas y cómo se forman?	1
1.2. Importancia de su determinación	1
1.3. Métodos de determinación	2
1.3.1. Métodos de determinación existentes	2
1.3.2. Método enzimático	2
1.3.3. Tiras reactivas y resultados previos con tiras de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3
1.3.4. Detección en tiras reactivas: espacios de color y código RGB	4
<b>2. Objetivos</b>	<b>5</b>
2.1. Objetivos y finalidad de este trabajo	5
<b>3. Experimental</b>	<b>6</b>
3.1. Reactivos y disoluciones	6
3.1.1. Reactivos generales	6
3.1.2. Enzimas	6
3.1.3. Aminas biógenas	6
3.2. Instrumentación y material	7
3.2.1. Instrumentos generales	7
3.2.2. Materiales y aparatos	7
3.3. Procedimiento operativo	7
3.3.1. Medidas en disolución	7
3.3.2. Medidas en celulosa	8
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>9</b>
4.1. Resultados en disolución	9
4.1.1. Estudio de reacción HRP+TMB+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9
4.1.2. Estudio de reacción HRP+TMB+DAO+AB	11
4.2. Resultados en soporte sólido	14
4.2.1. Estudio del soporte	14
4.2.2. Estudio de condiciones de medida	16
4.2.3. Estudio de las cantidades óptimas de TMB y HRP	18
4.2.4. Estudio de calibración en celulosa 10 y 15% con todos los parámetros optimizados	19
4.2.5. Inmovilización de la DAO	20

<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>24</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>27</b>
<b>ANEXO IV.....</b>	<b>27</b>
<b>ANEXO V.....</b>	<b>28</b>
<b>ANEXO VI.....</b>	<b>28</b>
<b>ANEXO VII.....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO VIII.....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO IX.....</b>	<b>30</b>
<b>ANEXO X.....</b>	<b>31</b>

## ABSTRACT

---

Biogenic amines (BAs) are defined as nitrogenated compounds, with low molecular weight and important biological activity. These amines are mainly originated by the decarboxilation of proteins or aminoacids. They can be produced either inside the organism (endogenous) or from other sources such as food (exogenous). On the one hand, exogenous BAs are produced in many types of tissues from our organism and are spread through the blood stream to other areas, in order to perform different physiological functions. On the other hand, exogenous BAs are produced by the enzymes on the food tissues or by the microorganisms that contaminate them. The most important BAs are histamine, putrescine, cadaverine and tyramine. Histamine has the greatest toxicological power, being able to exacerbate its toxicity due to other BAs. The organism has many tools for their degradation and elimination. This degradation is carried out through certain enzymes present in the intestinal and hepatic cells, such as monoamine oxidase (MAO), diamine oxidase (DAO) and polyamine oxidase (PAO), but many times their activity is not enough. The ingestion of high amounts of BAs can produce intoxications, whose clinical picture develops, among others, with headaches, cramps, rashes, etc. Nowadays, only maximum levels of histamine are legislated for certain foods, however, histamine is always accompanied by other BAs. That is why it is needed the development of a quick and easy to use method for the easy detection of these amines. To fulfill this purpose, we have proposed a semi-quantitative method based on strip test that allows, through a mobile application, to directly relate BAs concentration with the colorimetric properties of an enzymatic reaction.

## RESUMEN

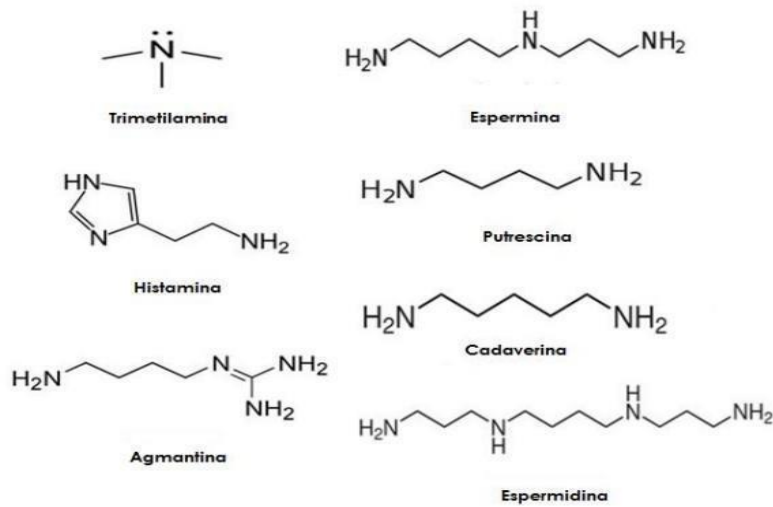
---

Las aminos biógenas (AB) se definen como compuestos nitrogenados, de bajo peso molecular e importante actividad biológica. Estas aminos se originan principalmente por descarboxilación de aminoácidos o proteínas; y pueden ser elaboradas dentro de nuestro organismo (endógenas) o proceder de otras fuentes como los alimentos (exógenas). Las AB endógenas se forman en distintos tipos de tejidos del organismo y a través de torrente sanguíneo son difundidas a otras zonas para desempeñar distintas funciones fisiológicas. Por otro lado, las AB exógenas se forman por la acción de ciertas enzimas en el tejido de los alimentos o por los microorganismos que los contaminan. Las AB más importantes son la histamina, putrescina, cadaverina y tiramina. De éstas, la histamina es la que mayor poder toxicológico presenta, pudiéndose exacerbar su toxicidad por la presencia de otras AB. El organismo posee herramientas para su degradación y eliminación. Esta degradación se lleva a cabo a través de ciertas enzimas presentes en las células intestinales y hepáticas, como son la monoamino oxidasa (MAO), diamino oxidasa (DAO) y la poliamino oxidasa (PAO), pero muchas veces su actividad no es suficiente. La ingesta de cantidades elevadas de AB puede producir intoxicaciones, cuyo cuadro clínico se desarrolla, entre otros, con dolores de cabeza, cólicos, erupciones, etc. Actualmente, sólo están legislados los niveles máximos de histamina para ciertos alimentos, sin embargo, esta siempre va acompañada de otras AB. Es por eso que se necesita desarrollar un método rápido y de fácil uso para la detección precoz de estas aminos. Para cumplir este propósito, hemos propuesto un método semicuantitativo basado en tiras reactivas que permite, a través de una aplicación móvil, relacionar directamente la concentración de AB con las propiedades colorimétricas de una reacción enzimática.

# 1. Introducción

## 1.1. ¿Qué son las aminas biógenas y cómo se forman?

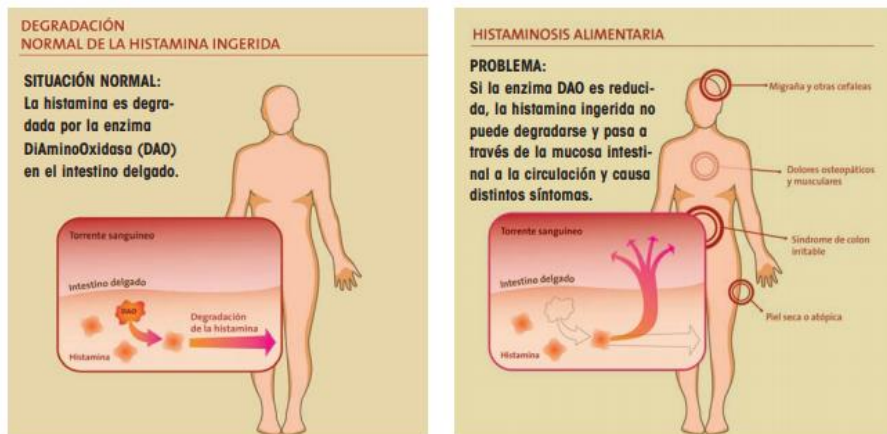
Muchas proteínas o aminoácidos encontrados en alimentos son degradados por la acción de enzimas descarboxilasas generadas por microorganismos. Este proceso da lugar a un tipo de aminas primarias denominadas “aminas biógenas” [1]. Dentro de los productos alimenticios, los pescados y carnes son los que exhiben un mayor riesgo de formación de este tipo de aminas, debido a sus altos niveles proteicos y de aminoácidos libres, así como a su elevada perechibilidad [2]. Las más comunes en alimentos son:



[3] Figura 1. Estructura de algunas aminas biógenas en alimentos

## 1.2. Importancia de su determinación

Este tipo de aminas, de bajo peso molecular e importante actividad biológica, pueden generar un cuadro tóxico en personas debido a su ingesta [2], siendo la histamina la que mayor potencial tóxico presenta (Figura 2), aunque otras como la putrescina o cadaverina, pueden potenciar el efecto de la misma.



[4] Figura 2. Cuadro toxicológico de las aminas biógenas

Dentro del organismo existen una serie de enzimas, localizadas principalmente en el tracto gastrointestinal e hígado, capaces de degradar las aminas biógenas ingeridas con los alimentos, permitiendo así su eliminación a través de la orina<sup>[5]</sup>. Estas enzimas son la monoamino oxidasa (MAO, EC 1.4.3.21<sup>[6]</sup>), diamino oxidasa (DAO, EC 1.4.3.22<sup>[7]</sup>) y poliamino oxidasa (PAO, EC 1.5.3.13<sup>[8]</sup>).

Este proceso no siempre es posible debido a que hay ciertos factores que limitan su actuación: alérgicos, genéticos, ingesta excesiva de aminas o consumo de medicamentos. Otros factores como la ingesta de alcohol también pueden aumentar el potencial tóxico de estas aminas.

Se ha observado que la aparición de aminas biógenas en alimentos suele ser previa a la visualización del deterioro de un producto, por lo que pueden ser un indicador de frescura y de calidad a la hora de consumir ciertos alimentos<sup>[2]</sup>. Debido a esto, la detección y determinación de estas aminas en la cadena alimentaria es de gran importancia.

### 1.3. Métodos de determinación

#### 1.3.1. Métodos de determinación existentes

Actualmente existe el BAI (Biogenic Amine Index)<sup>[9]</sup>, índice que marca los niveles de frescura de un producto. Sin embargo, para los cálculos de estos valores es necesaria la cuantificación previa de las aminas. Para ello se suelen utilizar métodos cromatográficos, electroquímicos (basados en biosensores) o espectrofotométricos (fluorescencia o absorción).

De estos métodos, el más usado es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa con detector UV-Visible (HPLC)<sup>[3],[10],[11]</sup>. Si bien, con este método se obtienen valores muy similares a los reales (Desviación estándar relativa <5%<sup>[3],[10],[11]</sup>), se requiere también tratamiento de muestra y derivatización. Tanto las administraciones sanitarias como la industria alimentaria necesitan métodos rápidos de control *in situ*, por lo que sería muy útil disponer de unas tiras reactivas capaces de determinar aminas biógenas de manera fácil y fiable, sin dependencia de los métodos anteriores.

El grupo de investigación de biosensores analíticos (GBA) de la Universidad de Zaragoza ha estado investigando acerca de este tipo de tiras reactivas basándose en una serie de reacciones enzimáticas que tienen lugar en disolución<sup>[12],[13]</sup>.

#### 1.3.2. Método enzimático

La evaluación de la cantidad de aminas biógenas presentes en disolución vendrá guiada por un método enzimático<sup>[4]</sup>, es decir, una serie de reacciones en serie controladas principalmente por enzimas. La elevada especificidad de las enzimas las hace idóneas para este tipo de determinación ya que catalizan la reacción e interaccionan con ciertas moléculas de una manera única.

Las enzimas utilizadas para los ensayos fueron la diamino oxidasa (DAO, EC 1.4.3.22<sup>[7]</sup>) y la peroxidasa (HRP, EC 1.11.1.7<sup>[14]</sup>), ambas catalogadas como oxidoreductasas.

Este tipo de enzimas se encargan de catalizar la transferencia de electrones entre moléculas donantes (agentes reductores) yceptoras (agentes oxidantes).

En la figura 3 se pueden ver la reacción completa y su desarrollo en dos etapas:

- En la primera etapa, el oxígeno (agente oxidante) reacciona con la amina biógena (agente reductor), por acción de la DAO (forma oxidada), generando agua y peróxido de hidrógeno.
- En la segunda etapa, el peróxido producido (agente oxidante) reacciona con el colorante (agente reductor), por acción de la HRP (forma reducida), generando oxígeno y un cambio de color en el colorante al pasar a su forma oxidada

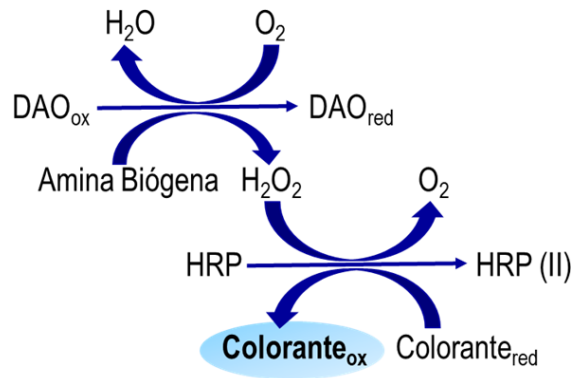


Figura 3. Reacción principal de estudio

El grupo de biosensores analíticos (GBA) ha realizado estudios con varios colorantes, medidos en disolución con un espectrofotómetros, como el ABTS, Amplex Red o TMB, obteniéndose muy buenos resultados<sup>[12],[13]</sup>. Para este estudio se eligió el TMB por varias razones:

- El colorante 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidina o TMB<sup>[15]</sup> actúa como sustrato de la peroxidasa, haciéndolo muy adecuado para procedimientos de tipo enzimático. La reacción de la peroxidasa con este colorante en presencia de peróxido de hidrógeno produce un producto final de color azul pálido detectable espectrofotométricamente a 370 o 620-650 nm. También puede ser medido a 450 nm en disoluciones ácidas generando un color amarillo.
- Es el colorante más utilizado por las casas comerciales para el desarrollo de tiras reactivas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 1.3.3. Tiras reactivas y resultados previos con tiras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

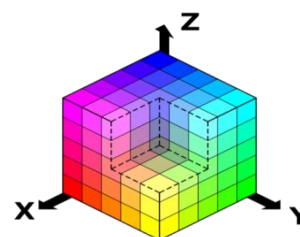
El desarrollo de unas tiras reactivas para la determinación semicuantitativa de aminas biógenas es importante por la posibilidad de determinación rápida *in situ*.

En la actualidad existen varias casas comerciales que fabrican tiras reactivas. Entre ellas existen las Macherey-Nagel QUANTOFIX® 100 para la determinación semicuantitativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[16]</sup>. Este tipo de tiras se utilizan principalmente para controlar solventes orgánicos, sin embargo, no tienen la aplicación específica que nosotros buscamos, que es la de determinar aminas biógenas en muestras de alimentos.

En el grupo de investigación se ha intentado determinar aminas biógenas añadiendo la enzima DAO sobre un soporte de celulosa preparada en el propio laboratorio, consiguiendo muy buenos resultados.

### 1.3.4. Detección en tiras reactivas: espacios de color y código RGB

Las medidas en tiras reactivas se obtendrán mediante un móvil con una aplicación capaz de leer en código RGB. Este código está basado en una descomposición de los tres colores primarios (rojo, verde y azul) <sup>[17],[18]</sup>, considerando a cada uno de ellos como una coordenada cartesiana dentro de un cubo de lado uno (Figura 4). Para el cálculo e interpretación de cada coordenada dentro del cubo es necesario aplicar las siguientes fórmulas <sup>[19]</sup>:



<sup>[20]</sup>Figura 4. Modelo RGB

Coordenada Cartesiana		
Rojo	Verde	Azul
$X = R / (R+G+B) \text{ (1)}$	$Y = G / (R+G+B) \text{ (2)}$	$Z = B / (R+G+B) \text{ (3)}$

Es un modelo de color basado en la síntesis aditiva, por lo que cualquier color se podrá expresar mediante este código por ser la mezcla de los tres colores primarios. Sin embargo, este código no define por sí mismo lo que significa exactamente rojo, verde o azul, por lo que los mismos valores RGB pueden mostrar colores notablemente diferentes en distintos dispositivos.

Dentro del código RGB utilizaremos la coordenada R. Se realizó un estudio previo al desarrollo de las tiras reactivas para comprobar como variaban las tres coordenadas en función de una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el TMB y HRP. Se observó, como se muestra en la Figura 5, que de las tres coordenadas, la roja es la única que presenta cambios significativos a lo largo de la reacción y que además presenta una relación lineal entre señal y concentración.

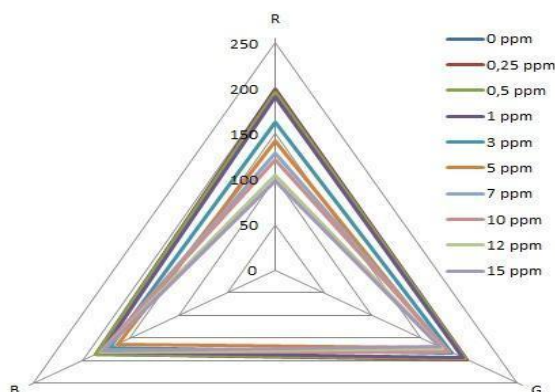


Figura 5. Diagrama triangular del código RGB

La invariabilidad de las coordenadas G y B nos permiten así, proponer un método basado en este código, considerando sólo una coordenada de las tres posibles y facilitando así la interpretación de los datos obtenidos.



## 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 rápidos para el análisis de aminas biógenas. El objetivo principal del trabajo es el desarrollo de tiras reactivas que permitan la determinación semicuantitativa de las aminas biógenas putrescina, cadaverina e histamina. Se descartó la posibilidad de determinar otras aminas como tiramina, triptamina o feniletilamina, debido a que otros estudios (realizados por el GBA) habían demostrado que no era posible con el método utilizado <sup>[12]</sup>.

El método se basa en la reacción de las aminas con la enzima diamino oxidasa (DAO) produciendo peróxido de hidrógeno que a su vez, reacciona con la enzima peroxidasa (HRP) en presencia de un colorante (TMB) cuyas propiedades ópticas cambian durante la reacción (*Sección 1.3.2 - Figura 3*).

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- Revisión bibliográfica.
- Comprobación de los resultados obtenidos en el grupo de investigación en disolución mediante espectroscopía de absorción molecular UV-Vis:
  - Estudio de la reacción HRP-TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - Estudio de la reacción HRP-TMB-DAO-Aminas
- Estudio del soporte en el que se van a inmovilizar los reactivos: tipo, tratamiento, cantidad, etc.
- Estudio de cantidades de reactivos inmovilizados en el soporte: HRP, TMB, DAO
- Estudio de las mejores condiciones para la detección del color mediante la cámara de fotos del Smartphone.
- Realización de las correspondientes rectas de calibrado estableciendo los parámetros analíticos.

Sobre esta base 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:
  - 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, etc).
  - 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)  $\geq 98\%$ , (Sigma-Aldrich 860336), (240,35 g/mol). Las disoluciones se prepararon por dilución de una disolución  $7,9 \cdot 10^{-3}$  M preparada pesando 1,9 mg y disolviendo en 1 mL de dimetil sulfóxido.
- Disolución acuosa amortiguadora  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , pH=6.0. La disolución tamponada de concentración 0,1 M fue preparada a partir de 3 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Panreac 131679.1211) y disolviéndolos en 200 mL de agua mili Q. El ajuste del pH se realizó mediante disoluciones HCl y NaOH 1 M hasta pH 6.
- Disolución comercial de peróxido de hidrógeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% (m/V), (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.
- Ácido clorhídrico 35-38% (Poch 575283115). Disolución de ácido clorhídrico 1 M, preparada a partir de la disolución concentrada.
- Hidróxido de sodio (VWR Chemicals 28245.265), (40 g/mol). Disolución de hidróxido de sodio, NaOH 1 M, prepara a partir del compuesto sólido.
- Celulosa sin tratar (Carboximetil celulosa), (Macherey, Nagel & Co). Las placas de celulosa se elaborarán a partir de una disolución de celulosa sólida en agua mili Q con distintas concentraciones de HRP y TMB, seguido de un secado en incubadora durante una hora y media a  $30^\circ \text{C}$ . Estas condiciones se eligieron para evaporar la fase acuosa de la disolución y evitar la desnaturalización de las enzimas.
- Celulosa tratada (Carboximetil celulosa), (Macherey, Nagel & Co.). Las placas de celulosa se elaborarán de la misma manera que el caso anterior pero aplicándole un proceso previo de desulfuración y secado para la eliminación de posibles impurezas.

##### 3.1.2. Enzimas

- Peroxidasa de rábano (146 U/mg), (Sigma-Aldrich EC 1.11.1.7<sup>[19]</sup>). Las disoluciones se prepararon por dilución de una disolución 248,2 U/mL preparada pesando 1,7 mg y disolviendo en 1 mL de disolución tampón.
- Diamino oxidasa de *Lathirus cicera* (150 U/mL), (Molirom EC 1.4.3.22<sup>[19]</sup>). Se tomará una fracción del vial anterior y se trabajará directamente con él.

##### 3.1.3. Aminas biógenas

- Putrescina (Putrescine Dihydrochloride)  $\sim 98\%$ , (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 mg y disolviendo en 1 mL de disolución tampón.
- Cadaverina (Cadaverine Dihydrochloride)  $\sim 98\%$ , (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 mg y disolviendo en 1 mL de disolución tampón.

- Histamina (Histamine Dihydrochloride) ~98%,(Sigma-Aldrich 53300), (184,07 g/mol). Las disoluciones se prepararon por dilución de una disolución  $1,08 \cdot 10^{-2}$  M preparada pesando 2 mg y disolviendo en 1 mL de disolución tampón.

## 3.2. Instrumentación y material

### 3.2.1. Instrumentos generales

- pH-metro CRISON, Basic 20
- Balanza analítica de precisión. GR-202-EC de precisión  $\pm 0,01$  mg
- Espectrofotómetro de absorción molecular de fotodiodos UV-vis Agilent 8453A, con lámpara de descarga de deuterio. El rango de medida del espectrofotómetro es de 190 a 1100 nm
- Teléfono móvil Nexus 5X, con una cámara integrada de 12,3 Megapíxeles y sistema operativo Android 6.0 con aplicación Color Grab®, del equipo Loomatix, capaz de recoger, capturar y reconocer colores en código RGB
- Teléfono móvil iPhone 6, con una cámara integrada de 8 Megapíxeles y sistema operativo iOS 8 con la aplicación RGB Color Value Pro (V 1.0), capaz de recoger, capturar y reconocer colores en código RGB

### 3.2.2. Materiales y aparatos

- Ordenador con el software Agilent ChemStation para la interpretación de datos
- Centrifugadora Eppendorf Minispin Plus
- Agitador magnético A-01, SBS
- Micropipetas Socorex de volumen variable (5-50  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L y 100-100  $\mu$ L)
- Material desechables: eppendorf, tubos falcon, puntas de micropipetas
- Cubeta de vidrio Hellma de 1cm de paso óptico
- Vasos de precipitado
- Placas de pocillos Nunc para la deposición de celulosa
- Filtro óptico Kodak amarillo que corta por debajo de 390 nm
- Incubadora OVAN modelo OM10E

## 3.3. Procedimiento operativo

Este trabajo está enfocado en dos partes: la primera parte abarca la optimización de parámetros y determinación de las aminas biógenas en disolución. La segunda parte comprende la determinación semicuantitativa de estas en tiras reactivas de celulosa.

### 3.3.1. Medidas en disolución

Se utilizó un espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis de fotodiodos en modo cinético. Sobre una disolución de tampón  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  a pH=6.0, que hace de blanco de medida, se añaden los reactivos necesarios:

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

y se comienza la medida registrando la variación de absorbancia con el tiempo a la longitud de onda de 650 nm. Cuando la señal es estable, se añade el analito y se registra el aumento de absorbancia debido a la formación de la especie oxidada del TMB. El volumen final en cubeta son 2 mL. Como el producto de la reacción es inestable fotoquímicamente, se debe colocar un filtro que elimine la radiación ultravioleta.

### 3.3.2. Medidas en celulosa

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

- HRP y TMB tanto para determinar  $H_2O_2$  como aminas biógenas

y se inyecta esta disolución en los pocillos de la placa de ensayo. Tras la inyección se incuba la placa a 30 °C durante una hora y media. Cuando la placa está seca, se inyectan 10 $\mu$ L de DAO sobre esta si se quieren determinar aminas (para la determinación de  $H_2O_2$  esta inyección no será necesaria). Después se inyectan 10 $\mu$ L del analito a determinar y cuando la señal es estable (generación del color) se registra el código RGB de cada pocillo. Se utilizó la aplicación Color Grab™ para la descomposición de colores en código RGB midiendo directamente sobre esta.

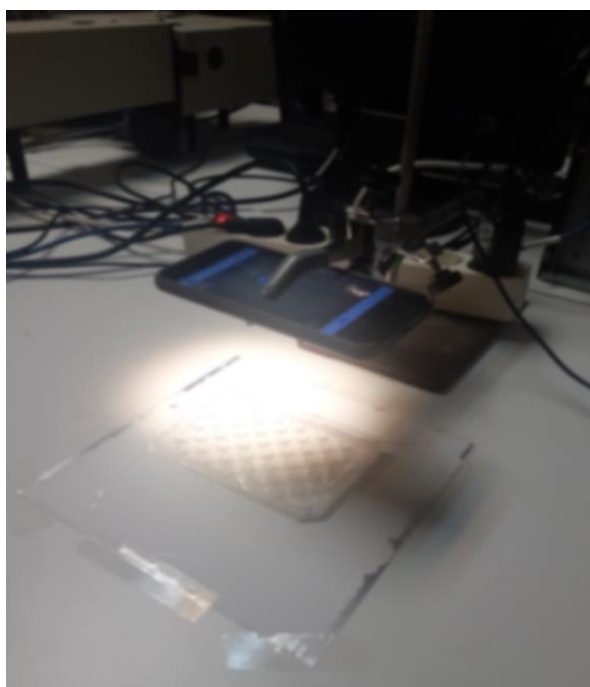


Figura 6. Dispositivo utilizado para la toma de medida

El dispositivo para todas las medidas estaba compuesto por: un soporte de laboratorio con un brazo cuyo extremo disponía de una pinza de cuatro dedos sin nuez, lugar donde se colocaba el teléfono, permitiendo así que permaneciese inmóvil. El teléfono se encontraba a una distancia de 6,5 cm respecto de la placa de medida. La placa se ubicaba sobre un soporte de material blanco antireflectante. Para la medida de los distintos pocillos se desplazaba la placa respecto del móvil. El conjunto del dispositivo permaneció en el mismo lugar a lo largo del estudio para no cambiar las condiciones de luz ajenas al método (Figura 6).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Resultados en disolución

#### 4.1.1. Estudio de reacción HRP+TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se estudiaron las condiciones en las cuales se obtenía una variación de absorbancia que fuera estable en el tiempo. Las variables estudiadas fueron la concentración de TMB y de HRP. Para estudiar la concentración de TMB se mantuvo constante la concentración de HRP (1,24 U/mL) y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $2 \cdot 10^{-6}$  M) y se modificó la concentración de TMB en proporción respecto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:1 hasta 50:1. Se trabajó con tampón fosfato a pH 6. Los resultados se muestran en la Figura 7.

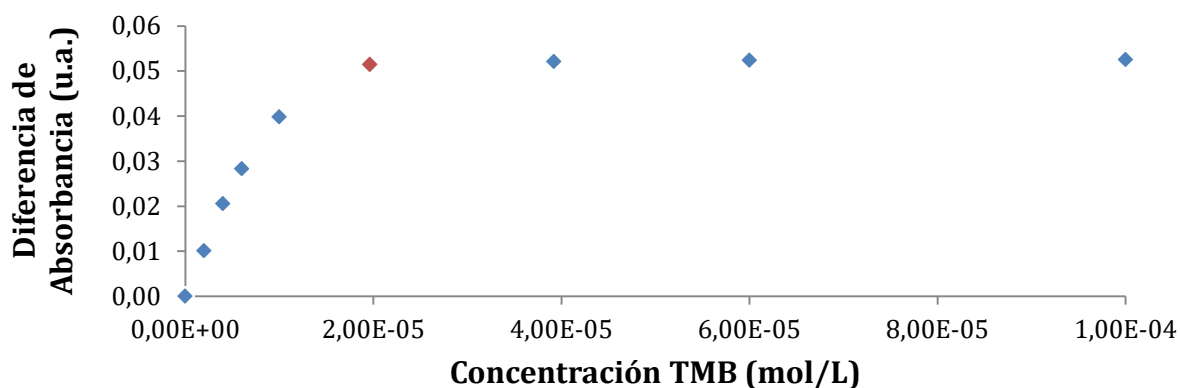


Figura 7. Optimización de TMB. [HRP]=1,24 U/mL, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]= $2 \cdot 10^{-6}$  M, pH=6,  $\lambda$ =650 nm

Se obtiene una gráfica cuyo **máximo se encuentra a partir de  $2 \cdot 10^{-5}$  M**, es decir, una proporción de 10:1 frente a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en disolución. Con la concentración elegida de TMB se optimizó la de HRP, con concentraciones entre 0,10 y 2,48 U/mL. Los resultados se muestran en la figura 8:

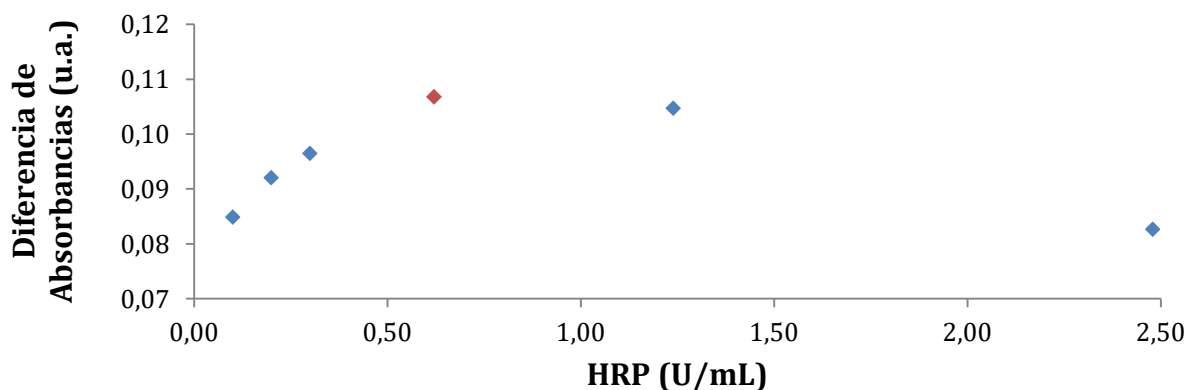


Figura 8. Optimización de HRP. [TMB]=  $2 \cdot 10^{-5}$  M, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]= $2 \cdot 10^{-6}$  M, pH=6,  $\lambda$ =650 nm

Como se puede observar se obtiene un **máximo de variación de absorbancia con 0,62 U/mL**, descendiendo después debido a que en exceso de HRP se forma el compuesto amarillo del TMB.

En las mejores condiciones se realizó una recta de calibrado de  $H_2O_2$  con concentraciones entre  $2 \cdot 10^{-7}$  y  $4 \cdot 10^{-6}$  M. Las señales obtenidas se muestran en la figura 9. La variación de absorbancia depende de la concentración de  $H_2O_2$  obteniéndose un valor estable (necesario para el desarrollo de tiras reactivas) si bien para la mayor concentración es necesario más tiempo. La representación de las diferencias de absorbancias frente a la concentración de  $H_2O_2$  medidas a 650 nm fueron tomadas al mismo tiempo (60 segundos):

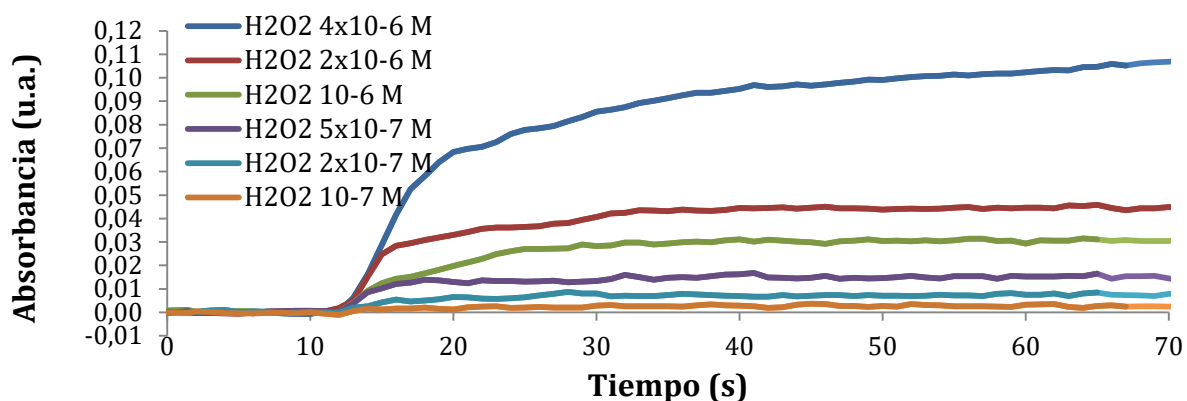


Figura 9. Cinética de reacción en función de la concentración de  $H_2O_2$

La calibración se muestra en la figura 10, obteniéndose un **rango lineal entre  $1 \cdot 10^{-7}$  y  $4 \cdot 10^{-6}$  M**, y la ecuación que describe dicha recta es:

$$y = 24764x + 0,001 \quad R^2 = 0,992 \quad (4)$$

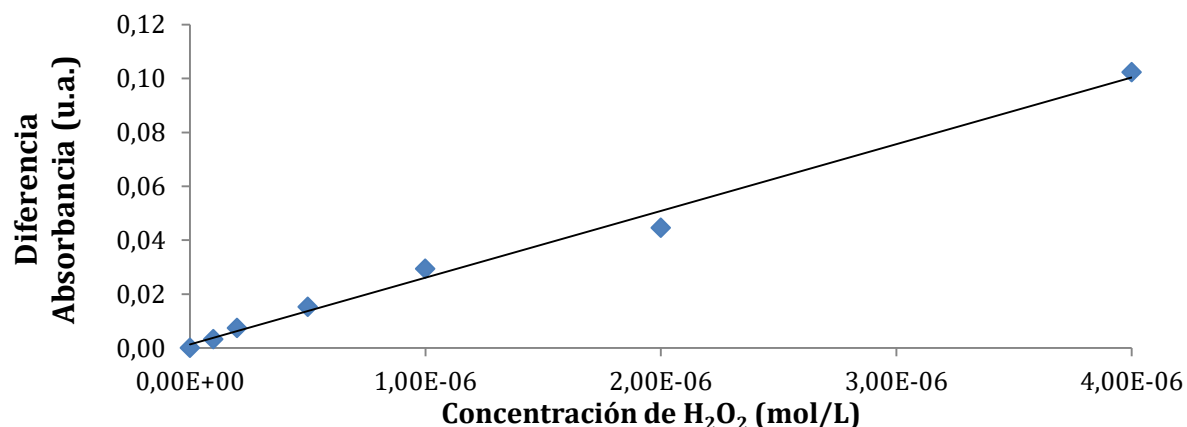


Figura 10. Recta de calibración para  $H_2O_2$ .  $[TMB]=2 \cdot 10^{-5}$  M,  $[HRP]=0,62$  U/mL,  $pH=6$ ,  $\lambda=650$  nm

La repetitividad de las medidas se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Peróxido de hidrógeno  $2 \cdot 10^{-6}$  M,  $n=5$ ,  $t=60$  s

Promedio	$\sigma$	DER
0,039	0,001	2,514 %

$[TMB]=2 \cdot 10^{-5}$  M,  $[HRP]=0,62$  U/mL,  $pH=6$ ,  $\lambda=650$  nm

#### 4.1.2. Estudio de reacción HRP+TMB+DAO+AB

El siguiente paso fue sustituir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comercial por el formado en la reacción de las aminos biógenas con DAO.

##### 4.1.2.1. Determinación de putrescina en disolución

Con una concentración de DAO de 1 U/mL se realizó una calibración de putrescina entre 1·10<sup>-6</sup> y 4·10<sup>-5</sup>M. Las señales obtenidas se muestran en la figura 11. Como se puede observar la señal aumenta con la concentración de putrescina. La pendiente de subida es más lenta que en el caso del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto es debido a que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se forma tras reaccionar putrescina con DAO.

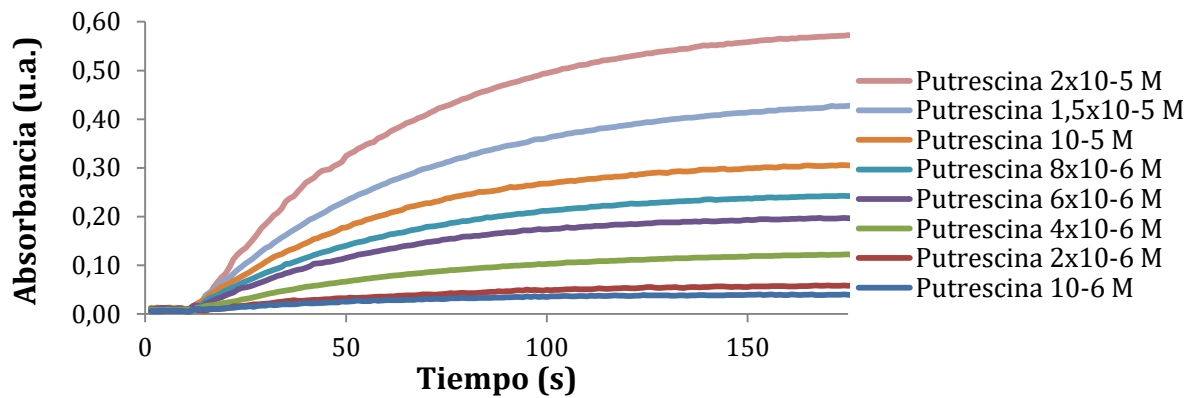


Figura 11. Cinética de reacción en función de la concentración de putrescina

La representación de las diferencias de absorbancias frente a la concentración de putrescina medida a 650 nm fueron a un tiempo mayor respecto a la determinación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que se observó que las disoluciones más concentradas tardan más tiempo en estabilizarse. La calibración se muestra en la figura 12, obteniéndose un rango lineal entre 1·10<sup>-6</sup> y 2·10<sup>-5</sup> M, y la ecuación que describe dicha recta es:

$$y = 26699x + 0,002 \quad R^2 = 0,995 \quad (5)$$

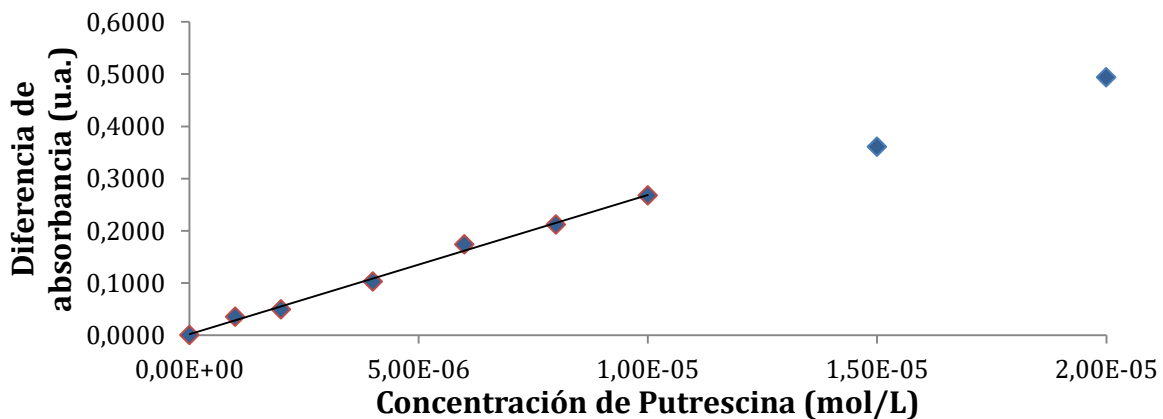


Figura 12. Recta de calibración para putrescina. [TMB]= 2·10<sup>-5</sup> M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL, pH=6, λ =650 nm

La repetitividad de las medidas se muestra en la tabla 2:

**Tabla 2. Putrescina  $6 \cdot 10^{-6}$  M,  $n=5$ ,  $t= 100$  s**

Promedio	$\sigma$	DER
0,185	0,001	0,778 %

[TMB]=  $2 \cdot 10^{-5}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL, pH=6,  $\lambda = 650$  nm

#### 4.1.2.2. Determinación de cadaverina en disolución

Se repitió el estudio con cadaverina con concentraciones entre  $1 \cdot 10^{-6}$  y  $4 \cdot 10^{-5}$  M obteniendo las señales de la figura 13 Como se puede observar la señal aumenta con la concentración de cadaverina, pero a concentraciones altas de esta se observa que la señal del TMB no es estable debido a que el producto de cadaverina descompone al TMB (Sección 1.3.2 <sup>[15]</sup>).

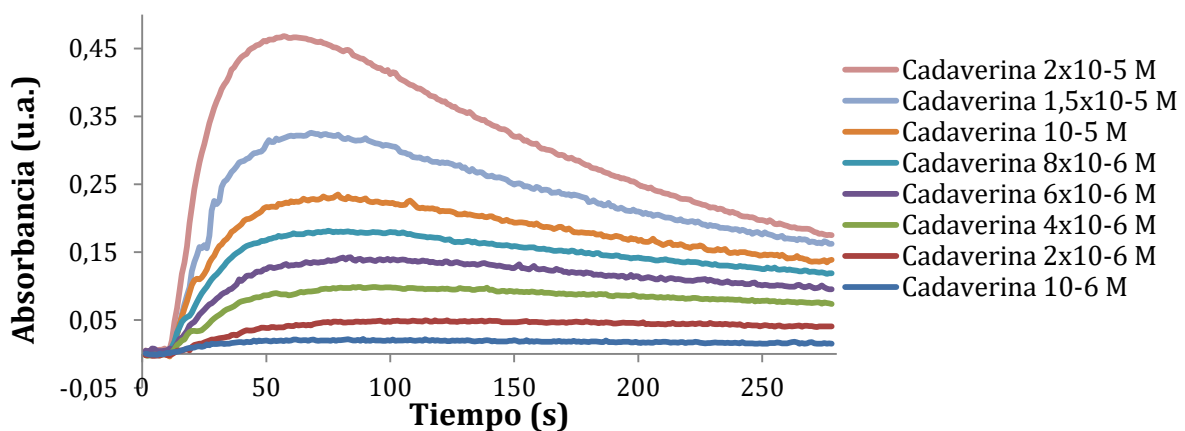


Figura 13. Cinética de reacción en función de la concentración de cadaverina

La representación de las diferencias de absorbancias frente a la concentración de cadaverina medida a 650 nm se muestra en la figura 14, obteniéndose un rango lineal entre  $1 \cdot 10^{-6}$  y  $2 \cdot 10^{-5}$  M, y la ecuación que describe dicha recta es:

$$y = 22374x + 0,002 \quad R^2 = 0,998 \quad (6)$$

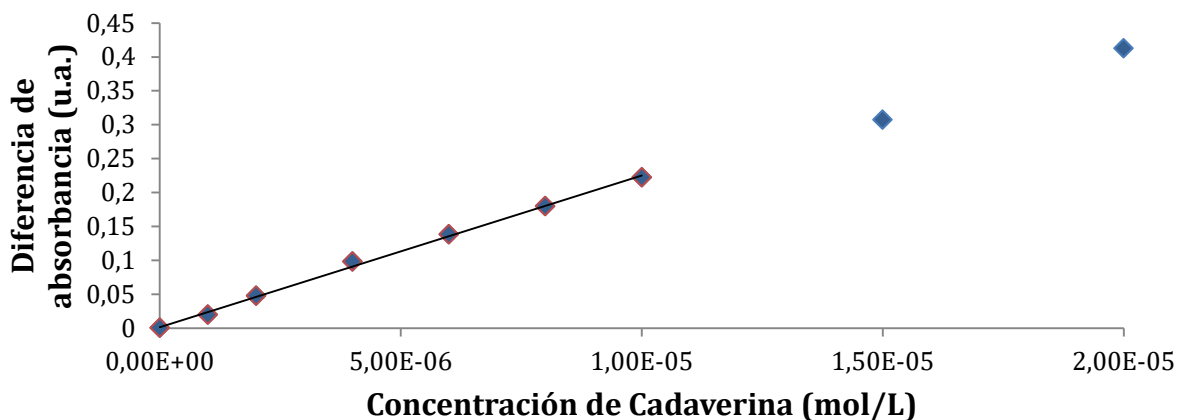


Figura 14. Recta de calibración para cadaverina. [TMB]=  $2 \cdot 10^{-5}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL, pH=6,  $\lambda = 650$  nm



La repetitividad de las medidas se muestra en la tabla 3:

**Tabla 3. Cadaverina  $1 \cdot 10^{-5}$  M, n=5, t= 100 s**

Promedio	$\sigma$	DER
0,196	0,002	1,237 %

[TMB]=  $2 \cdot 10^{-5}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL, pH=6,  $\lambda$  =650 nm

#### 4.1.2.3. Determinación de histamina en disolución

Para la histamina se ensayaron concentraciones entre  $6 \cdot 10^{-6}$  y  $4 \cdot 10^{-5}$  M en las mismas condiciones que las aminas anteriores. En este caso las señales fueron muy bajas no apreciándose visualmente el color azul hasta  $4 \cdot 10^{-5}$  M. Este color no perduraba mucho debido a que el TMB se degradaba rápidamente a causa del aldehído generado a partir de la histamina. El color final de la disolución era de color amarillo.

Se concluyó que no iba a ser posible la determinación de histamina con esta metodología, pero se desconocía si esta en presencia de otras aminas biógenas podía afectar a los valores de medida. Se continuó el estudio de la histamina mezclando diferentes concentraciones de esta (entre  $2 \cdot 10^{-6}$  y  $4 \cdot 10^{-5}$  M) con una concentración fija de putrescina. Algunos de estos resultados se muestra en la figura 15:

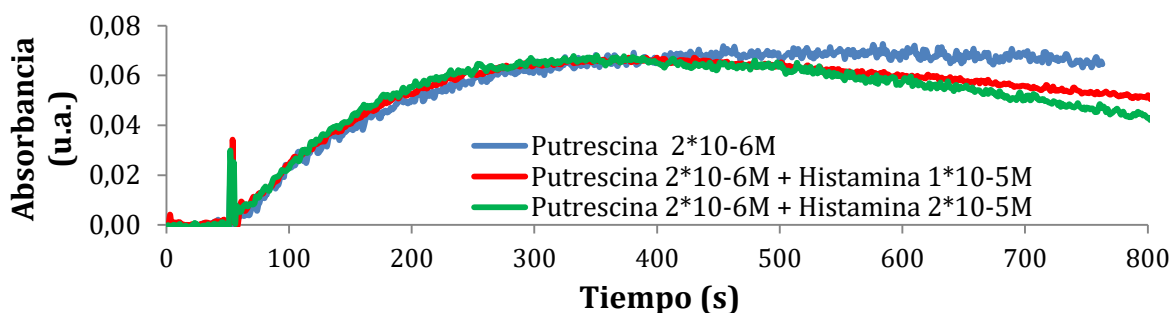


Figura 15. Cinética de reacción de la putrescina en función de la concentración de histamina

Como se observa, la presencia de histamina no modifica el máximo de señal obtenido para putrescina, por lo que la putrescina se podría determinar en presencia de histamina. Se repitió el estudio para cadaverina encontrando iguales resultados.

Por otro lado se observa que la concentración de histamina sí que afecta a la pendiente de bajada de la señal de putrescina (Figura 15). Si las pendientes se ajustan a la ecuación de una recta se obtienen los resultados de la tabla 4:

**Tabla 4. Ecuaciones de las rectas de las distintas concentraciones de histamina**

[histamina]	Ecuación de la recta	R <sup>2</sup>
0	$y = -1E-05x + 7,16E-02$	0,8955
$2 \cdot 10^{-6}$	$y = -1,8940E-05x + 7,2215E-02$	0,8563
$4 \cdot 10^{-6}$	$y = -2,4043E-05x + 6,9257E-02$	0,8666
$1 \cdot 10^{-5}$	$y = -4,2896E-05x + 8,5578E-02$	0,9862
$2 \cdot 10^{-5}$	$y = -6,5039E-05x + 9,6167E-02$	0,9808
$4 \cdot 10^{-5}$	$y = -1,2005E-04x + 1,0649E-01$	0,9631

[TMB]=  $2 \cdot 10^{-5}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL, [Putrescina]=  $2 \cdot 10^{-6}$  M, pH=6,  $\lambda$  =650 nm

Las pendientes de esas ecuaciones dependen linealmente de la concentración de histamina (Figura 16) lo que permitiría la determinación de histamina con un intervalo de respuesta lineal entre  $2 \cdot 10^{-6}$  y  $4 \cdot 10^{-5}$  M y una DER del 4,6 % (n=3), (Figura 16).

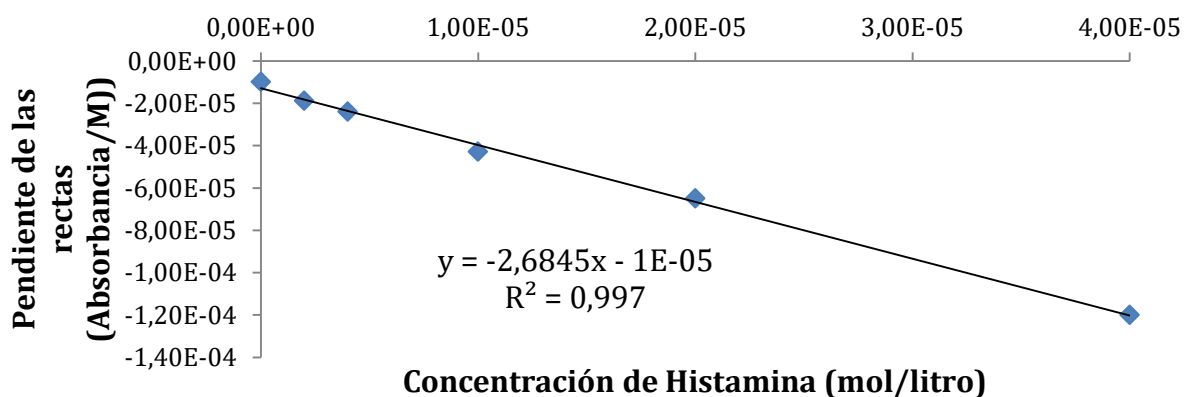


Figura 16. Recta de calibrado. [TMB]=  $2 \cdot 10^{-5}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL, pH=6,  $\lambda=650$  nm

## 4.2. Resultados en soporte sólido

### 4.2.1. Estudio del soporte

Una vez finalizado el estudio en disolución se intentó replicar todo lo estudiado anteriormente utilizando un soporte sólido basado en celulosa. Para ello se comenzó investigando la capacidad de distintos tipos de celulosa para inmovilizar tanto TMB como HRP y así poder comprobar si reaccionaban en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, generando un cambio de color. Se eligió la reacción HRP-TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a su simplicidad. La medida del color mediante código RGB se realizó inicialmente con una cámara de fotos de un iPhone como se ha explicado en la sección 3.3.2. Para la fabricación de los diferentes soportes se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.3.2.

#### 4.2.1.1. Estudio y comparación entre tipos de celulosas

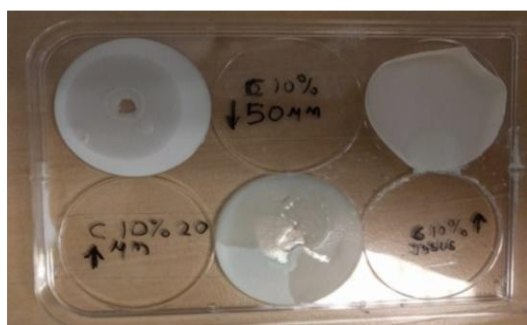


Figura 17. Distintos tipos de celulosa 10%

Se comenzó el estudio del soporte por la comparación entre tres tipos de celulosas al 10%. Ninguna de ellas había sido tratada previamente. Estas eran: Celulosa Aldrich 310697 (1), Celulosa Aldrich 11365 Avicel (2) y Celulosa Macherey, Nagel & Co (3). Cuando se dispuso a comenzar con la inyección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó que las celulosas 1 y 2 presentaban cierto aspecto arenoso. Tras la inyección se comprobó que la celulosa se rompía y que estas no podían ser usadas.

La celulosa 3 presentaba propiedades totalmente diferentes, las cuales permitían tanto la inyección como la aparición del color azul de la reacción de estudio, el cual fue medido con un dispositivo iPhone.

#### 4.2.1.2. Estudio y comparación entre tratamientos

Una vez comprobado que la reacción se daba en el soporte de celulosa, se prosiguió el estudio con una comparación entre celulosa tratada y sin tratar al 10%, ya que se desconocía si un tratamiento previo de eliminación de impurezas afectaba a los resultados de medida. Se realizaron dos rectas de calibrado en TMB ( $5,8 \cdot 10^{-4}$  M) y HRP (0,62 U/mL), una con tratamiento previo y otra sin él (Figura 18).

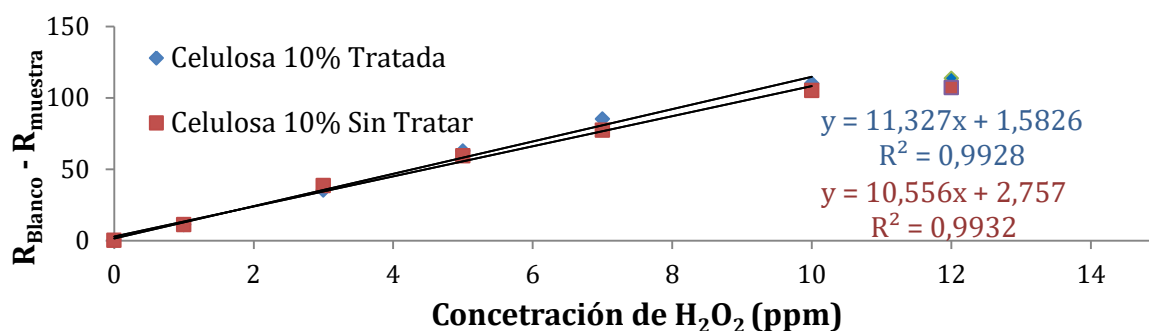


Figura 18. Rectas de celulosa tratada y sin tratar al 10%. [TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL

Tras aplicarles un test de regresión (Anexo I) a las rectas, se comprobó que son significativamente iguales, dejando presente que el tratamiento previo de eliminación de impurezas no afecta a nuestra señal. Ante estos resultados y debido a su disponibilidad, el resto de ensayos se realizaron con celulosa tratada.

#### 4.2.1.3. Concentración y volumen de celulosa

Se continuó el estudio del soporte evaluando la concentración y volumen de celulosa, ya que se desconocía si estas variables podían afectar a los resultados. Para ello se prepararon tres viales que contenían la misma concentración de TMB ( $5,8 \cdot 10^{-4}$  M) y HRP (0,62 U/mL) y diferente concentración de celulosa tratada (5, 10 y 15%). Se inyectaron 50, 75 y 100  $\mu$ L en varios pocillos y se dejó la placa en una incubadora durante 1 hora y cuarto a 30 °C.

Una vez seco se midió la coordenada R de cada soporte formado ( $R_{\text{blanco}}$ ) y se inyectaron 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de concentración comprendida entre 0,25 y 5 ppm. Tras 30 segundos se mide la componente R del color formado ( $R_{\text{muestra}}$ ). La señal se corresponde con la diferencia entre ambos valores para cada soporte medido ( $R_{\text{blanco}} - R_{\text{muestra}}$ ). Los resultados se muestran en la figura 19 y 20.

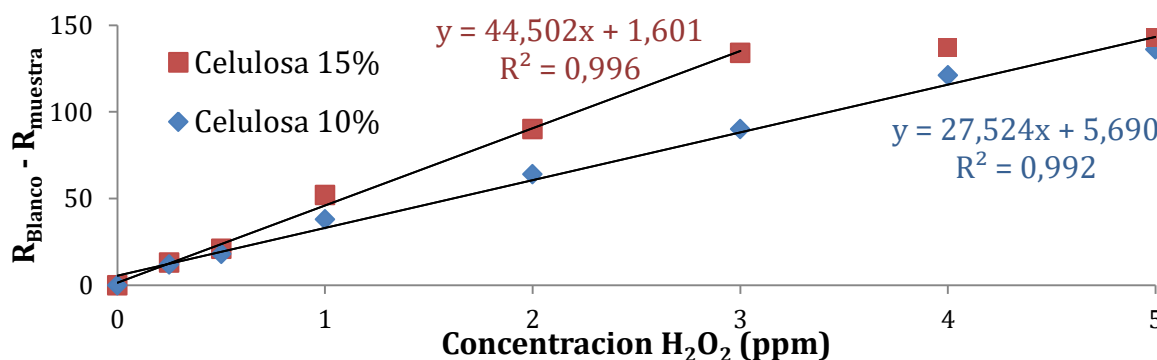


Figura 19. Comparación entre distintas concentraciones de celulosa ( $t_{\text{medida}} = 30$  s).

[TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL

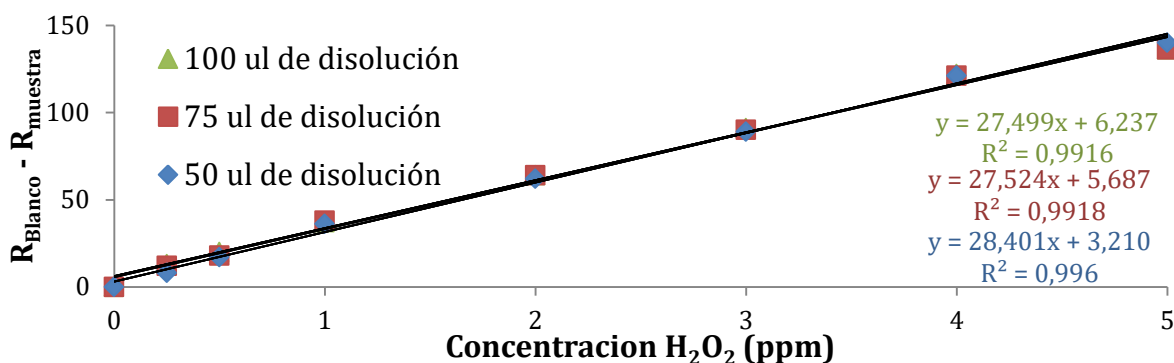


Figura 20. Comparación entre distintos  $V_{inyección}$  en Celulosa 10% ( $t_{medida} = 30 s$ ).  
 $[TMB] = 5,8 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[HRP] = 0,62 U/mL$

En cuanto al porcentaje de celulosa, la celulosa del 5% se descartó tanto por requerir un tiempo de secado superior a las dos horas como por romperse el soporte al inyectar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tras aplicarles un test de regresión (Anexo II) a las rectas del 10 y 15 % se comprobó que son significativamente distintas, dejando presente que a mayor concentración de celulosa, más sensible es la determinación, sin embargo se pierde rango de trabajo. Todo el estudio se realizó en una misma placa y el tiempo de medida de todo fue de 30 minutos.

En cuanto al volumen se confirmó que no había diferencias significativas entre ninguna de las tres rectas y por tanto el volumen de inyección en la placa usado es independiente de los resultados. (Anexo III).

La repetitividad en los distintos tipos de celulosa se muestra en las tablas 5 y 6:

**Tabla 5. Péroxido de hidrógeno, 1ppm en Celulosa 10%, n=16, t= 30 s**

Promedio	$\sigma$	DER
9,12	1,15	12,57 %

$[TMB] = 5,8 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[HRP] = 0,62 U/mL$

**Tabla 6. Peróxido de hidrógeno, 1ppm en Celulosa 15%, n=16, t= 30 s**

Promedio	$\sigma$	DER
11,31	1,08	9,53 %

$[TMB] = 5,8 \cdot 10^{-4} M$ ,  $[HRP] = 0,62 U/mL$

#### 4.2.2. Estudio de condiciones de medida

Se realizaron varios estudios acerca de las condiciones de medidas, ya que parte de ellas vienen condicionadas por el colorante, mientras que otras vendrán por el dispositivo móvil de medida, así como del programa que nos mide en código RGB.

##### 4.2.2.1. Estudio entre dispositivos móviles

Se comenzó el estudio de condiciones de medida comparando distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tomadas con distintos dispositivos (Figura 21).

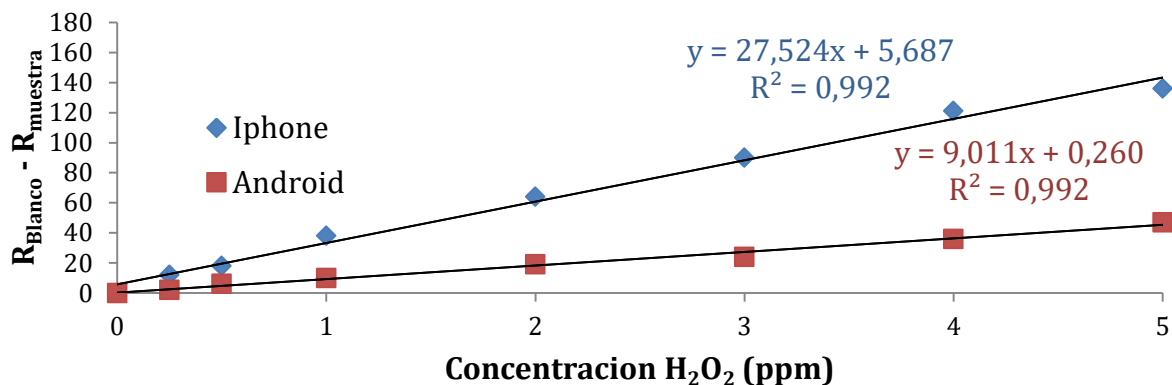


Figura 21. Comparación entre dispositivos móviles en Celulosa 10% ( $t_{\text{medida}} = 30 \text{ s}$ ),  $[TMB] = 5,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[HRP] = 0,62 \text{ U/mL}$

Tras aplicarles un test de regresión (Anexo IV) a las rectas se comprobó que son significativamente distintas, dejando presente que el dispositivo móvil afecta a la sensibilidad de las medidas. Se decidió usar el dispositivo Android por su disponibilidad.

#### 4.2.2.2. Estudio del tiempo de medida

Un parámetro importante es el tiempo al que se toman las medidas ya que la señal debe ser estable. Este estudio se realizó en celulosa al 10% con 4 pocillos independientes a los que se les inyectó 1, 4 y 10 ppm de  $H_2O_2$  respectivamente y un pocillo adicional de celulosa (Blanco) y se tomaron medidas cada 15 segundos. Los resultados se muestran en el figura 22.

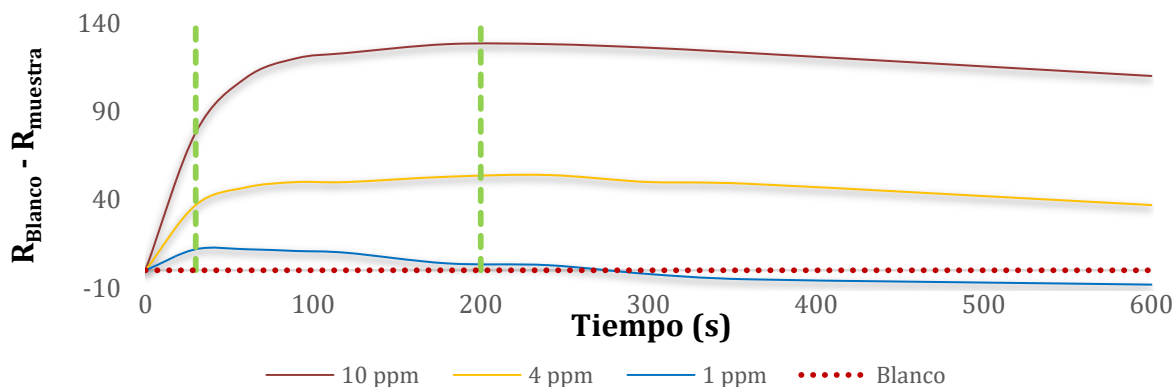


Figura 22. Estabilidad del colorante frente al tiempo ( $t_{\text{medida}} = \text{intervalos de } 15 \text{ s}$ ), Celulosa 10%,  $[TMB] = 5,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[HRP] = 0,62 \text{ U/mL}$

Las concentraciones más bajas requieren mucho menos tiempo para llegar al máximo y poco tiempo después la señal empieza a bajar, por lo que tomar la medida a su tiempo óptimo es realmente importante. Por otro lado, las concentraciones más elevadas requieren más tiempo para estabilizarse. Se consideró que el rango óptimo para la determinación es entre los 30-200 segundos y 90 segundos podría ser una situación de compromiso.

#### 4.2.2.3. Estudio y comparación entre tipos de medidas

Se enfocó en la toma de medida, ya que la aplicación utilizada permite medir cada soporte realizado de la placa de uno en uno o hacer una fotografía de todos ellos y luego coger los datos de cada uno. Se estudió si había influencia en las medidas. Para ello se trabajó en las condiciones habituales, TMB ( $5,8 \cdot 10^{-4}$  M) y HRP (0,62 U/mL), en celulosas del 10% y con  $H_2O_2$  entre 0,50 y 10 ppm tomando los datos de uno en uno o tomando una fotografía. Los resultados se muestran en la figura 23.

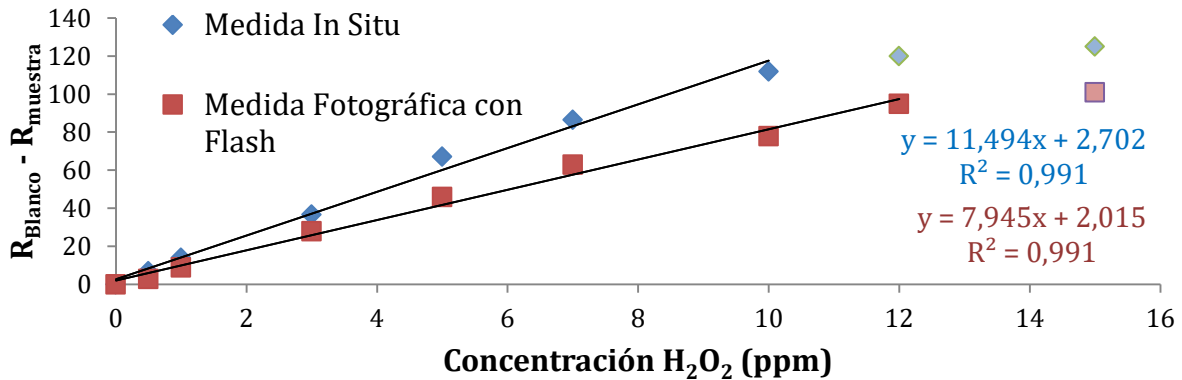


Figura 23. Rectas con distintos tipos de toma de medida.

Se realizó una comprobación estadística entre las ambas rectas (Anexo V), la cual indicó que había diferencias significativas entre realizar las medidas directamente o mediante fotografía. Si trabajamos directamente, tendremos más sensibilidad, sin embargo esto será a cambio del rango de trabajo. Trabajando con fotografía es justo al revés. Por lo que la utilización de un tipo de medida u otra dependerá de la decisión de la persona encargada de las medidas.

#### 4.2.3. Estudio de las cantidades óptimas de TMB y HRP

Se estudiaron la cantidad de TMB y la de HRP a una concentración de  $H_2O_2$  constante (1ppm).

- En la primera parte de este estudio se trabajó con HRP (0,62 u/mL),  $H_2O_2$  (1 ppm), con cantidades variables de TMB ( $5,8 \cdot 10^{-5} - 8,7 \cdot 10^{-4}$  M), en celulosa tratada 10%, medida directamente a los 100 segundos (Figura 24).

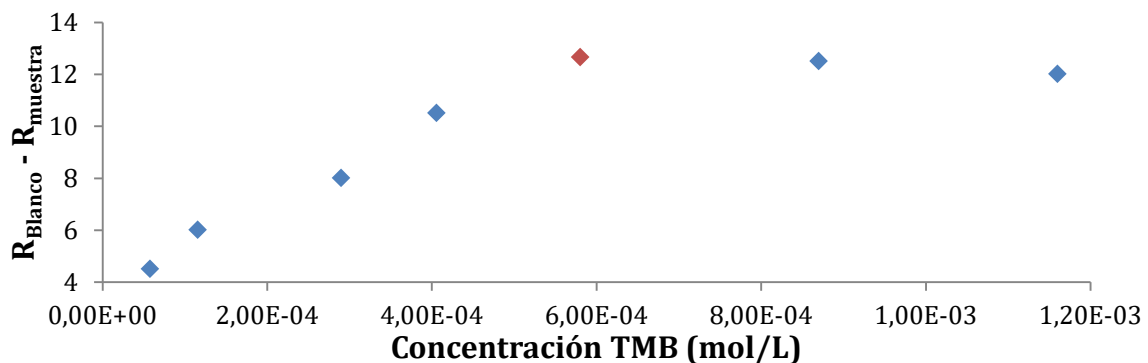


Figura 24. Optimización de TMB medida a los 100 segundos.  $[HRP]=0,62$  U/mL,  $[H_2O_2]=1$  ppm

La concentración óptima en este caso es  $5,80 \cdot 10^{-4}$  M.

En la segunda parte de este estudio se trabajó con TMB ( $5,80 \cdot 10^{-4}$  M),  $H_2O_2$  (1 ppm), con cantidades variables de HRP (0,31 – 2,48 U/mL), en celulosa tratada 10%, medida directamente a los 100 segundos (Figura 25).

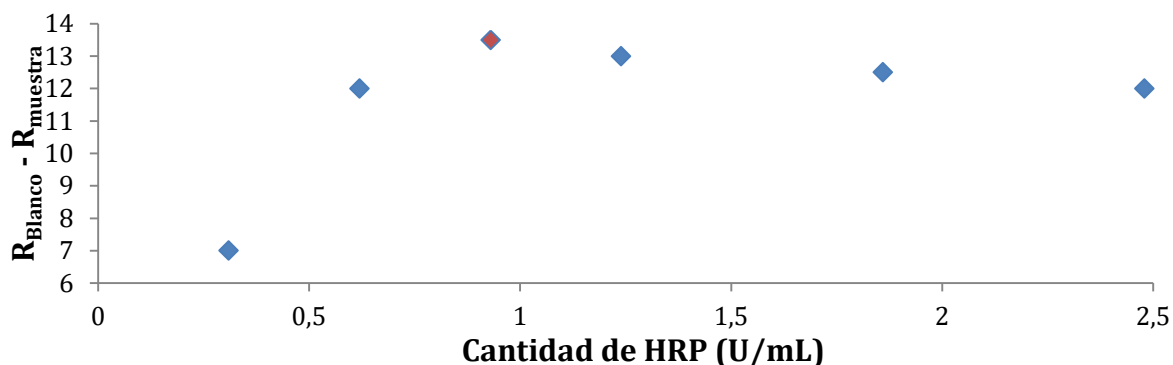


Figura 25. Optimización de HRP.  $[TMB] = 5,8 \cdot 10^{-4}$  M,  $[H_2O_2] = 1$  ppm

La mejor señal se obtuvo para un intervalo entre 0,62 y 0,93 U/mL.

#### 4.2.4. Estudio de calibración en celulosa 10 y 15% con todos los parámetros optimizados

Se hizo un estudio de calibración usando celulosa al 10 y 15% con todos los parámetros previamente optimizados, en un rango de  $H_2O_2$  de 0,50 a 15 ppm. Además se incluirá la repetitividad en ambas celulosas de una disolución de  $H_2O_2$  de 3 ppm. Los resultados se muestran en la figura 26 y 27.

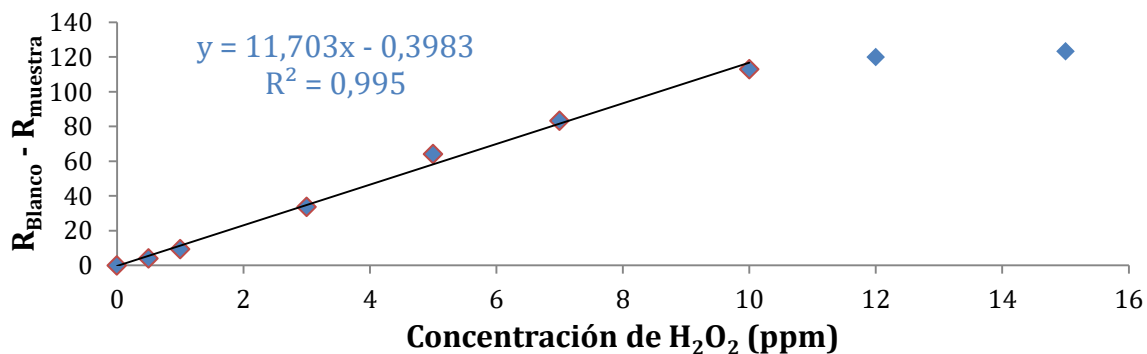


Figura 26. Recta de calibrado de  $H_2O_2$  en Celulosa 10%.  $[TMB] = 5,8 \cdot 10^{-4}$  M,  $[HRP] = 0,62$  U/mL

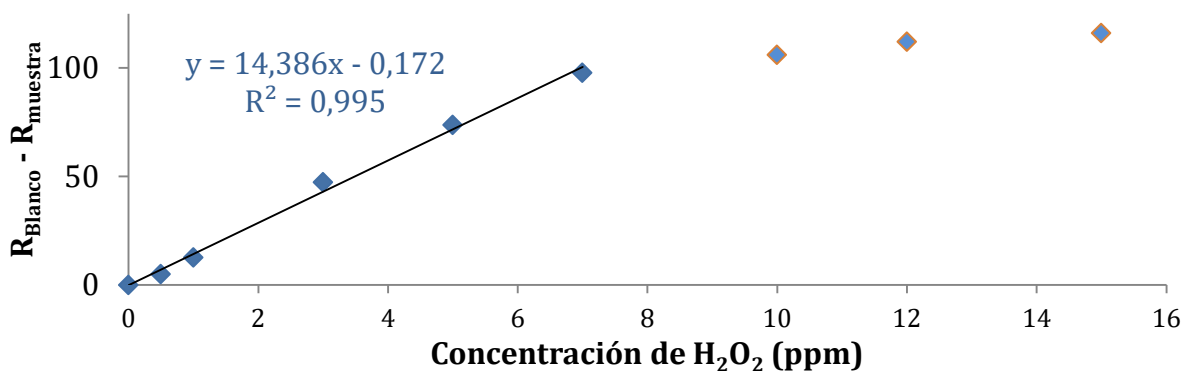


Figura 27. Recta de calibrado de  $H_2O_2$  en Celulosa 15%.  $[TMB] = 5,8 \cdot 10^{-4}$  M,  $[HRP] = 0,62$  U/mL

La repetitividad de las medidas se muestra en la tabla 7:

**Tabla 7. Peróxido de hidrógeno, 3ppm en Celulosa 10% y 15% optimizada. n=5, t= 100 s**

<b>Celulosa 15% Optimizada</b>			
<b>Promedio</b>	47,55	<b>Desviación Estándar</b>	1,81
<b>DSR%</b>	3,81 %	<b>Resultado</b>	47,55 ± 3,62
<b>Celulosa 10% Optimizada</b>			
<b>Promedio</b>	34,67	<b>Desviación Estándar</b>	2,64
<b>DSR%</b>	7,63 %	<b>Resultado</b>	34,667 ± 5,30

[TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL

Tras una comparación estadística (Anexo VI) se concluyó que había diferencias significativas entre ambas rectas. El rango de trabajo de la celulosa 15% sería entre 0,87 – 7ppm, mientras que en la celulosa 10% sería entre 1,75 – 10 ppm. En nuestro caso, seguiremos trabajando con celulosa 10%.

#### 4.2.5. Inmovilización de la DAO

El siguiente paso fue inmovilizar la DAO dentro del soporte de celulosa, así como optimizar las cantidades inyectadas. Además, se estudió la reacción de la DAO con las aminas biógenas y si estas se podían estudiar en presencia de histamina.

##### 4.2.5.1. Cuando inmovilizar la DAO

Se realizó un estudio sobre el momento óptimo de inyección de la DAO. Se trabajó con 6 pocillos. En tres de ellos se inyectó la DAO antes del secado de la celulosa (AS) y en los otros tres se inyectó después (DS). Las cantidades de DAO inyectada fueron 0.25, 0.5 y 1 Unidad en el pocillo. El estudio se realizó con putrescina  $1 \cdot 10^{-4}$  M y se tomaron varias fotos (7 fotos- Figura 28).

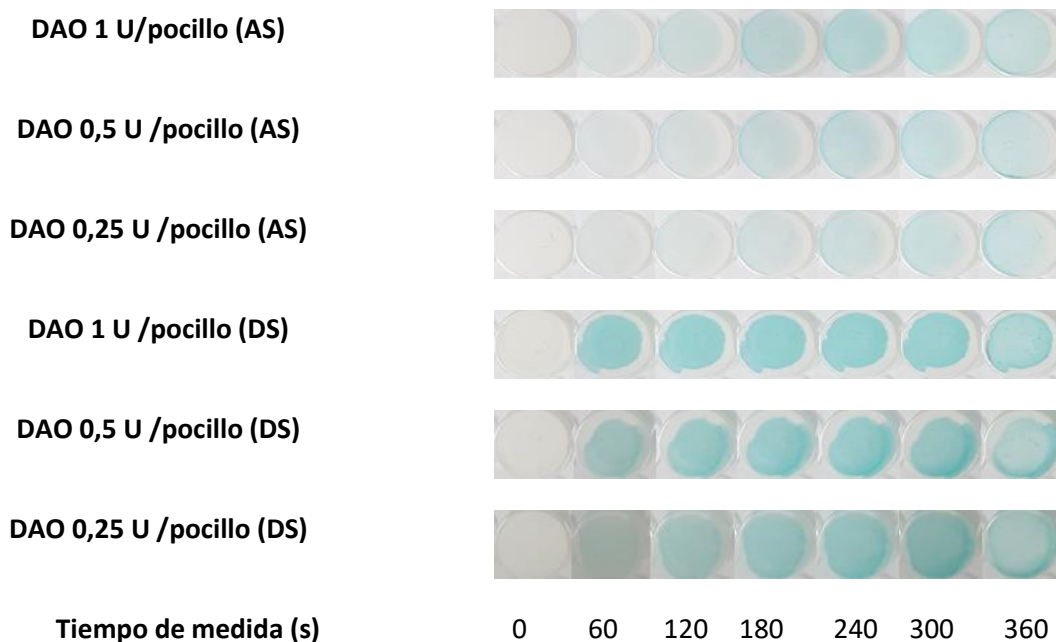


Figura 28. Evolución del color en función del momento de inyección de la DAO. [TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [Putrescina]=  $1 \cdot 10^{-4}$  M



Como se puede observar en la figura 28 en los pocillos en los que se ha inyectado DAO antes del secado de la celulosa, el color tarda más en estabilizarse, en cambio, en los pocillos en lo que se ha inyectado después, el color ya se ha estabilizado a los 60 segundos. También se aprecia que en los pocillos en los que se ha inyectado antes, la reacción funciona igualmente, aunque necesita más tiempo y es mucho menos sensible.

#### 4.2.5.2. Cantidad de DAO inmovilizada

En cuanto a cantidad en los pocillos en los que se había inyectado la DAO después del secado se observó que la señal depende de la cantidad de DAO, sobre todo al principio. Luego las señales se igualan, obteniéndose prácticamente la misma independientemente de la cantidad de DAO. Se ve también que pasado un tiempo (unos 240 s) el color difunde hacia fuera pero no dificulta la toma de la señal.

Se valoró cuando tomar las medidas. En el caso de añadir la DAO después, no afecta mucho y se puede tomar a 90 segundos, pero en el caso de antes afecta mucho a la sensibilidad (Figura 28). Se eligió el método de después para continuar con el estudio, ya que la señal es independiente de la cantidad de DAO y sólo depende de la concentración de putrescina.

#### 4.2.5.3. Calibración de putrescina y cadaverina

Para ello se prepararon una serie de disoluciones de putrescina y cadaverina y se inyectaron 10  $\mu$ L de cada una respectivamente en soportes de celulosa preparados en las condiciones consideradas óptimas. Las gráficas de calibración se muestran en las figuras 29 y 30 encontrando un intervalo de respuesta lineal entre  $5 \cdot 10^{-5}$  y  $2 \cdot 10^{-4}$  M para ambas aminas.

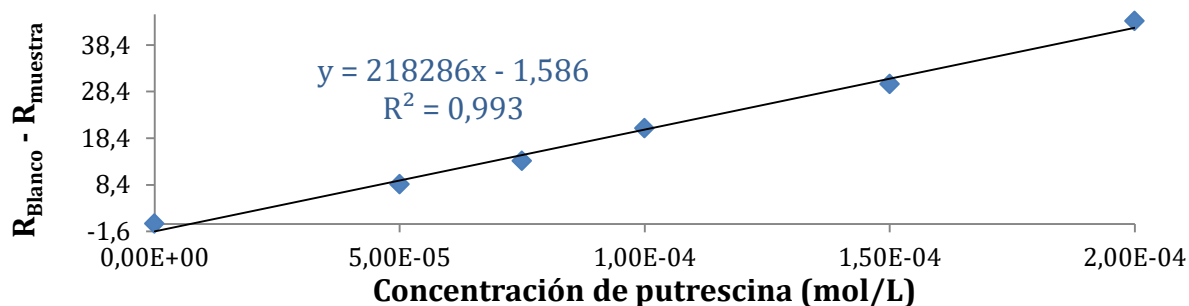


Figura 29. Recta de calibrado de putrescina. [TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL

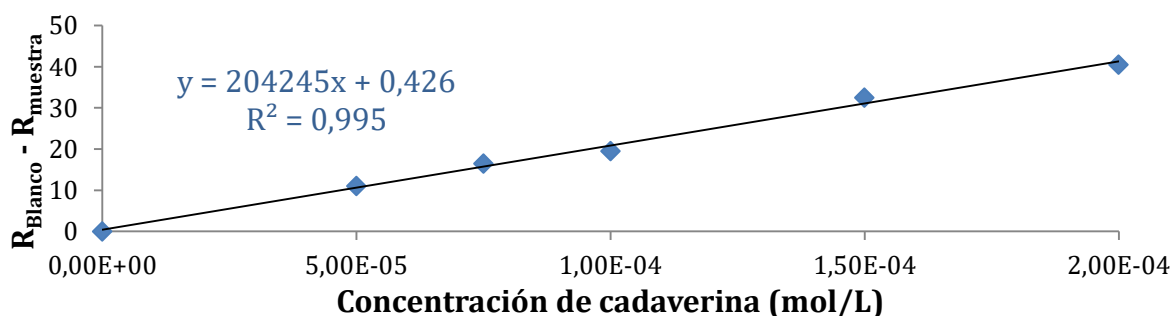


Figura 30. Recta de calibrado de cadaverina. [TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL

Como se observa las pendientes son muy parecidas por lo que se realizó una comparación estadística entre las rectas (Anexo VII) y se comprobó que no había diferencias significativas entre los resultados, es decir, putrescina y cadaverina proporcionan la misma señal ante la misma concentración de amina.

La repetitividad de las medidas se muestra en la tabla 8:

**Tabla 8. Putrescina y cadaverina  $1 \cdot 10^{-4}$  M en Celulosa 10%, n=5, t= 30 s**

<b>Analito</b>	<b>Promedio</b>	<b><math>\sigma</math></b>	<b>DER</b>
<b>Putrescina</b>	19,61	1,82	9,37 %
<b>Cadaverina</b>	18,88	1,93	10,21 %

[TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL

- **Estudio de la putrescina y cadaverina con histamina:**

Se realizaron varias medidas de histamina y al igual que pasaba en disolución, no hubo señal. Después se comprobó si la presencia de histamina influye en la señal de cadaverina y putrescina. Para ello se hicieron 5 réplicas de cadaverina ( $1 \cdot 10^{-4}$  M) y 5 de putrescina ( $1 \cdot 10^{-4}$  M) que contienen  $2 \cdot 10^{-4}$  M de histamina y se comparan con valores obtenidos en el estudio de repetitividad.

**Tabla 9. Comparación entre los valores de putrescina y cadaverina ( $1 \cdot 10^{-4}$  M) en Celulosa 10%, n=5, t= 30 s**

<b>Analito</b>	<b>Sin histamina</b>	<b>Con histamina (<math>2 \cdot 10^{-4}</math> M)</b>
<b>Putrescina (<math>10^{-4}</math> M)</b>	19,61±3,67	18,81±4,30
<b>Cadaverina (<math>10^{-4}</math> M)</b>	18,88±3,82	17,65±4,83

[TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL

Se realizó un test t de Student para comparar las medias con y sin histamina. En ambos caso la  $t_{crit} > t_{exp}$ , (Anexo VIII) por lo que no hay diferencias significativas en cuanto a los resultados cuando la muestra contiene histamina en esa concentración y por tanto histamina no afecta a la determinación de las otras dos aminas, lo que permitiría la determinación conjunta de cadaverina y putrescina en presencia del doble de concentración de histamina (que es habitual en muestras reales).

- **Calibración conjunta de putrescina y cadaverina:**

Se realizó un estudio para comprobar si la mezcla de aminas (1:1) generaban señales parecidas a las aminas medidas individualmente, ya que estas en muestras reales se determinan conjuntamente. Para ello se realizaron dos réplicas de una recta de calibrado en las condiciones habituales de reactivos, y se representó la media de ambas. Los resultados se muestran en la figura 31.

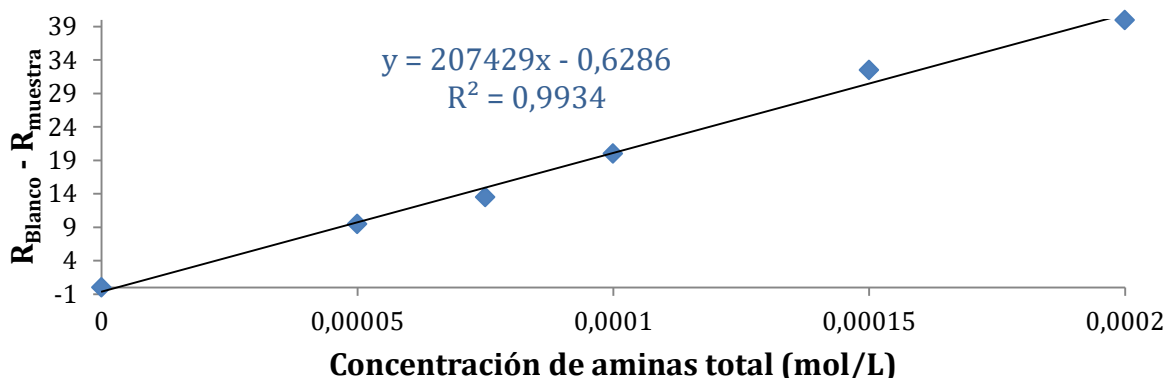


Figura 31. Recta de calibrado de putrescina y cadaverina. Proporción 1:1. [TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL

Se comparó estadísticamente (Anexo IX) la recta de mezcla con las rectas individuales y se comprobó que no hay diferencias significativas con estas, por lo que se pueden usar indistintamente para la determinación

- **Determinación conjunta de putrescina y cadaverina en la recta:**

Se prepararon varias muestras con la misma concentración de aminas totales pero diferente proporción de putrescina y cadaverina. Se midieron las señales de cada una 4 veces y se interpolaron en la recta encontrando los resultados de la tabla siguiente:

**Tabla 10. Mezclas relativas de putrescina y cadaverina  $1 \cdot 10^{-4}$  M en Celulosa 10%, n=5, t= 30 s**

Proporción relativa	Señal	Conc. recta de calibrado (M)	Error
1:1	20,75	1,03E-04	3,06 %
1:4	20,50	1,02E-04	1,86 %
4:1	19,25	9,58E-05	-4,17 %
1:0	19,00	9,46E-05	-5,37 %
0:1	19,50	9,70E-05	-2,96 %

[TMB]=  $5,8 \cdot 10^{-4}$  M, [HRP]=0,62 U/mL, [DAO]=1 U/mL

Tras realizar un estudio de varianza de un solo factor (Anexo X), se dedujo que no había diferencias significativas entre las distintas mezclas, por lo que independientemente de la proporción entre ellas, la señal será la misma, permitiendo por tanto la determinación conjunta de putrescina y cadaverina.

## 5. Conclusiones

En el desarrollo de este método colorimétrico para la determinación de aminas biógenas a través de reacciones enzimáticas en tiras reactivas de celulosa se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- La oxidación del colorante TMB durante la reacción enzimática entre las aminas biógenas, DAO y HRP en disolución permite la determinación de putrescina y cadaverina en el intervalo de concentraciones  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-5}$  M.
- La histamina no produce una señal apreciable por sí sola, pero si se encuentra en la muestra con las aminas anteriores produce un descenso de señal, cuya pendiente depende de la concentración de histamina. Esto permite su determinación.
- El soporte sólido basado en celulosa, es capaz de albergar las enzimas y colorantes y permite la determinación de aminas biógenas (putrescina y cadaverina) de una manera sencilla y rápida, sin usar instrumentación compleja, puesto que se hace uso de algo tan cotidiano como un teléfono móvil.
- Aunque haya diferencias significativas entre los resultados de un dispositivo móvil y otro, la relación lineal entre la concentración de aminas biógenas y la señal R del código RGB se mantiene. Para poder utilizar uno u otro hay que hacer su correspondiente calibración.
- La aplicación usada para la descomposición del color en código RGB permite al usuario decidir la mejor manera de trabajar en función de la muestra que tenga, ya que puede obtener los datos en continuo o a través de una fotografía.
- El tiempo óptimo para las medidas depende de la concentración de aminas presentes, siendo crucial el control de este para concentraciones inferiores a 1 ppm.
- La histamina no afecta significativamente a las señales obtenidas para putrescina y cadaverina.
- Por último, se ha concluido que la determinación conjunta de aminas biógenas genera los mismos resultados que el estudio de estas por separado, lo que facilita la determinación conjunta de ambas, situación que se encuentra en muestras reales.

## 6. Bibliografía

- [1].Koolman, J., & Röhm, K. H. *Bioquímica: texto y atlas*. Ed. Médica Panamericana. (2005). Pp. 52-72
- [2].Bayo Rodriguez, Francisco. *Aminas biógenas y seguridad alimentaria*. *Imagen Pp.3/Pp. 5-23*. URL: [https://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13\\_SaludPublica/AMINAS%20BI%20C3%93GENAS-II.BAYO%20.pdf](https://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13_SaludPublica/AMINAS%20BI%20C3%93GENAS-II.BAYO%20.pdf). (Consultada 01-06-2018)
- [3].López, A. F., Segovia, I. F., & Martínez, E. M. G. (2017). DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC). *Imagen Pp.3*
- [4]Duelo, Adriana. Déficit de actividad funcional de DAO: Acumulación de histamina. *Imagen Pp.3*. URL: [http://www.deficitdao.org/docs/Deficit\\_de\\_actividad\\_funcional\\_de\\_DAO.pdf](http://www.deficitdao.org/docs/Deficit_de_actividad_funcional_de_DAO.pdf) (Consultada 29-08-2018)
- [5].Callejón Salinas, Sara. Degradación de aminas biógenas mediante sistemas microbianos. Identificación y caracterización de las enzimas responsables. URL: <http://roderic.uv.es/handle/10550/56157?show=full> (Consultado 29-08-2018)

- [6] ExPASy. Bioinformatics Resource Portal. Enzyme nomenclature database. URL: <https://enzyme.expasy.org/EC/1.4.3.21>. (Consultado 29-08-2018)
- [7] ExPASy. Bioinformatics Resource Portal. Enzyme nomenclature database. URL: <https://enzyme.expasy.org/EC/1.4.3.22>. (Consultado 29-08-2018)
- [8] ExPASy. Bioinformatics Resource Portal. Enzyme nomenclature database. URL: <https://enzyme.expasy.org/EC/1.5.3.13>. (Consultado 29-08-2018)
- [9]. Galleguillos A., Mónica. Aminas biogénicas: Nuevos indicadores químicos utilizados como criterios de calidad en harina de pescado. URL: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S22.htm>, (Consultada 28-05-2018)
- [10]. Contreras, M., Izquierdo, P., Allara, M., Garcia, A., Torres, G., & Cespedes, E. (2007). Biogenic amines determination in Ripened Cheeses. *REVISTA CIENTIFICA-FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS*, 17(1), Pp.89-95.
- [11]. De la Torre, C. A. L., & Conte-Júnior, C. A. (2013). Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin. *Braz. j. vet. res. anim. sci*, 50(6), Pp. 430-446.
- [12] Lozano Lalaguna, Rebeca. Desarrollo de un método analítico enzimático para la determinación de aminas biógenas. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza. Departamento de Química Analítica. Grupo de Biosensores Analíticos (GBA). Junio de 2017
- [13] Rivero Trullen, Irina. Aminas biógenas: Estudio de nuevos colorantes para su determinación enzimática. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza. Departamento de Química Analítica. Grupo de Biosensores Analíticos (GBA). Junio de 2017
- [14] ExPASy. Bioinformatics Resource Portal. Enzyme nomenclature database. URL: <https://enzyme.expasy.org/EC/1.11.1.7>. (Consultado 29-08-2018)
- [15] Dako. TMB+Substrate-Chromogen, Ready to Use, Non.Flammable. URL: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/128008001.PDF> (Consultado 29-08-2018)
- [16]. Macherey-Nagel. Quantofix® Peroxide100. URL: <http://www.mn-net.com/tabid/10333/default.aspx>. (Consultado 29-08-2018)
- [17]. Boscarol, Mauro. Helmholtz: Experimentos básicos sobre la visión del color (2011). URL: [http://www.gusgsm.com/helmholtz\\_experimentos\\_basicos\\_sobre\\_la\\_vision\\_del\\_color](http://www.gusgsm.com/helmholtz_experimentos_basicos_sobre_la_vision_del_color). (Consultada 24-06-2018)
- [18]. Zelanski, P., & Fisher, M. P. *Color* (Vol. 48). Ediciones AKAL (2001). Pp.13-15
- [19]. Boscarol, Mauro. Maxwell: Las funciones colorimétricas del ojo humano (2011). URL: [http://www.gusgsm.com/maxwell\\_las\\_funciones\\_colorimetricas\\_del\\_ojo\\_humano](http://www.gusgsm.com/maxwell_las_funciones_colorimetricas_del_ojo_humano). (Consultado 29-08-2018)
- [20]. Modelo de Colores. Imagen del modelo de color RGB. Imagen. URL: [https://es.wikipedia.org/wiki/Modelo\\_de\\_colores#/media/File:RGBCube\\_b.svg](https://es.wikipedia.org/wiki/Modelo_de_colores#/media/File:RGBCube_b.svg). (Consultado 29-08-2018)

## ANEXO I

Se realizó un ensayo estadístico para la comparación de las pendientes de dos rectas de calibrado. Se comparó la varianza de ambas pendientes para averiguar si estas eran homogéneas o no. Se realizó un análisis de la regresión de ambas rectas de calibrado, y a partir del error típico asociado a cada una. Se realizó un nuevo análisis de regresión considerando el rango  $x$  de entrada como los valores de  $R_{blanco}-R_{muestra}$  de la recta con menor error típico y el rango de entrada y como los valores de  $R_{blanco}-R_{muestra}$  de la recta de calibrado con mayor error típico. Para poder establecer el criterio de homogeneidad entre la varianza de ambas pendientes, el valor de intercepción inferior y superior al 95,0% debe incluir el valor de 0 y el valor de la variable  $X_1$  inferior y superior al 95,0% debe incluir el valor de 1.

Resumen						
	Con tratamiento			Sin tratamiento		
	Estadísticas de la regresión			Estadísticas de la regresión		
Coeficiente $a$	0,95900548			Coeficiente $a$	0,96190293	
Coeficiente $b$	0,9196915			Coeficiente $b$	0,92525724	
R <sup>2</sup> ajustado	0,90630676			R <sup>2</sup> ajustado	0,91280011	
Error típico	14,3103431			Error típico	12,9235001	
Observacion	8			Observacion	8	
Comparación entre las varianzas de las rectas						
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-1,16820811	1,62417358	-0,71926309	0,49902233	-5,1424177	2,80600147
Variable X 1	1,06695341	0,02149731	49,6319497	4,4871E-09	1,01435139	1,11955543

## ANEXO II

Se aplicó el mismo ensayo estadístico explicado en el Anexo I.

Resumen						
	Celulosa 10%			Celulosa 15%		
	Estadísticas de la regresión			Estadísticas de la regresión		
Coeficiente $a$	0,9962398			Coeficiente $a$	0,99823341	
Coeficiente $b$	0,99249375			Coeficiente $b$	0,99646995	
R <sup>2</sup> ajustado	0,99061718			R <sup>2</sup> ajustado	0,99558743	
Error típico	3,32572776			Error típico	3,43285539	
Observacion	6			Observacion	6	
Comparación entre las varianzas de las rectas						
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-3,95260717	1,86224751	-2,12249293	0,101058	-9,12303516	1,21782082
Variable X 1	1,50322362	0,03840434	39,1420248	2,545E-06	1,39659608	1,60985116

## ANEXO III

Se aplicó el mismo ensayo estadístico explicado en el Anexo I.

Resumen						
50 µL			75 µL		100 µL	
<i>Estadísticas de la regresión</i>			<i>Estadísticas de la regresión</i>		<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente	0,99786228		Coeficiente	0,99589785	Coeficiente	0,99579916
Coeficiente	0,99572913		Coeficiente	0,99181253	Coeficiente	0,99161597
R <sup>2</sup> ajustado	0,99501731		R <sup>2</sup> ajustado	0,99044795	R <sup>2</sup> ajustado	0,99021863
Error típico	3,74363276		Error típico	5,03321231	Error típico	5,08901793
Observacion	8		Observacion	8	Observacion	8
Comparación entre las varianzas de las rectas de 50 y 75 µL						
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	2,49397185	1,013488	2,46078085	0,04906746	0,01405606	4,97388764
Variable X 1	0,97050365	0,01313135	73,9073798	4,1298E-10	0,93837239	1,0026349
Comparación entre las varianzas de las rectas de 50 y 100 µL						
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	3,05553263	1,21216771	2,52071772	0,04524321	0,08946509	6,02160017
Variable X 1	0,96946245	0,01570556	61,7273346	1,2152E-09	0,93103233	1,00789257
Comparación entre las varianzas de las rectas de 75 y 100 µL						
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0,55966577	0,563143	0,9938253	0,35868187	-0,81829553	1,93762706
Variable X 1	0,99900349	0,00732801	136,326802	1,0506E-11	0,98107251	1,01693448

## ANEXO IV

Se aplicó el mismo ensayo estadístico explicado en el Anexo I.

Resumen						
Iphone			Android			
<i>Estadísticas de la regresión</i>			<i>Estadísticas de la regresión</i>			
Coeficiente	0,99589785		Coeficiente	0,995801		
Coeficiente	0,99181253		Coeficiente	0,99161962		
R <sup>2</sup> ajustado	0,99044795		R <sup>2</sup> ajustado	0,99022289		
Error típico	5,03321231		Error típico	1,66718089		
Observacion	8		Observacion	8		
Comparación entre las varianzas de las rectas						
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	5,47701005	4,32472197	1,26644212	0,25229818	-5,10520339	16,0592235
Variable X 1	3,02211055	0,18070728	16,7237899	2,918E-06	2,57993577	3,46428533

## ANEXO V

Se aplicó el mismo ensayo estadístico explicado en el Anexo I.

Resumen						
	Cámara			Fotografía		
	<i>Estadísticas de la regresión</i>			<i>Estadísticas de la regresión</i>		
	Coeficiente de	0,98369668		Coeficiente de	0,998114984	
	Coeficiente de	0,96765915		Coeficiente de	0,996233522	
	R <sup>2</sup> ajustado	0,95148873		R <sup>2</sup> ajustado	0,994350282	
	Error típico	6,81598321		Error típico	1,952833665	
	Observacion	4		Observacion	4	
Comparación entre las varianzas de las rectas						
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0,35333333	3,49433192	0,10111613	0,928682161	-14,68156343	15,3882301
Variable X 1	1,18222222	0,10275225	11,5055605	0,007469596	0,740114977	1,62432947

## ANEXO VI

Se aplicó el mismo ensayo estadístico explicado en el Anexo I.

Resumen						
	Celulosa 10%			Celulosa 15%		
	<i>Estadísticas de la regresión</i>			<i>Estadísticas de la regresión</i>		
	Coeficiente de	0,99789484		Coeficiente de	0,99769303	
	Coeficiente de	0,99579412		Coeficiente de	0,99539139	
	R <sup>2</sup> ajustado	0,99474264		R <sup>2</sup> ajustado	0,99423924	
	Error típico	2,5081266		Error típico	3,05160842	
	Observacion	6		Observacion	6	
Comparación entre las varianzas de las rectas						
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	-1,38700414	1,88535972	-0,73567082	0,50273931	-6,62160192	3,84759363
Variable X 1	0,85749799	0,03501886	24,4867466	1,6505E-05	0,76027004	0,95472594



## ANEXO VII

Se aplicó el mismo ensayo estadístico explicado en el Anexo I.

Resumen						
Putrescina			Cadaverina			
Estadísticas de la regresión			Estadísticas de la regresión			
Coeficiente de correlación	0,99660464		Coeficiente de correlación	0,99748587		
Coeficiente de determinación	0,9932208		Coeficiente de determinación	0,99497807		
R^2 ajustado	0,991526		R^2 ajustado	0,99372258		
Error típico	1,44048603		Error típico	1,15903725		
Observación	6		Observación	6		
Comparación entre las varianzas de las rectas						
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-1,83956386	1,84359407	-0,99781394	0,37484052	-6,9582016	3,27907388
Variable X 1	1,05864486	0,0766613	13,8093775	0,00015938	0,84579896	1,27149076

## ANEXO VIII

Se realizó una prueba t para muestras independientes para evaluar si había diferencias significativas entre las medias de dos grupos. Si existe normalidad e igualdad de varianzas, la comparación de ambos grupos puede realizarse con un único parámetro como el valor medio. Se considerará una hipótesis inicial ( $H_0$ ), en la que se supondrá que la media es igual en ambas medidas. El test t para dos muestras independientes se basa en el estadístico:

$$t = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\frac{(n-1)\hat{S}_1^2 + (m-1)\hat{S}_2^2}{n+m-2} \left( \frac{1}{n} + \frac{1}{m} \right)}}$$

Si  $H_0$  es cierta, el valor obtenido de t debería estar dentro del rango de probabilidad (95%).

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales (Putrescina)		
	Variable 1	Variable 2
Media	19,6	18,8
Varianza	3,3	4,7
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	4	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	0,632455532	
P(T<=t) una cola	0,27236865	
Valor crítico de t (una cola)	1,859548038	
P(T<=t) dos colas	0,544737301	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004135	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales (Cadaverina)		
	Variable 1	Variable 2
Media	18,8	17,6
Varianza	3,7	5,8
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	4,75	
Diferencia hipotética de las medi	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	0,8705715	
P(T<=t) una cola	0,20467502	
Valor crítico de t (una cola)	1,859548038	
P(T<=t) dos colas	0,409350041	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004135	

Si el valor de  $t_{\text{crítico}} > t_{\text{calculador}}$ , se cumple la  $H_0$  y se podrán considerar las medias como iguales.

## ANEXO IX

Se aplicó el mismo ensayo estadístico explicado en el Anexo I.

Resumen						
Mezcla		Putrescina		Cadaverina		
Estadísticas de la regresión		Estadísticas de la regresión		Estadísticas de la regresión		
Coefficiente (	0,99669248	Coefficiente (	0,99660464	Coefficiente (	0,99748587	
Coefficiente (	0,99339591	Coefficiente (	0,9932208	Coefficiente (	0,99497807	
R^2 ajustado	0,99174488	R^2 ajustado	0,991526	R^2 ajustado	0,99372258	
Error típico	1,35092561	Error típico	1,44048603	Error típico	1,15903725	
Observacion	6	Observacion	6	Observacion	6	
Comparación entre las varianzas de las rectas de mezcla y putrescina						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	-0,7808813	1,48100499	-0,52726446	0,62589975	-4,89281034	3,33104774
Variable X 1	1,04489427	0,06287696	16,6180779	7,681E-05	0,87031983	1,2194687
Comparación entre las varianzas de las rectas de mezcla y cadaverina						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	-1,00233645	1,05292603	-0,95195334	0,39502716	-3,92572778	1,92105488
Variable X 1	1,01261682	0,04378333	23,1279099	2,0712E-05	0,89105482	1,13417882

## ANEXO X

El análisis de varianzas permite contrastar si la media de  $n$  poblaciones ( $n > 2$ ) son iguales. Para ellos se plantea una hipótesis ( $H_0$ ) en la las distintas poblaciones dan medias similares. Se aplica un test ANOVA en el que se considera que:

- Las poblaciones son normales.
- Las  $n$  muestras sobre las que se aplican los tratamientos son independientes.
- Las poblaciones tienen todas igual varianza.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Fila 1	4	83	20,75	10,91666667		
Fila 2	4	82	20,5	11		
Fila 3	4	77	19,25	16,25		
Fila 4	4	76	19	2		
Fila 5	4	78	19,5	0,333333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
n de las varianza de cuadrados de libertad/lo de los cua				F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9,7	4	2,425	0,299382716	0,873792266	3,055568276
Dentro de lo	121,5	15	8,1			
Total	131,2	19				

Si el valor de  $F_{\text{crítico}} > F_{\text{calculado}}$ , se cumple la  $H_0$  y se podrán considerar que varianzas son iguales y que pertenecen a una misma población.