



Desarrollo de tiras reactivas para el control de aminas biógenas en productos alimenticios

Development of test strips for biogenic amines control in foodstuffs

TRABAJO FIN DE GRADO

Lucía Marcuello Banzo

Director: Javier Galbán Bernal

Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza
Departamento de Química Analítica
Curso 2018/2019

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado con cargo al Proyecto CTQ2016-76846R (MINECO) y las ayudas a grupos de investigación DGA-FEDER (E25_17R).

Resumen

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un biosensor óptico para la determinación rápida de histamina. Para ello se ha estudiado la reacción de H_2O_2 -HRP con el colorante Amplex-Red acoplada a la oxidación de histamina con dos enzimas diferentes, diamina oxidasa (DAO) y tiramina oxidasa (TAO).

Se ha llevado a cabo la optimización de los parámetros que influyen en la determinación, como son el pH, la concentración de HRP, la concentración de la enzima correspondiente (DAO o TAO) y la concentración de colorante. Se han calculado los parámetros analíticos (límite de detección, límite de cuantificación, rango lineal, sensibilidad y reproducibilidad) de los dos métodos tras la realización de una recta de calibrado de histamina con cada enzima.

Tras ambas optimizaciones se ha aplicado el método realizado con la enzima TAO a una muestra sintética para la determinación simultánea de histamina y tiramina. Se han comparado mediante un test t los resultados obtenidos con el valor real de la muestra y se ha concluido como un método adecuado para esta determinación simultánea.

Finalmente, se han realizado los primeros estudios para el desarrollo de un biosensor para histamina con detección óptica basado en la inmovilización de los reactivos sobre un soporte sólido de celulosa a los que se añade posteriormente la histamina. Se ha optimizado la cantidad de TAO y de Amplex-Red para realizar la calibración.

Abstract

The objective of this work is the development of an optical biosensor for the rapid determination of histamine. For this purpose, the reaction of H_2O_2 -HRP with the Amplex-Red dye coupled to histamine oxidation with two different enzymes, diamine oxidase (DAO) and tyramine oxidase (TAO) has been studied.

Optimization of the parameters influencing the determination has been carried out, such as pH, HRP concentration, corresponding enzyme concentration (DAO or TAO) and Amplex-Red concentration. Analytical parameters (detection limit, quantization limit, linear range, sensitivity and reproducibility) of the two methods have been calculated after performing a histamine calibration line with each enzyme.

After both optimizations, the method performed with the TAO enzyme has been applied to a synthetic sample for the simultaneous determination of histamine and tyramine. The results obtained with the actual value of the sample have been compared using a t-test and concluded as an appropriate method for this simultaneous determination.

Finally, the first studies have been carried out for the development of a biosensor for histamine with optical detection based on the immobilization of the reagents on a solid support of cellulose to which histamine is subsequently added. Optimized the amount of TAO and Amplex-Red for calibration.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Aminas biógenas	1
1.2. Determinación de aminas biógenas en alimentos.	2
1.2.1. Determinación de histamina	2
1.2.2. Determinación de AB con biosensores ópticos.....	3
2. Objetivos y planteamiento	4
3. Parte experimental.....	5
3.1. Reactivos y disoluciones.....	5
3.1.1. Reactivos generales.....	5
3.1.2. Disoluciones de enzimas	5
3.1.3. Disoluciones de aminas	5
3.2. Instrumentación y material.....	5
3.2.1. Instrumentos	5
3.2.2. Materiales.....	6
3.3. Procedimiento operativo	6
3.3.1. Método en disolución.....	6
3.3.2. Soportes sólidos	6
4. Resultados	7
4.1. Estudio de la reacción HRP-H ₂ O ₂ con el colorante Amplex-Red	7
4.2. Estudio de la histamina con DAO	8
4.2.1. Optimización de los distintos parámetros de la reacción	8
4.2.1.1. Optimización del pH	8
4.2.1.2. Optimización de la concentración de DAO.....	10

4.2.1.3. Optimización de la concentración de HRP	10
4.2.1.4. Optimización de la concentración de Amplex-Red.....	11
4.2.2. Calibración de histamina	12
4.2.3. Parámetros analíticos.....	13
4.3. Estudio de la histamina con TAO	13
4.3.1. Optimización de los distintos parámetros de reacción	14
4.3.1.1. Optimización del pH	14
4.3.1.2. Optimización de la concentración de TAO	15
4.3.2. Calibración de histamina	16
4.3.3. Parámetros analíticos.....	17
4.3.4. Estudio de la interferencia: tiramina.....	18
4.3.4.1. Efecto de la tiramina sobre la histamina	18
4.3.4.2. Eliminación de la interferencia por adición estándar.....	19
4.3.5. Determinación simultánea de histamina y tiramina	20
4.4. Construcción del biosensor: inmovilización en soportes sólidos de celulosa	21
4.4.1. Optimización de los parámetros de reacción.....	21
4.4.1.1. Optimización de Amplex-Red	22
4.4.1.2. Optimización de TAO	22
4.4.2. Calibración.....	22
5. Conclusiones.....	24
6. Bibliografía.....	25

1. Introducción

1.1. Aminas biógenas

Las aminas biógenas (AB) son biomoléculas nitrogenadas de bajo peso molecular formadas por la reacción de descarboxilación de aminoácidos por la acción de enzimas descarboxilasas presentes en microorganismos.

Su descarboxilación viene determinada por diversos factores, como las reservas de aminoácidos libres, la presencia de microorganismos y las condiciones de conservación (pH, temperatura, concentración de sal...), ya que de estas dependerá el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la reacción de descarboxilación.

Pueden clasificarse en función de su estructura química en: aminas alifáticas, como la putrescina, cadaverina, espermina o espermidina; aminas aromáticas, como la feniletilamina y tiramina; y aminas heterocíclicas, como son la histamina y la triptamina. Figura 1¹.

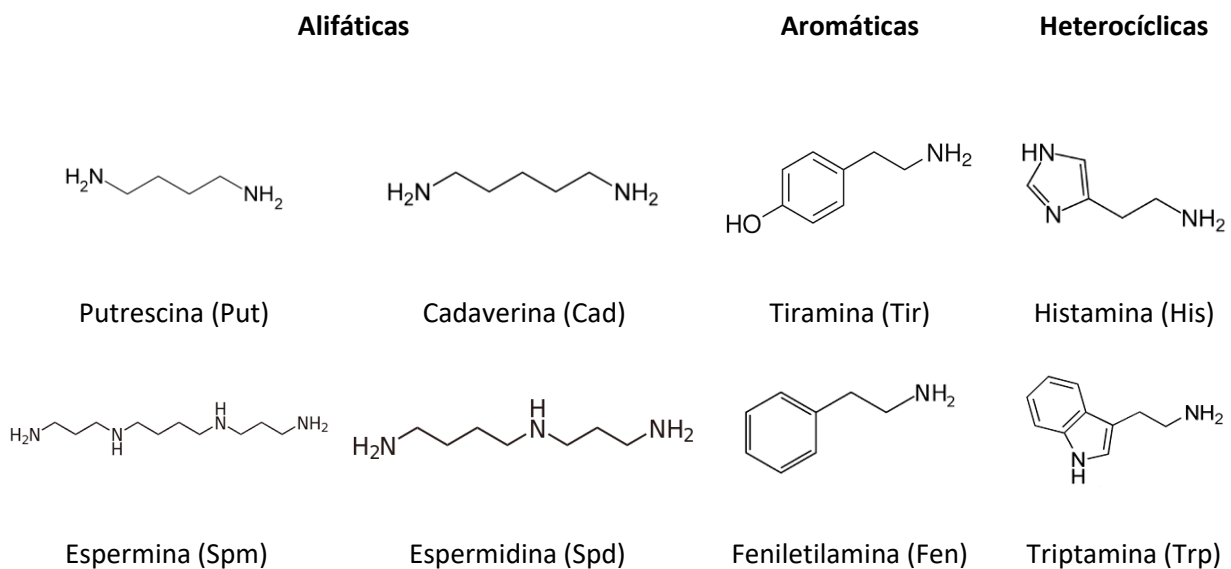


Figura 1. Clasificación de aminas biógenas.

Las AB tienen una actividad biológica importante ya que realizan multitud de funciones en el organismo, intervienen en procesos de transición sináptica, en el control de la presión arterial o en el control del crecimiento celular. En concreto, la histamina actúa como neurotransmisor transmitiendo impulsos nerviosos.

Sin embargo, si su concentración aumenta en exceso pueden resultar ser tóxicas. De todas ellas, las que presentan mayor toxicidad son la histamina y la tiramina. Además, algunas de ellas como la cadaverina o la putrescina pueden reaccionar con nitritos dando lugar a nitrosaminas que son compuestos carcinogénicos.

1.2. Determinación de aminas biógenas en alimentos.

La determinación de las diferentes aminas biógenas en alimentos tiene mucha importancia, por su toxicidad y como indicativo del deterioro o maduración del alimento, ya que el contenido de algunas AB está relacionado con su degradación.

Los objetivos que se proponen al analizar las diferentes aminas biógenas en alimentos son los siguientes:

- Conocer su concentración ya que pueden producir efectos adversos en el organismo.
- Controlar que los métodos de preparación, almacenamiento y envasado de alimentos sean efectivos para reducir su producción.
- Establecer la relación entre la cantidad de estas y de los microorganismos productores en diferentes alimentos.

1.2.1. Determinación de histamina

La histamina, junto con la tiramina, es la AB que produce intoxicaciones más agudas. Esta intoxicación se conoce como “escombroidosis” ya que está altamente relacionada con el consumo de pescado de la familia a la que pertenecen los escómbridos, como el atún, la caballa o el bonito. Estas especies de animales poseen gran cantidad de histidina libre, aminoácido precursor de la histamina².

La reacción de transformación de histidina en histamina es llevada a cabo por la enzima histidina descarboxilasa (HDC) y está representada en la figura 2.

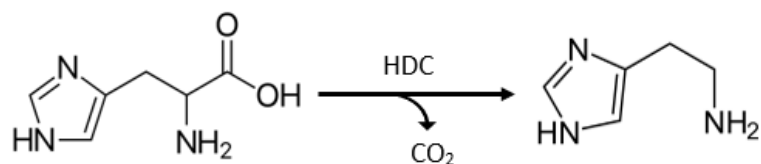


Figura 2. Reacción formación de histamina a partir de histidina.

El problema de la histamina radica en el efecto sinérgico causado por la presencia de otras aminas biógenas en el mismo alimento. La putrescina y la cadaverina actúan como inhibidores de la diamina oxidasa (DAO), que es la enzima encargada de la detoxificación de las AB, por lo que aumenta la toxicidad de la histamina³.

Otro problema que puede producir la histamina es su intolerancia, que está ligada a un aumento de esta amina en el plasma. Esto ocurre por una descompensación entre la síntesis de histamina y la capacidad de excreción, lo que puede deberse a su vez a la baja actividad de enzimas encargadas de su degradación, como la DAO.

La histamina es la única de las AB que se encuentra legislada, tanto por la Comisión Europea como por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos. Los límites oficiales europeos de esta AB en productos pesqueros se muestran en la tabla 1⁴.

Muestra	Valor límite de histamina
Escómbridos	100 mg/kg
Salmueras	200 mg/kg

Tabla 1. Valores límite de histamina permitidos en diferentes muestras.

1.2.2. Determinación de AB con biosensores ópticos

Los métodos analíticos más comunes en la cuantificación de AB se basan en la cromatografía de líquidos con alta resolución (HPLC) con detección por absorción UV o por fluorescencia, o acoplado a espectrometría de masas. Sin embargo, el inconveniente que tienen estos métodos es que requieren tratamientos previos de la muestra y equipos de coste elevado⁵.

Debido a la actual importancia de la determinación de aminas biógenas para el control de calidad en alimentos, se han desarrollado numerosos métodos que presenten una alternativa viable, como es el caso de los biosensores enzimáticos. Estos presentan ciertas ventajas respecto a los métodos generalmente usados, como son la rapidez, el menor coste y la selectividad.

Un sensor químico es un dispositivo que transforma información química obtenida por la reacción del analito en una señal analíticamente útil y así poder conocer su concentración en la muestra.

El proceso de transformación de estos sensores químicos ópticos consta de tres etapas: la primera es de reconocimiento químico, en la que un receptor (reactivo) interacciona selectivamente con el analito; la segunda es la de transducción, en la que un transductor transforma la información química en una señal visual o física, en este caso óptica, de absorción, fluorescencia, luminiscencia...; y la última etapa que consiste en la amplificación y procesamiento de la señal, para obtener una señal analítica⁶.

En este trabajo, se estudiarán biosensores ópticos enzimáticos, en los que la etapa de reconocimiento se lleva a cabo por enzimas, que actúan de forma más o menos específica sobre el analito.

2. Objetivos y planteamiento

La finalidad principal de este estudio es sentar las bases para el desarrollo de un biosensor óptico para la determinación rápida de histamina. A continuación, en la figura 3 se muestra la secuencia de reacciones en las que se basa la determinación⁷.

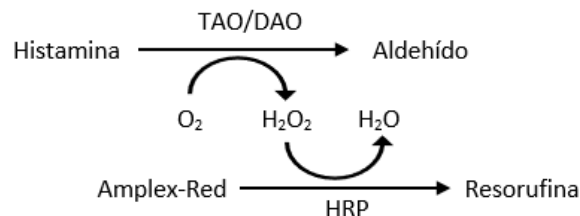


Figura 3. Esquema de las reacciones enzimáticas acopladas en las que se basa el biosensor óptico.

El analito que se quiere determinar, la histamina, es sustrato de la enzima diamina oxidasa (DAO) o de la tiramina oxidasa (TAO), que oxidan su grupo amino a un aldehído en presencia de oxígeno. Esta reacción genera peróxido de hidrógeno, que es sustrato de la segunda reacción. Con la peroxidasa (HRP) se reduce este H_2O_2 a H_2O , oxidando a su vez el colorante Amplex-Red a una resorufina que es la que presenta propiedades de absorción o de detección visual.

Además, se establecen los siguientes objetivos secundarios:

- Buscar en la bibliografía y en artículos publicados para conocer la situación sobre el tema.
- Repasar los aspectos teóricos de la absorción molecular UV-Vis y aprender el manejo del espectrofotómetro.
- Estudiar la reacción del H_2O_2 -HRP con el colorante Amplex-Red a diferentes pH. Realizar una recta de calibrado para conocer las características analíticas.
- Estudiar las reacciones enzimáticas acopladas de la histamina con las enzimas DAO y TAO (figura 3) en presencia del colorante. Optimizar los diferentes parámetros y obtener las características analíticas con ambas enzimas. Evaluar cuál de ellas es mejor para la determinación de histamina teniendo en cuenta la presencia de interferencias producidas por el resto de AB.
- Comprobar si es posible la determinación simultánea de histamina y tiramina con el método propuesto con la enzima TAO, a partir de una muestra sintética preparada en el laboratorio.
- Realizar los primeros estudios en el desarrollo de un biosensor visual para histamina, inmovilizando los reactivos para la determinación de histamina en soportes sólidos sobre los que se añadirá el analito. Observar y cuantificar el color resultante con una aplicación de Smartphone.
- Extraer datos obtenidos en el laboratorio y llevar a cabo el tratamiento estadístico correspondiente.

3. Parte experimental

3.1. Reactivos y disoluciones

3.1.1. Reactivos generales

- Disoluciones amortiguadoras $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M de pH 6, 7, 8 y 10. Se preparan disolviendo aproximadamente 1,40 g de NaH_2PO_4 (Panreac 131679.1211) en 100 mL de agua miliQ y ajustando el pH con una disolución de HCl 1 M o una disolución de NaOH 1 M.
- Disolución amortiguadora $\text{CO}_3^{2-} / \text{HCO}_3^-$ 0,1 M de pH 9. Se prepara disolviendo aproximadamente 1 g de Na_2CO_3 (EC 207-308-8) en 100 mL de agua miliQ y ajustando el pH con una disolución de HCl 1 M.
- Disolución patrón de peróxido de hidrógeno, H_2O_2 30% (m/V) (Panreac 131077.1211), a partir de la cual se hacen diluciones.
- 10-Acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina, Amplex[®]Red (Sigma-Aldrich Lote #BCBQ0525): se disuelven 5 mg de Amplex-Red en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).
- Celulosa microcristalina de 20 μm (Sigma-Aldrich Lote #310697)

3.1.2. Disoluciones de enzimas

- Peroxidasa (HRP) 88,16 U/mg (Peroxidase from Horseradish): Sigma-Aldrich Lote #SLBW5502.
- Tiramina oxidasa (TAO) 4,600 U/mg: Asahi Kasei Pharma Corporation.

Ambas disoluciones se preparan pesando una masa exacta y disolviéndola en 1 mL de agua miliQ.

- Disolución de diamina oxidasa (DAO) de 163 U/mL: Bio-Research Products Inc. Lote #0441A.

3.1.3. Disoluciones de aminas

Las disoluciones de aminas se preparan cada semana pesando una masa exacta de los sólidos siguientes en un Eppendorf previamente tarado y disolviéndola en un volumen de 1 mL de agua miliQ o disolución amortiguadora, dependiendo del ensayo a realizar, añadido con micropipeta. A partir de estas se preparan las diluciones necesarias.

- Histamina (Histamine dihydrochloride): Sigma-Aldrich Lote #WXBC34C, pureza 99%.
- Tiramina (Tyramine hydrochloride): Sigma-Aldrich Lote #BCBP6976V, pureza 98%.
- Cadaverina (Cadaverine dihydrochloride): Sigma-Aldrich Lote #BCBL6699V, pureza 98%.
- Putrescina (Putrescine dihydrochloride): Sigma-Aldrich Lote #BCBR1640V, pureza 98%.
- Feniletilamina (Phenylethylamine hydrochloride): Sigma-Aldrich Lote #SLBM0632V, pureza 98%.
- Triptamina (Tryptamine hydrochloride): Sigma-Aldrich Lote #MKBH7797V, pureza 99%.

3.2. Instrumentación y material

3.2.1. Instrumentos

- Balanza analítica de precisión. GR-202-EC.

- pH-metro CRISON, Basic 20.
- Espectrofotómetro de AM UV-VIS Agilent 8453A.
- Espectrofotómetro de AM UV- VIS Analytic Jena Sperscord 210 Plus.

Ambos espectrofotómetros están formados por fotodiodos y una lámpara de deuterio y wolframio que permite medir en un rango entre 190 y 1100 nm.

3.2.2. Materiales

- Cubetas de cuarzo Hellma con 1 cm de paso óptico.
- Agitador magnético A-01, SBS.
- Micropipetas de volumen variable: Socorex (5-50 μL y 10-100 μL) y Eppendorf (2-20 μL , 20-200 μL y 100-1000 μL).
- Material desechable: Eppendorf, viales, tubos Falcon, puntas de micropipetas, pipetas Pasteur.
- Filtro óptico Kodak amarillo.
- Placas de pocillos nunc™.

3.3. Procedimiento operativo

3.3.1. Método en disolución

Para la determinación de histamina, se realizan medidas de absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro de absorción molecular, utilizando el método cinético. Se utilizan cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, en las que el volumen final en cada medida es de 2 mL. Dado que el colorante utilizado, Amplex red, se descompone con la luz, es necesario utilizar un filtro óptico para evitar su degradación con la radiación UV.

Antes de cada medida se realiza un blanco con la disolución amortiguadora correspondiente. Después se añaden los reactivos (las enzimas y el colorante), y se deja estabilizar la línea base durante unos segundos. Por último, se añade el analito y se registra la variación de la señal. Cuando la reacción ha concluido, es decir, se ha estabilizado la señal, se detiene la medida. En la mayoría de los casos se utilizará como parámetro analítico la diferencia de absorbancia entre este valor final estable y el valor inicial ($\Delta\text{Absorbancia}$).

3.3.2. Soportes sólidos

Se prepara una disolución de celulosa al 5% utilizando la disolución amortiguadora de pH 8 que contiene 1 U/mL de HRP y se reparten en una placa de pocillos, colocando 90 μL en cada uno. Se deja secar en una incubadora a 37°C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, la celulosa se ha transformado en un fino papel blanco.

Sobre este papel se añaden los reactivos para la determinación de histamina, la enzima TAO y el colorante Amplex-Red. Tras dejar secar al aire, se adiciona el analito y se observa el cambio de color. El color resultante se mide con una aplicación de Smartphone, "RGB color value", que proporciona los valores de las coordenadas RGB.

4. Resultados

4.1. Estudio de la reacción HRP-H₂O₂ con el colorante Amplex-Red

El objetivo de este apartado es estudiar la reacción de reducción de H₂O₂ con el colorante Amplex-Red, cuyo esquema se muestra en la figura 4, a diferentes pH.

Los colorantes utilizados generalmente son el 2,2'-azino-bi (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) o el 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), pero presentan el inconveniente de que uno de los productos de la reacción, en concreto el aldehído procedente de la histamina, vuelve a reaccionar con el colorante y la señal desaparece con el tiempo.

Por ello, se quiere estudiar otro colorante, Amplex-Red para comprobar que no hay reacciones laterales y mejorar la determinación.

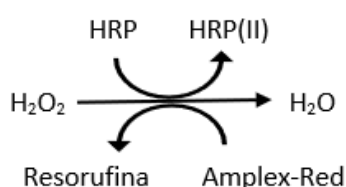


Figura 4. Esquema de la reacción HRP-H₂O₂-Amplex-Red.

El Amplex-Red reacciona con el H₂O₂ con estequiometría 1:1 produciendo una resorufina, que presenta un máximo de absorción a 570 nm. Este producto también es fluorescente, pero las medidas se realizaron por absorción molecular.⁸

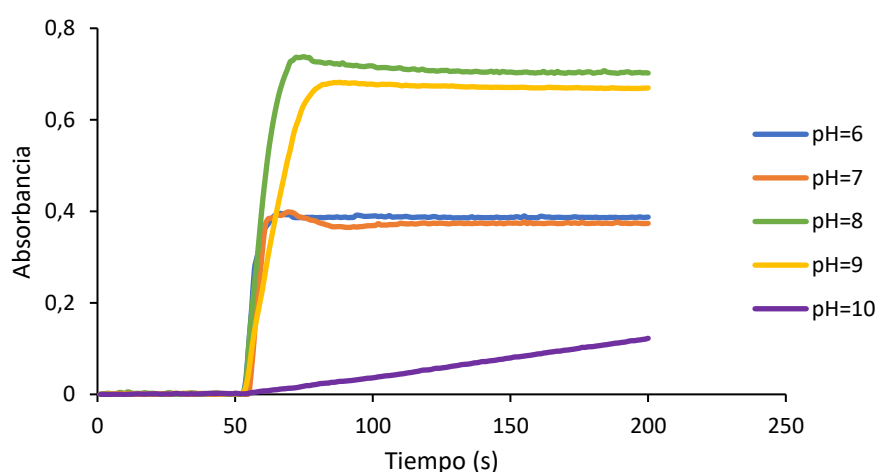


Figura 5. Señal de absorbancia a 570 nm a diferentes pH. Concentraciones en cada ensayo: [H₂O₂]= 4,9·10⁻⁶M, [HRP]= 0,49 U/mL y [Amplex-Red]= 5·10⁻⁵M.

Como muestra la figura 5, en los pH entre 6 y 9, la reacción se produce, de manera rápida y con alto valor de absorbancia, especialmente a pH 8 y 9. A pH 10, la reacción se produce muy lentamente por

lo que se descartó. El pH óptimo para la determinación de histamina se obtiene con la reacción de la amina con la enzima oxidasa que se esté estudiando (DAO o TAO).

Para el estudio detallado de la reacción, se realizó una calibración de H_2O_2 , que posteriormente, se comparará la pendiente con la de la recta de calibrado de la histamina y así comprobar que porcentaje de histamina se transforma en H_2O_2 .

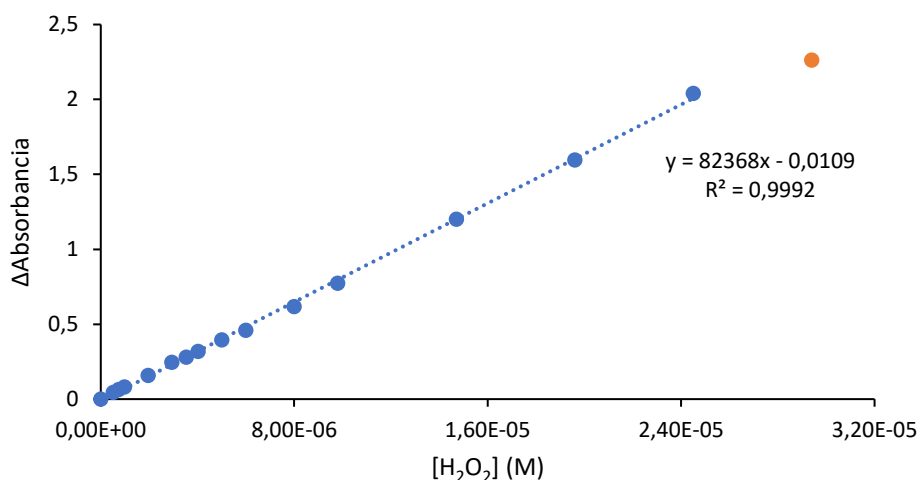


Figura 6. Recta de calibrado de H_2O_2 . Concentraciones en cada ensayo (a pH=8):
 $[HRP]= 0,49 \text{ U/mL}$ y $[Amplex-Red]= 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Se midieron concentraciones hasta $2,94 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de H_2O_2 , pero la última de ellas disminuye el coeficiente de correlación. Para comprobar si pertenece a la recta, se realiza análisis de la regresión, en concreto un test F (tabla 2).

F exp	F crít
8,8	7,2

Como el valor de F experimental, al 99%, es mayor que el tabulado, indica que el dato anómalo no pertenece a la recta. Por tanto, el rango lineal de la calibración de H_2O_2 llega hasta $2,45 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Tabla 2. Test F hacer el análisis de la regresión.

4.2. Estudio de la histamina con DAO

4.2.1. Optimización de los distintos parámetros de la reacción

4.2.1.1. Optimización del pH

El pH es determinante en la actividad de una enzima, por lo que fue lo primero que se optimizó. Para ello se llevó a cabo la reacción de histamina con la enzima DAO en diferentes disoluciones tampón para comprobar en cuál de ellos la absorbancia, y por tanto la sensibilidad, iba a ser mayor. Se utilizaron concentraciones fijas de HRP, DAO, Amplex-Red e histamina. Los resultados se muestran a continuación en la figura 7.

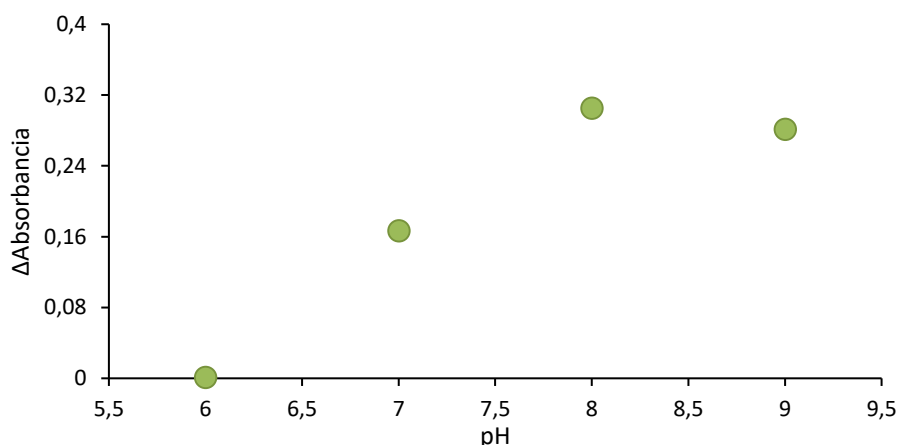


Figura 7. Señal de absorbancia a diferentes pH. Concentraciones en cada ensayo: [HRP]=0,5 U/mL, [DAO]= 1 U/mL, [Amplex-Red]= $5 \cdot 10^{-5}$ M y [His]= $5 \cdot 10^{-6}$ M.

También se realizó un estudio de interferencias con el resto de las AB para elegir el pH óptimo para la determinación de histamina. Estos ensayos se separaron en 3 bloques, dividiéndose por el comportamiento de las diferentes aminas con la enzima. Los resultados más relevantes se muestran en la figura 8 y el estudio completo en el anexo 1.

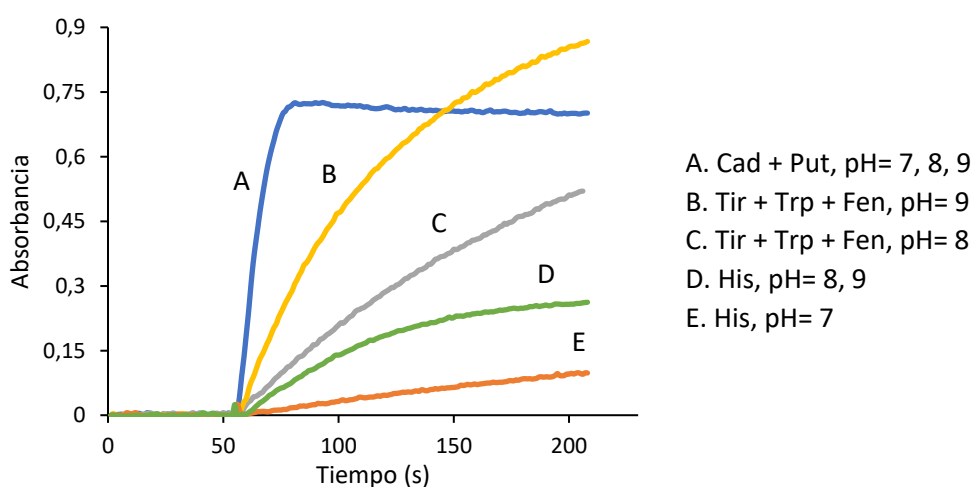


Figura 8. Señal de absorbancia a diferentes pH con las diferentes AB. Concentraciones en cada ensayo: [HRP]=0,5 U/mL, [DAO]= 1 U/mL, [Amplex-Red]= $5 \cdot 10^{-5}$ M y [AB]= $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Se concluyó que el pH óptimo para hacer la determinación de histamina (curvas D y E) con DAO es 8. Ya que a pH 6 y 7, la histamina no puede determinarse de forma rápida porque reacciona muy lentamente con la enzima, y a pH 9 aumentan las interferencias. El pH 8 es el más sensible para el análisis, se consigue una diferencia de absorbancia de 0,3 y en unos 200 segundos ya está estabilizada la señal.

Las interferencias más importantes son la cadaverina y la putrescina ya que reaccionan rápidamente con la DAO a pH 7, 8 y 9 (curva A).

El resto de las aminas, tiramina, triptamina y feniletilamina, están en concentraciones mucho menores que la histamina y no van a ser una interferencia importante, además de que reaccionan en poca extensión a pH=8.

4.2.1.2. Optimización de la concentración de DAO

Como se ha visto en la figura 8, La enzima DAO es muy reactiva hacia diaminas, como la cadaverina o la putrescina, pero no lo es tanto para la histamina, ya que solo tiene un grupo amino. Por tanto, su concentración va a ser clave para el análisis y la determinación rápida de histamina.

La optimización consiste en encontrar la concentración de enzima en la que la velocidad sea más rápida, para ello se probaron las siguientes concentraciones de DAO: 0,5, 1, 2 y 4 U/mL. Los ensayos se realizaron a pH 8 ya que se ha concluido como óptimo.

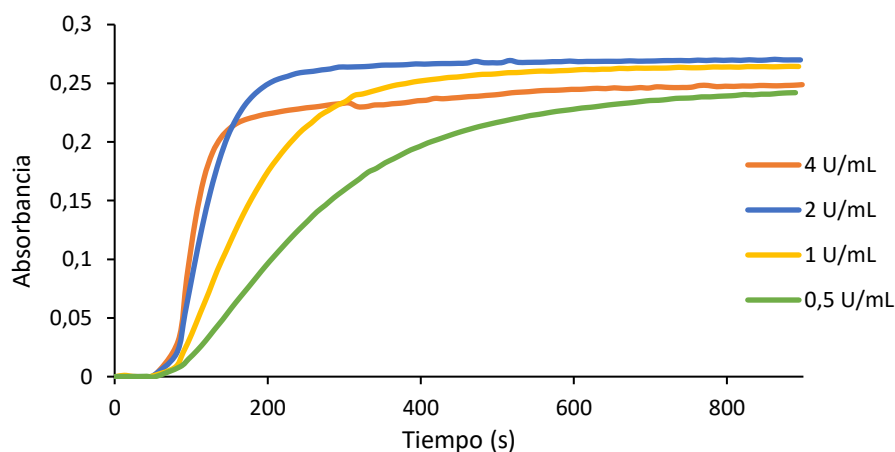


Figura 9. Señal de absorbancia con diferentes concentraciones de DAO a pH=8. Concentraciones en cada ensayo: [HRP]= 0,1 U/mL, [Amplex-Red]= $7 \cdot 10^{-5}$ M y [His]= $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Como se observa en la figura 9, la concentración de enzima óptima es 2 U/mL, ya que al aumentar su concentración de 0,5 a 2, aumenta la velocidad de la reacción y, por tanto, la pendiente. Si se aumenta todavía más, hasta 4 U/mL, apenas hay variaciones en la pendiente.

4.2.1.3. Optimización de la concentración de HRP

Lo que se pretende es conseguir la mayor velocidad de reacción con la menor cantidad de HRP. Para ello se utiliza una cantidad fija de DAO, de Amplex-Red y de histamina. Los ensayos se realizan a pH 8 y con la concentración de DAO que se ha determinado como óptima. Los resultados del estudio se muestran a continuación, tabla 3.

[HRP] (U/mL)	Velocidad inicial
0,01	1,68
0,03	1,88
0,1	2,06
0,25	2,02
0,5	1,98
1	1,96
2	1,95

Tabla 3. Datos de la velocidad inicial en función de la concentración de HRP. Concentraciones en cada ensayo (a pH=8): [DAO]= 2 U/mL, [Amplex-Red]= $7 \cdot 10^{-5}$ M y [His]= $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Se concluyó que la concentración de HRP óptima fue 0,1 U/mL, ya que hasta llegar a este valor la velocidad aumenta y después en las siguientes concentraciones se mantiene casi constante, la DSR de estos valores corresponde a 2,29%, que se encuentra en el rango de reproducibilidad del método.

Aun así, el aumento en la velocidad inicial no es tan grande como se esperaba. Esto puede deberse a que la cinética no está controlada por la reacción en la que interviene la HRP, sino en la que se produce la oxidación de la amina.

4.2.1.4. Optimización de la concentración de Amplex-Red

La concentración del colorante también es un factor clave en este método de análisis de la histamina, ya que de esta dependerá la absorbancia en cada medida.

Para su optimización se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de Amplex-Red y concentraciones fijas de HRP, DAO e histamina. Los resultados se muestran en la tabla 4.

[Amplex-Red] (M)	Δ Absorbancia	[AR]:[His]
$9 \cdot 10^{-6}$	0,2502	2:1
$2 \cdot 10^{-5}$	0,2523	5:1
$5 \cdot 10^{-5}$	0,2633	10:1
$7 \cdot 10^{-5}$	0,2672	14:1
$9 \cdot 10^{-5}$	0,2680	19:1

Tabla 4. Variación de absorbancia y relación [AR]:[His] en función de la [Amplex-Red]. Concentraciones en cada ensayo (a pH=8): [DAO]= 2 U/mL, [HRP]= 0,1 U/mL y [His]= $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Se concluye que no hay una concentración óptima de Amplex-Red, porque en todos los ensayos la variación de absorbancia era similar. Incluso con concentraciones menores, la señal no era mucho menor. La DSR calculada para los valores de absorbancia final obtenidos en cada caso es de 3,22%, que se encuentra en el rango de desviaciones de los métodos de absorción.

Sin embargo, la concentración del colorante va a determinar el rango lineal de concentraciones. Si se añade más concentración de Amplex-Red, el rango lineal aumenta. En todos los casos existe un exceso estequiométrico de colorante frente a concentración de histamina en cada ensayo que es $5 \cdot 10^{-6}$ M. Lo que significa que el rango lineal no será menor a causa del colorante.

Se eligió una proporción de exceso de colorante 14:1 ($7 \cdot 10^{-5}$ M) como más adecuado porque permite un rango lineal grande y buena sensibilidad.

4.2.2. Calibración de histamina

Para hallar el rango lineal de la determinación de histamina, se realizó una calibración utilizando todos los parámetros anteriormente optimizados. Se prepararon disoluciones con concentraciones de histamina desde $2,5 \cdot 10^{-7}$ hasta $1,2 \cdot 10^{-5}$ M. Los valores de señal obtenida se muestran a continuación, tabla 5.

[Histamina] (M)	Δ Absorbancia
0	0,0003
$2,51 \cdot 10^{-7}$	0,0201
$5,02 \cdot 10^{-7}$	0,0422
$1,00 \cdot 10^{-6}$	0,0700
$2,01 \cdot 10^{-6}$	0,1446
$4,01 \cdot 10^{-6}$	0,2632
$8,37 \cdot 10^{-6}$	0,5159
$1,19 \cdot 10^{-5}$	0,6441

Tabla 5. Señales de absorbancia en cada una de las disoluciones de histamina para la recta de calibrado con DAO.

Se ha representado la variación de absorbancia frente a la concentración de histamina (figura 10) para conocer el rango lineal de concentraciones.

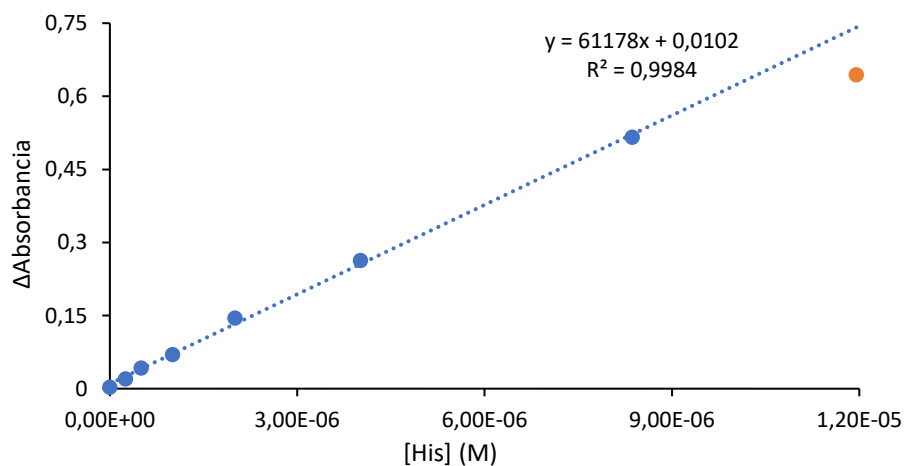


Figura 10. Recta de calibrado de histamina con DAO. Concentraciones en cada ensayo (pH=8): [DAO]= 2 U/mL, [Amplex-Red]= $7 \cdot 10^{-5}$ M y [HRP]= 0,1 U/mL.

La última concentración medida empeora el coeficiente de correlación, por tanto, se somete a un test F para comprobar si pertenece o no a la recta del mismo modo que en el punto 4.1.

F exp	F crít
27	14

Tabla 6. Test F para hacer el análisis de la regresión.

Se ha comprobado mediante un test F, al 99% de intervalo de confianza, que la última de las concentraciones probadas en la calibración, $1,19 \cdot 10^{-5}$ M, no pertenece a la recta.

Tras realizar la recta de calibrado de la histamina, se comparó su pendiente con la de la recta de calibrado de H₂O₂ mediante un test t al 95%.

	Recta H ₂ O ₂	Recta histamina
Pendiente	82368	61178
Incertidumbre	615	1062
Grados de libertad	13	6

Tabla 7. Datos de pendientes con sus incertidumbres y grados de libertad de las rectas de calibrado.

t exp	t crít
0,064	2,1

Tabla 8. Test t para hacer la comparación de pendientes.

Como muestra la tabla 8, aunque ya se sospechaba previamente, ambas pendientes no son iguales, lo que indica que no toda la histamina es oxidada por la enzima y solo parte, en torno al 74% se transforma en H₂O₂.

A pesar de esto, se puede realizar la determinación cuantitativa de histamina, porque (como indica la recta de calibrado) en cada medida, la conversión de histamina es la misma.

4.2.3. Parámetros analíticos

En la tabla 9 se muestra las características analíticas del método.

LD	$1,37 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
LQ	$4,55 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Rango lineal	$4,55 \cdot 10^{-7} \text{ M} - 8,37 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
Sensibilidad	61178 M^{-1}
Reproducibilidad (% DSR)	3,2%

Tabla 9. Parámetros analíticos de la calibración de histamina con DAO.

El límite de detección (LD) y el de cuantificación (LQ) se han calculado a partir de la desviación estándar del blanco (0,0028), multiplicando por 3 y por 10, respectivamente, y dividiendo por la pendiente de la recta de calibrado, que corresponde con la sensibilidad.

La reproducibilidad se calcula a partir de la incertidumbre de tres medidas iguales, con una concentración de histamina de $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, que corresponde con el punto central en la recta de calibrado.

4.3. Estudio de la histamina con TAO

Se quiere comprobar si con esta enzima se puede llevar a cabo la determinación de histamina, del mismo modo que con la DAO. Para ello, se seguirá el mismo procedimiento que en el punto 4.2. Se optimizarán los parámetros necesarios y utilizándolos, se realizará la recta de calibrado de histamina.

4.3.1. Optimización de los distintos parámetros de reacción

Los parámetros que se van a optimizar son el pH y la concentración de TAO. Se va a considerar que la concentración de HRP y de Amplex-Red son similares a los utilizados con la enzima DAO y se tomarán los resultados expuestos en el punto 4.1.2.3. y 4.1.2.4. Se utilizarán 0,1 U/mL de HRP y $7 \cdot 10^{-5}$ M de colorante en cada ensayo.

4.3.1.1. Optimización del pH

Del mismo modo que en el caso de la DAO, se optimizó el pH para ver cuál era el mejor para llevar a cabo la determinación de histamina. El rango probado fue de 6 hasta 10.

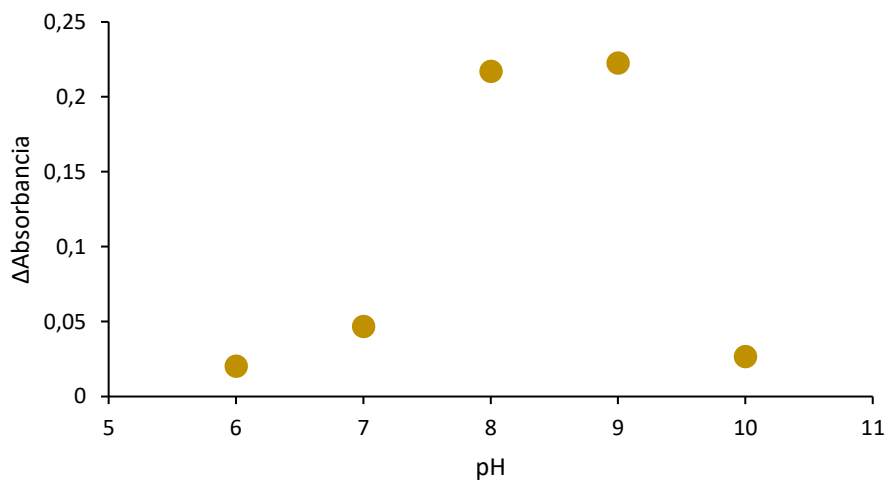


Figura 11. Señal de absorbancia a diferentes pH. Concentraciones en cada ensayo: [HRP]=0,1 U/mL, [TAO]= 0,5 U/mL, [Amplex-Red]= $7 \cdot 10^{-5}$ M y [His]= $5 \cdot 10^{-6}$ M

En los pH 6, 7 y 10, la histamina reacciona lentamente con esta enzima y no hay mucha sensibilidad. Por tanto, los ensayos se podrían hacer a pH 8 ó 9.

Para decidir en cuál de ellos va a ser mejor, se realizan los mismos ensayos con el resto de aminas biógenas (es decir, un estudio de interferencias), prestando mayor atención en la tiramina, ya que es la amina a la que la TAO es más selectiva.

En la figura 12 se muestra el resultado del estudio, donde se han representado los registros de las interferencias más importantes si se quiere determinar histamina. En el anexo 2 están representados los registros de todas las AB en cada pH estudiado.

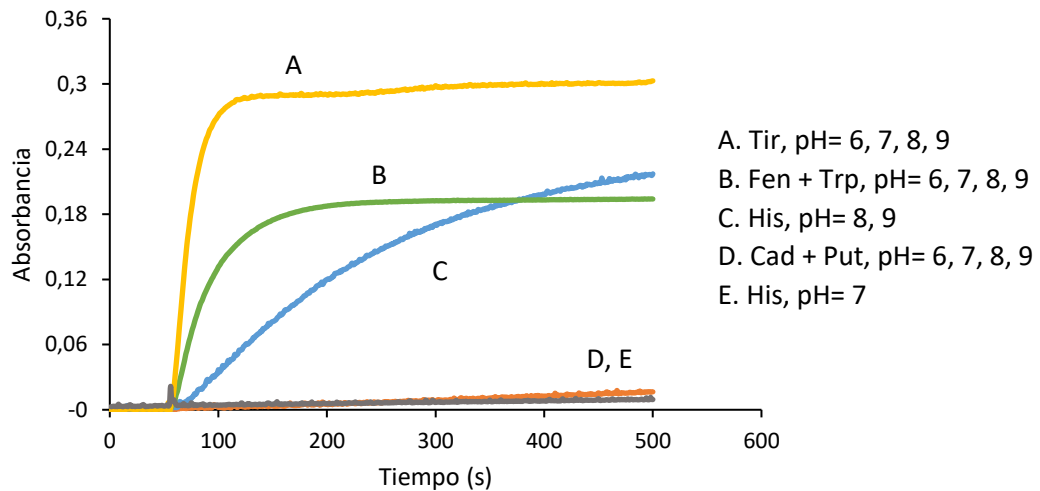


Figura 12. Señal de absorbancia a diferentes pH con las diferentes AB. Concentraciones en cada ensayo: $[HRP]=0,1 \text{ U/mL}$, $[TAO]= 0,5 \text{ U/mL}$, $[Amplex-Red]= 7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y $[AB]= 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Se observó que la cadaverina y la putrescina no reaccionan con esta enzima a ningún pH, por lo que no van a ser una interferencia.

La triptamina y la feniletilamina reaccionan de forma similar con la enzima a cualquiera de los pH estudiados, pero como se mencionó en el punto 4.2.1.1., estas aminas están en una concentración mucho menor que la histamina.

La tiramina va a ser una interferencia en cualquiera de los pH, y la señal de absorbancia resultante sería la suma de las dos aminas. Por tanto, si en la muestra hay tiramina, no se va a poder determinar la histamina de forma directa, sino que previamente hay que determinar la tiramina. Para hacerlo, podría medirse tiramina a pH 6 para conocer su señal de absorbancia y restarla a la absorbancia total, suma de las dos aminas, y así obtener la señal únicamente de la histamina.

Se concluye que los pH óptimos para la determinación de histamina son 8 y el 9. Se elige 8 como pH para realizar el resto de los ensayos.

4.3.1.2. Optimización de la concentración de TAO

Del mismo modo que en las optimizaciones de enzimas explicadas anteriormente, se pretende conseguir una alta sensibilidad y una buena velocidad con la menor concentración de enzima.

Utilizando pH 8, se estudian concentraciones crecientes de TAO, desde 0,25 hasta 3 U/mL para comprobar qué concentración es la mejor.

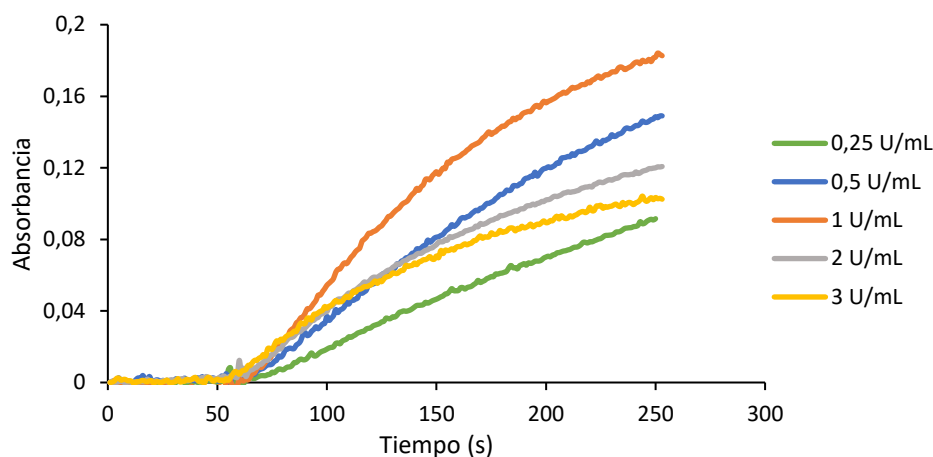


Figura 13. Señal de absorbancia con diferentes [TAO] a pH=8. Concentraciones en cada ensayo: [HRP]= 0,1 U/mL, [Amplex-Red]= $7 \cdot 10^{-5}$ M y [His]= $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Como puede observarse en la figura 13, al aumentar la concentración de TAO, desde 0,25 hasta 1 U/mL, se produce un aumento de la absorbancia y la velocidad de la reacción. Pero al seguir subiendo, se produce el efecto contrario y el cambio final de absorbancia es menor. Este comportamiento no es habitual en la cinética enzimática (inhibición para concentraciones alta de enzima) e interesante, aunque su estudio queda fuera del objetivo de este trabajo.

Por tanto, la concentración óptima de TAO para la determinación de histamina es 1 U/mL, y será la utilizada en el resto de las medidas.

4.3.2. Calibración de histamina

Del mismo modo que en el punto 4.2.2. se realizó una calibración de la histamina ahora con la enzima TAO, utilizando los parámetros optimizados.

Se prepararon concentraciones de histamina desde $1,00 \cdot 10^{-6}$ hasta $2,49 \cdot 10^{-5}$ M. Los valores de Δ Absorbancia obtenidos para cada concentración se muestran en la tabla 10.

[Histamina] (M)	Δ Absorbancia
0	0,0003
$1,00 \cdot 10^{-6}$	0,0250
$1,98 \cdot 10^{-6}$	0,0727
$3,97 \cdot 10^{-6}$	0,1601
$7,94 \cdot 10^{-6}$	0,3759
$1,20 \cdot 10^{-5}$	0,5999
$1,59 \cdot 10^{-5}$	0,8004
$2,49 \cdot 10^{-5}$	1,1643

Tabla 10. Señales de absorbancia en cada una de las disoluciones de histamina para la recta de calibrado con la enzima TAO.

A partir de los datos de absorbancia obtenidos con cada concentración, se obtuvo la recta de calibrado, figura 14.

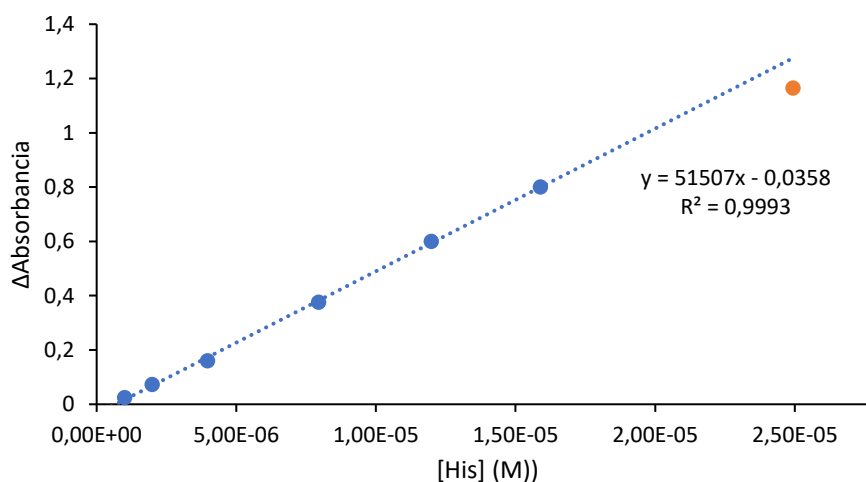


Figura 14. Recta de calibrado de histamina con TAO.

Del mismo modo, se aplicó un test F con un nivel de confianza del 99% para comprobar si el último punto medido, de concentración $2,49 \cdot 10^{-5}$ M, pertenecía o no a la recta.

F exp	F crít
19	14

Se ha comprobado mediante un test F que la última de las concentraciones medidas en la calibración, $2,49 \cdot 10^{-5}$ M, no pertenece a la recta.

Tabla 11. Test F para hacer el análisis de la regresión.

Para comprobar si la enzima TAO era capaz de transformar toda la histamina, se comparó con un test t al 95% la pendiente de la recta de calibrado con la de la recta de calibrado de H_2O_2 .

	Recta H_2O_2	Recta histamina
Pendiente	82368	51507
Incertidumbre	615	1040
Grados de libertad	13	5

Tabla 12. Datos de pendientes con sus incertidumbres y grados de libertad de las rectas de calibrado.

t exp	t crít
0,098	2,1

Tabla 13. Test t para hacer la comparación de pendientes.

Como ocurre con la DAO, esta enzima tampoco es capaz de transformar toda la histamina, ya que las pendientes de su recta de calibrado y la recta de H_2O_2 son significativamente distintas al 95% (tabla 13). Se oxida en torno al 62% de la histamina total, pero este porcentaje es el mismo en todas las medidas, por eso la cuantificación de la histamina utilizando TAO es posible.

4.3.3. Parámetros analíticos

Se muestra un resumen de los parámetros analíticos obtenidos en la calibración de histamina con la enzima TAO en la tabla 14. Han sido calculados del mismo modo que en el punto 4.3.3.

LD	$1,84 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
LQ	$6,14 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Rango lineal	$6,14 \cdot 10^{-7} \text{ M} - 1,59 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
Sensibilidad	51507 M^{-1}
Reproducibilidad (% DSR)	1,3%

Tabla 14. Parámetros analíticos de la calibración de histamina con TAO.

En este caso, la reproducibilidad del método se calculó con 3 réplicas que contenían una concentración de histamina de $8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. El valor de la desviación estándar del blanco para calcular el LD y el LQ es de 0,0031.

4.3.4. Estudio de la interferencia: tiramina

4.3.4.1. Efecto de la tiramina sobre la histamina

El objetivo de este estudio es analizar la interferencia de la tiramina, ya que como se ha comentado previamente es la amina a la que la enzima TAO es más selectiva.

Para ello, se realizaron 3 ensayos, uno con histamina, otro con tiramina y otro con ambas AB (figura 15). En el registro correspondiente a la tiramina la señal aumenta rápidamente y a partir de 120 segundos se estabiliza, en cambio la histamina presenta una cinética mucho más lenta. Al observar el registro His+Tir, se pensó que el primer salto, hasta 120 s, podría deberse a la tiramina, ya que reacciona instantáneamente y el segundo salto a la histamina, ya que lo hace de forma más lenta.

Debido a esa diferencia en el tiempo de reacción, se planteó si la interferencia debida a la tiramina se podría eliminar, separando las señales de la histamina y de la tiramina. Si eso fuera así, se podría medir la histamina sin necesidad de medir previamente la concentración de tiramina.

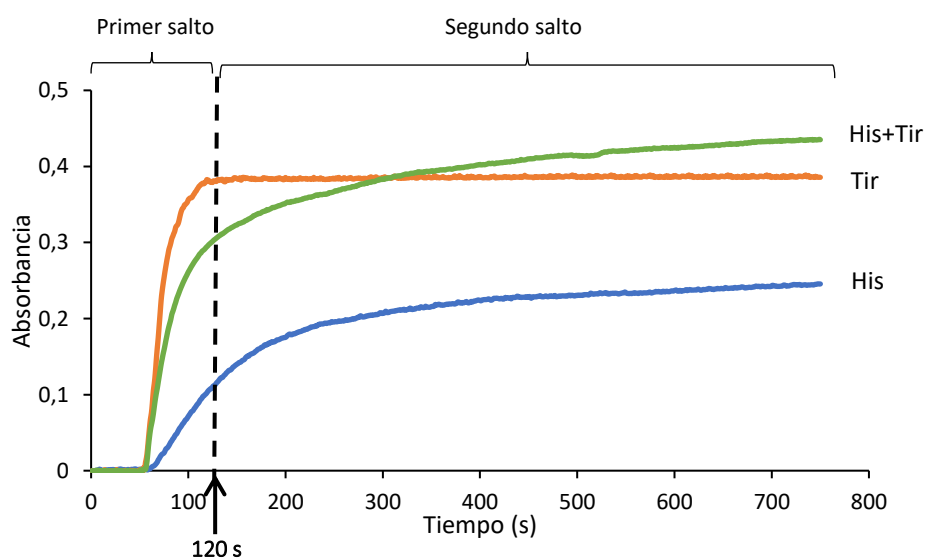


Figura 15. Señal de absorbancia para histamina y tiramina. Concentraciones en cada ensayo (a pH=8): [HRP]= 0,1 U/mL, [TAO]=1 U/mL, [Amplex-Red]= $7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y [AB]= $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Para estudiar este efecto e intentar separar las señales, se llevaron a cabo una serie de medidas, dejando constante la concentración de histamina y aumentando la de tiramina. Con ello, se quería comprobar si el segundo salto en las señales de histamina era constante.

[Tir]:[His]	[Tir] (M)	Pendiente del segundo salto
0:1	0	$1,59 \cdot 10^{-4}$
0,25:1	$2 \cdot 10^{-6}$	$1,64 \cdot 10^{-4}$
0,5:1	$4 \cdot 10^{-6}$	$2,16 \cdot 10^{-4}$
1:1	$8 \cdot 10^{-6}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$
2:1	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$3,15 \cdot 10^{-4}$

Tabla 15. Datos de la pendiente en función de la relación de [Tir]:[His].

Los ensayos se realizaron con una concentración de histamina de $8 \cdot 10^{-6}$ M y con diferentes relaciones de [Tir]:[His]. Como se observa en la tabla 15 (registros en el anexo 3) el aumento de la pendiente que corresponde a histamina no es constante.

Por tanto, no se puede suponer que el primer salto solo corresponda a la tiramina y el segundo a la histamina, ya que el aumento del segundo salto se ve afectado por la cantidad de tiramina que haya en la muestra y a mayor concentración de tiramina, la pendiente aumenta. Se concluye que las señales de ambas aminas no pueden separarse.

4.3.4.2. Eliminación de la interferencia por adición estándar

Ya que las señales de ambas aminas no se podían separar, el siguiente paso fue comprobar si la tiramina era una interferencia proporcional o aditiva. Para ello:

- Se preparó una disolución Muestra que contenía histamina y tiramina en concentración $8 \cdot 10^{-6}$ M.
- Se preparó una disolución $8 \cdot 10^{-6}$ M de tiramina y se midió su Δ Absorbancia (Δ Abs_{Tir}) a pH 8.
- Se preparó una recta de adición estándar conteniendo la disolución Muestra ($8 \cdot 10^{-6}$ M de tiramina e histamina) con las siguientes concentraciones de histamina patrón: 0, $4 \cdot 10^{-6}$, $8 \cdot 10^{-6}$ y $1,2 \cdot 10^{-5}$ M.
- Se obtuvieron los valores de Δ Absorbancia de las disoluciones y se restó a todas ellas Δ Abs_{Tir}, (para eliminar la señal correspondiente a la tiramina de la Muestra). Estos son los valores de Δ Absorbancia que se muestran en la tabla 16.
- Se realizó la recta de adición estándar (figura 16).
- Se calculó la concentración de histamina en la disolución Muestra por extrapolación.

[His] _{añadida} (M)	Δ Absorbancia
0	0,3427
$4 \cdot 10^{-6}$	0,5170
$8 \cdot 10^{-6}$	0,7073
$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,8753

Tabla 16. Señal de absorbancia en función de la concentración de histamina añadida para recta de adición estándar.

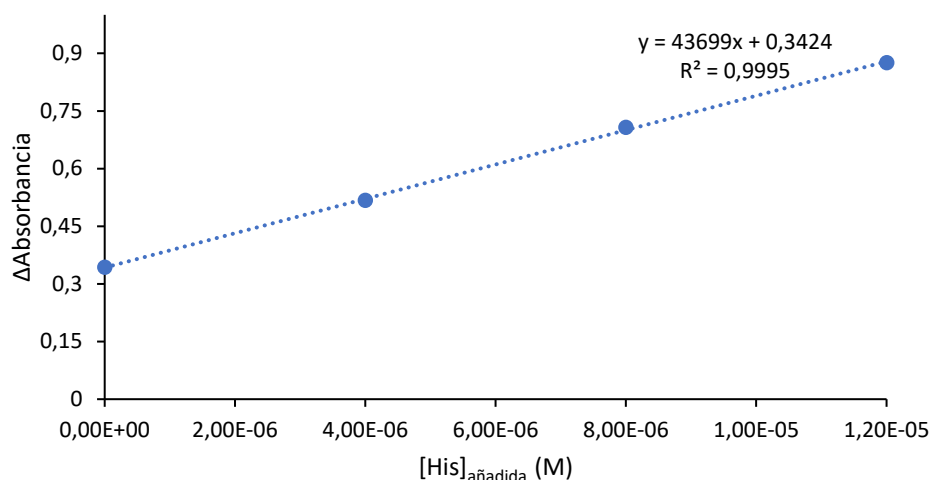


Figura 16. Recta de adición estándar de histamina.

La concentración obtenida, $(7,83 \pm 0,43) \cdot 10^{-6}$ M, se compara con un test t con el valor real (tabla 17) y se concluye que no hay diferencias significativas al 95% de límite de confianza. El error en la determinación es de 2,1%, que se encuentra dentro del rango de DSR de los métodos de absorción.

t exp	t crít
0,0011	3,2

Por esto, puede concluirse que la tiramina produce efectos proporcionales que pueden corregirse realizando una calibración por adición estándar.

Tabla 17. Test t para comparar el dato real con el experimental.

4.3.5. Determinación simultánea de histamina y tiramina

Los resultados anteriores permiten plantear la determinación simultánea de tiramina e histamina, mediante la combinación de calibración externa (tiramina) y de adición estándar (histamina). Para ello se determinó la concentración de ambas aminas en una muestra sintética preparada en el laboratorio.

Las medidas para la determinación se realizaron con los parámetros anteriormente optimizados: [HRP]= 0,1 U/mL, [TAO]=1 U/mL y [Amplex-Red]= $7 \cdot 10^{-5}$ M.

En primer lugar, se obtiene la concentración de tiramina a pH 7 en el cual la histamina no reacciona con la enzima (figura 12). Para ello se realizó una calibración de tiramina con concentraciones crecientes hasta $8 \cdot 10^{-6}$ M. Posteriormente, también a pH 7, se midió la variación de absorbancia de la muestra (por triplicado) y se interpoló la señal promedio en la recta de calibrado, obteniéndose que la concentración de tiramina era $4,09 \cdot 10^{-6}$ M. Con esa concentración se preparó un patrón de tiramina y se midió a pH 8 para conocer la absorbancia a ese pH.

En segundo lugar, se realizó una recta de adición estándar para obtener la concentración de histamina con las siguientes concentraciones del patrón: $0, 4 \cdot 10^{-6}, 8 \cdot 10^{-6}$ y $1,2 \cdot 10^{-5}$ M.

Como se ha explicado en el apartado anterior, 4.3.4.2., se restó la absorbancia del patrón de tiramina $4,09 \cdot 10^{-6}$ M a la señal obtenida tras la medida de cada disolución estándar. Con estos valores se representó la recta de adición estándar (anexo 5).

Los resultados de la determinación simultánea de histamina y tiramina se muestran en la tabla 18.

[His] _{experimental}	[His] _{real}	Error (%)	[Tir] _{experimental}	[Tir] _{real}	Error (%)
$(8,01 \pm 0,10) \cdot 10^{-6}$ M	$7,98 \cdot 10^{-6}$ M	0,41%	$(3,99 \pm 0,11) \cdot 10^{-6}$ M	$4,09 \cdot 10^{-6}$ M	2,54%

Tabla 18. Comparación de los resultados obtenidos con la concentración real de la muestra sintética.

Estos resultados se someten a un test t, con un nivel de confianza del 95% para comprobar si las diferencias obtenidas entre el valor real y el experimental son debidas a la incertidumbre del método.

t exp	t crít
0,60	3,2

Tabla 19. Test t para comparar el resultado de histamina.

t exp	t crít
1,6	4,3

Tabla 20. Test t para comparar el resultado de tiramina.

Se concluye que en ambos casos las diferencias obtenidas entre el valor experimental y el real se deben a la propia incertidumbre de método. Por lo tanto, este método sería adecuado para la determinación simultánea de histamina y tiramina.

4.4. Construcción del biosensor: inmovilización en soportes sólidos de celulosa

En este apartado, se pretende construir el biosensor para la determinación rápida de histamina. Para ello es necesario la inmovilización de los reactivos en soportes de celulosa.

Esta determinación será semicuantitativa, inicialmente por detección visual, y después mediante las coordenadas RGB utilizando una aplicación de Smartphone.

Como se ha explicado en el apartado 3.3.2. se fabrican los papeles de celulosa al 5%, a partir de una disolución de celulosa microcristalina de 20 μ m preparada con disolución amortiguadora de pH 8, así el soporte ya tendrá el pH adecuado para la determinación.

Sobre el papel está inmovilizada la enzima HRP con una concentración de 1 U/mL, ya que se sabe, por ensayos previos en el grupo de investigación, que es la concentración óptima de esta enzima.

4.4.1. Optimización de los parámetros de reacción

Para posteriormente hacer una calibración de histamina sobre estos soportes de celulosa, se optimizó la cantidad de Amplex-Red y de TAO que se añadían tras el secado de las tiras.

4.4.1.1. Optimización de Amplex-Red

En los primeros ensayos, se añadía el colorante previamente a la etapa de secado en la incubadora para inmovilizarlo también en el papel. Pero como se observa en la figura 17, la variación de color no era homogénea en todo el soporte, sino que solo aparecía la coloración en la circunferencia externa del papel.

Esto puede ser debido a que el Amplex-Red estaba disuelto en DMSO, un disolvente orgánico que tiende a colocarse en los bordes externos de la lámina, o a la baja solubilidad del colorante en agua. Por lo que era preferible añadirlo tras la incubación a 37°C para formar el papel de celulosa.

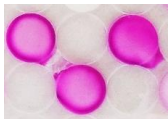


Figura 17. Foto de los papeles de celulosa donde se ha añadido previamente Amplex-Red, con una concentración de histamina de 0,015 M.

Para la optimización del Amplex-Red se probaron, a partir de una disolución $9,7 \cdot 10^{-4}$ M, los siguientes volúmenes: 2, 5, 10 y 20 μ L. Con una concentración de TAO de 1 U/mL y una concentración de histamina de 0,0037 M, de la cual se añadían 20 μ L. En cada uno de los volúmenes probados se hizo un blanco con agua MiliQ para comprobar la variación de color en el papel.

Se observó que solo en el caso de la adición de 10 y 20 μ L se producía un cambio de color homogéneo sobre toda la lámina. Esto puede deberse de nuevo al disolvente en el que está disuelto, ya que el DMSO no deja que el colorante se extienda uniformemente. En cambio, al adicionar mayor volumen se cubre completamente el papel con el colorante. Se eligió como óptimo el volumen de 10 μ L porque en ese caso, el blanco tenía menos coloración rosa que el correspondiente a 20 μ L, por lo que es más fácil apreciar la variación del color entre la muestra de histamina y el blanco.

4.4.1.2. Optimización de TAO

Por estudios previos llevados a cabo en el grupo de investigación, se sabe que la enzima TAO no puede inmovilizarse antes del secado porque queda desactivada, por tanto, hay que añadirla tras la formación del papel de celulosa⁹.

El rango de concentración de TAO estudiado fue desde 0,1 hasta 1 U/mL. Del mismo modo que en la optimización del colorante, cada concentración de TAO probada se hacía por duplicado, para poder comparar el color resultante de la histamina y del blanco con agua MiliQ.

Únicamente en el caso de 1 U/mL de TAO mostraba un color apreciable y homogéneo para poder medir fácilmente los parámetros RGB, por este motivo esta fue la concentración elegida.

4.4.2. **Calibración**

Para realizar la calibración de histamina en el biosensor se utilizaron los parámetros óptimos, que son: [HRP]= 1 U/mL, [TAO] = 1 U/mL y [Amplex-Red]= $10 \cdot 10^{-9}$ M.

Tras preparar nuevos soportes de celulosa a pH 8 y adicionar los reactivos necesarios, se añadieron 20 μL de concentraciones crecientes de histamina. En la figura 18, aparecen los papeles de celulosa con diferente coloración en función de la concentración de histamina. Las coordenadas RGB de cada lámina de celulosa fueron medidas con una aplicación de Smartphone llamada “RGB color value” y se recogen en la tabla 21.

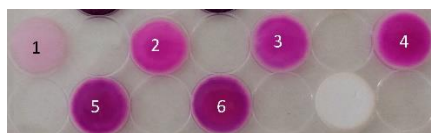


Figura 18. Foto de los papeles de celulosa para la calibración de histamina.

Número	[His] (M)	R	G	B
1	0	183	138	161
2	0,0037	164	20	121
3	0,0074	153	17	109
4	0,0148	145	9	93
5	0,0296	128	9	87
6	0,0592	125	8	77

Tabla 21. Coordenadas RGB en función de la concentración de histamina.

Al representar cada coordenada RGB en función de la concentración se observa que existe una relación de cada coordenada con la concentración de histamina, como muestra la figura 19.

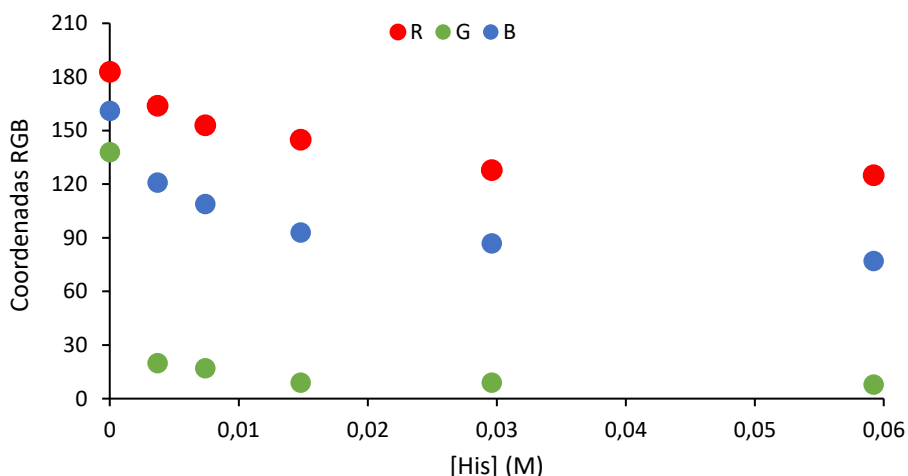


Figura 19. Representación de los parámetros RGB en función de la concentración de histamina.

Aun así, estos son los primeros estudios para la inmovilización de reactivos en soportes sólidos para la determinación de histamina. En ensayos posteriores se mejorarán las variables de las que depende la determinación, este estudio es un punto de partida para la cuantificación de histamina utilizando las coordenadas RGB.

5. Conclusiones

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio para la determinación rápida de histamina. Las conclusiones que se pueden obtener tras su realización son las siguientes:

- Se ha estudiado la reacción de H_2O_2 con HRP en presencia del colorante Amplex-Red y se obtuvo que el rango lineal llega hasta $2,94 \cdot 10^{-5}$ M.
- Se ha comprobado que es posible llevar a cabo la determinación de histamina utilizando las reacciones enzimáticas acopladas explicadas en la figura 3, tanto con la enzima DAO como con la TAO.
- Se han encontrado como condiciones óptimas para la determinación de histamina con DAO, las siguientes: pH= 8, [HRP]= 0,1 U/mL, [DAO]= 2 U/mL y [Amplex-Red]= $7 \cdot 10^{-5}$ M. Se obtiene un rango lineal desde $4,55 \cdot 10^{-7}$ M hasta $8,37 \cdot 10^{-6}$ M.
- Del mismo modo, se han encontrado como condiciones óptimas para la cuantificación con la enzima TAO las siguientes: pH= 8 ó 9, [HRP]= 0,1 U/mL, [TAO]= 1 U/mL y [Amplex-Red]= $7 \cdot 10^{-5}$ M. En este caso la respuesta lineal del método varía de $6,01 \cdot 10^{-7}$ M a $1,59 \cdot 10^{-5}$ M, por lo que es más amplio que en el caso de la DAO, aunque su sensibilidad es un poco inferior.
- Para ambas enzimas, se ha comprobado, con un test t, que las pendientes de la recta de calibrado obtenidas y la recta de calibrado de H_2O_2 son significativamente distintas al 95% de intervalo de confianza. Por lo que no toda la histamina es oxidada a H_2O_2 , pero en ambos casos, tanto con la DAO como con la TAO, la cuantificación es posible.
- Se puede determinar histamina en presencia de otras AB, siempre que se adecúen las condiciones de trabajo.
 - Si se quiere determinar histamina en presencia de putrescina o cadaverina, se lleva a cabo con TAO a pH 8 ó 9, ya que estas no reaccionan con la enzima.
 - Si se quiere determinar simultáneamente histamina y tiramina, se realiza previamente una determinación de tiramina a pH 7, y posteriormente una calibración por adición estándar a pH 8, utilizando TAO. Como se explica en el punto 4.3.5.
 - Tanto la feniletilamina como la triptamina, supondrían una interferencia con ambas enzimas, pero estas aminas están en concentraciones mucho menores que la histamina.
- Se ha demostrado que los métodos enzimáticos anteriores pueden servir de base para el desarrollo de un biosensor óptico para histamina, mediante su implementación sobre papeles de celulosa a pH 8. La determinación es semicuantitativa utilizando detección visual y mediante las coordenadas RGB obtenidas con una aplicación de Smartphone.

6. Bibliografía

1. Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., & Özogul, F. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in microbiology*. **2016**, 7, 1218.
2. Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*. **2019**, 8(2), 62.
3. Bodmer, S., Imark, C., & Kneubühl, M. Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation research*. **1999**, 48(6), 296-300.
4. Directiva 91/439/EEC. Directive of 22 July 1991 establishing standards to be applied to the production and commercialization of fishery products. Official Journal of the European Communities L268:15-34.
5. Önal, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. **2007**, 103(4), 1475-1486.
6. Newman, J. D., & Setford, S. J. Enzymatic biosensors. *Molecular biotechnology*. **2006**, 32(3), 249-268.
7. Lange, J., & Wittmann, C. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*. **2002**, 372(2), 276-283.
8. Dębski, D., Smulik, R., Zielonka, J., Michałowski, B., Jakubowska, M., Dębowska, K., ... & Sikora, A. Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: pulse radiolysis and enzymatic studies. *Free Radical Biology and Medicine*. **2016**, 95, 323-332.
9. Oliver, S. Determinación rápida y específica de tiramina. Desarrollo de tiras reactivas para el control de calidad en alimentación (trabajo fin de grado). Universidad de Zaragoza. **2018**.