



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Desarrollo de tiras reactivas para la determinación de histamina en alimentos

Development of test strips for histamine determination in food

Autor/es

María P. Montano Oliván

Director/es

Isabel Sanz-Vicente

Facultad de  
Veterinaria

2020

---

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. <i>Aminas biógenas: qué son, funciones y efectos</i> .....	3
1.2. <i>La importancia de las aminas biógenas en los alimentos</i> .....	3
1.3. <i>Histamina</i> .....	4
1.4. <i>Control de histamina en la industria alimentaria</i> .....	6
1.5. <i>Métodos para la determinación de histamina</i> .....	6
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	8
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	9
3.1. Reactivos y disoluciones.....	9
<b>3.1.1. Reactivos generales</b> .....	9
<b>3.1.2. Disoluciones de aminas</b> .....	10
3.2. Instrumentación y material.....	10
<b>3.2.1. Instrumentos</b> .....	10
<b>3.2.2. Materiales</b> .....	10
3.3. Procedimiento operativo .....	11
<b>3.3.1. Método en disolución</b> .....	11
<b>3.3.2. Método en soporte sólido</b> .....	11
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	12
4.1. Método en disolución .....	12
4.2. Método en soporte sólido.....	15
<b>4.2.1. Desarrollo de los soportes reactivos: inmovilización de los reactivos en soportes de celulosa</b> .....	15
4.2.1.1. Optimización de la concentración de celulosa y de HRP .....	16
4.2.1.2. Optimización de la concentración de colorante Amplex®Red .....	17
4.2.1.3. Estudio del método de secado de los soportes de celulosa .....	19
4.2.1.4. Calibración de la reacción H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HRP + Amplex®Red .....	20
4.2.1.5. Optimización de la concentración de TAO .....	22
4.2.1.6. Estudio del orden de adición de los reactivos.....	23
<b>4.2.2. Calibración de histamina con TAO en presencia de HRP y Amplex®Red</b> .....	24
<b>4.2.3. Estudio de interferencias</b> .....	26
4.2.3.1. Tiramina.....	27

4.2.3.2.	Cadaverina y putrescina .....	27
4.2.3.3.	Estudio del pH para la eliminación de la interferencia de tiramina .....	28
<b>4.2.4.</b>	<b>Determinación conjunta de histamina y tiramina.....</b>	<b>31</b>
4.2.4.1.	Calibración de tiramina con TAO.....	31
4.2.4.2.	Ensayo de determinación conjunta.....	33
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>VALORACIÓN PERSONAL.....</b>	<b>38</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>38</b>

## RESUMEN

Las aminas biógenas (AB) son biomoléculas formadas por la descarboxilación de aminoácidos tras la acción de enzimas microbianas. Una concentración elevada de AB en los alimentos causa intoxicaciones y está asociada al deterioro del alimento. Por tanto, son indicadores importantes para la calidad y seguridad alimentarias. La determinación de AB mediante métodos convencionales con técnicas como la cromatografía (HPLC), precisa tratamientos previos de la muestra y sus equipos suponen un coste elevado.

En este trabajo se propone un método alternativo más rápido y económico para la determinación de histamina, la única AB con límites legales y una de las más tóxicas. El método consiste en inmovilizar sobre soportes de celulosa la reacción de histamina con la enzima TAO en presencia de un colorante y HRP, que reacciona con el  $H_2O_2$  formado en la primera reacción. En pocos minutos se genera un compuesto de color rosa medible fácilmente con una aplicación de Smartphone.

Para ello se estudió primero el método en disolución. Luego se optimizó la inmovilización de los reactivos en los soportes y tras lograr una señal reproducible de  $H_2O_2$  e histamina, se obtuvieron las curvas de calibrado de ambos. Se consiguió el objetivo de obtener una señal dependiente de la concentración de histamina.

Más adelante se realizó un estudio de interferencias con otras aminas. Tras comprobar que la tiramina interfiere en la señal de histamina, se obtuvo también su curva de calibrado, que presenta una cinética de reacción distinta a la de histamina. Ante este hecho, se realizó un ensayo de determinación conjunta de ambas, en el cual se consiguieron buenos resultados en la estimación de las dos concentraciones.

Aunque la investigación debe continuar para mejorar la sensibilidad y reproducibilidad, los resultados obtenidos sugieren que estas tiras reactivas pueden llegar a ser un interesante método alternativo para histamina.

## ABSTRACT

Biogenic amines (BA) are biomolecules formed by the decarboxylation of amino acids after the action of microbial enzymes. A high concentration of BA in food causes poisoning and is associated with food spoilage. Therefore, they are important indicators for food quality and safety. The determination of BA by means of conventional methods with techniques such as chromatography (HPLC), requires previous treatments of the sample and its equipment involves a high cost.

In this work, a faster and cheaper alternative method is proposed for the determination of histamine, the only BA with legal limits and one of the most toxic. The method consists of immobilizing on cellulose supports the reaction of histamine with the TAO enzyme in presence of a dye and HRP, which reacts with the  $H_2O_2$  formed in the first reaction. In a few minutes, a pink color compound easily measurable with a Smartphone application is generated.

For that, the dissolution method was first studied. Then the immobilization of the reagents on the supports was optimized and after achieving a reproducible signal of  $H_2O_2$  and histamine, the calibration curves of both were obtained. The goal of obtaining a signal dependent on the histamine concentration was achieved.

Later, a study of interferences with other amines was carried out. After verifying that tyramine interferes in the histamine signal, its calibration curve was also obtained, which presents different reaction kinetics from the one of histamine. Given this fact, a joint determination test of both was carried out, in which good results were achieved in the estimation of the two concentrations.

Although research must continue to improve sensitivity and reproducibility, the results obtained suggest that these test strips may prove to be an interesting alternative method for histamine.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Aminas biógenas: qué son, funciones y efectos*

Las aminas biógenas (AB) son biomoléculas nitrogenadas no volátiles de bajo peso molecular formadas por la descarboxilación de aminoácidos. Según su estructura química, las AB se clasifican en aminas alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina), aminas aromáticas (tiramina, feniletilamina) y aminas heterocíclicas (histamina, triptamina) (Önal et al., 2013).

Las AB se generan y se degradan de manera natural como resultado de las actividades metabólicas en humanos, animales y plantas (EFSA, 2011), y participan en importantes funciones fisiológicas del cuerpo humano como la regulación del crecimiento celular, la regulación de la temperatura corporal y el pH del estómago, el control de la presión sanguínea y la transmisión neuronal (Ladero, V. et al., 2010)

Sin embargo, la ingesta de alimentos con altas concentraciones de AB puede resultar tóxica para el consumidor. El efecto tóxico provocado varía según el alimento, la concentración de AB ingerida y la susceptibilidad y estado de salud del consumidor (Feddern, V. et al, 2019); algunos de los síntomas son enrojecimiento en la piel y sarpullidos, dolores de cabeza, náuseas, palpitaciones cardíacas y aumento o disminución de la presión arterial (Ladero,V. et al., 2010).

## 1.2. *La importancia de las aminas biógenas en los alimentos*

La reacción de descarboxilación de los aminoácidos se produce por la acción de enzimas microbianas con actividad descarboxilasa presentes en los alimentos. Además de la presencia de estos microorganismos y de la disponibilidad de aminoácidos libres, la formación de AB en alimentos está condicionada por múltiples factores como: la calidad de la materia prima, los parámetros físico-químicos del alimento (pH, actividad de agua, etc.), las condiciones durante el almacenamiento y la distribución (humedad, tiempo, temperatura) y las prácticas durante el procesado (Dabadé, S. et al., 2020).

Por ello, se pueden encontrar concentraciones elevadas de ciertas AB en algunos alimentos cuando la calidad de la materia prima es baja, cuando las condiciones durante el procesado y el almacenamiento son deficientes, cuando existe contaminación microbiana o cuando las condiciones de conservación del alimento (pH, temperatura, envasado etc.) no son las adecuadas. En definitiva, aquellas condiciones que favorecen la proliferación de microorganismos aumentan el riesgo de que se generen AB.

Todo esto implica, por un lado, que las buenas prácticas llevadas a cabo por las industrias en la cadena alimentaria constituyen un mecanismo importante de prevención en la generación de AB y, por otro, se hace necesario el control del nivel de AB en los alimentos como indicador de calidad, más allá de su trascendencia por los efectos toxicológicos que provocan. Así pues, las AB son relevantes tanto para la calidad como para la seguridad alimentaria.

Aunque las AB se relacionan normalmente con alimentos de alto contenido proteico (mayor disponibilidad de aminoácidos), pueden desarrollarse en una gran variedad de alimentos. Un ejemplo de alimentos asociados a concentraciones elevadas de AB son los productos fermentados y/o madurados (productos cárnicos, queso, vino, cerveza), puesto que en su fabricación se genera una alta actividad microbiana. Además, la carne y en especial el pescado también pueden presentar altos niveles de AB, puesto que son alimentos de fácil deterioro. Por otro lado, también se han encontrado niveles significativos de AB en ciertos alimentos de origen vegetal (Shalaby, A., 1996).

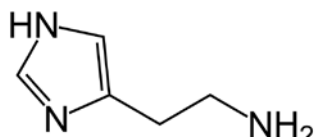
Otra característica relevante de las AB es que son termoestables (Feddern, V. et al., 2019), por lo que resisten cualquier tipo de tratamiento térmico y/o temperatura de conservación. Esto implica que una vez generadas en el alimento no se pueden eliminar, lo cual hace todavía más esencial la prevención y control de su aparición.

### *1.3. Histamina*

Dentro de las AB, la histamina y la tiramina son consideradas las más tóxicas y las que generan casos de intoxicación alimentaria con mayor frecuencia (EFSA, 2011). Sin embargo, los controles en la industria alimentaria suelen ir dirigidos a determinar el contenido en histamina, siendo ésta la única AB que está regulada con límites legales.

La histamina (Figura 1) se forma por la descarboxilación de la histidina, su aminoácido precursor, por lo que abunda en aquellos alimentos con un alto contenido en histidina. En concreto, la llamada “intoxicación histamínica” está asociada frecuentemente al consumo de

alimentos fermentados o madurados (queso, embutidos, vino) y de pescados azules (atún, caballa, arenque).



**Figura 1.** Estructura química de la histamina.

La diamina oxidasa (DAO) es la principal enzima encargada de la inactivación de la histamina exógena, es decir, la ingerida a través de la alimentación, pero altos niveles de histamina o un déficit de esta enzima ocasiona un aumento de la histamina en el plasma, que no se metaboliza y genera los síntomas asociados al exceso de esta amina. Algunos de ellos son dolores de cabeza, sudoración, reacciones cutáneas, diarrea y desórdenes en la presión sanguínea (Ladero, V. et al., 2010)

La Unión Europea, a través del Reglamento (CE) nº 2073/2005, establece los criterios de seguridad alimentaria que deben cumplir los pescados con alto contenido en histidina (especies de las familias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* y *Scombrosidae*) (Figura 2). El límite máximo fijado de 200 mg/Kg corresponde a la cantidad de histamina que tendría una porción media estimada en 250 g de pescado con 50 mg de histamina, que es el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) que fijaron los expertos de la FAO/OMS en la caracterización del peligro (FAO/WHO, 2014).

Por su parte, la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) fija el límite máximo de histamina en 50 mg/Kg.

Categoría de alimentos	Microorganismos/sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras <sup>(1)</sup>		Límites <sup>(2)</sup>		Método analítico de referencia <sup>(3)</sup>
		n	c	m	M	
Productos de la pesca sometidos a tratamiento de maduración enzimática en salmuera, fabricados a partir de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina <sup>(16)</sup>	Histamina	9	2	200 mg/kg	400 mg/kg	HPLC <sup>(18)</sup>
Productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina <sup>(16)</sup>	Histamina	9 <sup>(17)</sup>	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC <sup>(18)</sup>

**Figura 2.** Límites legales de histamina fijados en el Reglamento (CE) nº 2073/2005. Fuente: Diario Oficial de la Unión Europea.



#### *1.4. Control de histamina en la industria alimentaria*

La aplicación de Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y de sistemas de autocontrol basados en el Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) en las industrias alimentarias ha demostrado ser efectiva para controlar los niveles de histamina. Se estima que con su implementación se logra mantener la concentración de histamina por debajo de los 15 mg/Kg (FAO/WHO, 2015).

Para la verificación de las medidas tomadas en los sistemas de autocontrol para el peligro de histamina es importante establecer planes de muestreo y análisis adecuados. La evaluación sensorial del alimento es una herramienta útil en el control de calidad. No obstante, aunque el deterioro sensorial del alimento puede ser indicativo de la presencia de altos niveles de histamina, este tipo de análisis no aporta certezas en cuanto al contenido real de histamina, como sí aportan los análisis cuantitativos o semi-cuantitativos.

#### *1.5. Métodos para la determinación de histamina*

La determinación cuantitativa de histamina y de AB en general, se realiza comúnmente mediante técnicas de separación como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por absorción UV-visible o fluorescencia, la cromatografía de gases (GC) y la electroforesis capilar (CE) (Önal, A. et al., 2013). En concreto la HPLC es el método analítico de referencia que establece la Comisión Europea en el Reglamento (CE) nº 2073/2005 para la determinación de histamina.

Sin embargo, estas técnicas instrumentales presentan varios inconvenientes: precisan tratamientos previos de la muestra, los equipos suponen un coste elevado y la obtención de los resultados es lenta. Por ello, es importante disponer de alternativas fiables que permitan una determinación más rápida y sencilla de histamina y que sean aplicables en los controles dentro de las industrias alimentarias, para que sirvan como herramienta de calidad y seguridad.

En este sentido, en los últimos años se han llevado a cabo estudios para la creación de sensores de distintos tipos que permitan la determinación rápida de AB.

En el trabajo de Leonardo, S. y Campàs, M. (2016) se desarrolló un sensor electroquímico para la determinación de histamina, putrescina y cadaverina basado en la reacción de estas aminas con DAO. En él se logró conjugar esta enzima con esferas magnéticas e inmovilizar ambas en electrodos de carbono para llevar a cabo la determinación.

En otro estudio (Khairy, G. et al., 2016), se creó un sensor para la determinación rápida del contenido total de AB en muestras de queso y de carne. En este caso la reacción se producía gracias a la inmovilización de una mezcla de polímeros y un tinte fluorogénico (chameleon dye Py-1) selectivos para AB en el fondo de los pocillos de una microplaca.

Por su parte, el grupo de investigación de biosensores analíticos de la Universidad de Zaragoza ha investigado en los últimos años distintos métodos para la determinación de AB en alimentos. Entre ellos se encuentra el desarrollo de tiras reactivas basadas en reacciones enzimáticas selectivas para distintos tipos de AB, como cadaverina y putrescina (Sanz-Vicente, I. et al., 2020). Así mismo, dentro de este grupo de investigación también se sentaron las bases para el desarrollo de tiras reactivas sensibles a histamina (Marcuello, L. 2019) optimizando el método en disolución con TAO y DAO.

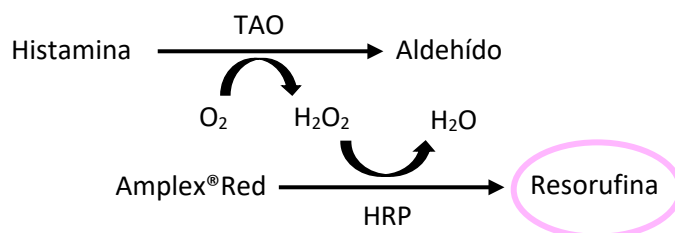
En el presente trabajo se sigue con esta última línea de investigación para lograr optimizar el método para histamina en soporte sólido. El fundamento de la determinación es la reacción enzimática acoplada de la histamina con TAO en presencia del colorante Amplex<sup>®</sup>Red y la enzima HRP, inmovilizando todos ellos en soportes de celulosa. En la reacción indicadora del HRP se oxida el colorante generando una resorufina, un compuesto con propiedades de absorción UV-Visible y fluorescencia que permiten la cuantificación de histamina. El color rosa formado en los soportes se puede medir con una aplicación de Smartphone obteniendo los valores de las coordenadas RGB. Este sistema RGB descompone el color obtenido en los tres colores primarios (rojo-verde-azul).

En estudios anteriores del grupo de investigación se inmovilizaron con éxito el colorante TMB, la DAO y la HRP en soportes de celulosa, pero todavía no se había optimizado en ningún estudio la inmovilización de Amplex<sup>®</sup>Red, TAO y HRP consiguiendo una señal dependiente de la concentración de histamina. En el presente trabajo se logra esto último, si bien es necesario continuar la investigación para mejorar la sensibilidad y reproducibilidad del método y validar su aplicación en muestras reales.

El método propuesto, una vez desarrollado por completo, puede suponer una herramienta muy útil para el control de histamina in situ en las industrias alimentarias, tratándose además de un mecanismo de análisis muy simple y accesible para personal sin formación específica en el tema.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este estudio es el desarrollo de un soporte reactivo a base de celulosa que sirva para la determinación rápida de histamina en alimentos. Se pretende obtener una señal estable dependiente de la concentración de histamina, a través de la siguiente secuencia de reacciones (Figura 3):



**Figura 3.** Secuencia de reacciones enzimáticas en las que se basa el método de determinación de histamina mediante el soporte reactivo.

En presencia de oxígeno, la enzima tiramina oxidasa (TAO) oxida el grupo amino de la histamina a un aldehído produciendo también peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este último sirve como sustrato de la enzima peroxidasa (HRP) en la segunda reacción. En ella se reduce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O y se oxida el colorante Amplex® Red a una resorufina, un compuesto con propiedades fluorescentes y de absorción que permiten la detección de la señal mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-VIS o mediante una aplicación de Smartphone.

Para alcanzar el objetivo general, se fijan los siguientes objetivos parciales:

- Revisar la bibliografía existente para conocer la situación actual de la investigación en este campo.
- Estudiar el método en disolución: obtener las rectas de calibrado tanto de la reacción H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–HRP – Amplex® Red como de la reacción enzimática acoplada de la histamina con TAO en presencia de Amplex® Red y HRP.
- Estudiar las mejores condiciones de inmovilización de los reactivos en celulosa para obtener una señal estable y reproducible: cantidad de celulosa, concentración de enzimas y colorante, orden de inmovilización, método de secado...

- d) Estudiar las características analíticas del método: rango de respuesta lineal, límite de detección y reproducibilidad.
- e) Estudio de las interferencias producidas por otras aminas biógenas en el método en soporte sólido. Comprobar si es posible la determinación simultánea de histamina y tiramina con el método propuesto.
- f) Evaluación de los resultados obtenidos en la investigación.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **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 y 8. Para prepararlas se disuelve una masa exacta de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Panreac 131679.1211) en agua Milli-Q y se ajusta el pH con una disolución de HCl 1 M o de NaOH 1M.
- Disolución amortiguadora  $\text{CO}_3^{2-} / \text{HCO}_3^-$  0,1 M de pH 9. Se prepara disolviendo una masa exacta de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (EC 207-308-8) en agua Milli-Q y ajustando el pH con una disolución de HCl 1M.
- Disolución de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 9,8 M (Panreac 131077.1211). A partir de ella se preparan las disoluciones necesarias.
- 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, Amplex®Red (Sigma-Aldrich, Lote #BCBQ0525)
- Celulosa microcristalina de 20  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich, Lote #310697)
- Agua ultrapura Milli-Q®

##### **3.1.1. 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 de la enzima en la balanza analítica y disolviéndola en agua Milli-Q.

### 3.1.2. Disoluciones de aminas

Las disoluciones de aminas se preparan en agua ultrapura Milli-Q o en disolución amortiguadora del pH correspondiente, dependiendo del ensayo a realizar. Se pesa en la balanza analítica una masa exacta de las aminas en estado sólido en viales Eppendorf. Las aminas empleadas son las siguientes:

- 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%

## 3.2. Instrumentación y material

### 3.2.1. Instrumentos

- Balanza analítica de precisión GR-202-EC.
- pH-metro CRISON Basic 20.
- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-VIS Agilent 8453 A. Formado por fotodiodos y una lámpara de deuterio y wolframio que permite medir en un rango de entre 190 y 1100 nm.
- Smartphone de la marca Xiaomi (modelo Redmi Note Plus 8)

### 3.2.2. Materiales

- Material desechable:
  - Viales y puntas de micropipeta Eppendorf™.
  - Tubos Falcon.
- Micropipetas de volumen variable:
  - Socorex (5-50  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$  y 200-300  $\mu\text{L}$ ).
  - Eppendorf (2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$ ).
- Cubetas de cuarzo Hellma de 1 cm de paso óptico.
- Agitador magnético A-01, SBS.
- Filtro óptico Kodak amarillo.
- Placas de pocillos nunc™.

### 3.3. Procedimiento operativo

#### 3.3.1. Método en disolución

El método consiste en medir la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro de absorción molecular para determinar el contenido de histamina o  $H_2O_2$ , según la reacción estudiada. El Amplex<sup>®</sup>Red se descompone con la luz, por lo que es necesario acoplar un filtro óptico al espectrofotómetro para evitar que la radiación UV degrade el colorante. Para realizar las medidas se emplea el método cinético y se utilizan cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Para llevar a cabo la determinación se preparan con anterioridad las correspondientes disoluciones de enzimas (HRP y TAO), de Amplex<sup>®</sup>Red y de disolución amortiguadora de pH 8. Según la reacción estudiada, el analito puede ser  $H_2O_2$  o histamina.

La primera medida corresponde al blanco que se realiza tras haber añadido a la cubeta únicamente la disolución amortiguadora. A continuación, se añaden los reactivos y se espera a que se establezca la línea base. Las condiciones en cubeta de cada reactivo si se determina histamina son las siguientes: [HRP] = 0,1 U/mL, [TAO]= 1 U/mL, [Amplex<sup>®</sup>Red]= $7 \cdot 10^{-5}$  M. En cambio, si se determina  $H_2O_2$  las condiciones son: [HRP]= 0,5 U/mL, [Amplex<sup>®</sup>Red]=  $2 \cdot 10^{-5}$  M.

Una vez agitados los reactivos, se añade el analito ( $H_2O_2$  o histamina) y se registra la variación de la señal hasta que acaba la reacción y se estabiliza la señal. Es necesario volver a agitar la cubeta tras añadir el analito. El resultado se expresa como la diferencia entre el máximo valor estable de absorbancia y el valor de la línea base ( $\Delta$  Absorbancia).

#### 3.3.2. Método en soporte sólido

Para poder realizar la determinación de histamina o de  $H_2O_2$  en soporte sólido es necesario inmovilizar los reactivos de la reacción en soportes de celulosa. Se preparan sobre la tapa de placas de pocillos, cuyos orificios hacen de molde. Para ello se procede de la siguiente manera:

Se prepara en un vial una dispersión de celulosa microcristalina de 20  $\mu$ m al 5 % (m/v) en agua ultrapura Milli-Q<sup>®</sup> a la que se le añade también Amplex<sup>®</sup>Red en concentración  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Se reparte la dispersión en una tapa de placa de pocillos inyectando 75  $\mu$ L en cada orificio. Se deja secar en la incubadora a 35-37 °C durante aproximadamente 2'5 horas, hasta que se forma

una fina lámina de celulosa blanca. La dispersión de celulosa se puede preparar también en disolución amortiguadora de pH 8 en vez de en agua Milli®Q, dependiendo del ensayo a realizar.

Sobre los soportes de celulosa secos se añaden 10 µL de la disolución que contiene la mezcla de enzimas HRP y TAO ([HRP]=20 U/mL, [TAO]= 23 U/mL) y se deja secar al aire. Por último, se adicionan 10 µL del analito (histamina o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se mide la variación de las coordenadas de color RGB con el tiempo utilizando la aplicación de Smartphone “Color Grab” hasta que se estabilice la señal. El resultado se expresa como la diferencia entre el valor inicial de las coordenadas RGB antes de inyectar el analito y el valor final de señal estable. A este resultado se le resta el valor obtenido en el blanco.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

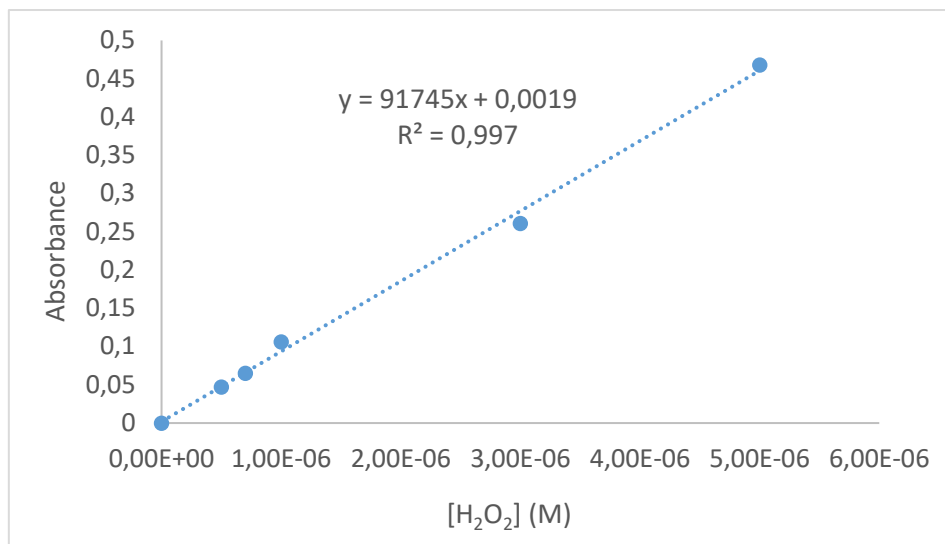
### **4.1. Método en disolución**

#### **4.1.1. Estudio de la reacción HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de Amplex®Red**

Como se ha comentado con anterioridad, el método en disolución ha sido estudiado y optimizado en un trabajo previo (Marcuello, L., 2019), por lo que se parte de las condiciones fijadas en él para seguir con los ensayos de la reacción en disolución.

Tal y como se muestra en la figura 1, la HRP reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y, a su vez, se oxida el Amplex®Red generando una resorufina que presenta un máximo de absorción en la región del visible a una longitud de onda de 570 nm. Este es el fundamento de la determinación.

Se realizó una calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello, tras seguir la metodología explicada en el apartado 3.3.1. en cuanto a la adición de reactivos, se añadieron como analito 20 µL de distintas disoluciones de concentración creciente y conocida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (desde 5·10<sup>-7</sup> M hasta 1·10<sup>-5</sup> M). Tras medir la absorbancia con cada concentración se obtiene la recta de calibrado; los resultados obtenidos en la calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encuentran representados en la figura 4. El rango de respuesta lineal es hasta 5·10<sup>-6</sup> M.



**Figura 4.** Recta de calibrado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Condiciones del ensayo: pH 8, [HRP]= 0,5 U/mL, [Amplex®Red]= 2·10<sup>-5</sup> M.

El objetivo de este estudio es, sabiendo la pendiente de la recta de calibrado, conocer qué porcentaje de histamina se transforma en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo que más adelante se comparará la pendiente de esta recta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con la pendiente de la recta obtenida en la calibración de histamina con TAO.

En la tabla 1 se muestran las características analíticas del método en disolución para la determinación de peróxido.

Límite de detección (LD)	3,60·10 <sup>-7</sup> M
Sensibilidad (S)	91745 M <sup>-1</sup>
Desviación estándar	0,011
Reproducibilidad (% DSR)	1,58 %

**Tabla 1.** Características analíticas del método en disolución para la determinación de peróxido.

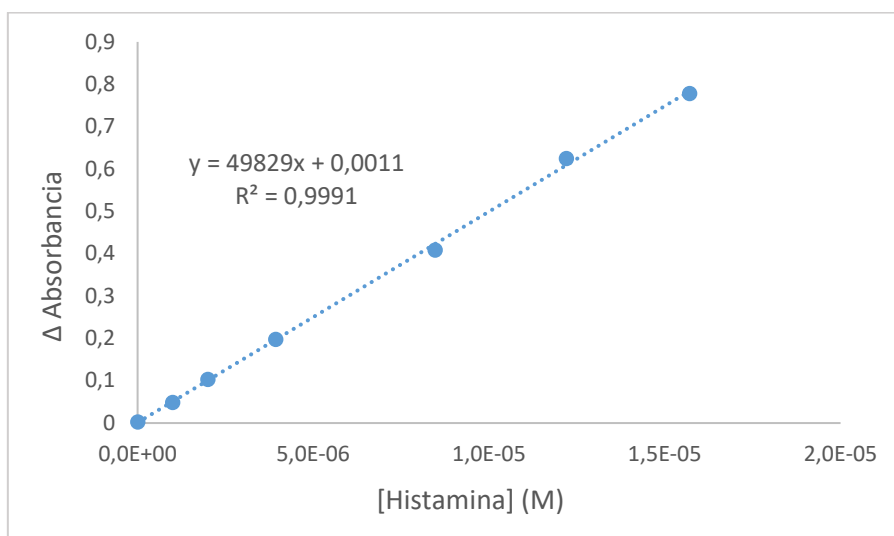


#### 4.1.2. Estudio de la reacción de histamina con TAO en presencia de Amplex® Red y HRP

En las condiciones optimizadas previamente, se realizó una calibración preparando disoluciones de histamina con concentraciones desde  $1 \cdot 10^{-6}$  M hasta  $1,57 \cdot 10^{-5}$  M en disolución amortiguadora de pH 8 y registrando el incremento de absorbancia tras añadir las al resto de reactivos de la reacción, según la metodología explicada en el apartado 3.3.1. Los resultados obtenidos se pueden ver en la tabla 2 y la recta de calibrado obtenida a partir de ellos se presenta en la figura 5.

[Histamina] (M)	$\Delta$ Absorbancia
0	0,003
1,00E-06	0,049
2,00E-06	0,103
3,93E-06	0,198
8,46E-06	0,409
1,22E-05	0,625
1,57E-05	0,778

**Tabla 2.** Señales de absorbancia en función de la concentración de histamina.



**Figura 5.** Recta de calibrado de la histamina con TAO. Condiciones: pH 8, [HRP]=0,1 U/mL, [Amplex® Red]= $7 \cdot 10^{-5}$  M, [TAO]= 1 U/mL.

Para comprobar si la TAO es capaz de transformar toda la histamina, se comparó la pendiente de esta recta con la pendiente de la recta de calibrado de  $H_2O_2$  obtenida en el apartado 4.1.1. (Tabla 3).

	Recta H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Recta histamina
Pendiente	91745	49829
Desviación estándar	0,011	2,22·10 <sup>-3</sup>
n (nº muestras)	6	6

**Tabla 3.** Datos de las rectas de calibrado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de histamina.

Las pendientes de las rectas de calibrado son significativamente distintas entre sí. Esto indica que **la histamina no se transforma por completo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reacción con TAO**. Comparando ambas pendientes se puede estimar que se oxida entorno al 54 % de la histamina total, lo que va a condicionar la sensibilidad del método.

A continuación se muestran las características analíticas del método en disolución para la determinación de histamina con TAO (Tabla 4). La reproducibilidad se calcula a partir de la incertidumbre de tres medidas realizadas en un punto intermedio de la recta (1,22·10<sup>-5</sup> M).

Límite de detección (LD)	1,34·10 <sup>-7</sup> M
Límite de cuantificación (LQ)	4,46·10 <sup>-7</sup> M
Rango de respuesta lineal	1·10 <sup>-6</sup> M – 1,57·10 <sup>-5</sup> M
Sensibilidad (S)	49829 M <sup>-1</sup>
Reproducibilidad (% DSR)	0,35 %

**Tabla 4.** Parámetros analíticos del método en disolución para la determinación de histamina con TAO.

## 4.2. Método en soporte sólido

### 4.2.1. Desarrollo de los soportes reactivos: inmovilización de los reactivos en soportes de celulosa

Para la construcción de los soportes sensibles a histamina es necesario inmovilizar los diferentes reactivos en un soporte sólido; se seleccionó para ello celulosa microcristalina de 20 micras, puesto que ha dado buenos resultados en estudios anteriores (Visiedo, V., 2019).

En el proceso de optimización de los distintos reactivos, se comienza por la reacción indicadora (HRP+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Amplex<sup>®</sup>Red) para más adelante introducir la TAO.

Siguiendo la metodología expuesta en el apartado 3.3.2., se crean los soportes de celulosa sobre los que se añaden las enzimas HRP y TAO en las concentraciones optimizadas; una vez secos se añade la disolución de histamina preparada en disolución amortiguadora de pH 8. De este modo, los reactivos y el analito quedan inmovilizados en el soporte en las condiciones óptimas para la determinación.

A continuación se explican los resultados obtenidos en los distintos procesos de optimización realizados para el desarrollo definitivo del soporte de celulosa.

#### 4.2.1.1. Optimización de la concentración de celulosa y de HRP

En primer lugar, se estudió la reacción indicadora (HRP+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A través del ensayo se pretendía conocer la influencia de la concentración de celulosa sobre la consistencia del soporte de papel, la dispersión de los reactivos en él y la señal obtenida. Para ello, se prepararon soportes de celulosa al 3 % y al 5 % (m/v) y se compararon los resultados. A su vez, se probaron cuatro concentraciones distintas de HRP para optimizar la concentración de esta enzima: 0,1 U/pocillo, 0,2 U/pocillo, 0,4 U/pocillo y 0,8 U/pocillo.

El analito en este estudio fue H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5·10<sup>-5</sup> M (10 µL en cada pocillo) y se usó como colorante Amplex®Red a concentración 2·10<sup>-4</sup> M (1,5·10<sup>-5</sup> M/pocillo). Las medidas se realizaron por duplicado y se compararon con un blanco en cada caso. Los resultados obtenidos al medir la variación de las coordenadas de color RGB (ΔR, ΔG, ΔB) con la App “Color Grab” se muestran en las tablas 5 y 6.

	CELULOSA 3% (m/v)		
	Δ R ± σ	Δ G ± σ	Δ B ± σ
Blanco	12	15	11
HRP 10 U/mL	10 ± 1,4	35 ± 0,7	11 ± 0,7
HRP 20 U/mL	3,0 ± 0,7	48 ± 0,7	13 ± 2,9
HRP 40 U/mL	0,0 ± 1,4	44 ± 1,4	8,0 ± 2,8
HRP 80 U/mL	4,0 ± 4,9	50 ± 4,9	16 ± 2,1

**Tabla 5.** Incremento de las coordenadas RGB a distintas concentraciones de HRP (U/pocillo) en la placa de celulosa al 3 % (m/v). Reacción a pH 8. Analito: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

	CELULOSA 5% (m/v)		
	$\Delta R \pm \sigma$	$\Delta G \pm \sigma$	$\Delta B \pm \sigma$
Blanco	7	19	10
HRP 0,1 U	2,0 ± 2,8	47 ± 6,4	4,5 ± 6,4
<b>HRP 0,2 U</b>	<b>2,0 ± 2,1</b>	<b>60 ± 3,5</b>	<b>13 ± 2,1</b>
HRP 0,4 U	1,0 ± 1,4	56 ± 7,1	12 ± 5,7
HRP 0,8 U	4,0 ± 2,1	54 ± 2,1	6,0 ± 2,1

**Tabla 6.** Incremento de las coordenadas RGB a distintas concentraciones de HRP (U/pocillo) en la placa de celulosa al 5 % (m/v). pH 8,  $[H_2O_2]=5 \cdot 10^{-5}$ .

Como se puede observar, se registraron mayores incrementos de la señal en la placa de celulosa al 5 % en todas las concentraciones de HRP. Además, al tener mayor concentración de celulosa las láminas de papel eran más consistentes y el color se distribuía de manera más homogénea en las láminas. Quizás esta condición permitió una dispersión más homogénea de los reactivos, facilitando el desarrollo de la reacción y obteniendo así una señal mayor y más homogénea que con la celulosa al 3 % (m/v). Por todo ello **se seleccionó como concentración óptima de celulosa la de 5 % (m/v)**.

En cuanto a la concentración de HRP, se obtuvo la señal más elevada con 0,2 U/pocillo en la placa seleccionada de 5 % de celulosa. Esto indica que a partir de esta concentración de enzima la reacción ya se desarrolla por completo y la enzima llega al punto de saturación. Por tanto, **se fija 0,2 U/pocillo como concentración óptima de HRP**.

Otra conclusión que arroja este estudio es que las coordenadas de color "R" y "B" apenas presentan variación al inyectar el analito, siendo ésta además muy similar o incluso inferior a los valores registrados en el blanco (en él se inyectó disolución amortiguadora de pH 8 en vez de analito). Así, como estas coordenadas no muestran señal y para facilitar el análisis de los siguientes ensayos del presente trabajo se decide focalizar la atención en la coordenada de color "G" de aquí en adelante.

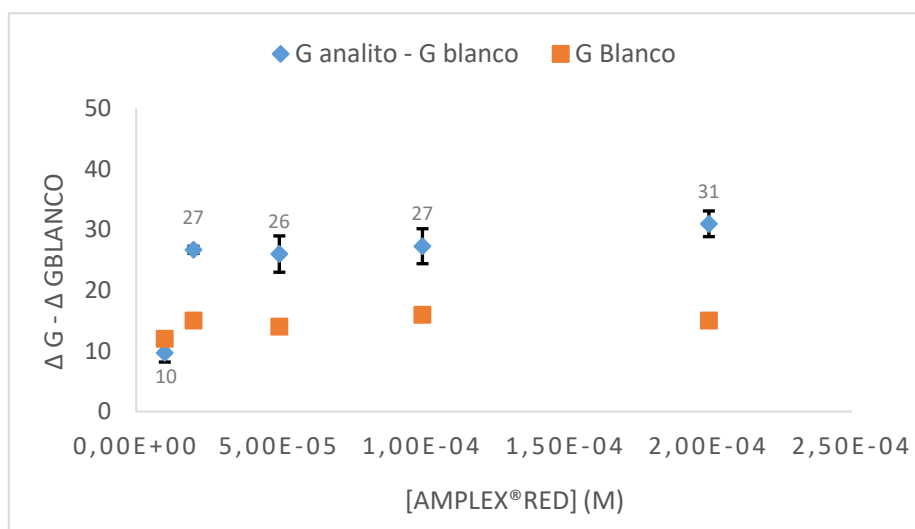
#### 4.2.1.2. Optimización de la concentración de colorante Amplex®Red

Se estudió la influencia de la concentración de colorante sobre la señal analítica variando únicamente la concentración de Amplex®Red y manteniendo fija la concentración del resto de reactivos:

En viales de 500  $\mu$ L, se prepararon dispersiones de celulosa al 5 % (m/v) que contenían distintos volúmenes de Amplex®Red  $1 \cdot 10^{-3}$  M disuelto en un disolvente orgánico (DMSO),

obteniendo las siguientes concentraciones del colorante:  $2 \cdot 10^{-4}$  M (100  $\mu$ L),  $1 \cdot 10^{-4}$  M (50  $\mu$ L),  $5 \cdot 10^{-5}$  M (25  $\mu$ L),  $2 \cdot 10^{-5}$  M (10  $\mu$ L),  $1 \cdot 10^{-5}$  M (5  $\mu$ L).

A continuación, se inyectaron 75  $\mu$ L de cada dispersión por cuadruplicado sobre los orificios de la placa, para obtener tres medidas y un blanco de cada concentración estudiada. Después se secó en la incubadora y se añadieron 10  $\mu$ L de HRP 20 U/mL. Tras adicionar 10  $\mu$ L de  $H_2O_2$   $5 \cdot 10^{-5}$  M como analito, se registraron las variaciones de la coordenada de color "G" (Figura 6). Se realizaron las medidas por triplicado en comparación con un blanco para cada concentración de colorante.



**Figura 6.** Resultados del estudio del Amplex®Red. Condiciones: [celulosa]= 5 % (m/v), [HRP]=20 U/mL (0,2 U/pocillo), [Amplex®Red]=  $2 \cdot 10^{-4}$  M ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  M/pocillo).

Con los resultados obtenidos se puede concluir que utilizando desde  $2 \cdot 10^{-5}$  M hasta  $2 \cdot 10^{-4}$  M de Amplex®Red se obtiene una señal analítica adecuada y similar entre las distintas concentraciones. Esto indica que la concentración de colorante no supone grandes diferencias analíticas cuando hay suficiente exceso de colorante con respecto al analito  $H_2O_2$  (en el caso de la concentración más elevada el exceso es de  $1,5 \cdot 10^{-3}$  mmol de Amplex®Red frente a  $5 \cdot 10^{-7}$  mmol de  $H_2O_2$  en cada pocillo). A pesar de que esto significa que existe margen para reducir la concentración de colorante dentro del rango indicado, **se decide fijar  $2 \cdot 10^{-4}$  M ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  M por pocillo) como concentración óptima de Amplex®Red**, puesto que permitirá un mayor rango de respuesta lineal.

Observando la figura 6 también se puede concluir que la concentración de Amplex®Red no influye en la señal del blanco.

#### 4.2.1.3. Estudio del método de secado de los soportes de celulosa

Una vez optimizados los parámetros de la reacción se decidió investigar si el método de secado de los soportes de celulosa influye en la señal obtenida.

Para ello se elaboraron dos placas con la dispersión de celulosa al 5 % (m/v) y Amplex®Red  $1,5 \cdot 10^{-5}$  M/pocillo y se secaron cada una de una forma: una placa a temperatura ambiente en el laboratorio y la otra a 36 °C en la incubadora. Ambas placas se protegieron de la luz para evitar la oxidación del colorante, puesto que el Amplex®Red es especialmente sensible a ella.

Una vez secas se añadió el HRP (0,2 U/pocillo) sobre los soportes. A continuación, se dejaron secar ambas placas a temperatura ambiente, ya que se trata de un periodo corto de tiempo (10 minutos). Por último, se adicionó el analito, en este caso 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  $5 \cdot 10^{-5}$  M. La variación de señal se midió con la aplicación de smartphone “Color Grab” hasta obtener un valor estable en cada medición. Una vez registradas las coordenadas de color RGB se calcularon los incrementos en la coordenada de color “G” restando el valor inicial antes de inyectar el analito y el valor final. Tras restar el incremento de “G” de los blancos correspondientes a cada placa, se calculó la media de señal obtenida en ambas (Tabla 7) y se realizó un test t al 95 % (tabla 8) para poder comparar las medias de los dos grupos muestrales.

	Secado a 37 °C en incubadora	Secado a T <sup>a</sup> ambiente
Señal media	25 unidades	30 unidades
Desviación estándar	4,502	3,609
nº de muestras	6	9

**Tabla 7.** Datos de los resultados obtenidos.

t experimental	t crítico
2,73	2,16

**Tabla 8.** Test t al 95 % para la comparación de las medias.

Según los resultados obtenidos, como el valor de t experimental es mayor que el valor de t crítico, se puede afirmar que las medias son estadísticamente distintas. Esto implica que la señal obtenida en la placa secada en la incubadora (25 unidades) sí que es menor que la señal registrada en la placa secada a temperatura ambiente (30 unidades). Esto puede ser debido a que a temperaturas superiores a la ambiental la actividad de las enzimas puede verse reducida, obteniendo así menor señal.

No obstante, dado que la diferencia de señal es pequeña y el tiempo de secado a temperatura ambiente es de entre 10 y 24 horas frente a las 2'5 horas de secado en incubadora, se decide emplear esta última para el resto de ensayos; de este modo se facilita el trabajo y se reduce el riesgo de contaminación y/o de oxidación del colorante en los soportes de celulosa.

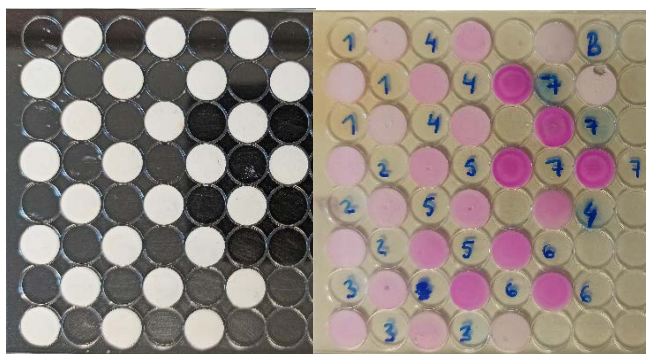
#### 4.2.1.4. Calibración de la reacción $H_2O_2 + HRP + Amplex^{\circ}Red$

Se realizó la calibración de  $H_2O_2$  una vez optimizados todos los parámetros de la reacción: [celulosa]= 5 % (m/v), [HRP]=20 U/mL (0,2 U/pocillo), [Amplex<sup>®</sup>Red]=  $2 \cdot 10^{-4}$  M ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  M/pocillo).

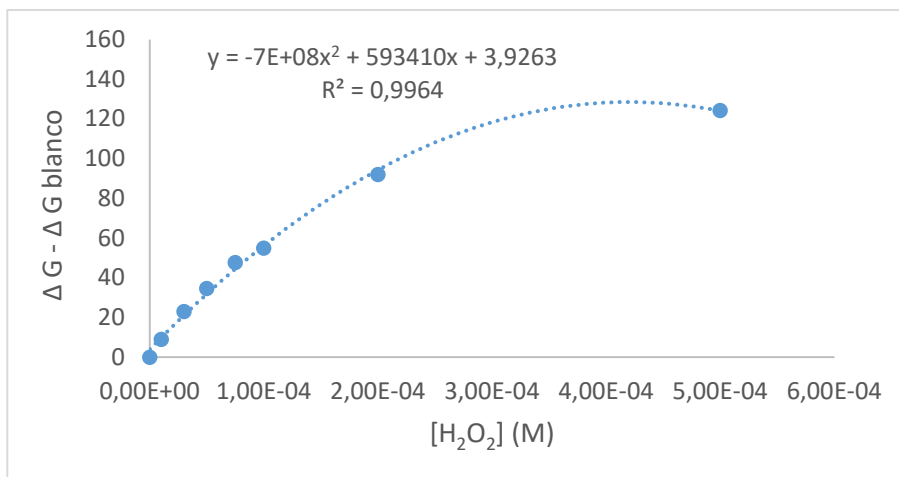
Tras preparar nuevos soportes de celulosa a pH 8 según la metodología ya explicada, se prepararon disoluciones de concentración creciente y conocida de  $H_2O_2$ , desde  $1 \cdot 10^{-5}$  M hasta  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Se añadieron sobre los soportes 10  $\mu$ L de cada una de estas disoluciones, por triplicado, y se registró la variación de la coordenada de color "G" hasta obtener una señal estable. Se compararon las medidas obtenidas con un blanco realizado con disolución amortiguadora de pH 8. Los resultados de la calibración se encuentran recogidos en la tabla 9 y representados en la figura 8, con la correspondiente curva de calibrado.

[ $H_2O_2$ ] (M)	$\Delta G - \Delta G$ blanco
0,00E+00	0
1,00E-05	9
3,00E-05	23
5,00E-05	35
7,50E-05	48
1,00E-04	55
2,00E-04	92
5,00E-04	124

**Tabla 9.** Señal obtenida ( $\Delta G_{analito} - \Delta G_{blanco}$ ) en función de la concentración de  $H_2O_2$ .



**Figura 7.** Soportes de celulosa antes (izquierda) y después (derecha) de añadir  $H_2O_2$ .



**Figura 8.** Curva de calibrado de  $H_2O_2$  con HRP en presencia de Amplex®Red. Condiciones:  $pH=8$ ,  $[HRP]=0,2$  U/pocillo,  $[Amplex^{\circ}Red]= 1,5 \cdot 10^{-5}$  M/pocillo.

Con los resultados obtenidos en la calibración se confirma que con el método en soporte sólido **se consigue obtener una señal dependiente de la concentración de  $H_2O_2$** . Sin embargo, esta relación no es lineal, sino que se ajusta a una ecuación polinómica de segundo grado, como ya se había visto en casos anteriores (Sanz-Vicente, I. et al., 2020)

En la tabla 10 se muestran las características analíticas del método en soporte sólido para la determinación de  $H_2O_2$ . Para realizar los cálculos se toma como referencia un punto intermedio de la recta de calibrado ( $1 \cdot 10^{-4}$  M).

Curva de calibrado ( $R^2 = 0,9964$ )	$\Delta G - \Delta G \text{ blanco} = -7E+08 [H_2O_2]^2 + 593410[H_2O_2] + 3,9263$
Rango de respuesta	$1 \cdot 10^{-5} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Reproducibilidad (% DSR)	1,70 %

**Tabla 10.** Características analíticas del método en soporte sólido para la determinación de  $H_2O_2$ .

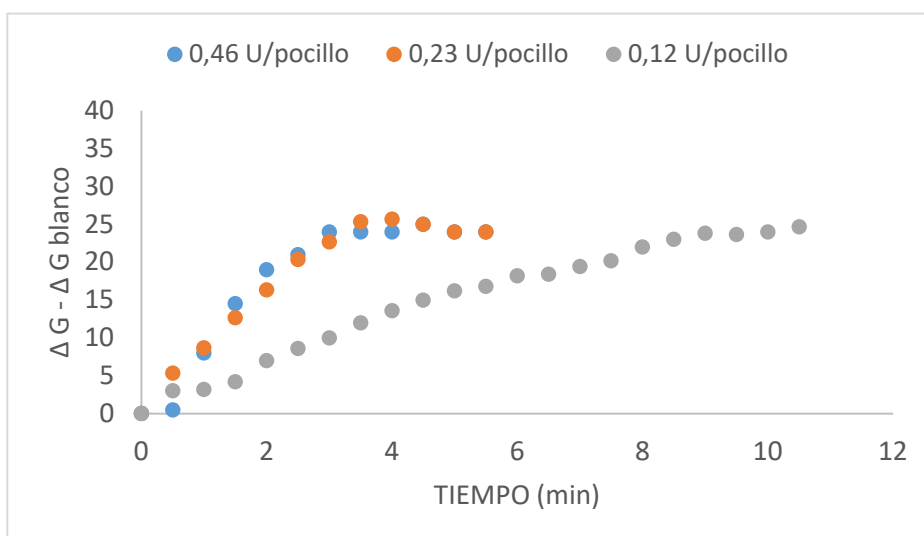


#### 4.2.1.5. Optimización de la concentración de TAO

Una vez estudiada la reacción indicadora (la segunda reacción enzimática) y tras comprobar que se puede determinar peróxido, se intenta inmovilizar TAO para determinar histamina, analizando en qué condiciones se obtiene señal.

Para ello se realizó un ensayo probando tres concentraciones distintas de la enzima (0,46 U/pocillo, 0,23 U/pocillo y 0,12 U/pocillo); se pesó una masa exacta de TAO y se prepararon con agua Milli-Q® las disoluciones necesarias (46 U/mL, 23 U/mL, 12 U/mL) que se añadirían más adelante sobre los soportes. Se analizó cómo afectaba cada concentración a la señal obtenida y a la cinética de la reacción.

Para llevar a cabo el ensayo se elaboraron con anterioridad los soportes de celulosa al 5 % (m/v) con Amplex®Red ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  M/pocillo) y una vez secos se adicionó la HRP (0,2 U/pocillo). Tras dejar secar de nuevo se añadieron 10  $\mu$ L de las distintas disoluciones de TAO y una vez secas se adicionó el analito (10  $\mu$ L de histamina  $1 \cdot 10^{-4}$  M). Se registró la variación de la coordenada de color "G" en los distintos pocillos a lo largo del tiempo, comparando las medidas con un blanco en cada caso. Los resultados se encuentran representados en la figura 9.



**Figura 9.** Representación de las señales obtenidas en función del tiempo y de la concentración de TAO. Condiciones: pH 8, [celulosa]= 5% (m/v), [HRP]=0,2 U/pocillo, [Amplex®Red]=  $1,5 \cdot 10^{-5}$  M/pocillo, [Histamina]=  $1 \cdot 10^{-4}$  M.

Aunque con las tres concentraciones de TAO se alcanzan valores muy similares en cuanto a la señal, se puede observar cómo la reacción con 0,12 U/pocillo es mucho más lenta que las otras dos, llegándole a costar casi el triple de tiempo alcanzar el valor final de señal; por ello queda descartada. Sin embargo, las reacciones con 0,46 U/pocillo y 0,23 U/pocillo muestran

una cinética similar: la primera se estabiliza entorno al minuto 3 y la segunda entorno al minuto 3,5. Teniendo en cuenta esta mínima diferencia y tratándose del doble de concentración la relación entre una y otra, **se decide seleccionar 0,23 U/pocillo como concentración óptima de TAO.**

#### *4.2.1.6. Estudio del orden de adición de los reactivos*

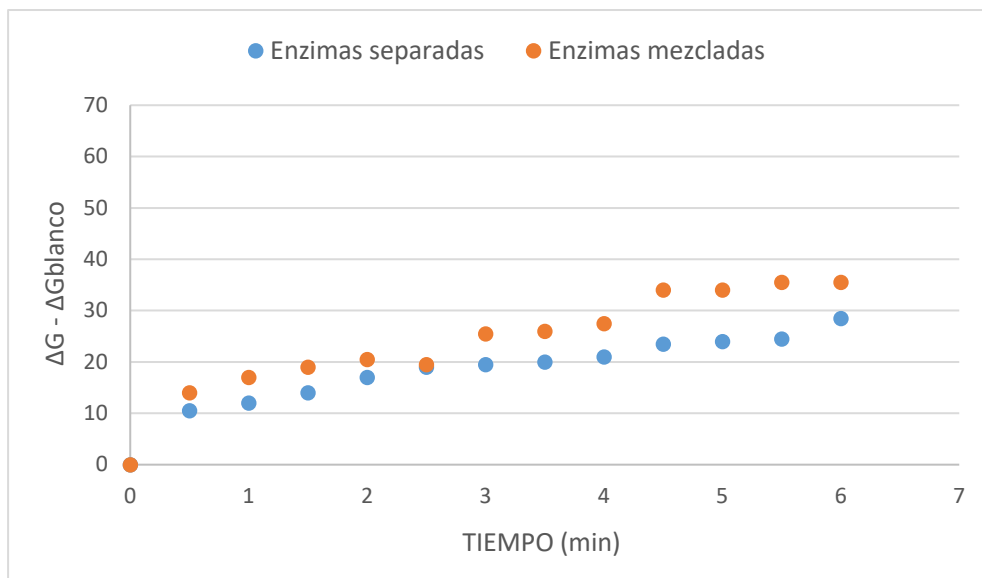
En estudios previos llevados a cabo en el grupo de investigación, se inmovilizaban los reactivos (HRP, TAO y Amplex<sup>®</sup>Red) antes de la etapa de secado y, una vez formados las tiras de celulosa, se adicionaba el analito. Sin embargo, los resultados no eran aceptables, puesto que el color únicamente aparecía sobre los bordes externos del soporte. Se propuso la hipótesis de que la TAO no puede adicionarse en la etapa previa al secado porque queda desactivada, por lo que hay que añadirla una vez formadas las tiras de celulosa.

En el presente estudio se propuso inmovilizar únicamente el colorante antes del secado y añadir las enzimas posteriormente; en estudios anteriores del grupo de investigación se obtuvieron buenos resultados de esta manera, añadiendo las enzimas de una en una sobre el soporte seco.

Con el fin de reducir pasos en el análisis, se propone la posibilidad de adicionar las enzimas en una única etapa, elaborando en un vial una mezcla de HRP y TAO en las concentraciones deseadas (20 U/mL y 23 U/mL respectivamente), para acortar los tiempos de secado y reducir el riesgo de que se produzca la oxidación antes de comenzar la determinación.

Para ello se realizó un ensayo estudiando dos formas de añadir las enzimas y comparando los resultados. La primera consistió en adicionar HRP (10 µL, 20 U/mL) sobre las tiras de celulosa (contienen el colorante), dejar secar, adicionar TAO (10 µL, 23 U/mL), dejar secar y por último añadir el analito (10 µL de histamina  $1 \cdot 10^{-4}$  M). En el segundo de los casos las enzimas se añadieron sobre los soportes de celulosa en un único paso, inyectando 10 µL de la mezcla de HRP y TAO preparada y dejando secar antes de adicionar el analito.

Se realizaron por duplicado ambos métodos y se compararon con un blanco. Los resultados obtenidos en este ensayo al medir la variación de la coordenada de color "G" tras inyectar el analito se muestran en la figura 10.



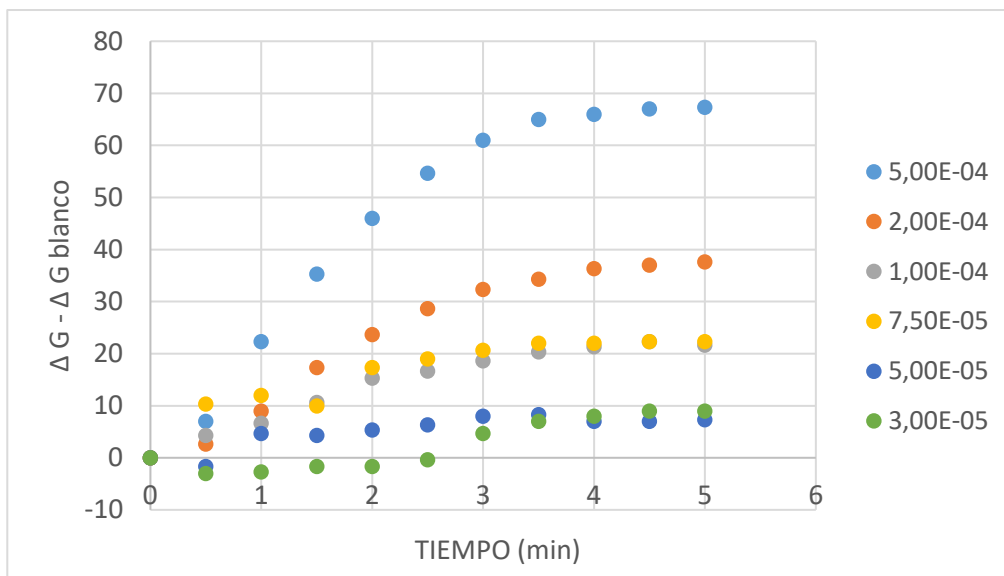
**Figura 10.** Resultados del ensayo del método de adición de las enzimas.

Los resultados muestran cómo, aunque la cinética de la reacción y la señal obtenida son similares en ambas, sí que se consigue una señal ligeramente superior al añadir HRP y TAO mezcladas. Quizás con este método se logra una mayor homogeneidad en la dispersión de los reactivos y, al transcurrir menos tiempo hasta la determinación, la actividad de las enzimas se ve menos afectada. Por tanto, **se concluye como método óptimo adicionar HRP y TAO mezcladas, en una única etapa, sobre las tiras de celulosa con colorante secas.**

#### 4.2.2. Calibración de histamina con TAO en presencia de HRP y Amplex®Red

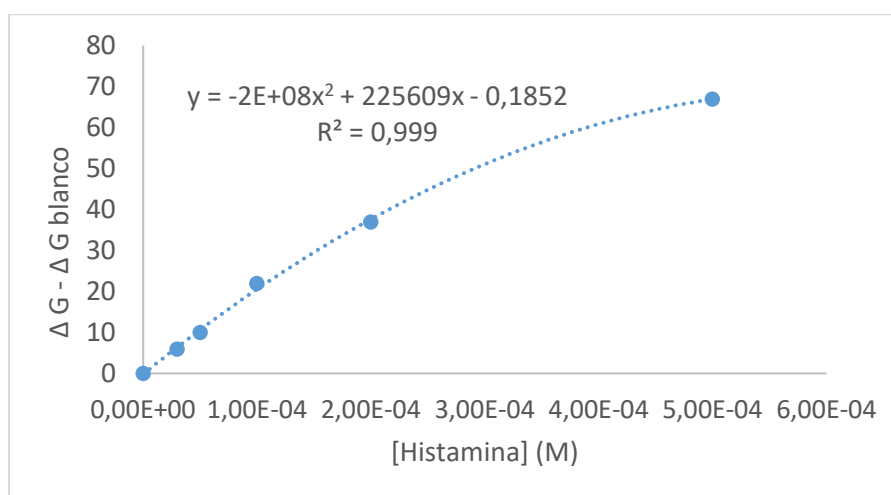
Tras observar en ensayos anteriores que la reacción de histamina con TAO en soporte sólido genera señal y es reproducible, se decide realizar una calibración para comprobar si la señal obtenida es dependiente de la concentración de histamina.

Para ello se crearon láminas de celulosa al 5 % (m/v) con Amplex®Red y una vez secas se adicionaron la HRP y la TAO según las condiciones optimizadas a lo largo del apartado 4.2.1. Así mismo, se prepararon disoluciones de histamina a pH 8 con concentraciones desde  $3 \cdot 10^{-5}$  M hasta  $7,5 \cdot 10^{-5}$  M y se añadieron 10  $\mu$ L de cada una de ellas sobre los soportes de celulosa secos. Esto se realizó por triplicado para cada punto de calibración. Se registró la variación de la coordenada de color "G" en los distintos pocillos, en comparación con un blanco, utilizando la aplicación de Smartphone "Color Grab". La media de los resultados obtenidos a cada concentración a distintos tiempos de medición se encuentra representada en la figura 11.



**Figura 11.** Media de las señales obtenidas con cada concentración de histamina a distintos tiempos de medida.

Queda comprobado a la vista de estos resultados que **la señal obtenida con el método en soporte sólido sí es dependiente de la concentración de histamina**. Para obtener la correspondiente curva de calibrado se representan los resultados obtenidos en el minuto 4 de medición (Figura 12), puesto que a este tiempo es cuando se encuentran estabilizadas las señales de todas las concentraciones estudiadas.



**Figura 12.** Curva de calibrado de histamina con TAO. Condiciones: pH 8, [HRP]=0,2 U/pocillo, [TAO]=0,23 U/pocillo.



**Figura 13.** Imagen de los soportes de celulosa antes (izquierda) y después (derecha) de añadir histamina

Con los resultados de la calibración de histamina se concluye que **la señal es dependiente de la concentración de histamina, ajustándose a una ecuación polinómica de segundo grado, lo que permite aplicar esta metodología a muestras que contengan histamina.**

Por otro lado, la sensibilidad del método con histamina es muy inferior a la de  $H_2O_2$ , como ocurría en disolución. Las características analíticas del método se muestran en la tabla 11. La reproducibilidad se calculó con tres medidas del punto de calibración  $5 \cdot 10^{-5}$  M.

Curva de calibrado ( $R^2 = 0,999$ )	$\Delta G - \Delta G \text{ blanco} = -2E+08 [\text{Hist}]^2 + 225609 [\text{Hist}] - 0,1852$
Rango de respuesta	$3 \cdot 10^{-5} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Reproducibilidad (% DSR)	2,34 %

**Tabla 11.** Características analíticas del método para la determinación de histamina con TAO.

#### 4.2.3. Estudio de interferencias

Se investigó si con el método desarrollado para histamina existían interferencias con otras aminas biógenas comunes en alimentos. Teniendo en cuenta que la enzima empleada en la reacción es la TAO (tiramina oxidasa), el resultado a esperar era que únicamente la tiramina fuera susceptible de dar señal en esta determinación, con las condiciones fijadas para histamina. No obstante, se decidió estudiar también la posible reacción con cadaverina y putrescina.

Para llevar a cabo el estudio se elaboraron soportes de celulosa en las condiciones óptimas (pH 8, [HRP]=0,2 U/pocillo, [TAO]=0,23 U/pocillo) según la metodología expuesta en el apartado 3.3.2. Así mismo, tras añadir el analito con la amina estudiada en cada caso se registró

la variación de la coordenada de color “G” con la aplicación “Color Grab”, de igual modo que en el resto de ensayos, en comparación con un blanco.

#### 4.2.3.1. Tiramina

En el ensayo con tiramina se tomó como referencia inicial la adición de 10 µL tiramina  $1 \cdot 10^{-4}$  M para ver si existía interferencia. Como sí que se obtuvo señal, se fue reduciendo la concentración de tiramina para conocer cuál es la mínima concentración que genera señal en el soporte diseñado. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

[Tiramina]	$1 \cdot 10^{-4}$ M	$5 \cdot 10^{-5}$ M	$1 \cdot 10^{-5}$ M
Señal (uds)	51	25	2

**Tabla 12.** Señal obtenida (incremento unidades “G”) en el ensayo de interferencia con tiramina tras inyectar tres concentraciones distintas de la amina.

Tras los resultados del ensayo, se estima que la mínima concentración a la que se produce la interferencia con tiramina dentro de las tres estudiadas es  $5 \cdot 10^{-5}$  M, puesto que el valor de 2 unidades no supone una señal observable. Por tanto, fue necesario estudiar cómo eliminar esta interferencia ya que no es una concentración lo suficientemente baja como para que no interfiera en el método.

#### 4.2.3.2. Cadaverina y putrescina

Para realizar el ensayo de interferencias con cadaverina y putrescina se prepararon nuevos soportes de celulosa en las condiciones optimizadas, así como disoluciones de ambas aminas en concentración de  $1 \cdot 10^{-3}$  M y  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Se inyectaron 10 µL de cada disolución de cada amina para hacer la determinación. Las medidas se hicieron de igual modo que en el resto de ensayos, registrando la variación de la coordenada G en comparación con un blanco. Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 13.

TIEMPO (min)	PUTRESCINA		CADAVERINA	
	$1 \cdot 10^{-4}$ M	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$1 \cdot 10^{-4}$ M	$1 \cdot 10^{-3}$ M
0	0	0	0	0
0,5	1	1	2	4
1	0	0	1	5
1,5	2	2	2	4
2	2	2	2	4

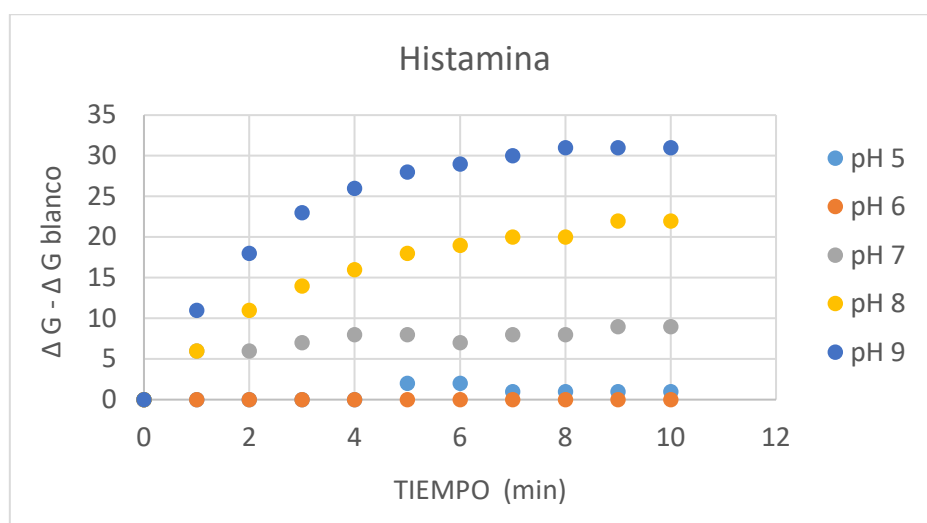
**Tabla 13.** Resultados del ensayo de interferencia con putrescina y cadaverina ( $\Delta G$  analito –  $\Delta G$  blanco). Condiciones: pH 8, [HRP]=0,2 U/pocillo, [TAO]=0,23 U/pocillo.

Con los resultados obtenidos se concluye que **no existe interferencia con putrescina y cadaverina en el método propuesto para la determinación de histamina**. No se produjo un cambio de coloración en los soportes y las ligeras variaciones registradas en la coordenada de color “G” se asocian a la variabilidad que presenta el método semicuantitativo, no a la obtención de señal.

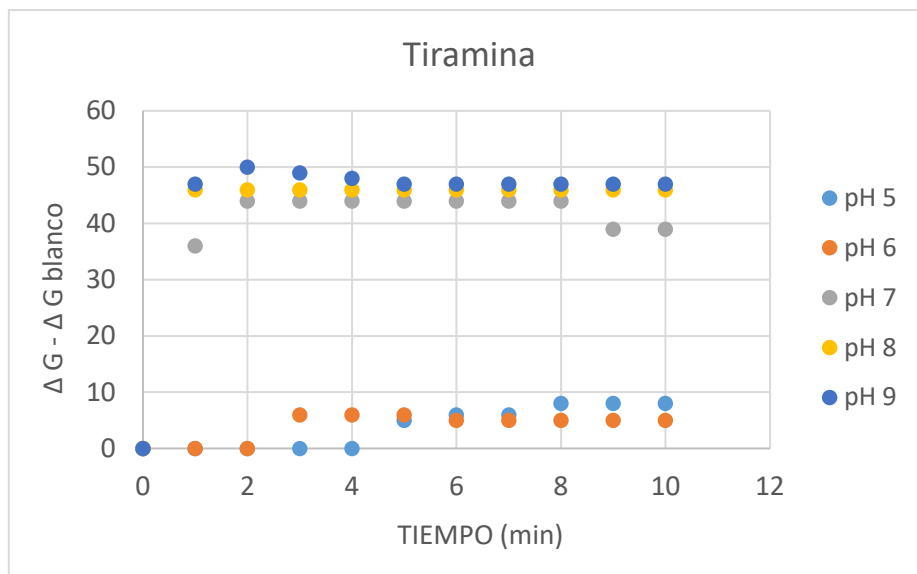
#### 4.2.3.3. Estudio del pH para la eliminación de la interferencia de tiramina

Tras concluir en el apartado 4.2.3.1. que existe interferencia con tiramina en el método para la determinación de histamina, se decide realizar un estudio del pH en las reacciones de ambas aminas para ver cómo influye este parámetro sobre la señal y la cinética de las reacciones. El objetivo fue encontrar un pH en el que sólo dé señal una de las dos aminas, o un pH donde la cinética de una de ellas sea mucho más lenta que la cinética de la otra. Con ello se conseguiría diferenciarlas, pudiendo determinar histamina y tiramina por diferencia en la señal total tras obtener la señal de una de ellas en una muestra que contenga ambas aminas. Los pH estudiados fueron 5, 6, 7, 8 y 9.

Para realizar el estudio se elaboraron soportes de celulosa en las condiciones optimizadas a lo largo del apartado 4.2.1. Se prepararon disoluciones de histamina y de tiramina  $1 \cdot 10^{-4}$  M en disoluciones amortiguadoras de pH 5, 6, 7, 8 y 9. Tras añadir 10  $\mu$ L de cada una de ellas sobre los soportes, se registró la variación de la coordenada de color “G” a lo largo del tiempo con la aplicación “Color Grab”. Los resultados del estudio se muestran en las figuras 14 y 15.



**Figura 14.** Señales obtenidas ( $\Delta G$  analito-  $\Delta G$  blanco) en la determinación de histamina  $1 \cdot 10^{-4}$  M a distintos pH. Condiciones:  $[HRP]=0,2$  U/pocillo,  $[TAO]=0,23$  U/pocillo.



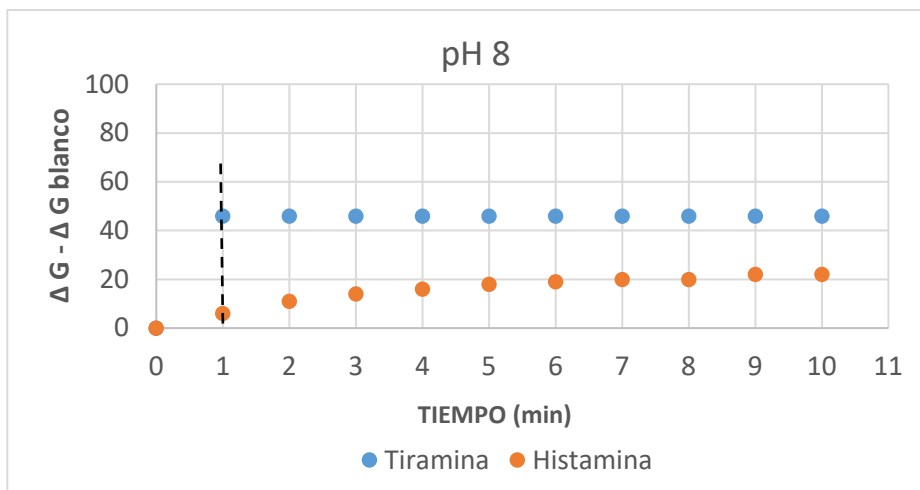
**Figura 15.** Señales obtenidas ( $\Delta G$  analito -  $\Delta G$  blanco) en la determinación de tiramina  $1 \cdot 10^{-4}$  M a distintos pH. Condiciones: [HRP]=0,2 U/pocillo, [TAO]=0,23 U/pocillo.

Como se puede observar en las figuras, a pH 5 y 6 la histamina no da señal y la tiramina genera una señal muy reducida y a menor velocidad que con el resto de pH. A pH 7, al igual que a pH 8 y 9, la tiramina da una señal elevada y rápida, mientras que la histamina a pH 7 genera poca señal y la reacción es lenta. A pH 8 y 9 la histamina presenta una señal alta, siendo mayor a pH 9.

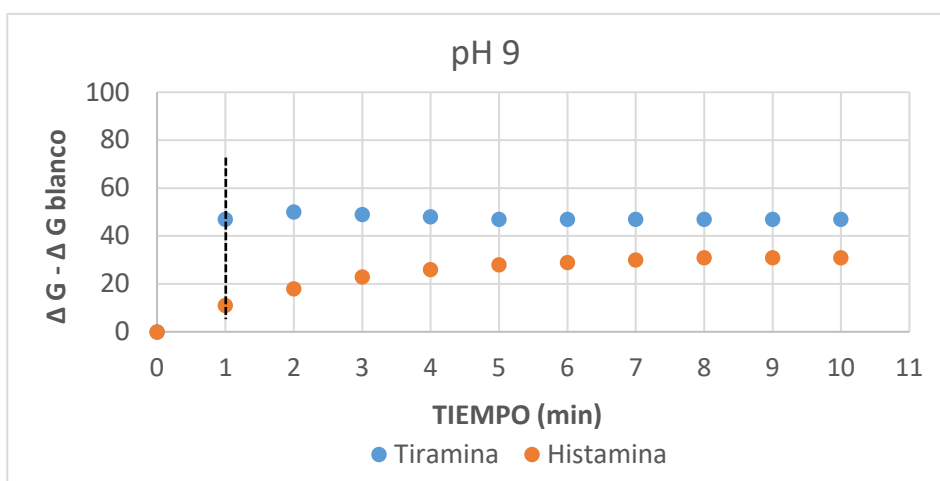
**Por tanto, en una muestra se podría determinar tiramina a pH 7 y determinar ambas a pH 9, obteniendo la concentración de histamina por diferencia entre ambas determinaciones.**

Además, observando la cinética de la reacción con histamina y la reacción con tiramina, se observa una clara diferencia: **la tiramina reacciona rápido y se estabiliza** en el primer minuto de determinación, **mientras que la histamina reacciona lentamente**, incrementando su señal progresivamente hasta estabilizarse, **y no genera apenas señal en los primeros instantes**. Para apreciar mejor las diferencias entre la cinética de ambas, se representaron los resultados del estudio a pH 8 y pH 9 (figuras 16 y 17), puesto que en ellos las dos aminas presentan la señal más elevada.





**Figura 16.** Señales de tiramina e histamina obtenidas a pH 8 a lo largo del tiempo. Condiciones: [HRP]=0,2 U/pocillo, [TAO]=0,23 U/pocillo.



**Figura 17.** Señales de tiramina e histamina obtenidas a pH 9 a lo largo del tiempo. Condiciones: [HRP]=0,2 U/pocillo, [TAO]=0,23 U/pocillo.

Como se puede observar, la señal de tiramina e histamina hasta el minuto 1 de determinación es significativamente distinta, existiendo mayor diferencia entre ambas a pH 8, donde la histamina prácticamente no genera señal. Este hecho podría permitir determinar en una muestra tiramina antes del minuto 1 y, una vez estabilizada la señal, determinar la señal conjunta de histamina y tiramina para conocer la concentración de histamina en la muestra.

Así pues, este ensayo permite plantear la **posibilidad de una determinación conjunta de tiramina e histamina bien trabajando a dos pH distintos, o bien trabajando a un único pH midiendo a distintos tiempos**; esta propuesta se estudia en profundidad en el apartado 4.2.4.

#### 4.2.4. Determinación conjunta de histamina y tiramina

Para abordar la determinación conjunta a un único pH es necesario realizar en primer lugar una calibración de tiramina, tomando la señal en los primeros momentos de la reacción enzimática (30 segundos, cuando la señal es sólo debida a tiramina) y a un tiempo en el que la señal de ambas aminas se haya estabilizado (4 minutos), y por otro lado una calibración de histamina tomando las señales a 4 minutos.

Además, hay que medir a esos dos tiempos la señal de una muestra que contenga ambas aminas. A partir de todo ello se realizan los siguientes cálculos:

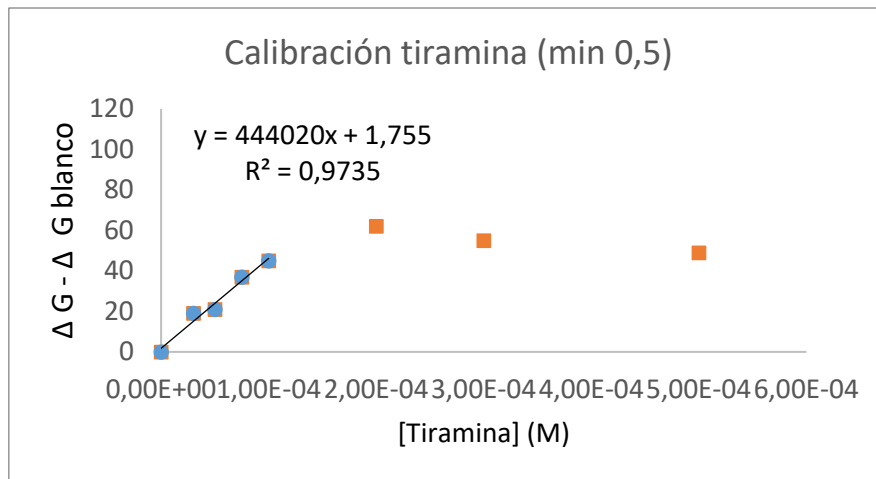
- La señal de la muestra en los primeros momentos se interpola en la calibración de tiramina para calcular la concentración que hay de esta amina en la muestra.
- Conociendo este dato y con la calibración de tiramina a 4 minutos, se calcula qué parte de la señal de la muestra a 4 minutos es de tiramina y, por tanto, se calcula la que es debida a histamina por diferencia.
- Interpolando esta señal en la calibración de histamina a 4 minutos, se calcula la concentración de histamina.

Este procedimiento se realiza en una hoja de cálculo Excel fácilmente. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

##### 4.2.4.1. Calibración de tiramina con TAO

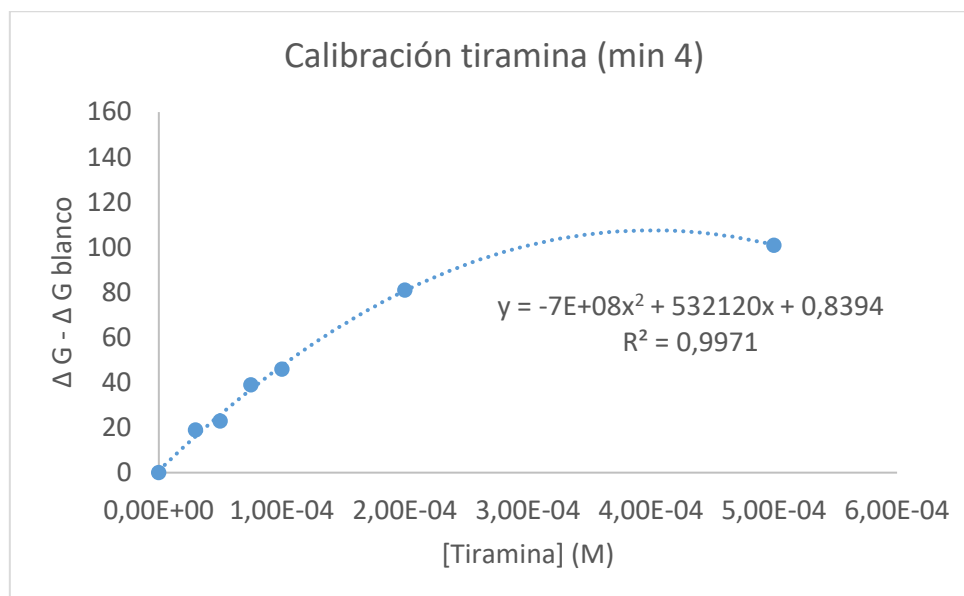
Para la calibración de tiramina, se elaboraron soportes de celulosa en las condiciones optimizadas. Se prepararon también disoluciones de tiramina de concentración creciente y conocida (desde  $3 \cdot 10^{-5}$  M hasta  $5 \cdot 10^{-4}$  M) a pH 8, pues es el pH seleccionado para la determinación conjunta. A continuación, se adicionaron sobre los soportes 10  $\mu$ L de cada una de las disoluciones de tiramina por triplicado. Se registró la variación de la coordenada "G" cada 30 segundos y se compararon los valores con un blanco.

Se representaron las rectas de calibrado obtenidas en aquellos tiempos de medida que serán de interés en la determinación simultánea de las dos aminas (Figuras 18 y 19):



**Figura 18.** Resultados en el minuto 0,5 de la calibración de tiramina con TAO. Condiciones: [HRP]=0,2 U/pocillo, [TAO]=0,23 U/pocillo.

La figura 16 muestra cómo a los 0,5 min de medición se obtiene un intervalo de respuesta lineal hasta aproximadamente  $1 \cdot 10^{-4}$  M de tiramina. Esto permitirá interpolar fácilmente los resultados obtenidos en una determinación conjunta con histamina. Como en esta última se tomarán medidas hasta los 4-5 minutos de medición para registrar la señal de histamina, se representa también la calibración de tiramina en el minuto 4 (figura 17).



**Figura 19.** Resultados en el minuto 4 de la calibración de tiramina con TAO. Condiciones: [HRP]=0,2 U/pocillo, [TAO]=0,23 U/pocillo.

En la calibración de tiramina con TAO, con las señales registradas en el minuto 4 se obtiene una curva de calibrado que se ajusta a una ecuación de segundo grado, al igual que

**ocurría con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la histamina.** Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente por el grupo de investigación en la determinación de otras AB con soportes de celulosa y TMB (Sanz-Vicente, I. et al., 2020)

En la tabla 14 se muestran las características analíticas del método en la determinación de tiramina. La reproducibilidad se calcula a partir de las medidas obtenidas (n=3) en un punto intermedio ( $2 \cdot 10^{-4}$  M) de la calibración del minuto 4.

Curva de calibrado (R <sup>2</sup> = 0,9971)	$\Delta G - \Delta G \text{ blanco} = -7E+08 [\text{Tir}]^2 + 532120[\text{Tir}] + 0,8394$
Rango de respuesta	$3 \cdot 10^{-5} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Reproducibilidad (% DSR)	1,02 %

**Tabla 14.** Características analíticas del método en la determinación de tiramina con TAO.

En la anterior calibración, el primer tramo es lineal (su ecuación es  $y=394427x + 4,756$ ) y será empleado para calcular la señal en la muestra debida a tiramina a los 4 minutos. La calibración de histamina empleada será la de la figura 9, que en su primer tramo es lineal ( $y=232281x + 0,085$ ).

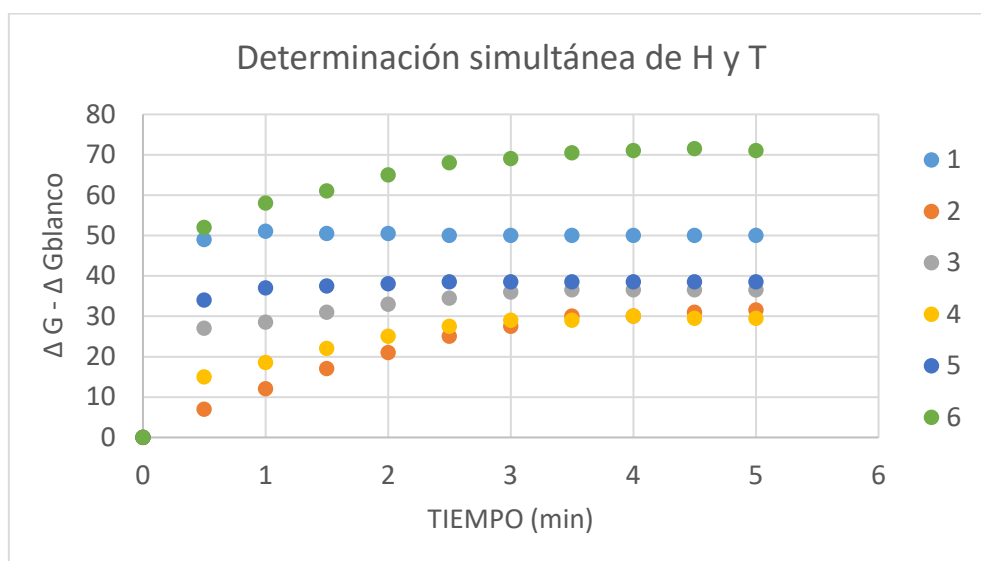
#### 4.2.4.2. Ensayo de determinación conjunta

Para comprobar la viabilidad de lograr una determinación conjunta de histamina y tiramina, se realizó un ensayo en el que se midió la señal obtenida en disoluciones que contenían ambas aminas mezcladas.

Para llevar a cabo el ensayo se crearon con anterioridad los soportes de celulosa en las condiciones optimizadas. Se prepararon 6 disoluciones de tiramina (T) + histamina (H) en distintas proporciones (100 % corresponde a una concentración de  $1 \cdot 10^{-4}$  M):

- 1) 100 % T + 0 % H,
- 2) 0 % T + 100 % H,
- 3) 50 % T + 50 % H,
- 4) 25 % T + 75 % H,
- 5) 75 % T + 25 % H,
- 6) 100 % T + 100 % H.

Tras añadir 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las mezclas por duplicado sobre los soportes, se registró la variación de la coordenada "G" con la aplicación "Color Grab" y se compararon las medidas con un blanco. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20.



**Figura 20.** Señales obtenidas en la determinación simultánea de histamina y tiramina. Condiciones:  $[\text{HRP}] = 0,2 \text{ U/pocillo}$ ,  $[\text{TAO}] = 0,23 \text{ U/pocillo}$ . Disoluciones: 1 (100 % T + 0 % H), 2 (0 % T + 100 % H), 3 (50 % T + 50 % H), 4 (25 % T + 75 % H), 5 (75 % T + 25 % H), 6 (100 % T + 100 % H).

Simplemente observando la cinética de las distintas mezclas se puede concluir que: cuando la proporción de histamina es baja o nula y predomina tiramina, la señal es prácticamente estable desde el principio; cuando predomina la histamina la señal aumenta progresivamente con el tiempo hasta estabilizarse. Por tanto, **la pendiente de subida depende de la histamina y la señal a 30 segundos es prácticamente debida a tiramina, que se mantiene estable en el tiempo**

También se puede observar cómo **a los 4 minutos de análisis todas las señales se encuentran estabilizadas**, independientemente de la proporción de aminas de la mezcla.

Por tanto, **con estas observaciones se plantea viable la determinación de histamina y tiramina en una muestra:**

Se realizaron los cálculos detallados al inicio del apartado 4.2.4 con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Tablas 15 y 16). La señal de la muestra a 30 segundos (columna 3 de la tabla 15) se interpola en la recta de calibrado de tiramina a 30 segundos y se obtiene la concentración de tiramina en la muestra (columna 4 de la tabla 15). Como se puede observar los resultados son buenos, con errores entre 2,7 y 16%.

Mezclas T+H	Concentraciones reales en mezclas	Señal a 30 segundos	Interpolando en la recta de tiramina	% error
1 (100 % T-0 % H)	1x10 <sup>-4</sup> M T	49	1.06x10 <sup>-4</sup> M	6%
	0 H		----	---
2 (0 % T-100 % H)	0T	7	0	---
	1x10 <sup>-4</sup> M H		----	---
3 (50 % T- 50 % H)	5x10 <sup>-5</sup> M T	27	5.7x10 <sup>-5</sup> M	14%
	5x10 <sup>-5</sup> M H		----	---
4 (25 % T-75 % H)	2.5x10 <sup>-5</sup> M T	15	2.9x10 <sup>-5</sup> M	16%
	7.5x10 <sup>-5</sup> M H		----	---
5 (75 % T -25 % H)	7.5x10 <sup>-5</sup> M T	34	7.3x10 <sup>-5</sup> M	-2.7%
	2.5x10 <sup>-5</sup> M H		----	---
6 (100 % T-100 % H)	1x10 <sup>-4</sup> M T	52	1.1x10 <sup>-4</sup> M	10%
	1x10 <sup>-4</sup> M H		----	---

**Tabla 15.** Cálculo de la concentración debida a tiramina en las mezclas de tiramina e histamina de la determinación conjunta.

Una vez conocida la concentración de tiramina, se calcula la señal que daría esta amina a los 4 minutos en la muestra. Restando este valor de la señal total de la muestra, se obtiene la señal de histamina en la muestra (columna 4 de la tabla 16). Este valor se interpola en el tramo recto de la calibración de histamina (figura 12), obteniendo la concentración de histamina en la muestra (columna 5 de la tabla 16).

Mezclas T+H	Concentraciones reales en las mezclas	Señal a 4 minutos mezcla	Señal a 4 minutos Histamina	Interpolando en la recta de 4 min de histamina	% error
1 (100 T-0H)	1x10 <sup>-4</sup> M T	50		1.06x10 <sup>-4</sup> M	6%
	0 H		3.44	0	---
2 (0T-100H)	0T	30		0	---
	1x10 <sup>-4</sup> M H		24.78	1.1x10 <sup>-4</sup> M	10%
3(50T-50H)	5x10 <sup>-5</sup> M T	37		5.7x10 <sup>-5</sup> M	14%
	5x10 <sup>-5</sup> M H		9.76	4.2x10 <sup>-5</sup> M	-16%
4 (25-75)	2.5x10 <sup>-5</sup> M T	30		2.9x10 <sup>-5</sup> M	16%
	7.5x10 <sup>-5</sup> M H		13.81	5.9x10 <sup>-5</sup> M	-20%
5 (75-25)	7.5x10 <sup>-5</sup> M T	39		7.3x10 <sup>-5</sup> M	-2.7%
	2.5x10 <sup>-5</sup> M H		5.45	2.35 x10 <sup>-5</sup> M	-6%
6 (100-100)	1x10 <sup>-4</sup> M T	71		1.1x10 <sup>-4</sup> M	10%
	1x10 <sup>-4</sup> M H		22.86	9.8x10 <sup>-5</sup> M	-2%

**Tabla 16.** Cálculo de la concentración de histamina en la determinación conjunta.

Como se puede observar los resultados son bastante satisfactorios, obteniendo errores de entre 2 % y 20 % para ambas aminas, lo cual es bastante adecuado para un método semicuantitativo.

## 5. CONCLUSIONES

1. La determinación rápida de histamina mediante el método en soporte reactivo propuesto es posible, puesto que se ha logrado obtener una señal dependiente de la concentración de histamina, con un rango de respuesta desde  $3 \cdot 10^{-5}$  M hasta  $5 \cdot 10^{-4}$  M.
2. Esta relación entre la señal obtenida a través de la coordenada de color G y la concentración de histamina se ajusta a una ecuación de segundo grado, tal y como se había observado en estudios previos con otras AB. Esto hace posible la aplicación del método a muestras reales.
3. Las condiciones en el soporte reactivo que se han fijado como óptimas para la determinación son: [celulosa]= 5 % (m/v), [HRP]= 0,2 U/pocillo, [TAO]=0,23 U/pocillo, [Amplex®Red]= $1,5 \cdot 10^{-5}$  M/pocillo.
4. Comparando las pendientes de las calibraciones de la reacción indicadora de  $H_2O_2$  y de la reacción con histamina, se comprueba que no toda la histamina se oxida a  $H_2O_2$  en la reacción con TAO, lo cual condiciona la sensibilidad del método. Tanto en disolución como en soporte sólido, la sensibilidad del método con histamina es inferior a la del  $H_2O_2$ .
5. Se ha comprobado que la tiramina interfiere en la señal de histamina en el método en soporte sólido. Sin embargo, sus reacciones presentan cinéticas diferentes, lo cual hace viable la determinación conjunta de tiramina e histamina en una muestra que contenga ambas. En el ensayo realizado se han obtenido buenos resultados como método semicuantitativo.

## 6. CONCLUSIONS

1. The rapid determination of histamine using the proposed reagent support method is possible, since it enables to obtain a signal dependent of the histamine concentration, with a response range from  $3 \cdot 10^{-5}$  M to  $5 \cdot 10^{-4}$  M.
2. This relationship between the signal obtained through the G color coordinate and the histamine concentration is adjusted to a quadratic equation, just as it had been observed in previous studies with other BAs. This makes possible to apply the method to real samples.
3. The following conditions in the reagent support have been set as optimal for the histamine determination: [cellulose] = 5% (m/v), [HRP] = 0,2 U/well, [TAO] = 0,23 U/well, [Amplex<sup>®</sup>Red] =  $1,5 \cdot 10^{-5}$  M/well.
4. Comparing the slopes of the calibrations of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicator reaction and the histamine reaction, it is verified that not all the histamine is oxidized to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the reaction with TAO, which influences the sensitivity of the method. Both in solution and on solid support, the sensitivity of the histamine method is lower than the one of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
5. Tyramine has been found to interfere with histamine signal in solid support method. However, their reactions present different kinetics, which makes feasible the joint determination of tyramine and histamine in a sample containing both. In the test carried out, good results have been obtained as a semi-quantitative method.



## 7. VALORACIÓN PERSONAL

El desarrollo del Trabajo de Fin de Grado ha servido para aumentar mis conocimientos acerca de las aminas biógenas y su importancia en el control de alimentos, además de para conocer técnicas alternativas para su análisis.

Por otro lado, me ha permitido adquirir mayor autonomía en el laboratorio y aprender la forma en la que se trabaja allí. Cabe destacar que el buen ambiente que había en él facilitó mi adaptación al trabajo en el laboratorio. Además, realizar el Trabajo de Fin de Grado en el área de Química Analítica me ha permitido revisar y refrescar muchos de los conceptos en esta área que se estudian en los primeros cursos del Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos.

El proceso de elaboración de la memoria me ha aportado mayor destreza para buscar información bibliográfica relevante. También me ha ayudado a aprender a sintetizar mejor todos los datos recogidos durante la investigación y expresarlos de forma clara y sacando conclusiones.

En definitiva, valoro muy positivamente todo el proceso de elaboración del Trabajo de Fin de Grado por los conocimientos que aporta.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 338, de 22 de diciembre de 2005.
- Comisión del Codex Alimentarius (2014). "Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Documento de trabajo referente a la Histamina", *Comisión del Codex sobre pescado y productos pesqueros*, Bergen, 17-21 de febrero de 2014. Roma: FAO/WHO, pp. 1-12.
- Dabadé, D., Jacxsens, L., Miclotte, L., Abatih, E., Devlieghere, F. y De Meulenaer, B. (2020). "Survey of multiple biogenic amines and correlation to microbiological quality and free amino acids in foods". *Food Control*, 120. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107497
- EFSA (2011). "Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods". *EFSA Journal*, 9 (10) DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (2013). ***Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and their Biogenic Amines from Fish and Fishery Products***. Roma: FAO/WHO, pp. 88.
- Feddern, V. Mazzuco, H. Fonseca, F. N. de Lima, G. J. M. M. (2019). "A review on biogenic amines in food and feed: toxicological aspects, impact on health and control measures". ***Animal Production Science***, 59 (4), pp. 608-618.
- Khairy, G., Azab, H., El-Korashy, S., Steiner, M. y Duerkop, A. (2016). "Validation of a Fluorescence Sensor Microtiterplate for Biogenic Amines in Meat and Cheese". ***Journal of Fluorescence***, 26, pp. 1905-1916.
- Ladero Losada, V., Calles-Enrriquez, M., Fernández García, M. y Álvarez González, M.Á (2010). "Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines". ***Current Nutrition and Food Science***, 6, pp. 145-156. DOI: 10.13039/501100000780.
- Leonardo, S. y Campàs, M. (2016). "Electrochemical enzyme sensor arrays for the detection of the biogenic amines histamine, putrescine and cadaverine using magnetic beads as immobilisation supports". ***Microchimica Acta***, 183, pp. 1881-1890.
- Marcuello Banzo, L. y Galbán Bernal, F.J. (2019). ***Desarrollo de tiras reactivas para el control de aminas biógenas en productos alimenticios***. Trabajo Fin de grado. Universidad de Zaragoza.
- Önal, A., Tekkeli, S. y Önal, C. (2013). "A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods". ***Food Chemistry***, 138 (1), pp. 509-515 DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.056.
- Sanz-Vicente, I., Lopez-Molinero, A., de Marcos, S., Navarro, J., Cebrian, P., Arruego, C. y Visiedo, V. (2020). "Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in food". ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***, 412 (18), pp. 4261-4271. DOI: 10.1007/s00216-020-02677-7.
- Shalaby, A.R. (1996). *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. ***Food Research International***, 29 (7), pp.675-690. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X
- Visiedo Lafuente, V. y Sanz Vicente, M.I. (2019). ***Desarrollo de tiras reactivas para la determinación de cadaverina y putrescina: estudio de estabilizadores enzimáticos***. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.