

Tiras reactivas acopladas a Smartphones para el control de tiramina en alimentos: condiciones de inmovilización

Test strips coupled to Smartphones for the control of tyramine in food: study of immobilization conditions

Alejandra Alba Pérez

Directora: Isabel Sanz Vicente
Departamento de Química Analítica
Nanosensores y Sistemas Bioanalíticos (N&SB)
Curso 2019/2020

ABSTRACT

The presence of tyramine in some foods, such as certain cheeses and fish, can be toxic. It is for this reason that it is necessary to develop a rapid method for determining this biogenic amine. With the aim of improving the determination of tyramine through test strips, this work expects to study the optimal immobilization conditions of the reagents necessary for it.

This procedure is based on the coupling of two enzymatic reactions. In the first reaction, tyramine is oxidized to its corresponding aldehyde by the action of the enzyme tyramine oxidase (TAO). In the second enzymatic reaction, the H_2O_2 also obtained in the previous reaction, is reduced to H_2O in the presence of the peroxidase enzyme (HRP). This enzyme reverts to its reduced form, oxidizing the colourant 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), which changes from being colourless to presenting a blue colour when oxidized. It is this change in the optical properties of the TMB that allows the reaction to be monitored; this is carried out through an application on the Smartphone, thus having an autonomous system for measurements in situ.

The study of the reaction will be conducted on solid cellulose supports, in which the reagents are immobilized, acting as test strips. A series of analyzes will be carried out to observe how different parameters such as pH, the concentration of HRP, TAO, the order of immobilization, the % of cellulose or the use of stabilizers, affect the determination of tyramine.

RESUMEN

La presencia de tiramina en algunos alimentos, como ciertos quesos y pescados, puede llegar a resultar tóxica. Es por este motivo que resulta necesario el desarrollo de un método rápido de determinación de esta amina biógena. Con el objetivo de mejorar la determinación de tiramina a través de tiras reactivas, este trabajo pretende estudiar las condiciones óptimas de inmovilización de los reactivos necesarios para la misma.

Este procedimiento está basado en el acoplamiento de dos reacciones enzimáticas. En la primera reacción, la tiramina es oxidada a su correspondiente aldehído por acción de la enzima tiramina oxidasa (TAO). En la segunda reacción enzimática, el H_2O_2 también obtenido en la reacción anterior, es reducido a H_2O en presencia de la enzima peroxidasa (HRP). Esta enzima revierte a su forma reducida, oxidando al colorante 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que pasa de ser incoloro a presentar una coloración azul cuando está oxidado. Es este cambio en las propiedades ópticas del TMB lo que permite realizar un seguimiento de la reacción; esto se lleva a cabo a través de una aplicación en el smartphone, teniendo de esta forma un sistema autónomo para medidas in situ.

El estudio de la reacción se realizará en soportes sólidos de celulosa, en los cuales se inmovilizan los reactivos, actuando como tiras reactivas. Se estudiará cómo afectan a la determinación de tiramina distintos parámetros, tales como el pH, la concentración de HRP, TAO, el orden de inmovilización, el % de celulosa o el uso de estabilizantes.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Qué son las aminos biógenas.....	1
1.2. Por qué es importante su determinación.....	1
1.3. Métodos para la determinación de aminos biógenas.....	2
1.4. Método enzimático: desarrollo de tiras reactivas.....	3
2. Objetivos y planteamiento.....	4
3. Parte experimental.....	6
3.1. Reactivos y disoluciones.....	6
3.1.1. Reactivos generales.....	6
3.1.2. Disoluciones de enzimas y aminos biógenas.....	7
3.2. Instrumentación y materiales.....	7
3.2.1. Instrumentos.....	7
3.2.2. Material y aparatos.....	7
3.3. Procedimiento experimental.....	8
3.3.1. Método en disolución.....	8
3.3.2. Método en soportes sólidos.....	8
3.3.2.1. Construcción de los soportes sólidos.....	8
3.3.2.2. Medida del analito.....	9
4. Resultados y discusión.....	10
4.1. Método en disolución.....	10
4.1.1. Reacción HRP-TMB-H ₂ O ₂	10
4.1.1.1. Posibles productos de oxidación TMB.....	10
4.1.1.2. Reacción HRP-TMB-H ₂ O ₂	12
4.1.2. Reacción HRP-TMB-TAO-tiramina.....	14
4.2. Método en soportes sólidos.....	15
4.2.1. Ensayos previos.....	15
4.2.2. Reacción HRP-TMB-H ₂ O ₂	16
4.2.3. Acoplamiento TAO.....	18

4.2.3. Acoplamiento TAO.....	18
4.2.4. Optimización condiciones de inmovilización.....	19
4.2.4.1. Estudio concentración HRP.....	19
4.2.4.2. Estudio del % celulosa.....	19
4.2.4.3. Estudio del pH	20
4.2.4.4. Calibración tiramina.....	20
4.2.4.5. Estudio concentración TAO.....	21
4.2.4.6. Estudio del uso de estabilizantes.....	22
5. Conclusiones.....	23
6. Bibliografía.....	24

1. Introducción

1.1. ¿Qué son las aminas biógenas?

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular formados principalmente por descarboxilación de aminoácidos. Según su estructura química se pueden clasificar en aminas alifáticas como la putrescina, aromáticas como la tiramina o heterocíclicas como la histamina^[1] (ver figura 1). Por otra parte, atendiendo a su origen se pueden clasificar en aminas exógenas, si se ingieren a través de los alimentos, o endógenas, si provienen de la degradación en las células de moléculas biológicas.

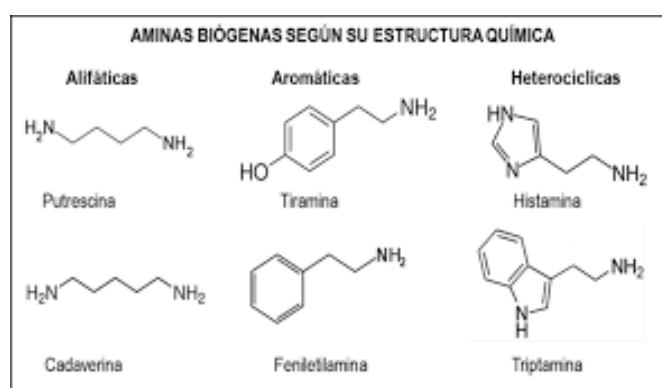


Figura 1. Clasificación de las principales aminas biógenas según su estructura química.

Este trabajo se va a centrar en la determinación de la tiramina, que se obtiene por descarboxilación del aminoácido tirosina, cuya reacción está catalizada por la enzima tiramino oxidasa (TAO).

1.2. ¿Por qué es importante su determinación?

Desde un punto de vista biológico, las aminas biógenas tienen funciones fisiológicas imprescindibles para los seres vivos, como la regulación de la temperatura corporal o del pH estomacal. Ahora bien, ciertas cantidades de estas aminas en el organismo, pueden llegar a resultar tóxicas. Por esta razón, el propio organismo tiene mecanismos capaces de eliminar las aminas biógenas gracias a enzimas como la diamino oxidasa (DAO), la tiramino oxidasa (TAO) o la histaminometil transferasa (HNMT)^[2].

Así, la capacidad tóxica de las aminas biógenas depende de la ingesta de alimentos y de la sensibilidad de los consumidores. En individuos con los sistemas de detoxificación alterados

(como déficit de MAO), puede llegar a producir efectos crónicos: síntomas gastrointestinales, cutáneos, neurológicos^[3].

La aminas biógenas pueden desarrollarse en una gran cantidad de alimentos, especialmente en aquellos con un alto contenido proteico, es decir, con gran número de aminoácidos libres. Algunos de estos alimentos son: alimentos fermentados como quesos, vino, cerveza; alimentos con facilidad a sufrir procesos de descomposición como pescado y carne^[4].

Las intoxicaciones más frecuentes se relacionan con la histamina y la tiramina, cuyos aminoácidos precursores son la histidina y la tirosina, respectivamente. La intoxicación por histamina, presente en el pescado y derivados en cantidades significativas, es la más conocida y la única para la que existe una legislación en cuanto a su concentración se refiere. En esta se establece un límite de 100 mg/kg para pescados de la familia de los escómbridos y cupleidos y de 200 mg/kg para salmueras. ^[5]

La tiramina se encuentra, en cantidades que pueden resultar tóxicas, en productos cárnicos y quesos. Algunos de los síntomas indicativos de una intoxicación por tiramina son dolor de cabeza o un aumento de la presión arterial. Recientemente, se ha demostrado que la tiramina participa, además, en el proceso de adhesión de algunos microorganismos patógenos, como la *Escherichia coli*, a la mucosa gástrica. ^[6]

La presencia de aminas biógenas en alimentos está asociada a la previa visualización del deterioro de los mismos, por esto pueden ser un indicador de la frescura y la calidad de ciertos productos ^[7]. Por esta razón, su detección y posterior determinación en la cadena alimentaria tiene gran importancia.

1.3. Métodos para la determinación de aminas biógenas

En la actualidad existen diferentes procedimientos analíticos capaces de determinar y cuantizar las aminas biógenas en alimentos. La mayoría de ellos son electroquímicos, espectrofotométricos y cromatográficos^[1].

De todos los métodos anteriores los cromatográficos son los más usados; como cromatografía de capa fina, de gases y líquida de alta resolución (HPLC), siendo esta última la más utilizada. La determinación de aminas biógenas por HPLC está basada en métodos de detección UV y/o fluorescencia que requieren derivatización con cloruro de dansilo, entre otros. ^[8]

Para determinar tiramina en queso es necesario preparar la muestra homogeneizando con ácido perclórico, centrifugando y tratándola con cloruro de dansilo. Una vez preparada la muestra, se inyecta en el cromatógrafo, utilizando un gradiente de elución con una mezcla de acetato de amonio y acetonitrilo. La concentración de tiramina en la muestra se calcula por comparación de las áreas de los picos con los estándares de referencia ^[9].

Aunque la determinación por cromatografía HPLC presenta gran precisión y exactitud, es un procedimiento que resulta largo y costoso; por ello parece imprescindible crear un método de determinación rápido e *in situ*, para suplir esta necesidad y lograr conocer la cantidad de amina biógena que contiene un determinado alimento de manera casi inmediata.

El grupo de investigación de Nanosensores y Sistemas Bioanalíticos (N&SB) de la Universidad de Zaragoza ha estado trabajando en el desarrollo de tiras reactivas de un solo uso, basadas en el método enzimático, para la determinación de aminas biógenas en alimentos.

1.4. Método enzimático: desarrollo de tiras reactivas

La evaluación de la cantidad de aminas biógenas presentes vendrá guiada por un método enzimático^[10], es decir, una serie de reacciones en serie controladas principalmente por enzimas. Su elevada especificidad las hace idóneas para este tipo de determinación, ya que catalizan la reacción e interaccionan con ciertas moléculas de una manera única. En la figura 2 pueden verse la secuencia de las dos reacciones en las que tienen su fundamento las tiras reactivas basadas en este método:

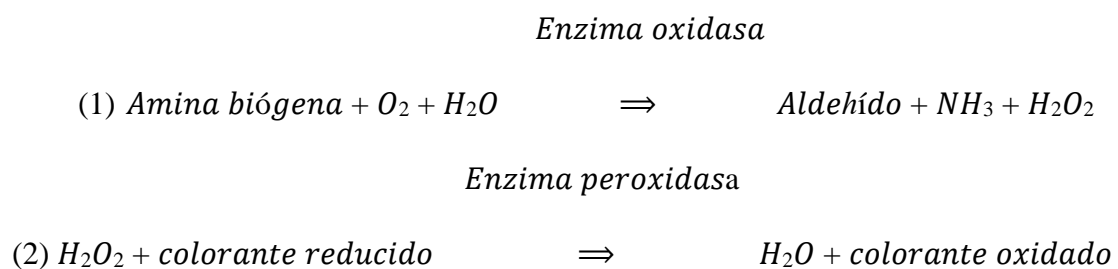


Figura 2^[11]. Esquema de las reacciones en las que se basan las tiras reactivas monouso para la determinación de aminas biógenas.

- En la primera reacción se oxida la amina a su correspondiente aminoácido gracias a la presencia de enzima oxidasa, dando también amoniaco y peróxido de hidrógeno.
- La segunda es una reacción redox en la que el H₂O₂ obtenido en la primera se reduce por acción de una enzima peroxidasa. A su vez, un colorante se oxida generando un

cambio de color observable. Es este cambio de color el que permitirá realizar un seguimiento de la reacción.

Existen diferentes enzimas oxidasas en función de la amina biógena a la que oxidan. Algunas son específicas y solo pueden oxidar un determinado analito, como la tiramina oxidasa (TAO) que oxida la tiramina; otras, como la diamino oxidasa (DAO) son capaces de oxidar diaminas como la cadaverina y putrescina.

El grupo de investigación de Nanosensores y Sistemas Bioanalíticos (N&SB) ha realizado estudios con varios colorantes, medidos en disolución con un espectrofotómetro, como el ABTS, Amplex Red o TMB, obteniéndose muy buenos resultados. Este estudio empleará el TMB, por ser el más adecuado para procedimientos de tipo enzimático.

Para la construcción de las tiras, los reactivos se inmovilizan en un soporte sólido hecho de celulosa, capaz de inmovilizar tanto el colorante, como las enzimas. Estas tiras reactivas son enzimáticas-colorimétricas: están basadas en el método enzimático y en ellas se controla la cantidad de amina biógena mediante métodos visuales y de imagen.

Las medidas del color en tiras reactivas se realizan a través de una aplicación usando un teléfono inteligente, *Smartphone*. Esta aplicación es capaz de leer en código RGB, basado en una descomposición de cualquier color en los tres primarios (rojo, verde y azul), considerando cada uno de ellos como una coordenada cartesiana dentro de un cubo de lado uno ^[12] (ver figura 3).

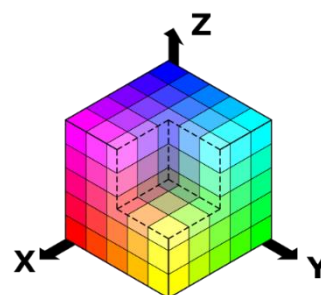


Figura 3. Descripción gráfica del modelo RGB.

2. Objetivos y planteamiento

El objetivo principal de este trabajo es estudiar cuáles son las mejores condiciones de inmovilización de reactivos para la construcción de tiras reactivas, para determinar tiramina en alimentos. Con este fin se realizará un estudio basado en la siguiente reacción:

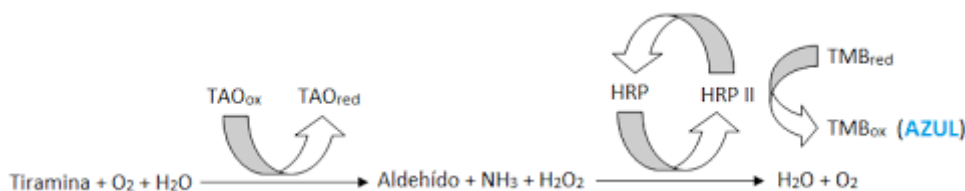


Figura 4. Esquema de las reacciones para la determinación de tiramina.

La tiramina es oxidada al correspondiente aldehído en presencia de la enzima tiramina oxidasa (TAO), obteniéndose H₂O₂ como uno de los productos de la reacción. Éste es reducido a H₂O en un proceso redox al reaccionar con la enzima peroxidasa HRP. La HRP revierte a la forma reducida, oxidando al colorante 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que pasa de ser incoloro en su forma reducida, a presentar una coloración azul cuando se oxida. Es este cambio en las propiedades ópticas del TMB lo que permite llevar a cabo un seguimiento de la reacción y, por lo tanto, la determinación de la tiramina.

La determinación de tiramina en disolución ha sido estudiada en un TFG previo, por ello todas las concentraciones están optimizadas. También se realizaron unas primeras medidas en soportes sólidos, aunque no se consiguió observar el color azul necesario para la determinación.

Este trabajo pretende continuar ese estudio, centrándose en hallar las condiciones óptimas de inmovilización de los reactivos en los soportes sólidos de celulosa (tiras reactivas) y, se dividirá en dos partes:

- En la primera parte se estudiará la reacción en disolución por espectrometría de absorción molecular UV-vis para comprender su fundamento y aprender a manejar el material y los reactivos, especialmente las enzimas, y conseguir así reproducibilidad.
- En la segunda parte se pasará al estudio de la reacción en soportes sólidos de celulosa, en la cual se inmovilizan los reactivos. En esta parte se realizarán una serie de estudios para observar cómo afectan distintos parámetros como el pH, la concentración de HRP, TAO, el orden de inmovilización, el % de celulosa o el uso de estabilizantes a la determinación de tiramina mediante estas tiras reactivas.

Con la finalidad de conseguir los objetivos, el trabajo se va a estructurar de esta forma:

1. Consultar material bibliográfico para adquirir conocimiento sobre el tema.
2. Aprender a manejar correctamente un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis y así poder comprobar los resultados obtenidos en el grupo de investigación de la reacción en disolución.

3. Comprobar también los resultados de la reacción en soporte sólido y con ello aprender a elaborar los soportes de celulosa y a manejar la aplicación para llevar a cabo las medidas con el Smartphone.
4. Estudio de diferentes parámetros que afectan a la inmovilización: pH, % celulosa, concentración de HRP o TAO y momento del secado en el que se adicionan estas.
5. Realizar un estudio de la influencia del uso de estabilizantes en la reacción en soporte sólido.

Con todo esto se pretende:

- Conocer y aplicar las diferentes etapas del Método Científico para la resolución de un problema en Química Analítica.
- Utilizar de forma integrada los conocimientos adquiridos en Química Analítica a lo largo del Grado como son: la correcta utilización del material y los instrumentos, el desarrollo de un protocolo de trabajo detallado, la evaluación de parámetros de calidad de un método analítico (sensibilidad, rango de aplicación, etc.), el tratamiento estadístico y la correcta presentación de los resultados.

3. Parte experimental

3.1. Reactivos y disoluciones

3.1.1. Reactivos generales

- 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (**TMB**) de pureza mayor del 99% (Sigma-Aldrich 860336). Para preparar la disolución se pesan exactamente alrededor de 2,5mg y se disuelven en 1mL de DMSO y se diluye hasta obtener la concentración adecuada.
- Disolución comercial de peróxido de hidrógeno, **H₂O₂** 33% (m/V) (Panreac 131077.1211).
- Disoluciones amortiguadoras de H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0,1M que se preparan disolviendo 4,26g de Na₂HPO₄ (Panreac 131679.1211) en 300mL de agua milli-Q y ajustando al pH requerido con una disolución de HCl 1M.
- **Celulosa** de 20 micras n° 310697 de Aldrich.
- **Estabilizantes:**

- StabilGuard Immunoassay Stabilizer. Product (SGIS) N° SC01-0050. 299.
- StabilCoat Immunoassay Stabilizer. Surmodics. Product (SCIS) N°SG01-0050. 298.
- StabilZyme Select Stabilizer. Product (SZSS) N° SZ03-CF02-00508. 297.
- StabilZyme Protein-Free. Product (SZPF) N° SZPF-CF01-0050. 296.

3.1.2. Disoluciones de enzimas y aminos biógenas

- Enzima peroxidasa (**HRP**) de 88,16 U/mg (Sigma-Aldrich EC1.11.1.7.). La disolución se prepara disolviendo aproximadamente 2,5mg de enzima en 1mL de disolución tampon de pH 6 y haciendo diluciones hasta alcanzar la actividad que deseamos.
- Enzima tiramina oxidasa (**TAO**) de 4,6 U/mg (Asahi kasei pharma T-25). Disolución preparada disolviendo aproximadamente 11mg de enzima en 1mL de agua milli-Q.
- **Tiramina** (Tiramyne hydrochloride) 98 % pureza (Sigma-Aldrich 53300). Para preparar la disolución de esta amina biógena se pesa entre 5 y 10mg, se disuelven en 1mL de tampon de pH 6 y se hacen las diluciones necesarias hasta obtener la concentración requerida.

3.2. Instrumentación y materiales

3.2.1. Instrumentos

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Agilent 8453A, con lámparas de deuterio, red de fotodiodos y un rango de medida comprendido entre 190 y 1100 nm.
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión $\pm 0,01$ mg.
- pH-metro CRISON, Basic 20.
- Teléfono móvil Xiaomi Redmi Note 8 Pro con una cámara integrada de 64 megapíxeles y sistema operativo Android 9 con aplicación Color Grab®, del equipo Loomatix, capaz de recoger, capturar y reconocer colores en código RGB.

3.2.2. Material y aparatos

- Vasos de precipitados.
- Micropipetas Socorex de volúmenes 5-50 μ L, 10-100 μ L y 100-1000 μ L.
- Material desechable: puntas de micropipetas, Eppendorf, pipetas Pasteur y tubos Falcon.
- Cubeta de vidrio Hellma de 1 cm de paso óptico.

- Agitador magnético A-01, SBS.
- Filtro óptico Kodak amarillo que corta por debajo de 390 nm.
- Ordenador con el software Agilent ChemStation para la interpretación de datos.
- Placas de pocillos Nunc™.
- Incubadora OVAN modelo OM10 E.
- Soporte de laboratorio.
- Pinza de cuatro dedos sin nuez.

3.3. Procedimiento experimental

3.3.1. Método en disolución

Las medidas en disolución se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis, que permite medidas cinéticas, utilizando cubetas de vidrio de 1cm de paso óptico y un filtro óptico que absorbía la luz de longitud de onda de hasta 390nm, para así evitar que se degradara el TMB.

El volumen total puesto en la cubeta para cada medida fue de 2mL y, primero, se realizaba la medida de un blanco con disolución amortiguadora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 6. Para llevar a cabo las medidas, se adicionaban sobre la disolución amortiguadora los reactivos: HRP 0,6U/mL y TMB $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ en el caso de la determinación de H_2O_2 ; HRP 0,6U/mL, TMB $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ y TAO 0,5U/mL si lo que se determina es la tiramina (concentraciones de los reactivos en cubeta) y se daba comienzo a la medida registrando la variación de absorbancia con el tiempo a la longitud de onda de 650 nm.

A los 90s aproximadamente, cuando la línea base ya se había estabilizado, se inyectaban 20 μL de analito (H_2O_2 $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ o tiramina $4,06 \cdot 10^{-6}\text{M}$) y, como consecuencia de la reacción, se producía un aumento de la absorbancia; cuando la señal de esta se estabilizaba, se daba por finalizada la medida.

3.3.2. Método en soportes sólidos

3.3.2.1. Construcción de los soportes sólidos

Sobre una dispersión de celulosa al 3%, se añaden los reactivos necesarios y, a continuación, se depositan 75 μL de la misma en los orificios de una tapa de placa de pocillos,

que actúa como molde (ver figura 5). Se deja secar 2h a 35°C en la incubadora y, tras el tiempo de secado, la dispersión de celulosa se convierte en un soporte sólido con los reactivos inmovilizados en él (ver figura 6).

El TMB $6 \cdot 10^{-4}M$ se añade directamente a la dispersión de celulosa; con el resto de los reactivos (HRP 0,2U/pocillo y TAO 0,5U/pocillo; de todos ellos se añaden 10 μ L) se experimentará en qué momento hay que adicionarlos, si junto al TMB o después del secado. En este último caso habrá que dejar secar la placa unos 15 minutos más en la incubadora.

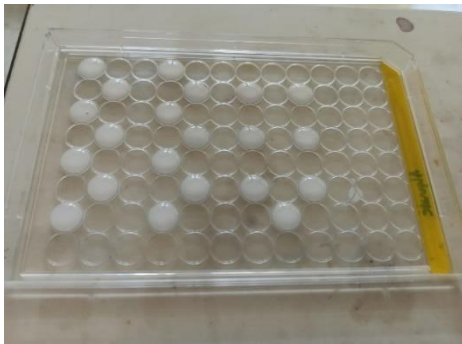


Figura 5. Placa antes del secado.

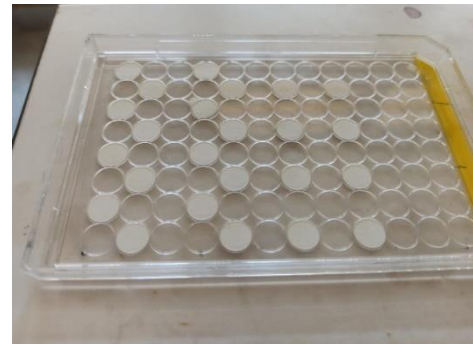


Figura 6. Placa después del secado.

3.3.2.2. Medida del analito

Antes de empezar a medir, sujetamos el teléfono móvil a una pinza de cuatro dedos sin nuez, colocada en un soporte de laboratorio. Con esta disposición nos aseguramos de dos cosas: por una parte, de que el móvil está en la misma posición durante todas las medidas y, por otra, de que a la placa, colocada debajo y sobre una superficie blanca, le llega siempre la misma luz, ya que de no ser así podría cambiar la reproducibilidad de las medidas (ver figura 7).



Figura 7. Dispositivo utilizado para realizar las medidas.

Una vez la placa se encuentra seca y colocada en la posición correcta, se puede proceder a realizar la medida. Esta se lleva a cabo a través de la aplicación Color Grab®, colocando el círculo que indica dónde está realizando la medida, en el pocillo de interés. Antes de añadir el analito, se lleva a cabo una primera medida de la coordenada R del pocillo, esta será la señal de blanco (R_0).

Finalmente, se adicionan 10 μ L del analito a determinar, y se aprecia cómo el pocillo va adquiriendo un color azul. Esta variación se puede seguir a través del cambio de la coordenada R en la aplicación. Cuando esta sea estable, se considera que se han alcanzado las condiciones óptimas, y se anota el valor de R (R_M). La señal final será el resultado de restar R_M al valor del blanco, R_0 ($R_0 - R_M$). Para evitar que varíen las condiciones de luminosidad de la placa, antes de medir el siguiente pocillo es esta la que se desliza, y no el teléfono móvil.

Dentro del código RGB se va a utilizar la coordenada R, ya que, en un estudio anteriormente realizado para comprobar cómo variaban las coordenadas en función de la concentración del colorante TMB, H_2O_2 y enzima peroxidasa se observó que, de las tres coordenadas, esta era la única que mostraba cambios significativos a lo largo de la reacción y, además, presentaba una relación lineal entre la señal y la concentración ^[13].

4. Resultados y discusión

Este trabajo se va a dividir en dos partes: en la primera, se va a estudiar la reacción enzimática en disolución a través de un espectrómetro de absorción molecular UV-vis, y en la segunda, se pasará a su estudio en soportes de celulosa. En esta segunda parte se realizará, no solo el estudio de la reacción, sino también estudios para conocer cómo afectan a esta las distintas condiciones de inmovilización de los reactivos.

4.1. Método en disolución

4.1.1. Reacción HRP-TMB- H_2O_2

4.1.1.1. Posibles productos de oxidación TMB

La reacción de oxidación del TMB se puede ver en la figura 8. A pesar de que este trabajo realiza un seguimiento de la absorbancia correspondiente al color azul, debido a que un producto de la oxidación es de este color. Cabe mencionar que hay otro posible producto, con una coloración distinta: amarilla ^[14].

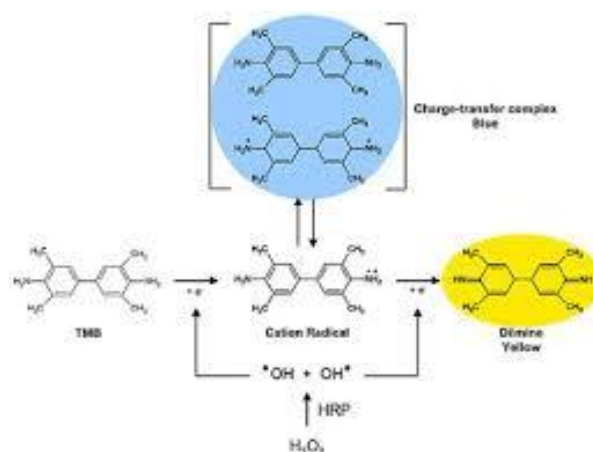


Figura 8. Estructura química de los dos posibles productos de oxidación del TMB.

Como se observa en la figura 8, la coloración azul se debe a la formación de un complejo de transferencia de carga compuesto por una diamina (dador de electrones) y una diimina (aceptor de electrones). Por otro lado, también se puede formar un radical catiónico, en cuyo caso se observará un color amarillo.

Sabemos, gracias a estudios anteriores, que el color azul corresponde con el máximo a 650nm y el amarillo con el de 450nm del espectro de absorción. Desde un punto de vista analítico, la percepción y detección del color azul tiene más ventajas que la del amarillo. Por esta razón, a lo largo de todo el trabajo se va a intentar obtener un color azul estable, y las medidas presentadas se corresponden con las de 650nm.

La aparición de un producto u otro, depende de la relación en la disolución de las concentraciones de TMB y H₂O₂, como puede verse en la figura 9. Para una relación igual o menor a 1:1, se observa el color amarillo; mientras que para una relación igual o mayor a 2:1 se puede observar el color azul.

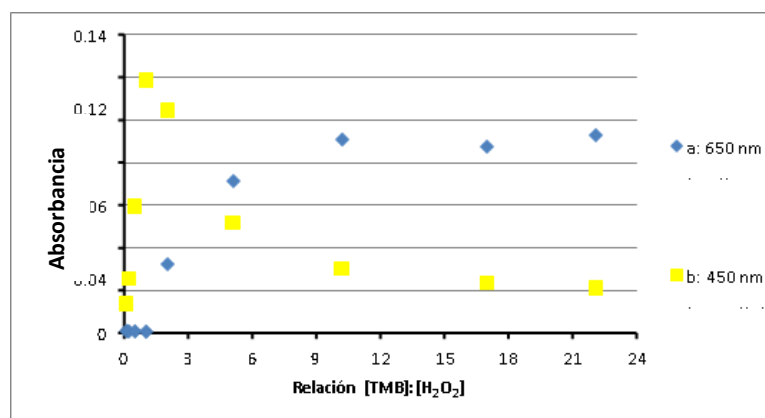


Figura 9^[12]. Representación de la absorbancia frente a la relación de [TMB]:[H₂O₂] a 450 y 650nm. [H₂O₂]= 2,45·10⁻⁶ M, [HRP]= 0,12 U/mL, pH=6.

Se observa, además, que al aumentar la concentración de TMB, la señal obtenida a 650 nm va aumentando hasta que llega a un valor determinado, a partir del cual se mantiene constante. El primer valor de concentración que da dicha señal es $2,69 \cdot 10^{-5}$ M, aproximadamente diez veces superior al de la concentración de H_2O_2 . Por lo tanto, se deduce que, para obtener las mayores señales de absorbancia posibles a 650 nm, la concentración de TMB en cubeta debe ser diez veces superior a la de H_2O_2 , es decir, la relación $[TMB]:[H_2O_2]$ debe ser 10:1. ^[15]

4.1.1.2. Reacción HRP-TMB- H_2O_2

Se comienza prescindiendo de la reacción de oxidación de la tiramina para estudiar la reacción enzimática entre el H_2O_2 y la enzima peroxidasa (HRP), como se observa en la figura 10.

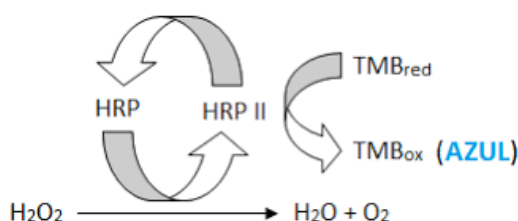


Figura 10. Esquema de la reacción HRP-TMB- H_2O_2 .

Ahora, en la figura 11 podemos ver un ejemplo de la cinética de la reacción en un espectrómetro de absorción molecular. Para realizar la medida, primero se vierte en la cubeta una disolución formada por tampón de pH 6, TMB y HRP y comenzamos a medir a 650nm para obtener la línea base y, a los 90s aproximadamente, se inyectan 20 μ L de H_2O_2 (vemos como aumenta la absorbancia) y continuamos la medición hasta que la señal se estabiliza.

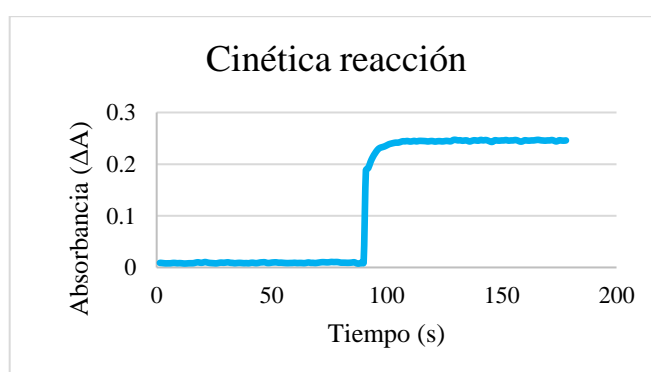


Figura 11. Ejemplo cinética de reacción de H_2O_2 .
 $[H_2O_2]=1 \cdot 10^{-5}$ M, $[TMB]=1 \cdot 10^{-4}$ M, $[HRP]=0,12$ U/mL y pH=6, $\lambda =650$ nm.

Para conocer el rango de respuesta lineal, se realizó una calibración de H_2O_2 , con concentraciones comprendidas entre $2 \cdot 10^{-7} M$ y $1 \cdot 10^{-4} M$ inclusive. En la figura 12 se puede observar la cinética de la reacción a 650nm para las distintas concentraciones de H_2O_2 y cómo, en todas ellas, la señal de absorbancia depende de esta. Mientras que en la figura 13 se muestra la calibración, obteniéndose un rango lineal entre $2 \cdot 10^{-7}$ y $7 \cdot 10^{-6} M$.

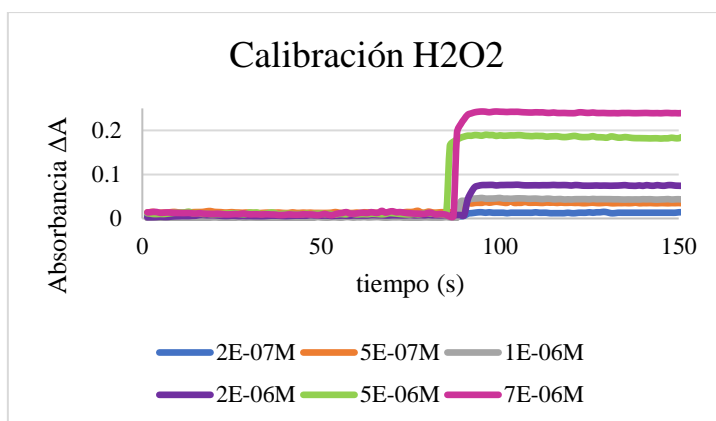


Figura 12. Cinéticas de reacción en función de $[H_2O_2]$.
 $[TMB]= 1 \cdot 10^{-4} M$, $[HRP]= 0,6 U/mL$, $pH=6$, $\lambda =650 nm$.

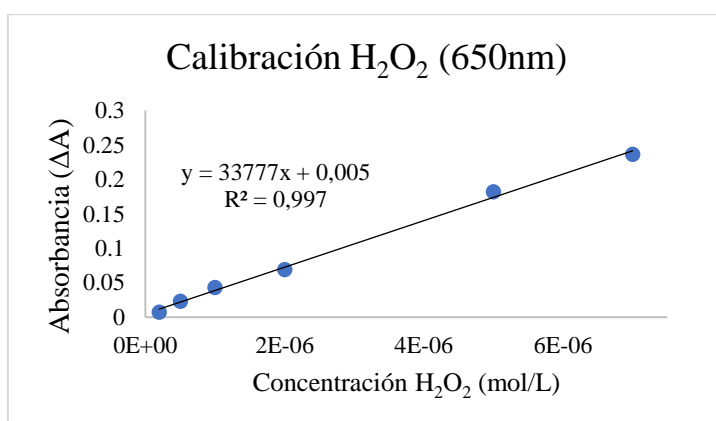


Figura 13. Recta calibración H_2O_2 en disolución.
 $[TMB]= 1 \cdot 10^{-4} M$, $[HRP]= 0,6 U/mL$, $pH=6$, $\lambda =650 nm$.

En cuanto a la reproducibilidad. Los valores de absorbancia obtenidos para varias medidas de H_2O_2 $7 \cdot 10^{-6} M$, se pueden ver en la tabla 1; cada dato se corresponde con la diferencia entre el valor máximo alcanzado, y el de la línea base antes de inyectar el H_2O_2 .

Tabla 1. Datos de absorbancia obtenidos para las distintas medidas de H_2O_2 .

N	1	2	3	4	5	6	7
ΔA	0,239	0,238	0,234	0,229	0,241	0,230	0,236

Media:	0,235
sx:	0,005
DSR(%):	1,9

4.1.2. Reacción HRP-TMB-TAO-tiramina

El acoplamiento de la primera reacción, la de oxidación de la tiramina por la enzima TAO, implica que ahora el estudio se basa en el esquema completo de las dos reacciones (ver figura 4, página 3). El analito ahora va a ser la tiramina, que al oxidarse va a dar lugar a H_2O_2 , que reaccionará a su vez con la enzima HRP.

En la figura 14 se puede observar un ejemplo de la cinética de esta reacción completa. Primero se vierte en la cubeta una disolución formada por tampon de pH 6, TMB, HRP y TAO y se comienza a medir a 650nm para obtener la línea base y, a los 90s aproximadamente, se inyectan 20 μ L de tiramina (vemos como aumenta la absorbancia) y continuamos midiendo hasta que la señal se estabiliza.

Al estudiar la cinética de la reacción HRP-TMB- H_2O_2 , se observaba cómo cuando se inyectaba el H_2O_2 , la absorbancia aumentaba de manera muy pronunciada y alcanzaba valores de 0,25. Mientras que ahora, en el estudio de la reacción completa, se observa cómo la absorbancia crece de manera más paulatina y alcanza valores menores, algo más de 0,07. Esto se debe a que la cinética está controlada por la reacción entre la tiramina y la enzima TAO, que es lenta, por esta razón será importante optimizarla en los soportes.

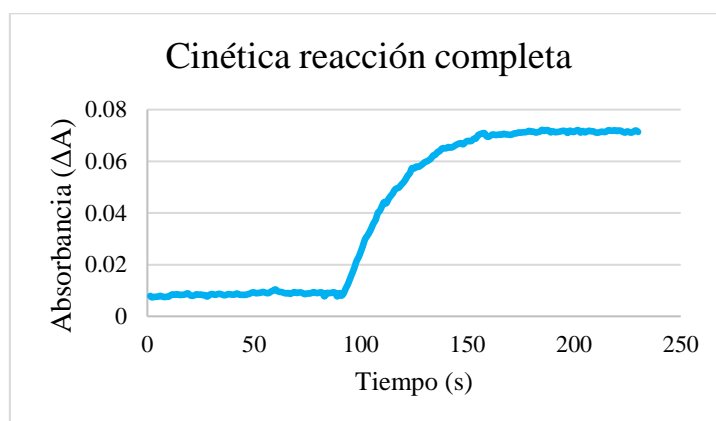


Figura 14. Ejemplo cinética de la reacción completa.

[tyr]= $4,06 \cdot 10^{-6}$ M, [TMB]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [TAO]= 0,5U/mL, [HRP]= 0,6U/mL, pH=6, λ =650nm.

Seguidamente, para conocer el rango de respuesta lineal, se hizo una calibración de tiramina con concentraciones comprendidas entre $5,18 \cdot 10^{-7}$ M y $3,3 \cdot 10^{-5}$ M, ambas incluidas. En la figura 15 se muestra la cinética de reacción con las dos enzimas y las diferentes concentraciones de tiramina a 650nm, de nuevo, la señal depende de la cantidad de esta amina biógena. En la figura 16, se puede ver la calibración, obteniéndose un rango lineal entre $5,18 \cdot 10^{-7}$ M y $8,12 \cdot 10^{-6}$ M.

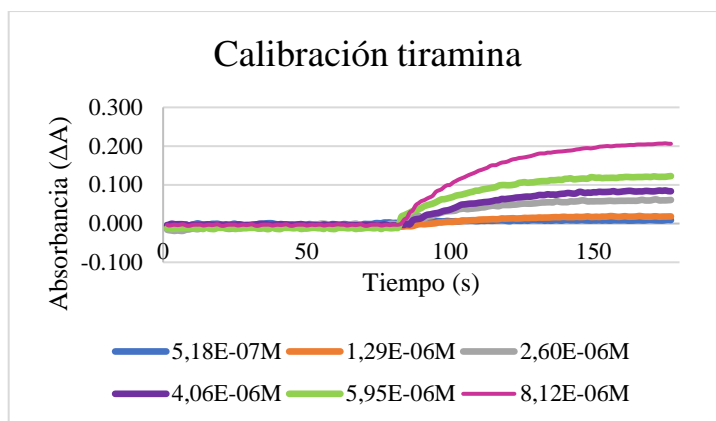


Figura 15. Cinéticas de reacción en función de [tyr].
 [TMB]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [TAO]= 0,5U/mL, [HRP]= 0,6U/mL, pH=6, $\lambda=650$ nm.

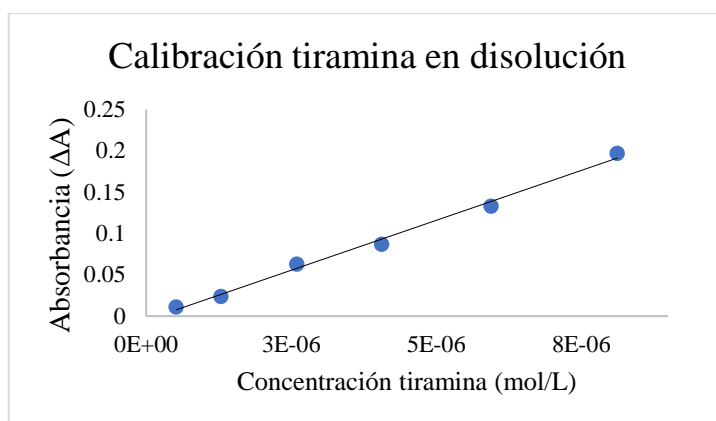


Figura 16. Recta calibración tiramina en disolución.
 [TMB]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [TAO]= 0,5U/mL, [HRP]= 0,6U/mL, pH=6, $\lambda=650$ nm.

En cuanto a la reproducibilidad del método, se realizaron distintas medidas. Cada dato de absorbancia recogido en la tabla 2, se corresponde con la diferencia entre el valor máximo alcanzado y el de la línea base antes de inyectar la tiramina.

Tabla 2. Datos de absorbancia obtenidos para las distintas medidas de tiramina.

N	1	2	3	4	5	6	7
ΔA	0,063	0,076	0,069	0,077	0,070	0,066	0,076

Media:	0,072
sx:	0,005
DSR(%):	7,6

4.2. Método en soportes sólidos

4.2.1. Ensayos previos

Uno de los problemas que pueden aparecer en el diseño de los soportes sólidos es la irreproducibilidad a la hora de depositar la dispersión de celulosa sobre el molde. Es por ello que resulta primordial realizar este primer paso correctamente.

Con este fin, se realizaron unas primeras pruebas adicionando la dispersión con la placa situada en una balanza, de esta manera se podía comprobar que, efectivamente, todos los soportes contenían la misma cantidad de dispersión. Para ello se prepararon 3 dispersiones de celulosa, 3%, 5% y 10%; de estas se adicionaron primero 75µL y después 100µL. Los resultados de reproducibilidad pueden observarse en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de reproducibilidad primer paso de elaboración de soportes.

µL adicionados	75µL			100µL		
% celulosa	3%	5%	10%	3%	5%	10%
medida±s	75,9±0,9	75,9±0,7	75,1±0,7	99,9±1,1	100,7±0,8	97,7±1,1

Una vez asegurada la apropiada elaboración de los soportes, se procedió a estudiar la reacción de oxidación de H₂O₂. Se decidió utilizar 75µL debido a que con 100µL era más complicado evitar que se saliera del soporte.

4.2.2. Reacción HRP-TMB-H₂O₂

Al igual que en disolución, se comienza prescindiendo de la reacción de oxidación de la tiramina, para realizar un estudio centrado en la reacción de la enzima HRP con el H₂O₂. La resultante oxidación del TMB hará que el soporte sólido vaya pasando de color blanco a azul.

Se llevó a cabo una primera medida (cuyos resultados pueden verse en la tabla 4), añadiendo el colorante (TMB) y la enzima HRP a la dispersión de celulosa en agua milli-Q y preparando con ella los soportes. Una vez están secos, se adiciona el analito (H₂O₂ en este caso), responsable de la aparición de la coloración azul.

Tabla 4. Datos de R_M-R₀ para la primera medida y su valor de DSR. [TMB]= 6·10⁻⁴M, [HRP]= 0,2 U/pocillo, [H₂O₂]=1·10⁻⁴M, pH=6, celulosa microcristalina al 3%.

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media:	31,0
R0-RM	33	34	30	32	31	30	31	30	30	29	sx:	1,56
											DSR(%):	5,0

Se comprueba así que, no solo se observa señal, sino que esta es reproducible.

Se procedió a estudiar otro aspecto: en qué momento añadir la enzima HRP. Con este fin se realizaron dos calibraciones de H₂O₂, la primera adicionando la enzima HRP antes del secado (junto al TMB) y la segunda después. El objetivo era comparar las dos rectas, y poder concluir cuál de las dos opciones es la más adecuada. Ambas calibraciones se realizaron con concentraciones de H₂O₂ comprendidas entre 1,5·10⁻⁵M y 3·10⁻⁴M inclusive.

La calibración añadiendo la enzima HRP a los soportes antes del secado, se muestra en la figura 17 y tiene un rango lineal entre $1,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

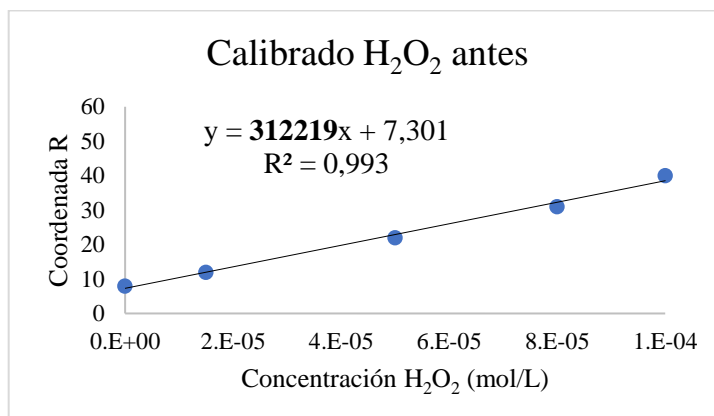


Figura 17. Recta calibración H₂O₂ añadiendo HRP antes del secado. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4} \text{M}$, [HRP]= 0,2 U/pocillo, pH=6, celulosa 3%.

La calibración añadiendo la enzima HRP a los soportes después del secado, o lo que es lo mismo, cuando la placa ya ha estado 2h en la incubadora y los soportes están listos, se muestra en la figura 18 y, como en el caso anterior, también tiene un rango lineal entre $1,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

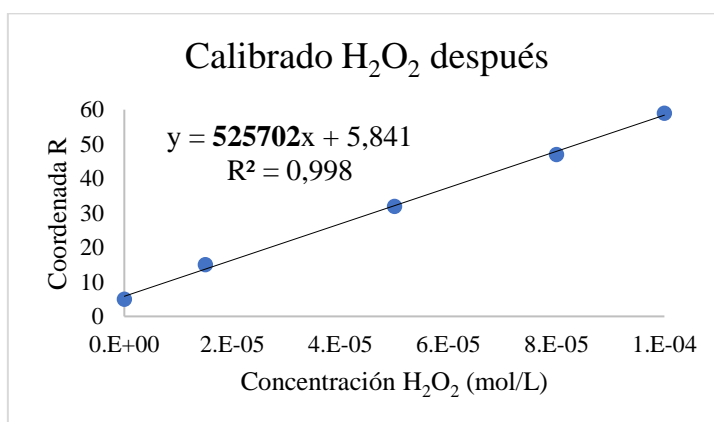


Figura 18. Recta calibración H₂O₂ añadiendo HRP después del secado. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4} \text{M}$, [HRP]= 0,2 U/pocillo, pH=6, celulosa 3%.

Con este estudio se han podido comprobar dos cosas: por un lado que la señal obtenida depende de la concentración de H₂O₂ de manera lineal en ambos casos; por otro, que se obtienen resultados mejores cuando se adiciona la enzima HRP después de secar (una pendiente de 525702 frente a 312219 si se añade antes). Para asegurar esto, se realizó un test t de comparación de rectas de calibrado, cuyo resultado se puede ver en la tabla 5.

texp	10,61
tcrit	2,31

Tabla 5. Resultados test t comparación de las calibraciones.

Debido a que el t experimental obtenido es mayor que el t crítico, se puede concluir que las rectas de calibrado son significativamente diferentes, y que la adición de la enzima HRP después del secado es más apropiada.

4.2.3. Acoplamiento TAO

A continuación, de igual forma que en el estudio en disolución, se pasó a estudiar la reacción basada en el esquema completo (ver figura 4, página 5). Es decir, la reacción de oxidación de tiramina gracias a la acción de la enzima TAO; en ella se obtiene H_2O_2 , posteriormente reducido por la enzima HRP. Simultáneamente, el TMB es oxidado, dando lugar a un cambio de color que se puede monitorizar y medir a través de la aplicación en el Smartphone.

Se llevaron a cabo medidas con distintas concentraciones de TAO, adicionada tras el secado de la placa una vez añadida la enzima HRP. Se realizaron 3 medidas por cada concentración, los resultados se encuentran en la tabla 6, mientras que en la figura 19 se puede observar la distinta coloración obtenida según la diferente cantidad de TAO. Como se puede observar, con todas ellas se obtiene señal, y esta es reproducible, al igual que dependiente de la concentración de TAO.

Tabla 6. Datos de R_M-R_0 para distintos valores de TAO. $[TMB]= 6 \cdot 10^{-4}$ M, $[HRP]= 0,2U/pocillo$, $[tyr]=4,06 \cdot 10^{-5}M$, $pH=6$, celulosa microcristalina al 3%.

[TAO] (U/p)	0,05	0,1	0,25	0,5
$(R_0-R_M) \pm s$	14 ± 1	$26 \pm 1,1$	$38 \pm 1,1$	$66 \pm 1,1$

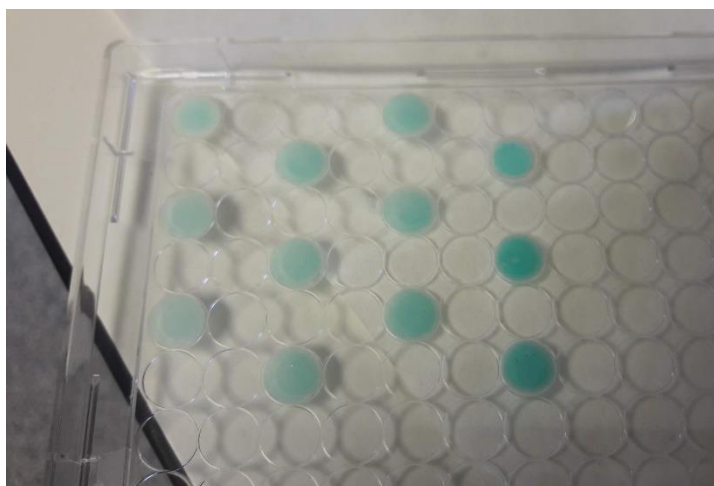


Figura 19. Diferentes señales según la concentración de TAO.

4.2.4. Optimización condiciones de inmovilización

Una vez comprobado que se obtiene la señal, se optimizaron diferentes parámetros con el objetivo de obtener la mejor señal en el mínimo tiempo posible:

4.2.4.1. Estudio concentración HRP

El primer factor que se estudió fue la concentración de la enzima HRP; para ello se prepararon soportes a los que se añadió el mismo volumen (10 μ L) de diferentes concentraciones de HRP (entre 0,1 y 0,3U/pocillo). Se midió, por duplicado, tanto la señal obtenida, como el tiempo de estabilización de la misma.

Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 7 y de ellos se concluye que, tanto la señal como el tiempo de estabilización, son independientes de la concentración de HRP. Por esta razón se continuó trabajando con una concentración de HRP de 0,2U/pocillo y se pasó a estudiar otras condiciones que pudieran a la reacción.

Tabla 7. Resultados obtenidos para distintas concentraciones de HRP. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [TAO]= 0,5U/pocillo, [tyr]= $4,6 \cdot 10^{-5}$ M, pH=6, celulosa 3%.

[HRP] U/pocillo	0,1	0,2	0,25	0,3
(R0-RM) \pm s	58,5 \pm 0,7	58,5 \pm 1,4	59 \pm 0,7	56,5 \pm 0,7
t (min) \pm s	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0

4.2.4.2. Estudio del % celulosa

El siguiente estudio se centró en el % de las dispersiones de celulosa con las que se construyen los soportes. Para ello, se prepararon distintos soportes con celulosa al 1, 3, 5 y 10%, y se llevaron a cabo las medidas por duplicado.

En la tabla 8 se pueden ver los resultados obtenidos. La celulosa al 1% se descartó debido a la baja señal obtenida con esta. Por otra parte, se observó que, trabajando con la celulosa al 3, 5 y al 10%, obtenemos señales del mismo orden.

Tabla 8. Resultados obtenidos en el estudio del % de celulosa. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,2U/pocillo, [TAO]= 0,5U/pocillo, [tyr]= $4,6 \cdot 10^{-5}$ M, pH=6.

% celulosa	1	3	5	10
(R0-RM) \pm s	11 \pm 0,0	38,5 \pm 0,7	37 \pm 0,7	34,5 \pm 1,4

4.2.4.3. Estudio del pH

El tercer factor estudiado fue el pH; para ello se prepararon 4 disoluciones tampon de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 6, 7, 8 y 9 y con ellos se hicieron las disoluciones de celulosa, HRP, TAO y tiramina. Realizando una primera medida, no se obtuvo señal, por lo que se decidió repetir las preparando la celulosa en agua milli-Q, y las disoluciones de enzimas y de tiramina con la disolución de tampon correspondiente.

Estas segundas medidas sí proporcionaron señales, de las cuales se observa que al aumentar el pH disminuye la señal, como puede verse en la figura 20. Se concluyó que el mejor pH era el de 6, ya que con él se obtiene la mayor señal.

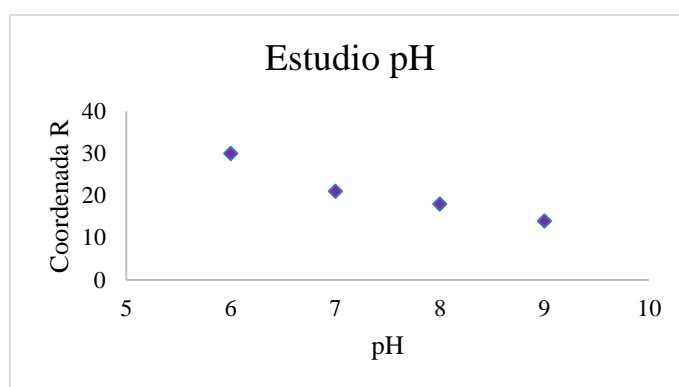


Figura 20. Estudio del pH. $[\text{TMB}] = 6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{HRP}] = 0,2\text{U/pocillo}$, $[\text{TAO}] = 0,5\text{U/pocillo}$, $[\text{tyr}] = 4,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, celulosa 3%.

4.2.4.4. Calibración tiramina

El siguiente paso es estudiar si la señal depende de la concentración. Para ello se realizó una calibración de tiramina con concentraciones comprendidas entre $7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ y $4,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, encontrando los resultados que se muestran en la figura 21.

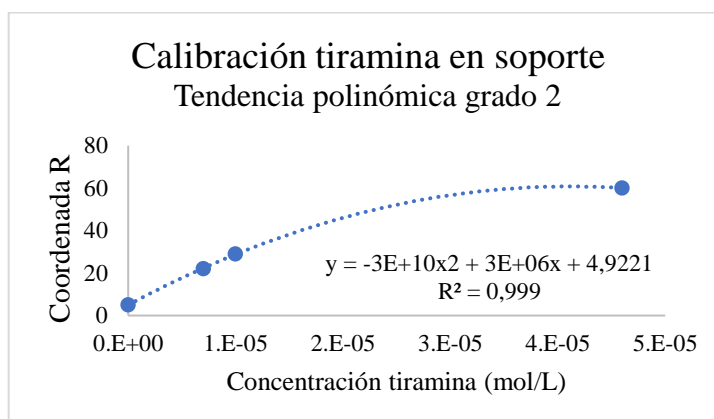


Figura 21. Calibración tiramina en soporte con tendencia polinómica. $[\text{TMB}] = 6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{HRP}] = 0,2\text{U/pocillo}$, $[\text{TAO}] = 0,5\text{U/pocillo}$, $\text{pH} = 6$, celulosa 3%.

Como se puede observar, la señal depende de la concentración hasta $4,6 \cdot 10^{-5}M$, si bien lo hace de forma polinómica. Se concluyó que, la falta de linealidad en la calibración, pudo deberse a no haber esperado a que la reacción en los soportes con mayor concentración de tiramina se estabilizara. Esto ocurrió porque se tomó la señal de R_M a los 90s en todas las medidas, sin tener en cuenta para concentraciones altas de tiramina, se necesita más tiempo de estabilización. Por ello, se decidió estudiar cómo afectaban la cantidad de la enzima TAO y el uso de estabilizantes a este tiempo de estabilización, con el objetivo de obtener la máxima señal en un tiempo razonable.

4.2.4.5. Estudio concentración TAO

Se llevó a cabo un estudio del efecto de la concentración de TAO en la señal y el tiempo de estabilización de la misma, para concentraciones altas de tiramina (se estudió también para una concentración más baja, para comprobar que no tenía efectos negativos). Con este objetivo se realizaron distintos soportes que contenían cantidades de TAO comprendidas entre 0,25 y 3U/pocillo, y se estudió cómo afectaba este factor para dos concentraciones distintas de tiramina. En la tabla 9 se pueden ver los resultados logrados.

Tabla 9. Estudio concentración TAO. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}M$, [HRP]=0,2U/pocillo, concentraciones tiramina: $4,6E-05M$; $4,6E-04M$, pH=6, celulosa 5%

[TAO]	0,25U/p		0,5U/p		1U/p		2U/p		3U/p	
(R0-RM) \pm s	27,5 \pm 0,7	79,5 \pm 0,7	26,5 \pm 0,7	102,5 \pm 0,7	27,5 \pm 0,7	116,5 \pm 0,7	27,5 \pm 0,7	120,5 \pm 0,7	25,5 \pm 0,7	127,5 \pm 0,7
tiempo	90s	10min	75s	7min	60s	5min	60s	4min	60s	2min

Se observa que, para una concentración de tiramina de $4,6 \cdot 10^{-5}M$, se obtiene siempre señales del mismo orden, sin importar la cantidad de TAO utilizada. El tiempo de estabilización sí que es dependiente de la concentración de TAO, ya que al aumentar esta se alcanza antes una señal estable, alcanzando un punto óptimo a una concentración de 1u/pocillo, a partir de la cuál el tiempo de estabilización no continua disminuyendo.

Si se aumenta la concentración de tiramina, se observa que aumenta también la señal y el tiempo de estabilización. En este caso, utilizando una concentración de $4,6 \cdot 10^{-4}M$, al aumentar la concentración de TAO, la señal aumenta, a diferencia de lo que ocurría en el caso anterior. Además, si aumenta la cantidad de TAO, disminuye el tiempo de estabilización considerablemente, consiguiendo una señal estable en dos minutos.

4.2.4.6. Estudio del uso de estabilizantes

Con el objetivo de encontrar un estabilizante adecuado para la reacción, que disminuya el tiempo de estabilización sin perjudicar la señal obtenida, se realizó un estudio con varios de estos. Este análisis se planteó de la siguiente manera: se realizaron los soportes como hasta el momento y, después de adicionar las enzimas HRP y TAO, se añadieron 10 μ L del estabilizante al pocillo. Los resultados se pueden ver en la tabla 10.

Tabla 10. Estudio de distintos estabilizantes. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,2U/pocillo, [TAO]= 0,5 U/pocillo, [tyr]= $4,6 \cdot 10^{-5}$ M, pH=6, celulosa 5%.

Estabilizante	sin	StabilZyme protein free	StabilZyme	StabilCoat	StabilGuard
(R0-RM) \pm s	33,5\pm0,7	24,5 \pm 0,7	26,5 \pm 0,0	33,5\pm0,0	24,5 \pm 0,7
t (s)	120	60	60	90	60

De este estudio se concluyó que, el estabilizante que proporcionaba los mejores resultados era el StabilCoat. Con este se consiguió disminuir el tiempo de reacción en 30s, manteniendo la misma señal alcanzada sin el estabilizante. Por el contrario, se observó que usando los otros estabilizantes, aunque el tiempo de estabilización disminuía en 60s, la señal obtenida era menor que la conseguida sin su uso.

Se procedió a realizar un estudio en profundidad del uso del estabilizante StabilCoat, por ser el que mejor resultado ha proporcionado en el estudio anterior, centrado en su capacidad para estabilizar las enzimas antes de su inmovilización. Para ello se añadió el estabilizante a la disolución de las enzimas HRP y TAO; preparando tres disoluciones distintas, con estabilizante al 25%, al 50% y al 75%.

Este estudio se subdividió en dos: unos soportes se medían directamente tras adicionar la disolución de enzimas y estabilizante (- en la tabla 11), mientras que a otros se les añadía, además de esta, 10 μ L del estabilizante al 100% (+ en la tabla 11). Cada una de las medidas se realizó por duplicado, los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 11 y de ellos se deduce que, las medidas no mejoran respecto a las de la tabla 10.

Tabla 11. Estudio del estabilizante 298 en la disolución de enzimas. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]=0,2U/pocillo, [TAO]= 0,5U/pocillo, [tyr]= $4,6 \cdot 10^{-5}$ M, pH=6, celulosa 5%.

298	sin		25%		50%		75%	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(R0-RM) \pm s	31 \pm 0.0	28 \pm 0.0	31.5 \pm 0.7	28 \pm 0.0	27.5 \pm 0.7	26 \pm 0.7	25 \pm 0.7	22 \pm 0.7
tiempo	120s	90s	120s	90s	90s	75s	60s	60s

Para comprobar que la señal continuaba dependiendo de la concentración de analito, se diseñó el mismo estudio realizado en la tabla 10, ahora con dos concentraciones diferentes de tiramina: otra inferior ($1,0 \cdot 10^{-5}$ M) y una superior ($4,6 \cdot 10^{-4}$ M); los resultados de la concentración inferior se pueden ver en la tabla 12. No solo se comprobó la dependencia de la señal con la concentración de tiramina, sino también la concordancia con los resultados anteriores: el estabilizante StabilCoat proporciona la misma señal que sin su uso, alcanzándose esta en un menor tiempo de estabilización.

Tabla 12. Estudio dependencia señal con la concentración. [TMB]= $6 \cdot 10^{-4}$ M, [HRP]= 0,2U/pocillo, [TAO]= 0,5U/pocillo, [tyr]= $1,0 \cdot 10^{-5}$ M, pH=6, celulosa 5%.

Estabilizante	sin	StabilZyme protein free	StabilZyme	StabilCoat	StabilGuard
(R0-RM) \pm s	21\pm0,7	14 \pm 0,7	15 \pm 0,0	21\pm0,0	15 \pm 0.7
t (s)	90	45	45	60	45

Los resultados correspondientes a la concentración superior no pudieron terminarse debido a la situación del confinamiento. En estudios futuros, podría continuarse con este estudio de los estabilizantes, realizarse un estudio de reproducibilidad del método y repetir la calibración de la reacción completa, ahora con todas las condiciones de inmovilización optimizadas.

5. Conclusiones

En el estudio de las condiciones óptimas de inmovilización de los reactivos necesarios para la determinación de tiramina en soportes de celulosa, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

- La reacción en disolución de tiramina ($4,06 \cdot 10^{-6}$ M) con las enzimas HRP (0,6U/mL) y TAO (0,5U/mL) resulta en la oxidación del colorante TMB ($1 \cdot 10^{-4}$ M). La aparición del color azul que esto produce es lo que permite la determinación de tiramina.
- La reacción en soportes sólidos, se puede seguir a través de una aplicación capaz de leer en código RGB, debido a la relación lineal entre concentración de tiramina y la coordenada R.
- Se ha conseguido inmovilizar los reactivos en soportes sólidos de celulosa, haciéndolos sensibles a la tiramina y consiguiendo una señal medible.

- Se comparó la posibilidad de adición de HRP antes o después del secado de los soportes en la reacción HRP-TMB-H₂O₂ y se concluyó que añadirla después era la más adecuada.
- De un primer acoplamiento de la enzima TAO a la reacción, se comprobó que la señal depende de la concentración de la misma si esta es menor o igual a 0,5U/mL.
- Se demostró que, tanto la señal obtenida como el tiempo de estabilización de la misma son independientes de la concentración de HRP.
- Se comprobó que el pH 6 era el óptimo para la reacción en soporte sólido, al igual que lo era en disolución, y que la celulosa al 3, 5 o 10% proporcionan señales del mismo orden.
- Se demostró que el uso de estabilizantes no afectaba a la dependencia de la señal con la concentración y que el más apropiado para esta reacción era el estabilizante StabilCoat.
- Se concluyó que, para concentraciones de TAO superiores a 25U/mL, la señal es independiente de la misma para la concentración de tiramina utilizada, $4,6 \cdot 10^{-5}M$.

6. Bibliografía

- [1] Fernández, M.; Álvarez, M. A. (2008). Las Aminas Biógenas en los alimentos. Agrocisc.
- [2] Callejón Salinas, S. (2016). Degradación de aminas biógenas mediante sistemas microbianos. Identificación y caracterización de las enzimas responsables. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- [3] Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla M. L., Garriga, M. y Vidal-Carou, C. (2005). “Aminas biógenas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control”. Eurocarne, 141, pp.1-5. Disponible en (consultado 09/09/2020):
<http://www1.clermont.inra.fr/tradisausage/Publi/Spain/Eurocarne%20141.pdf>
- [4] EFSA. (2011). “Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods”. EFSA Journal, 9(10) 2391:2393. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393.
- [5] 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.

- [6] Ruiz-Capillas Pérez, C.; Jiménez-Colmenero, F. (2010). Aminas biógenas: importancia toxicológica. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). Consejo Superior de Investigaciones Científicas; Madrid, España.
- [7] Bayo Rodriguez, Francisco. Aminas biógenas y seguridad alimentaria. Imagen Pp.3/Pp. 5-23. URL (consultado 09/09/2020): <https://docplayer.es/21115085-Aminas-biogenas-y-seguridad-alimentaria.html>
- [8] Fuentes López, A., Fernández Segovia, I., & García Martínez, E. M. (2017). Determinación de Aminas Biógenas Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
- [9]. Contreras, Mary, Izquierdo, Pedro, Allara, María, García, Aiza, Torres, Gabriel, & Céspedes, Euclimar. (2007). Determinación de aminas biógenas en quesos madurados. Revista Científica, 17(1), 89-95.
- [10].Koolman, J., & Röhm, K. H. Bioquímica: texto y atlas. Ed. Médica Panamericana. (2005). Pp. 52-72
- [11] Lange, J.; Wittmann, C. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. Special Issue Paper 2001, Anal Bioanal Chem 372 (2002), 276-283; DOI 10.1007/s00216-001-1130-9.
- [12] Zelanski, P., & Fisher, M. P. Color (Vol. 48). Ediciones AKAL (2001).Pp.13-15
- [13] Cebrián Aznárez, Pablo. Desarrollo de tiras reactivas colorimétricas para la determinación de aminas biógenas. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza. Departamento de Química Analítica. Grupo de Biosensores Analíticos (GBA). 2018.
- [14] Josephy, P. D.; Eling, T.; Mason, P. The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine. The Journal of Biological Chemistry 1982,257 (7), 3669-3675.
- [15] Oliver Ledesma, Sofía. Determinación rápida y específica de tiramina. Desarrollo de tiras reactivas para el control de calidad en alimentación. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza. Departamento de Química Analítica. Grupo de Biosensores Analíticos (GBA). 2018.