



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

DESARROLLOS EN MICROFLUIDICA COMO TÉCNICA PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODOS RÁPIDOS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE AMINAS

MICROFLUIDIC DEVELOPMENTS AS TECHNIQUE
FOR THE IMPLEMENTATION OF FAST METHODS
IN QUALITY CONTROL OF AMINES

Autor/es

ANDREA GARCÍA CUBERO

Director/es

ÁNGEL LÓPEZ MOLINERO

Titulación del autor

GRADO EN QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ANALÍTICA

FACULTAD DE CIENCIAS

Año 2021

ABSTRACT

Work has been done on the analytical determination of biogenic amines, ABs -tyramine as a model- by colorimetric reaction with Au nanoparticles and on paper microfluidic support. The color measurement is carried out by the 'Digital Image Colorimetry, DIC' technique, with digital cameras-Smartphone to obtain RGB basic colors and their subsequent relationship with concentration. It has been oriented to its application in fast food control.

The paper microfluidics technique has required the study of different chromatographic papers, their flow and detection characteristics; as well as practical considerations in the preparation of reaction chips-supports. After its study, it has been considered that the Whatman grade 4 paper chips in the shape of circular discs of 8 mm diameter prepared by cutting with a metal mold have been the ones that could provide us with the best results in our reaction.

In the first place, experiments have been carried out with formaldehyde to characterize the factors that influence the process and its application has been seen in the determination of formaldehyde in water.

In the determination of tyramine in microfluidics on paper, the best results have been obtained with white lighting and the red channel. A factorial design, DOE, has been carried out to find out which are the optimal conditions: 30 mM Au, 25 units / ml enzyme and 1 M NaOH. We obtain a linear range smaller than for formaldehyde and higher sensitivity. Its application has been seen in the determination of tyramine in white wine, where difficulties due to the matrix effect can be appreciated.

RESUMEN

Se ha trabajado en la determinación analítica de aminas biógenas, ABs -tiramina como modelo- mediante reacción colorimétrica con nanopartículas de Au y sobre soporte de microfluidica en papel. La medida de color se lleva a cabo por la técnica 'Digital Image Colorimetry, DIC', con cámaras digitales-Smartphone para obtener colores básicos RGB y su posterior relación con la concentración. Ha sido orientado a su aplicación en el control rápido de alimentos.

La técnica de microfluidica en papel ha requerido el estudio de distintos papeles cromatográficos, sus características de flujo y detección; así como consideraciones prácticas en la preparación de los chips-soportes de reacción. Tras su estudio, se ha considerado que los chips de papel Whatman grado 4 con forma de discos circulares de diámetro 8 mm preparados mediante corte con molde metálico han sido los que mejores resultados nos podían proporcionar en nuestra reacción.

En un primer lugar, se han realizado experimentos con el formaldehído para caracterizar los factores que influyen en el proceso y se ha visto su aplicación en la determinación del formaldehído en agua.

En la determinación de la tiramina en microfluidica en papel los mejores resultados se han obtenido con iluminación White y el canal red. Se ha realizado un diseño factorial, DOE, para saber cuáles son las condiciones óptimas: 30 mM Au, 25 ud/ml enzima y 1 M NaOH. Obtenemos un rango lineal menor que para el formaldehido y mayor sensibilidad. Se ha visto su aplicación en la determinación de la tiramina en vino blanco, donde se pueden apreciar dificultades debidas al efecto matriz.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1. Aminas biógenas (ABs)	1
1.2. ABs en alimentos	1
1.3. Tiramina.....	2
1.4. Determinación de ABs.....	2
1.5. Formación de nanopartículas de Au	2
1.6. Colorimetría de imágenes digitales, DIC ¹⁰	3
1.7. Microfluidica.....	4
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO.....	4
2.1. Planteamiento	4
2.2. Objetivos	5
CAPÍTULO II: EXPERIMENTAL	5
1. INSTRUMENTACIÓN	5
1.1. Material de laboratorio	5
1.2. Material para colorimetría de imagen digital	6
1.3. Instrumentos	6
1.4. Papel cromatográfico en microfluidica	6
2.REACTIVOS Y DISOLUCIONES	6
3.PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	7
3.1. Captura de imágenes.....	7
3.2. Lectura de colores	7
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
1.REACCIÓN DE FA CON Au (III).....	7
1.1. Estudio de factores.....	8
1.2. Cinética y Energía de activación de la reacción	9
1.3. Posibilidades analíticas del método con DIC.....	10
1.4. Comparación frente a referencia con EAM-uv-vis	11
2.REACCIÓN DE FA CON Au (III) SOBRE SOPORTE EN PAPEL: MICROFLUIDICA	12
2.1. Estudio factores.....	13
2.2. Posibilidades analíticas del método de microfluidica con DIC.....	14
3. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE FA EN AGUA.....	16
4. REACCIÓN DE LA TIRAMINA CON Au (III)	17
4.1. Posibilidades analíticas del método con DIC.....	17

4.2. Comparación analítica frente al método EAM-uv-vis	18
5. REACCIÓN DE LA TIRAMINA CON Au (III) SOBRE SOPORTE EN PAPEL: MICROFLUIDICA....	18
5.1. Estudio de factores.....	19
5.2. Posibilidades analíticas del método microfluidico con DIC.....	20
6.MUESTRA VINO	22
CAPÍTULO IV: CONCLUSIÓN Y BIBLIOGRAFÍA	23
1.CONCLUSIONES	23
2.BIBLIOGRAFÍA.....	23

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Se ofrece una visión de conjunto del estado actual de los principales métodos y temas tratados en el TFG.

1.1. Aminas biógenas (ABs)

Son biomoléculas nitrogenadas de bajo peso molecular que aparecen en procesos naturales de descarboxilación enzimática de aminoácidos, tales como los que ocurren en la descomposición de productos biológicos como alimentos, pudiendo dar lugar a problemas de insalubridad o rechazo de los mismos si se dan situaciones de acumulación¹.

Se pueden clasificar atendiendo a su estructura en:

- i- Aminas Alifáticas: putrescina, cadaverina, ...
- ii- Aminas Aromáticas: tiramina, feniletilamina, ...
- iii- Aminas Heterocíclicas: histamina, triptamina, ...

También atendiendo al número de grupos aminos que presentan en:

- i- Monoaminas: histamina, tiramina, feniletilamina, ...
- ii- Diaminas: putrescina, cadaverina, ...
- iii- Poliaminas: espermidina, agmatina², ...

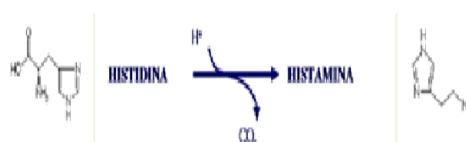


Figura 1: Reacción de descarboxilación del aminoácido Histidina para la producción natural de Histamina

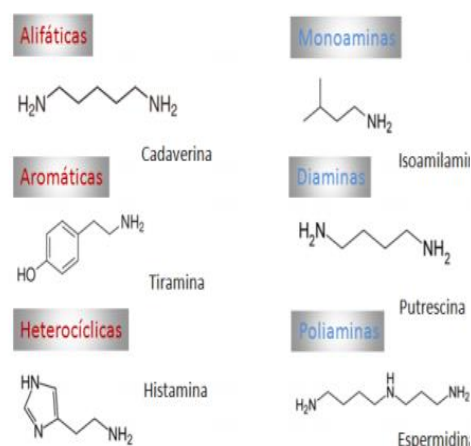


Figura 2: Fórmula estructural de ABs tipo

1.2. ABs en alimentos

Como se ha dicho, pueden aparecer de forma natural en la descomposición y/o fermentación de alimentos². Su presencia puede ser detectada en conservas, pescado azul o fermentados como quesos, vinos, etc. La ingestión de una elevada dosis de estos compuestos puede provocar toxicidad con síntomas como picor, ardor en la boca, urticaria, dolor de cabeza y en ocasiones dolor abdominal, náuseas y diarrea³.

De lo anterior se derivan criterios de seguridad alimentaria que se recogen en la legislación europea, EU (Reglamento CE 2073/2005 de 15 de Nov de 2005 relativo a criterios microbiológicos de los alimentos) con valores límites de concentraciones en alimentos. Muy observados en pescados con rangos de valores entre mínimo 100 mg/Kg y máximo 200 mg/Kg de producto, en referencia a histamina.

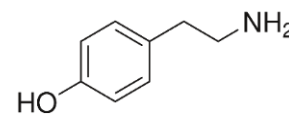
Se subraya el hecho de que, el nuevo Reglamento UE 1019/2013 de la Comisión del 23 de octubre de 2013 modifica el anexo del Reglamento 2073/2005 ampliando el tipo de productos y derivados de pescado que están sometidos a criterios de seguridad.

1.3. Tiramina

Es una AB que se produce en la descarboxilación de tirosina como aminoácido precursor mediante la acción de enzimas descarboxilasas³.



Figura 3: Descarboxilación de la tirosina para producir tiramina



Puede encontrarse en altas concentraciones en fermentados como la cerveza o el vino.

En el caso del vino, un parámetro que influye en el contenido de ABs es la disponibilidad de aminoácidos libres en el mosto y en la uva. Además, puede darse una acumulación de ABs en el proceso de fermentación³; por tanto, es del máximo interés la detección de la tiramina en estos productos.

1.4. Determinación de ABs

Se han desarrollado diversas técnicas para su ensayo⁴. La referencia es la cromatografía de alta eficacia (HPLC) según se recoge en el Reglamento CE 2073/2005. También pueden aplicarse técnicas por cromatografía en capa fina de alta resolución o electroforesis capilar⁵. Como método de preparación y extracción de analito de la muestra se aplica un procedimiento mediante ácido acético o tricloroacético⁶; y como detección en HPLC puede utilizarse técnica de fluorescencia o bien ultravioleta-visible. En este caso se realiza una etapa de derivatización que se suele llevar a cabo utilizando como reactivo cloruro de dansilo⁶.

Estos métodos producen buenos resultados, pero requieren de largo tiempo de análisis; por ello, hoy en día, se tiende a métodos de análisis rápido que permitan detección in situ, siempre con resultados fiables y económicos.

Entre los métodos rápidos destacan los procedimientos enzimáticos por su alta selectividad. Así en el caso de la tiramina, la enzima tiramina oxidasa (TAO) cataliza su oxidación (atmosférica) a H₂O₂ y aldehído⁷. Este proceso ha sido aplicado en nuevos ensayos analíticos para la determinación de tiramina y se ha utilizado en este TFG como modelo para la implementación de procedimientos mediante microfluidica en papel.

1.5. Formación de nanopartículas de Au

Los nano-materiales están siendo investigados de manera creciente a lo largo de los últimos años debido a propiedades como: capacidad de adsorción, actividad redox en electroquímica, actividades catalíticas o/y ópticas. De especial interés son las nanopartículas metálicas y entre ellas las de Au, GNPs, cuyas características las hacen de interés como indicadores en 'bio-determinaciones'⁸. La formación de GNPs produce coloración y cambios de color perceptibles a simple vista, como el típico de púrpura a azul con la precipitación de GNPs⁹; son colores asociados al tamaño y grado de agregación- conglomeración de los precipitados. El color azul es característico de GNPs de tamaño grande mientras que las de color púrpura-morado son asociadas a tamaño pequeño. Estas especies dan señales de absorción en EAM uv-vis con máximos en los

espectros a 520 (color púrpura) y 650 nm (color azulado)¹⁰ consecuencia del fenómeno SPR, Resonancia del Pasmón Superficial: el pico del Plasmón superficial.

Analíticamente se han usado procesos tanto de reducción de iones Au (III) para obtener GNPs como en los que ya se parte de GNPs y los analitos producen agregación-aglomeración y/o dispersión.

Las reducciones, que se aplican en el TFG, pueden tipificarse como de producción de GNPs y suelen ser descritas en la bibliografía como procesos 'Top-down'. Con ejemplos tipo como la reducción con citrato o borohidruro (NaBH₄).

Otras nanopartículas metálicas como las Ag y Pt también son de interés analítico.

1.6. Colorimetría de imágenes digitales, DIC¹⁰

La colorimetría de imágenes digitales (DIC) es un método analítico basado en la captura de imágenes mediante cámaras digitales, smartphones, tablets, ..., lectura de colores básicos y relación cuantitativa con la concentración. Proporciona información de modo muy eficiente.

Para procesar imágenes digitales de color hay que tener en cuenta los espacios de color y sus coordenadas cromáticas. El espacio más habitual en aplicaciones analíticas hace uso de las coordenadas RGB: rojo, verde y azul. Otros espacios como HSV, CMY, CMYK también son usados.

La información colorimétrica va a estar muy influida por la iluminación. En nuestro estudio las imágenes son tomadas de cubetas o chips de papel con iluminación pancromática blanca o monocromas: roja, verde o azul. La imagen en archivo 'raw' o 'jpeg' y se procesa mediante un programa informático propio que usa la aplicación ImageJ: Image Processing and Analysis. Esta aplicación es 'open source', muy reconocida para las 'ciencias de la vida' ¹¹ y está expandida como herramienta multidisciplinar en los campos científicos.

Este programa puede seleccionar una zona de interés de la imagen (ROI) – cuadrada, circular, ...-. Efectúa la lectura de su intensidad cromática. Además, puede editar y procesar imágenes y proporciona gran tipo de información desde histogramas a gráficos de detalle con el perfil de los píxeles.

Analíticamente se relaciona la intensidad cromática con la concentración del analito a través de una experiencia de calibración. De modo que el color de una muestra problema se puede relacionar con la concentración mediante la calibración, pero también otras variables como el área del color o la distancia-longitud recorrida han sido tratadas como variables cuantitativas analíticas.

Este programa también puede trabajar con la imagen transformada en escala de grises.

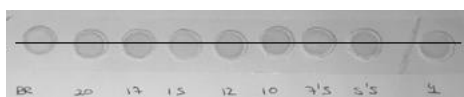


Figura 4: Imagen de muestras tipo de tiramina sobre papel cromatográfico en escala de grises

Obsérvese el perfil de gris de la línea marcada en la imagen superior.

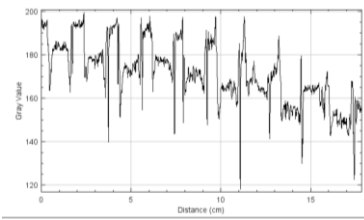


Figura 5: Gráfica de las muestras anteriores

1.7. Microfluidica

Es una técnica de manipulación de líquidos o micro-líquidos en la que mediante canales se produce un microflujo de pequeños volúmenes. Favorece la sensibilización de las determinaciones analíticas a la vez que mejora la reproducibilidad, posibilitando la multi-determinación y la implementación de análisis rápidos. Esto se practica con pequeños dispositivos, chips, que permiten el paso de líquidos por capilaridad. Pueden modular el transporte y conseguir una interacción química selectiva. Así se simplifican los ensayos y reducen drásticamente la cantidad y concentración de reactivos.

Empezó a desarrollarse a comienzo de los 90 y desde entonces ha tenido un gran desarrollo y aplicación en campos como: ciencias bio-médicas, control de alimentos o medio-ambiente.

Los chips son desarrollados mediante impresoras convencionales o impresoras 3D. Existen diversos soportes de preparación, pero el papel, por su fácil disponibilidad, calidad y bajo coste es de gran interés. En investigación se denomina: micro-paper based analytical devices¹². Se pueden emplear diferentes tipos de papel según el tamaño de poro, gramaje y espesor¹³, así como el tipo de tóner de impresión. No es necesario un sistema de bombeo del flujo ya que es impulsado por la fuerza capilar de los poros del papel. Como alternativa al método de impresión se pueden preparar mediante corte.

La clave en el uso de papel - carácter hidrofílico- es la preparación de circuitos canales para el paso de fluidos – generalmente de carácter hidrofílico- lo que requiere generar barreras hidrofóbicas que delimiten el paso. En nuestro grupo se ha podido conseguir mediante el procedimiento: i- se diseñan chips en su forma y dimensiones, ii- se imprimen sobre papel cromatográfico – impresora láser convencional- y iii- se calienta/templa para hacer penetrar las ceras del tóner a través del grosor del papel y crear barreras y canales de circulación.

Este tipo de 'chips' ha sido estudiado en nuestro grupo, en TFGs previos¹⁴, y actualmente han sido mejorados.



Figura 6: Forma y dimensiones de un chip desarrollado por nosotros con impresión sobre papel cromatográfico

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

2.1. Planteamiento

El objetivo es detectar una amina biógena, tiramina, con un método rápido mediante reacciones enzimáticas y colorimétricas sobre un soporte de microfluidica en papel.

En el procedimiento se oxida la tiramina catalizada por la enzima TAO (tiramina oxidasa) y de los productos de la reacción se utiliza el aldehído, p-hidroxi fenil acetaldehído, para la reducción de los iones Au (III) y producir GNPs.

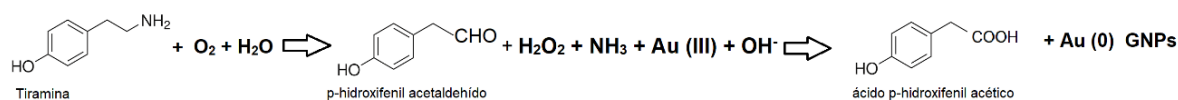


Figura 7: Oxidación de la tiramina catalizada por la enzima TAO y reducción del Au (III) por p-hidroxi fenil acetaldehído para producir GNPs

Se ha creído de interés caracterizar el modelo de reducción de Au (III) con ‘aldehídos’, tomando formaldehído, FA. En el esquema se describe la reacción principal, aportando tensioactivo (Poli(vinilPoliPirrolidona, PVPP) como agente de recubrimiento y estabilización (capping) de las GNPs.

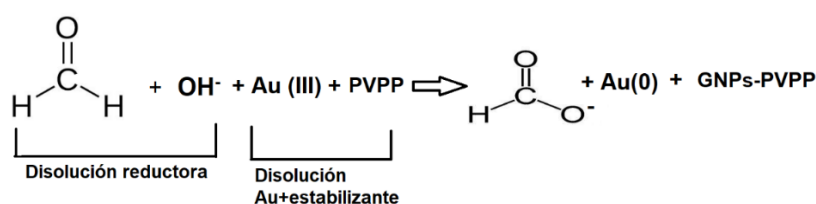


Figura 8: Reducción de Au (III) por FA diferenciando dos tipos de disoluciones en los reactivos

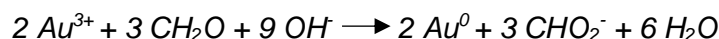
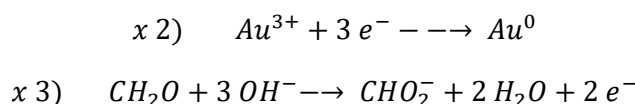


Figura 9: Ajuste de la Reducción de Au (III) por FA

2.2. Objetivos

- Estudiar la determinación de la tiramina a través de la medida de color de GNPs generadas en las oxidaciones favorecidas con TAO, en cubeta y en microfluidica
- Evaluar el modelo de reacción a GNPs con FA, tanto en disolución con cubeta como en microfluidica en papel
- Desarrollar metodología rápida basada en colorimetría de imagen digital
- Estudiar la implementación en muestras reales

CAPÍTULO II: EXPERIMENTAL

1. INSTRUMENTACIÓN

1.1. Material de laboratorio

- Micropipetas Pipet-Lite ‘RAININ’ 2-20 μ l, 5-50 μ l, 20-200 μ l, 100 μ l -1 ml y 1-5 ml
- Material desechable: puntas para micropipetas, pipetas Pasteur
- Cubetas espectrofotométricas de plexiglás de 3.5 ml
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml y 2 ml
- Vasos de precipitados, varilla de vidrio, ...
- Placa calefactora con agitación mediante núcleo magnético

1.2. Material para colorimetría de imagen digital

Cámara réflex NIKON: D3400

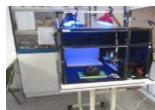
- Resolución: 24,2 megapíxeles, 24,2x10 6 píxeles -Mp
- Conversor analógico digital de 12 bits
- Sensor CMOS: 23.5x15,6 mm
- ISO 100- 25600
- Lente objetivo: AF P 18-55 mm
- Formatos imagen: JPEG y RAW

Cámara Apple-IPhone 7

- Resolución: 12 Mpx
- Apertura de $f/1.8$
- Flash Quad-LED True Tone
- Sensor de iluminación posterior
- Filtro híbrido IR
- Formato image: jpg

Caja de iluminación:

Para tomar las fotos con restricción y selección de iluminante



LED Colours EGLO

- RGB E27: Regulable a 16 colores
- Características: 6W, 3000K warm white, 220-240V, 52 mA



1.3. Instrumentos

Espectrofotómetro UV-vis de fotodiodos Agilent 8453A

- Lámparas de wolframio y deuterio
- Rango de medida desde 190 hasta 1100 nm



E. absorción molecular UV-vis SPECORD^R 210 Plus

- Lámparas de wolframio y deuterio
- Rango de medida entre 185 y 1200nm



1.4. Papel cromatográfico en microfluidica

Whatman grado 1

- Retención partículas 11µm
- Velocidad: 150s /100ml
- WxL: 460x570 mm

Whatman grado 2

- Retención partículas 8 µm
- Velocidad: 240s/100ml
- WxL: 460x570 mm

Whatman grado 4

- Retención partículas 20-25 µm
- Velocidad: 37s/100ml
- WxL: 460x570 mm

Papel resma Scharlab

- Filtro medio
- Velocidad: rápida

2.REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Disolución tampón fosfato pH 7, PBS: Se pesan 3.49 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Panreac. P.M. 137,99 g/mol. CAS [7558-79-4]) y se disuelven en 250 ml de agua desionizada. Se adiciona disolución de HCl 6 M hasta 7.
- Ácido tetracloroáurico trihidratado, $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$: (Aldrich, Gold (III) chloride hydrate, peso formula 339.79). Se prepara disolución de concentración 50mM en agua mili-Q. Disoluciones diluidas se preparan a partir de diluciones de ésta, diluyendo con D.I., PVPPP o tampón fosfato según convenga en el experimento.
- Tiramina hidrocloreto: (Sigma T2879) 98% pureza, 173.64 g/mol.

- Enzima Tiramina Oxidasa, TAO, (Asahi kasei pharma T-25).4600 U/mg (EC 1.4.3.9) Se prepara pesando 9 mg en 1 mL de PBS.
- Disolución Poly(VinilPolyPyrrolidone), PVPP, Sigma, (C₅H₉NO)_x: Se pesan 5 g en 100 ml de agua desionizada para una concentración 5% (p/v).
- FA, 30.03 g/mol: Panreac, 37% p/v (37 g en 100 ml disol). 12.32 Mol/L Densidad: 1.08 Kg/l.
- NaOH, 40 g/mol, Merck, PA: Disoluciones de 1 y 3 M. Se pesan 4 y 12 g en 100 ml de D.I.
- Muestra de agua de grifo: Tomada de la red urbana de Zaragoza, el 22/06/2021 a las 12h
- Muestra vino: V. blanco Vega del Barón 75 cL, verdejo-viura 2020, alc 13% vol.
- Agua desionizada, DI y Mili Q han sido usadas.

3.PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.1. Captura de imágenes

En el interior de la caja de iluminación se colocan las cubetas o chips de papel, seleccionando iluminación adecuada. Se toman las imágenes, sin reflejos con cámara digital o iPhone 7, sin flash.

3.2. Lectura de colores

Las imágenes se pasan a ordenador en formato 'jpg'. Se abren con el programa-script desarrollado y con la aplicación ImageJ. Se miden las intensidades RGB en zonas de interés 'ROI'.

Se obtienen valores: máximos, mínimo, 'desvest', media y moda de los colores.

Habitualmente se ha tomado la 'moda' de la intensidad como parámetro de intensidad de coloración por su robustez.

También se transforman a gris. En la imagen se muestra el perfil sobre una mancha en anillo.

Los datos se tratan en Excel.

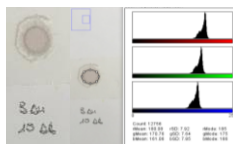


Figura 10: Imagen Mancha de GNPs y selección de zona ROI para FA (120 mg/L) y Au (III) 20 mM

channel	mean	mode	std dev
1 red	180.0800	185	7.9153
2 green	170.7574	175	7.6417
3 blue	161.0646	166	7.8481

Figura 11: Tabla con datos de lectura

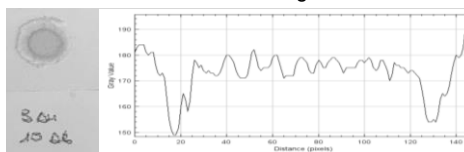


Figura 12: Mancha con formato a gris y perfil de la lectura

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.REACCIÓN DE FA CON Au (III)

El Au (III) es reducido por FA en medio alcalino dando lugar a GNPs. El proceso se identifica visualmente ya que las GNPs son coloreadas por el efecto Plasmón superficial, SPR. En la figura 9 se ha detallado la reacción.

La reducción ha mostrado una cinética de formación no inmediata, pero es más favorecida y reproducible aplicando el procedimiento: preparar 'disolución reductora' mezclando previamente FA y NaOH; y sobre ella adicionar disolución de Au (III) con PVPP como estabilizante. El procedimiento se ha caracterizado primero en cubeta, estudiándose la influencia de las variables, la cinética y la energía de activación de la reacción. Posteriormente se obtienen las prestaciones del método analítico.

1.1. Estudio de factores

Mediante diseño de experimentos, DOE se evalúa la influencia de los factores principales y se seleccionan condiciones óptimas.

Se ha propuesto un diseño factorial completo: 2^3 de 8 experimentos, con 2 niveles y 3 factores, según se describe en la tabla 1.

FACTORES	-	+
NaOH, mol/l	0.02	3
Au (III), mM	0.4	1.2
PVPP, g/l	0.1	0.25

Tabla 1: factores y valores de máximo y mínimo

En la tabla 2 se ofrece la matriz de experimentos.

cubetas	D reductora	tº (min)	Au+PVPP	volumen total	
				DISOL	µl
disoluciones	µl	espera	µl		
1	1920.0		60	A	1980.0
2	1920.0		60	B	1980.0
3	1920.0		25	C	1945.0
4	1920.0		20	A	1940.0
5	1920.0		60	A	1980.0
6	1920.0		60	B	1980.0
7	1920.0		25	C	1945.0
8	1920.0		20	A	1940.0

Tabla 2: Matriz experimental con las condiciones del experimento

Los resultados obtenidos con lectura DIC, para FA (4.85 mM), son:

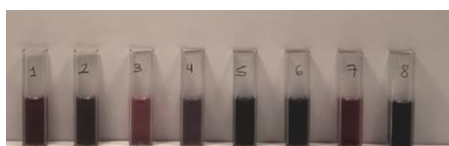


Figura 13: Resultado de las cubetas del DOE tras la reacción

Sobre las cubetas se miden los colores R-G-B, en 4 condiciones de iluminación: White-red-green-blue. Los valores se ofrecen en la tabla 3.

	NaOH	Au	PVPP	Respuesta w, R
1	+	+	+	49
2	+	+	-	41
3	+	+	-	82
4	+	+	-	56
5	+	-	+	34
6	+	-	-	33
7	+	-	+	52
8	+	-	-	31

Tabla 3: Resultados del DOE con la respuesta del canal R

Se puede ver que las condiciones del experimento 3:

[NaOH] 3 M, [Au (III)] 0.4 mM, PVPP 0.25 g/l

con iluminación 'White' produce la mayor intensidad de color R.

El estudio de los resultados permite determinar el efecto de las tres variables.

En la tabla 4 se muestran los resultados de los efectos de las variables principales.

Mean	47.25
NaOH	19.50
Au	-16
PVPP	14

Tabla 4: Cálculo de efectos sobre la respuesta

Se pone de manifiesto que el factor que más influye es [NaOH], con efecto positivo. Así, al aumentar la concentración de NaOH, aumenta la respuesta y lo mismo ocurre con la influencia del PVPP; mientras que el Au presenta una influencia negativa: mayor concentración produce menor color. Se deduce un modelo polinómico a la respuesta:

$$Y(R_{ur}) = 47.25 + 19.50 \cdot [NaOH] - 16 \cdot [Au (III)] + 14 \cdot [PVPP]$$

1.2. Cinética y Energía de activación de la reacción

1.2.1. Constante de la velocidad de reacción

La cinética estudia la variación de los reactivos o productos con el tiempo, a Tª y presión constante. En este caso se aplica la técnica DIC para medir la concentración mediante el color de los productos de la reacción, GNPs que aparecen.

Si el proceso sigue una cinética de 1º orden, la concentración de GNPs se ajusta al modelo: $C=C_0 \cdot e^{Kt}$

donde: C= concentración de GNPs a tiempo= t, en mol/L

C₀= concentración inicial a t=0, en mol/L

K= cte de velocidad del proceso, en s⁻¹

Tomando logaritmos y reordenando la expresión inicial se transforma:

$$\ln C = \ln C_0 + K \cdot t, \text{ y por tanto: } \ln(C/ C_0) = K t$$

Como hay una relación lineal entre C y el color R: C = m R. Siendo m la sensibilidad del método DIC. La expresión última se aproxima a: $\ln(R/ R_0) = K t$. Siendo R₀ color para t=0 y R color en tiempo t. La representación gráfica $\ln(R/ R_0)$ vs. t⁰, es una recta de pendiente 'K'.

Los resultados del estudio para una concentración FA 11.83 mg/L midiendo color R en el tiempo, a Tª ambiente:18°C, (y P atmosférica ambiente) son:

Tiempo (s)	Ln (R/R ₀)
300	0
900	-0.0927
2100	-0.1841
3000	-0.2388
3900	-0.2165
4800	-0.2165
5700	-0.2276
6600	-0.2276
7500	-0.2276
8400	-0.2056
9300	-0.2056

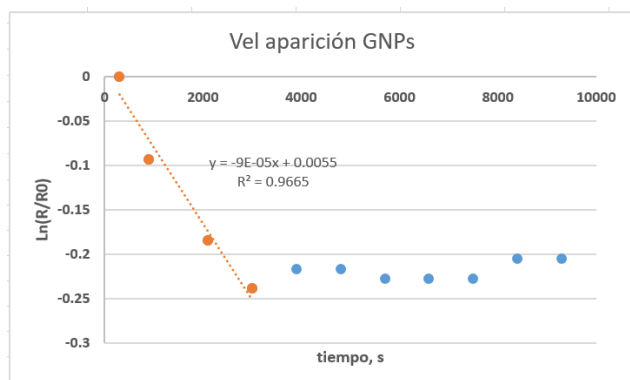


Figura 14: Grafica de la velocidad de aparición de GNPs

Los resultados deducen cinética de 1 orden, con $K = 9 \times 10^{-5}$ s, hasta 50 min (estabilización); de modo que requiere un tiempo de 30-50 min para alcanzar la estabilidad de la medida.

1.2.2. Energía de activación de la reacción

Se estudia la energía de activación a través del principio de Arrhenius: relación entre K cinética y Energía de activación (E_a): $k = A * e^{-\frac{E_a}{RT}}$ (A es el factor de frecuencia y el resto de variables tiene su sentido habitual)

De la ecuación anterior se toman logaritmos: $\ln(k) = \ln A - \frac{E_a}{RT}$

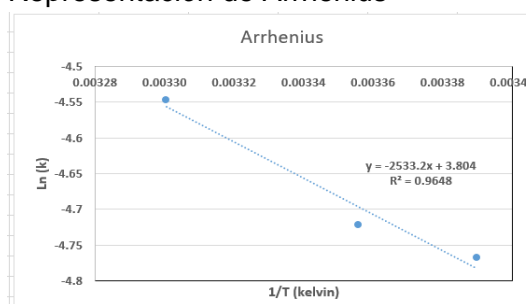
Esta expresión establece una relación lineal entre $\ln(k)$ vs $1/T$, con pendiente: $-\frac{E_a}{R}$

De modo que se experimenta modificando la T^a y evaluando k a cada valor de T^a . En este caso se mide mediante EAM uv-vis para una concentración fija de FA de $3.94 \cdot 10^{-4}$ M (11.83 mg/L).

Los resultados resumidos se presentan en la tabla 5. Representación de Arrhenius

k	ln (K)	Tª	1/T(K)
0.0085	-4.768	22	0.00339
0.0089	-4.722	25	0.00336
0.0106	-4.547	30	0.00330

Tabla 5: Datos para calcular Energía de activación



Obsérvese que la absorbancia crece con la aparición de GNPs, de modo que es una medida opuesta a la obtenida por DIC que se basa en la disminución del color reflejado R .

Lo que permite deducir un valor de Energía de activación:

$m = -E_a/R$	$E_a = m \cdot R$	E_a	E_a
-25533.2	$R = \text{Jul}/\text{K.mol}$	212283.02	212.283
	8.314	Jul/mol	KJul/mol

Este estudio pone de manifiesto un muy importante crecimiento de la constante de velocidad de 18°C (obtenida con DIC) a 20-30°C. Estos datos se confirman experimentalmente; es decir, a T^a ambiente-cálida la reacción ya es 'rápida', pero a temperaturas algo bajas la reacción requiere tiempo.

1.3. Posibilidades analíticas del método con DIC

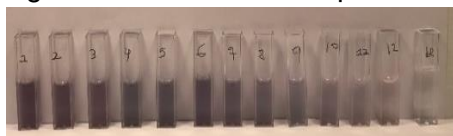
En condiciones óptimas de reacción, se diseña un plan de calibrado del FA con Au (III), midiendo colores mediante DIC. Se aplican los valores de la tabla y disoluciones patrones estándares:

Condiciones óptimas: 3 M NaOH, 0.4 mM Au (III) y 2.5×10^{-5} M PVPP.

cubetas	1 D reductora	tº (min)	2 D Au	Volumen total	[Aldehído]	
					mol/l	mg/l
disoluciones	μl		μl	μl	1.31E-03	39.45
1	1920.0		25	1945.0	1.05E-03	31.56
					7.88E-04	23.67

Tabla 6: Condiciones del experimento con disoluciones de concentración estándar

El experimento de la tabla 6 se repite para todas las concentraciones indicadas a la derecha. Imagen de la experiencia con iluminación W. Iluminaciones monocromas r g b también han sido experimentadas.



5.91E-04	17.75
5.25E-04	15.78
4.60E-04	13.81
3.94E-04	11.83
3.28E-04	9.86
2.63E-04	7.89
1.97E-04	5.92
1.31E-04	3.94
3.28E-05	0.99

El iluminante 'w' proporciona mejores resultados con el canal R: mayor sensibilidad y varianza. Los resultados de calibración son:

FA, mg/L	w, R	R0-R
0.99	119	24
3.94	107	36
5.92	102	41
7.89	100	43
9.86	88	55
11.83	81	62
13.81	72	71
15.78	75	68
blanco, R0	143	
sd BI	1	

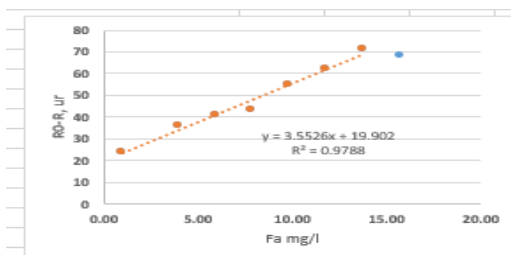


Figura 15: Recta de calibrado

Límite detección	0.9 mg/L																														
Límite cuantificación	3.0 mg/L: rango : 3.0-15.8 mg/L																														
Sensibilidad	3.6 L/mg																														
Análisis varianza:	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="6">ANÁLISIS DE VARIANZA</th> </tr> <tr> <th></th> <th>G d l</th> <th>Suma cuad</th> <th>Mean cuad</th> <th>F</th> <th>F crítico</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Regresión</td> <td>1</td> <td>1532.5015</td> <td>1532.5015</td> <td>230.7094</td> <td>0.0000</td> </tr> <tr> <td>Residuos</td> <td>5</td> <td>33.2128</td> <td>6.6426</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>6</td> <td>1565.7143</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	ANÁLISIS DE VARIANZA							G d l	Suma cuad	Mean cuad	F	F crítico	Regresión	1	1532.5015	1532.5015	230.7094	0.0000	Residuos	5	33.2128	6.6426			Total	6	1565.7143			
ANÁLISIS DE VARIANZA																															
	G d l	Suma cuad	Mean cuad	F	F crítico																										
Regresión	1	1532.5015	1532.5015	230.7094	0.0000																										
Residuos	5	33.2128	6.6426																												
Total	6	1565.7143																													
Calidad regresión																															
Fcrit < Fexp:																															
RMSE calibración	2.6 mg/L																														

Tabla 7: Prestaciones analíticas

Los errores en validación con 'validación cruzada- dejando uno fuera', CV-LOO, muestran valores algo superiores a los de calibración.

1.4. Comparación frente a referencia con EAM-uv-vis

Se compara la experiencia anterior frente a otra similar, pero medida en EAM uv-vis, rango 400-1000 nm y como técnica de referencia.

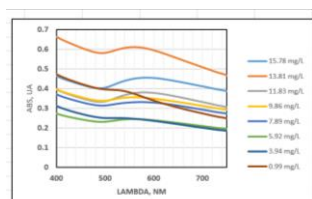
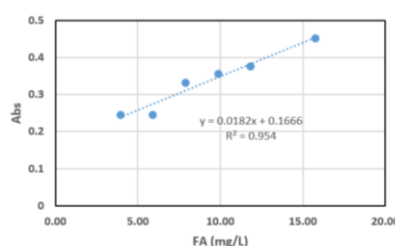


Figura 16: Espectros EAM uv- vis



FA (mg/L)	Abs, 580 nm
3.94	0.2459
5.92	0.2457
7.89	0.3311
9.86	0.356
11.83	0.3759
15.78	0.4514
blanco, A0	DI'
SD bl= 0.01X0.33	0.003311

Figura 17: Recta calibrado con 'di' como blanco. SD del blanco 1% de señal centroide

Límite detección	0.6 mg/L
Límite cuantificación	2.0 mg/L rango : 2.0-15.8 mg/L
Sensibilidad	0.0182 L/mg

Análisis de varianza: Calidad regresión	ANÁLISIS DE VARIANZA					
		<i>G d l</i>	<i>Suma Squar</i>	<i>Mean Squar</i>	<i>F</i>	<i>F crit</i>
	Regresión	1	0.0301	0.0301	83.0374	0.0008
	Residuos	4	0.0015	0.0004		
Fcrit < Fexp:	Total	5	0.0316			
RMSE calibración	0.02 mg/L					

Tabla 8: Prestaciones analíticas

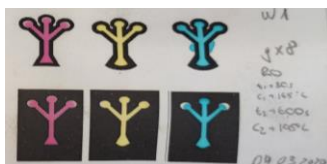
Posteriormente comparamos resultados de los dos métodos.

2. REACCIÓN DE FA CON Au (III) SOBRE SOPORTE EN PAPEL: MICROFLUIDICA

La reacción en microfluidica-papel ha supuesto el estudio de distintos papeles cromatográficos: Whatman Grade 1, 2 y 4, y también Resma Scharlab; así como el modo de preparación de los chips/soportes de reacción. Se ha evaluado su robustez y el procedimiento de preparación y aplicación de los reactivos. Los resultados más relevantes se presentan en modo síntesis, con imágenes y comentarios.

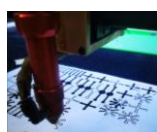
En la preparación de chips:

i- Por impresora láser y templado térmico con permeación del tóner.

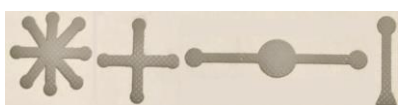


Resultados orientadores de sus capacidades	
Flujo de colorantes tipo con inyección de hasta 7 µl de disolución estándar.	Reacción de FA con Au (III) sobre W4. Ensayos positivos de 160 y 120 mg/l y de blanco.
Ventajas	Inconvenientes
Fáciles de diseño, modificación y preparación.	En el tratamiento térmico pueden alterarse la calidad del papel. Puede haber fugas en los fluidos.

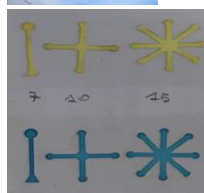
ii- Por corte laser, de diseño gráfico: con las imágenes se orienta sobre el procedimiento de preparación.



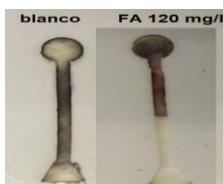
Cortadora Laser de baja potencia actuando sobre w1



Tipos de chips



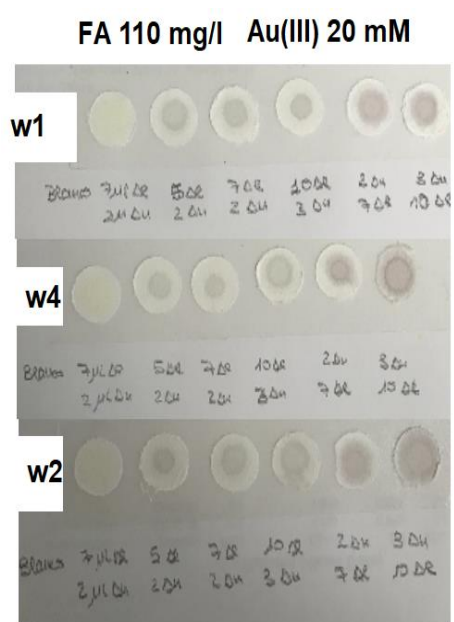
Colorantes fluyen en chips sujetos con cinta adhesiva de doble cara



Reacción FA/Au (III): Au (III) en ROI-círculo y FA fluye. Se produce Au⁽⁰⁾ GNPs de color purpura

Ventajas	Inconvenientes
Muy eficaz en el transporte.	Requieren sujeción a soporte. Se puede alterar-quemar el papel en la preparación laser. 'Blancos', sin analito, produce valores altos.

iii-Por corte, con molde metálico -troquel- de discos circulares. Diámetro 8 mm.



Deposito inyección de reactivos con micropipeta sobre la zona ROI.

Reacción tipo con diferentes volúmenes de inyección.

Sobre los diferentes tipos de papel cromatográfico: W grado 1-2-4.Y también Resma Scharlab RS.

Sobre la imagen se reconocen los resultados de las reacciones como manchas circulares, tipo 'coffee-ring like'; donde la mayor parte del material depositado se ubica en los bordes.

Dependiendo de las condiciones se forman 'anillos' coloreado pero tambien se generan manchas homogeneas y repartidas, si en el medio se inyectan compuestos de alto peso molecular (PVPP).

Ventajas	Inconvenientes
<p>Rapidez en la preparación. Robustez en el desarrollo de las reacciones.</p> <p>No existe gran diferencia entre los grados de papel, pero se tiende a elegir entre w1 (habitual) o w4 (poro grande).</p>	<p>Adiciones sobre-impuestas de reactivos. Requiere tiempos de secado entre inyecciones.</p> <p>Formación de anillos de reacción: 'ring coffee'.</p> <p>Diseño y dimensiones fijas.</p>

En la preparación de reactivos se tiende a obtener de modo previo disoluciones que son luego inyectados en el papel.

Procedimiento tipo de adiciones:

- 1- Disolución de Au (III). Se deja secar unos minutos. Seguidamente adicionar disolución de FA.
- 2- Finalmente, tras unos 20 minutos, adicionar disol de NaOH que provoca la aparición de color.
- 3-La imagen se mide mediante DIC.

Figura 18:
Inyección/es sobre el disco de papel y captura de la imagen



2.1. Estudio factores

Se presentan solo los resultados de microfluidica con discos circulares de papel W4 diámetro 0.8 cm.

FACTORES	- A	+ B
NaOH, mol/l	0.3	1
Au (III), mM	5	25

Tabla 9: Variación de factores

Se realiza un diseño de experimentos, DOE, para evaluar la influencia de los factores- condiciones, un diseño factorial completo: 2² de 4 experimentos, con 2 niveles y 2 factores. En la tabla 9 se dan los niveles y en la figura 19 los resultados de los 4 experimentos junto con sus blancos.

	1 Au+ PBS	2 D aldehído	3NaOH
	μl	μl	μl
1	6(B)	6	6(B)
2	6(B)	6	6(A)
3	6(A)	6	6(B)
4	6(A)	6	6(A)

Tabla 10: Matriz de experimentos

En este caso FA y Au (III) se ponen inicialmente en contacto sobre el papel a pH 7.

Los resultados obtenidos con una concentración fija de FA (0.53 mM) se presentan en la siguiente figura:

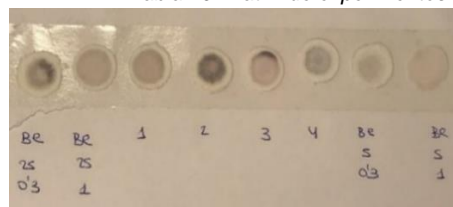


Figura 19: Chips de las disoluciones del DOE

Los resultados muestran unas mejores condiciones en el experimento 3. Son medidos con Iluminación 'w' y canal R.

Mean	152.50
NaOH	24.00
Au	-21.00

Tabla 12: Cálculo de efectos sobre la respuesta

	Respuesta w,			R
	NaOH	Au		
1	+	+	+	161
2	+	+	-	123
3	+	-	+	168
4	+	-	-	158
Blanco		+	+	171
Blanco		+	-	178
Blanco		-	+	173
Blanco		-	-	178

Tabla 11: resultados del DOE con la respuesta del canal R e iluminación blanca (calida)

El estudio demuestra que: i- el factor que más influye es [NaOH], con efecto positivo: al aumentar su concentración, aumenta la respuesta; ii- [Au (III)] presenta efecto negativo. Este valor a diferencia de lo que ocurre en cubeta es consecuencia de la interferencia del papel.

El modelo polinómico de la respuesta

$$(R_{ur}) = 152.50 + 12 \cdot [NaOH] - 10.5 \cdot [Au (III)]$$

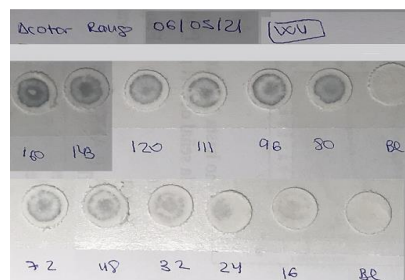
2.2. Posibilidades analíticas del método de microfluidica con DIC

En condiciones óptimas, se diseña un plan de calibrado de la reacción del FA con Au (III) con lectura de colores RGB en imágenes digitales.

El procedimiento mostraba claramente dos tipos de sensibilidad en rangos de concentraciones: altas (160 -80 mg/L) y bajas (70-15 mg/L).

La imagen a la derecha muestra los resultados.

Se ha optado en el estudio siguiente por las prestaciones en el rango de bajas concentraciones.



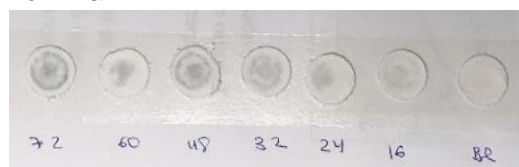
La experiencia de calibración se prepara inyectando según las condiciones:

Microfluidica	1 D Au	2 D FA Reductora	3 NaOH	FA	
Experimento	µl	µl	µl	mg/l	mol/l
1	6	6	6	71.928	0.0024
2	6	6	6	59.94	0.0020
3	6	6	6	47.952	0.0016
4	6	6	6	31.968	0.0011
5	6	6	6	23.976	0.0008
6	6	6	6	15.984	0.0005
blanco	6	6 sin FA (PBS)	6	0	0

Tabla 13: Valores del experimento (Condiciones óptimas: 1.0 M NaOH y 5 mM Au (III))

Los resultados obtenidos por colorimetría de imagen digital han sido obtenidos con diferentes iluminaciones. Se presenta solo la correspondiente a 'w'.

Ilumina w



FA, mg/L	w, G	G-G0
15.98	186	1
23.98	191	6
31.97	198	13
47.95	202	17
59.94	217	32
blanco,	185	

Se ofrece la calibración con iluminante 'w' y canal G que en este experimento proporciona mejores resultados. La intensidad se obtiene tras restar la intensidad del experimento de blanco.

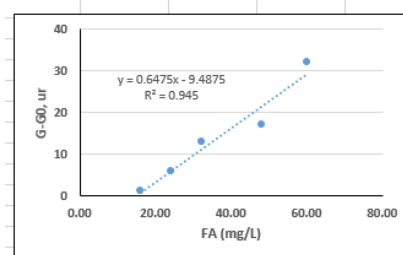


Figura 20: Recta de calibrado

Las prestaciones analíticas más relevantes se dan en la tabla:

Límite detección: para Sd bl=1.0	4.6 mg/L																														
Límite cuantificación	15.4 mg/L rango : 15-60 mg/L																														
Sensibilidad	0.65 L/mg																														
Análisis de varianza: Calidad regresión	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="6">ANÁLISIS DE VARIANZA</th> </tr> <tr> <th></th> <th>G d l</th> <th>Sum Square</th> <th>Mean Square</th> <th>F</th> <th>F crit</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Regresión</td> <td>1</td> <td>535.613</td> <td>535.613</td> <td>51.522</td> <td>0.006</td> </tr> <tr> <td>Residuos</td> <td>3</td> <td>31.188</td> <td>10.396</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>4</td> <td>566.800</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	ANÁLISIS DE VARIANZA							G d l	Sum Square	Mean Square	F	F crit	Regresión	1	535.613	535.613	51.522	0.006	Residuos	3	31.188	10.396			Total	4	566.800			
ANÁLISIS DE VARIANZA																															
	G d l	Sum Square	Mean Square	F	F crit																										
Regresión	1	535.613	535.613	51.522	0.006																										
Residuos	3	31.188	10.396																												
Total	4	566.800																													
Fcrit < Fexp:																															
RMSE calibración	3.2 mg/L																														

Tabla 14: Prestaciones analíticas

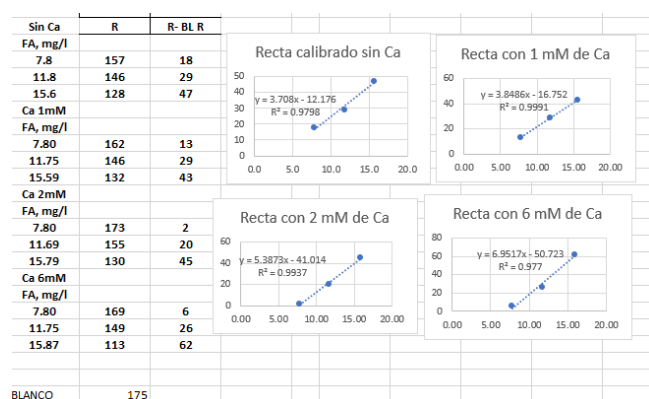
La comparación del ensayo de FA mediante los tres métodos: muestra diferencias significativas. El método DIC en cubeta muestra la mayor sensibilidad con iluminación 'w' y respuesta. Es más sensible que el método EAM si bien su rango de respuesta lineal es muy similar en ambos. El error de calibración en EAM

es inferior al de DIC y el peor error RMSE se presenta en microfluidica, lo cual es indicativo de una mayor irreproducibilidad que se ve perjudicada por la existencia de un alto blanco. Destacar que se ha optado por la medida en el canal G; mientras que en disolución no aparece influencia de blanco y la medida es más ventajosa sobre canal R. La interferencia en papel puede ser justificada por la presencia de grupos carbonilo-reductores en el papel-celulosa (hidrolisis a β -glucosa) y también por residuos de aldehído que puede ser añadido como conservante del papel.

3. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE FA EN AGUA

Se lleva a cabo una determinación de FA en aguas mediante el método DIC en cubeta y para ello se realiza un experimento de referencia de patrones puros en DI. Así mismo, se preparan las mismas referencias, pero con tres adiciones de efecto salino, expresado en contenido de CaCO_3 : 1 mM, 2 mM y 6 mM.

Por otra parte, las muestras de agua de la red urbana de Zaragoza, se preparan con adición patrón fortificada a tres niveles de FA: bajo-medio-alto, para evaluar su valor de recuperación y su sensibilidad. Los resultados se ofrecen y comparan mediante las pendientes de los experimentos.

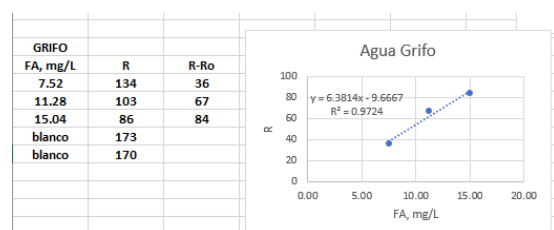


Se puede observar que las pendientes de las referencias y de la muestra son diferentes. Por tanto hay un efecto matriz en la muestra.

Cuando se aumenta la concentración de Ca en las referencias aumenta la pendiente.

El efecto salino aumenta la sensibilidad de la calibración.

La pendiente de la muestra de agua de grifo se iguala a la concentración de referencia con efecto salino de 6 mM de Ca.



Es decir, conforme aumenta la concentración de Ca aumenta la pendiente de las rectas. Este resultado concuerda con que las imágenes muestran un desplazamiento del color: de púrpura en patrones puros a tonos azules en las muestras aditivadas, por tanto, la precipitación con mayor efecto salino produce partículas de mayor tamaño de aglomeración. Se evidencia un efecto iónico, fuerza iónica, sobre la precipitación, con coherencia puesto que el color azul que se produce en el agua de grifo es coincidente con el que se obtiene a fuerza iónica 6 mM de Ca. Como conclusión, se puede proponer como procedimiento de igualación de matriz en base a estos resultados.

4. REACCIÓN DE LA TIRAMINA CON Au (III)

Esta reacción ya ha sido estudiada anteriormente por el grupo de investigación en experimentos con medida mediante EAM uv-vis. En resumen, la tiramina se oxida a aldehído, favorecida por la enzima TAO y el aldehído reduce el Au (III) a Au⁽⁰⁾ que pasa a forma de nanopartículas coloreadas. Ahora estas GNPs pueden ser medidas mediante DIC.

4.1. Posibilidades analíticas del método con DIC

Se evalúan las prestaciones analíticas con un experimento preparado sobre cubeta y en condiciones de referencia óptimas deducidas en EAM uv-vis: 1 mM de Au (III) y 0.50 ud/ml de enzima TAO en cubeta. Se toman imágenes y se miden por DIC.

En un primer lugar se introduce en la cubeta el tampón fosfato, seguido de la concentración de amina y finalmente la enzima. Se espera unos 5 minutos aproximadamente y se introduce la disolución de Au en tampón fosfato.

cubetas	PBS	Amina	Enzima	5 min	Au (III)	volumen total	[amina]	[amina]
disoluciones	μl	μl	μl		μl	μl	mg/l	mol/l
1	1900	20	40		40	2000.0	4.41	2.54E-05
							8.81	5.07E-05
							17.62	1.01E-04
							26.43	1.52E-04
							39.65	2.28E-04
							48.46	2.79E-04
							61.67	3.55E-04

El experimento de la tabla se repite para todas las concentraciones de la derecha.

Tabla 15: Condiciones del experimento con disoluciones estándar de amina, enzima y Au (III) en tampón PBS

Las imágenes digitales se han obtenido en diferentes iluminaciones. Se presenta de modo resumido la iluminación 'w':



Figura 21: Imágenes con diferentes iluminaciones

Tyr, mg/L	log (Tyr)	w,R	R-R0
61.67	1.79007395	6	147
48.46	1.68538341	11	142
39.65	1.59824319	12	141
26.43	1.42209716	28	125
17.62	1.2460059	39	114
8.81	0.94497591	101	52
4.41	0.64443859	135	18
0		153	0

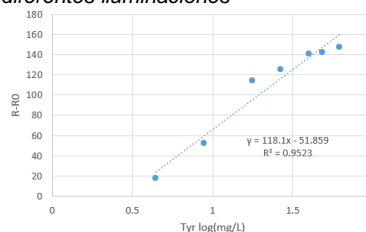


Figura 22: Recta de calibrado

Las prestaciones analíticas más importantes se presentan en la tabla:

Límite detección	0.193 log (mg/L) (1.5 mg/l)
Límite cuantificación	0.644 log (mg/L) (4.4 mg/l) : rango 4.4- 62 mg/L
Sensibilidad	118.1 log (L/mg)

Análisis de varianza: Calidad regresión	ANÁLISIS DE VARIANZA					
		<i>Grados de libertad de cuadrado de los cua</i>		<i>F</i>	<i>valor crítico de F</i>	
	Regresión	1	14556.213	14556.213	99.768248	0.0001719
	Residuos	5	729.50128	145.90026		
Fcrit < Fexp:	Total	6	15285.714			
RMSE calibración	0.0998 log (mg/L) (1.26 mg/l)					

Tabla 16: Prestaciones analíticas

4.2. Comparación analítica frente al método EAM-uv-vis

La experiencia anterior de calibrado se ha medido en espectrofotometría de absorción molecular uv-vis, rango 400-1000 nm, con el fin de establecer una comparación. Los espectros y datos de absorción (vs blanco reactivos) son:

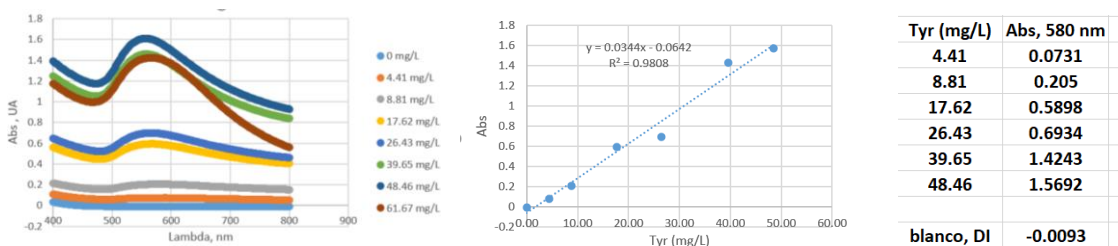


Figura 23: Gráfica de los espectros recta de Calibrado y absorbancia a la lambda máxima.

Límite detección	1.323 mg/L					
Límite cuantificación	4.41 mg/L rango 4.4- 49 mg/L					
Sensibilidad	0.0344 L/mg					
Análisis de varianza: Calidad regresión	ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad de cuadrado de los cua</i>					
	<i>F</i>					
	<i>valor crítico de F</i>					
Fcrit < Fexp: se rechaza la hipótesis	Regresión	1	1968.78173	1968.78173	256.012099	1.7364E-05
	Residuos	5	38.4509511	7.69019021		
	Total	6	2007.23269			
RMSE calibración	0.096 mg/L					

Tabla 17: Prestaciones analíticas

Es decir, el método DIC presenta valores de sensibilidad y rangos de respuesta lineal superiores al de EAM, eso sí, transformando la abscisa (está en valor logarítmico). Los valores LD y LQ son similares en ambos métodos; y si bien el error de calibración es superior en DIC esto es consecuencia de un mayor rango de respuesta y de una menor reproducibilidad. No obstante, hay que considerar la eficiencia y coste entre métodos.

5. REACCIÓN DE LA TIRAMINA CON Au (III) SOBRE SOPORTE EN PAPEL: MICROFLUIDICA

En ese procedimiento se preparan previa y separadamente en tubos Eppendorf de 1.5 ml, disoluciones de tiramina con TAO en tampón fosfato y por otro lado disolución mezcla de Au (III) en tampón fosfato.

Posteriormente se inyectan los volúmenes de las disoluciones, sobre disco de papel en el orden: 1- disolución de Au (III), después de unos minutos de secado, 2-disolución de amina y finalmente, tras unos 20 minutos 3- disolución de NaOH.

Las nanopartículas de Au aparecen como manchas coloreadas y de las que se obtienen los valores RGB mediante DIC.

5.1. Estudio de factores

Se realiza un diseño de experimentos que estudia las influencias y condiciones óptimas de la reacción, aplicando un diseño factorial completo: 2^3 de 8 experimentos, con 2 niveles y 3 factores.

En la tabla 18 se dan los niveles y en la tabla 19 la matriz de experimentos. Además, se realizan los correspondientes ensayos de blanco a cada experimento.

FACTORES	-	+
Au (III), mM	5	30
Enzima, ud/ml	25	50
NaOH, M	0.3	1

Tabla 18: Variación de factores

	Au (III)	Enzima	NaOH
disoluciones	μl	μl	μl
1	5 (B)	5	5 (N)
2	5 (B)	5	5 (n)
3	5 (B)	5	5 (N)
4	5 (B)	5	5 (n)
5	5 (A)	5	5 (N)
6	5 (A)	5	5 (n)
7	5 (A)	5	5 (N)
8	5 (A)	5	5 (n)

Tabla 19: Matriz de experimentos

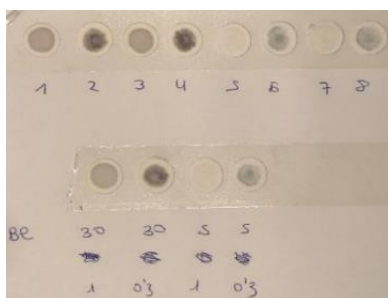


Figura 24: Chips de las disoluciones DOE

	Au	Enzima	NaOH	w, R
1	+	+	+	152
2	+	+	-	117
3	+	+	-	153
4	+	+	-	96
5	+	-	+	190
6	+	-	+	154
7	+	-	-	178
8	+	-	-	152
blanco 1		+	+	157
blanco 2		+	-	120
blanco 3		-	+	186
blanco 4		-	-	156

Tabla 20: resultados del DOE con la respuesta del canal R e iluminación blanca (calida)

Los resultados son obtenidos con una concentración fija de amina ($7.11 \cdot 10^{-5}$ M) y se presentan en la figura 24.

Los valores de intensidad son corregidos por los valores de las disoluciones de blanco.

El experimento de óptimo es el 3 con el iluminante 'w' y canal R.

Mean	149
Au	-39
Enzima	8.5
NaOH	38.5

El factor que más influye es el Au. En sentido negativo: menos Au, favorece el color. Seguidamente la [NaOH], cuando aumenta la concentración, aumenta la respuesta. Mientras que la enzima es ligeramente positiva.

Tabla 21: Variación efectos

La tabla 21 se muestra los efectos de las variables principales

El efecto del Au (III) evidencia la influencia del efecto de interferencia del papel y es coincidente con lo observado en el estudio del FA.

Del experimento se deduce un modelo polinómico a la respuesta:

$$Y(Rur) = 149 + 19.25 \cdot [NaOH] - 19.5 \cdot [Au (III)] + 4.25 [Enzima]$$

5.2. Posibilidades analíticas del método microfluidico con DIC

Con las condiciones óptimas obtenidas del DOE anterior se diseña un plan de calibrado que se ofrece en las tablas siguientes:

Tampón	Amina	Enzima	vol
µl	µl	µl	µl
1090	400.000	10	1500

Las disoluciones se preparan de modo previo en Eppendorf y se inyectan sobre disco de papel.

Las condiciones se repiten para todas las concentraciones de la derecha.

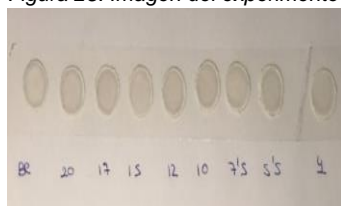
Amina	
mol/l	mg/l
1.14E-04	19.75
9.95E-05	17.28
8.53E-05	14.81
7.11E-05	12.35
5.69E-05	9.88
4.27E-05	7.41
3.13E-05	5.43
2.28E-05	3.95

Tabla 22: Condiciones del experimento con las condiciones óptimas: 30 mM Au, 25 ud/ml enzima y 1 M NaOH

El resultado por DIC fue obtenido con diferentes iluminaciones. Se ofrecen los presentados con 'w' y en este caso sobre canal R:

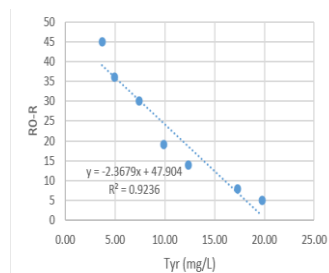
Ilumina w

Figura 25: Imagen del experimento



Tyr (mg/L)	w, R	R0-R
19.75	192	5
17.28	189	8
12.35	183	14
9.88	178	19
7.41	167	30
4.94	161	36
3.70	152	45
Blanco	197	

Tabla 23: Resultados óptimos



Límite detección	1.481 mg/L
Límite cuantificación	4.938 mg/L rango: 3.70- 19.8 mg/L
Sensibilidad	1.772 L/mg

Análisis de varianza: Calidad regresión	ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad de cuadrado de los cua</i>			<i>F</i>	<i>valor crítico de F</i>	
	Regresión	1	696.60174	696.60174	61.9142079	0.00053268
	Residuos	5	56.2554028	11.2510806		
Fcrit < Fexp: se rechaza la hipótesis	Total	6	752.857143			
RMSE calibración	1.82 mg/L					

Tabla 24: Prestaciones analíticas

El estudio también se ha realizado sobre la imagen transformada a gris. La comparación de las prestaciones muestra resultados muy similares, si bien en color R se presenta un menor error de calibración.

Las prestaciones como sensibilidad, rango lineal y error de calibración, son inferiores a los métodos DIC y EAM. Y están muy influidas por la menor reproducibilidad y el mayor efecto de blanco en este procedimiento.

Dentro de las prestaciones del método se ha evaluado su robustez. Para ello se aplica un diseño de experimentos fraccionado, de acuerdo a los criterios de Youden-Steiner, modificando las condiciones de las variables a valores ligeramente diferentes (10%) a los óptimos.

Se evalúa posteriormente la varianza del resultado y se compara con el valor de referencia del método.

En las tablas se ofrecen los resultados.

experimentos	factor A	B	C	D	E	F	G	w, R	factor	A-Val Nominal	a-Variación	10%
num 1	1	30	20	25	5	'6'+	'7'+	9	A-NaOH,M	1.0	0.9	0.9
2	1	30	18	25	4.5	'6'-	'7'-	19	B-Au,mM, fr	30.0	27.0	27
3	1	27	20	22.5	5	'6'-	'7'-	6	C-tº, min	20.0	18.0	18
4	1	27	18	22.5	4.5	'6'+	'7'+	8	D-TAO, unid	25.0	22.5	23
5	0.9	30	20	22.5	4.5	'6'+	'7'-	2	E- vols, ul	5	4.5	4.5
6	0.9	30	18	22.5	5	'6'-	'7'+	8	F-seis	'6'	'6'	'6'
7	0.9	27	20	25	4.5	'6'-	'7'+	3	G-siete	'7'	'7'	'7'
8	0.9	27	18	25	5	'6'+	'7'-	3				

Tabla 25 : Diseño Youden-Steiner y valor de modificación en las variables

Obtención de la varianza del experimento y comparación con el valor de referencia

		RESULTADOS			
	Diferencias			Diferencias	Dif ²
A-NaOH, M	A-a	efecto =(SUMA(H2:H5)/4) -(SUMA(H6:H9)/4)		6.50	42.250
B-Au, mM	B-b			4.50	20.250
C-tº, min	C-c			-4.50	20.250
D-TAO, ud/ml	D-d			2.50	6.250
E- vols, ul	E-e			-1.50	2.250
F-Seis	F-f			-3.50	12.250
G-Siete	G-g			-0.50	0.250
				S Di, desvest	Desviación estándar de las diferencias D _i (S _{Di}):
				5,445	$S_{D_i} = \sqrt{2 \cdot \sum(D_i^2)/7}$
				S intralab: 5.02	
				determinado en el lab	

Adoptando el valor de varianza intralab, de referencia en los métodos DIC, se demostraría que SDi supera la referencia. Por tanto, las condiciones influyen y se puede argumentar que método no es robusto, al 95% de confianza. Su aplicación debiera extremar la repetibilidad de las condiciones para obtener valores congruentes.

6.MUESTRA VINO

Se lleva a cabo una determinación de tiramina en vino mediante el método en microfluidica y con DIC. Aplicando una estrategia de reforzamiento a distintos niveles para evaluar la recuperación y el efecto matriz a través de la sensibilidad.

Para ello se realiza un experimento de adición patrón de FA a muestras de vino

- i- Muestra de vino tomada directamente de la botella
- ii- Muestra de vino después de haber evaporado el alcohol

Las muestras se aditivan con tres valores de tiramina: bajo-medio-alto y se compara con una experiencia de calibrado de patrones puros.

Los resultados se ofrecen en las tablas figuras y se realiza una comparación.

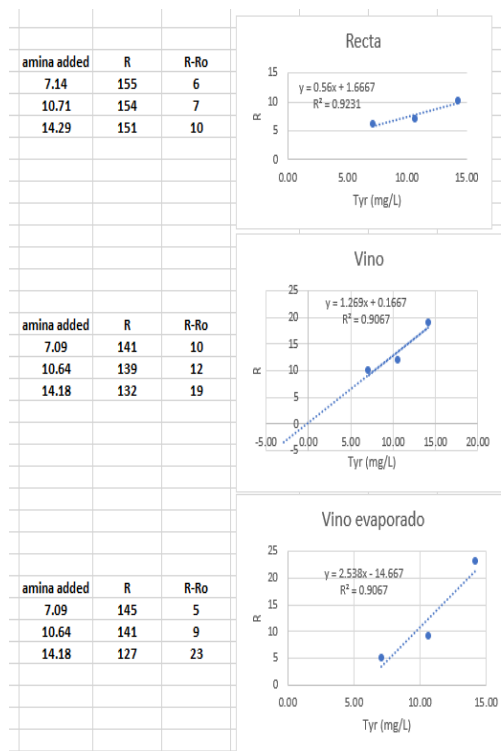
La pendiente de patrones es de 0.56 ur/mg/L de tiramina, mientras que en el vino es 1.26 ur/mg/L.

Esto demuestra un efecto matriz importante en la muestra que impide la interpolación de las señales en la experiencia de patrones.

Para la muestra de vino evaporado la pendiente es todavía superior, 2.53 ur/mg/L. Es decir, hay interferencias de matriz que impiden interpolar y estudiar valores de recuperación.

Es evidente que la complejidad de la composición del vino, con productos como azúcares, ácidos, poli-fenoles, sales... pueden tener efecto reductor sobre los iones Au (III) y, por tanto, la influencia es compleja. No obstante, se han hecho experiencias modificando el efecto iónico para producir resultados de igualación de matriz.

Por otra parte, los valores de extrapolación en las rectas de recuperación-adición siempre dan valores por debajo del límite de detección del método, 1.5 mg/L. Lo cual sería coherente con niveles de tiramina inferiores a ese valor.



CAPÍTULO IV: CONCLUSIÓN Y BIBLIOGRAFÍA

1.CONCLUSIONES

- Centrándose en el aspecto principal se ha estudiado y propuesto una nueva alternativa para la determinación de aminas biógenas, tiramina, mediante reacción con nanopartículas de Au, sobre soporte de microfluidica en papel y lectura cromática con Smart-phone; para establecerse finalmente como método rápido y de gran eficiencia.
- Entre sus prestaciones se destaca: rango lineal: 3.7-19.8 mg/L, sensibilidad 1.8 L/mg y LD 1.5 mg/L. Y se ha evaluado su robustez por Youden –Steiner.
- Se ha aplicado en el control rápido de Tiramina en vino mediante un método de recuperación-adición patrón. Este pone de manifiesto un fuerte efecto de matriz que, no obstante, demuestran niveles de contenido inferiores al límite de detección 1.5 mg/L.

2.BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bayo Rodríguez, F; *ABs y seguridad alimentaria*; Zaragoza,2014.
- (2) Doeun, D.; Davaatseren, M.; Chung, M. S. Biogenic Amines in Foods. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, 26 (6), 1463–1474; DOI: 10.1007/s10068-017-0239-3.
- (3) Marcobal, A.; de las Rivas, B.; Landete, J. M.; Tabera, L.; Muñoz, R. Tyramine and Phenylethylamine Biosynthesis by Food Bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, 52 (5), 448–467; DOI: 10.1080/10408398.2010.500545.
- (4) Si-Jin Liu, Juan-Juan Xu, Chang-Lu Ma y Chun-Feng Guo; A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC; *Food Chemistry*, **2018**, 266, pp. 275-283; DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.001.
- (5) Jastrzębska, A; A Comparative Study for Determination of Biogenic Amines in Meat Samples by Capillary Isotachopheresis with Two Electrolyte Systems. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, 235 (3), 563–572; DOI: 10.1007/s00217-012-1783-y.
- (6) Loizzo, M. R.; Menichini, F.; Picci, N.; Puoci, F.; Spizzirri, U. G.; Restuccia, D.; Technological Aspects and Analytical Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, 30 (1), 38–55; DOI: 10.1016/j.tifs.2012.11.005.
- (7) Isabel Sanz-Vicente, Ángel López-Molinero, Susana de Marcos, Jesús Navarro, Pablo Cebrián, Chantal Arruego, Victor Visiedo, Javier Galbán; Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in food; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2020**, 412(18):4261-4271; DOI: 10.1007/s00216-020-02677-7.

- (8) Tomás Pinheiro, João Ferrão, Ana C. Marques, Maria J. Oliveira, Nitin M. Batra, Pedro M. F. J. Costa, M. Paula Macedo, Hugo Águas, Rodrigo Martins and Elvira Fortunato; Paper-Based In-Situ Gold Nanoparticle Synthesis for Colorimetric, Non-Enzymatic Glucose Level Determination; **2020**; 10(10) DOI:10.3390/nano10102027.
- (9) Liu, G.; Lu, M.; Huang, X.; Li, T.; Xu, D. Application of Gold-Nanoparticle Colorimetric Sensing to Rapid Food Safety Screening. *Sensors (Switzerland)* **2018**, 18 (12), 1–16.; DOI: 10.3390/s18124266.
- (10) Lopez Molinero, A.; Jimenez Lamana, J.; The Chromatic Variance matrix in digital image based method for the potential evaluation as quantitative procedures; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2016**; 157, pp. 29-34. DOI.org/10.1016/j.chemolab.2016.06.010.
- (11) Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, **2012**; 9(7), 671–675; DOI: 10.1038/nmeth.2089.
- (12) Noviana, E.; Blascke Carrão, D.; Pratiwi, R.; Henry, C.S.; Emerging applications of paper-based analytical devices for drug analysis: A review; *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1116, 70-90; DOI:10.1016/j.aca.2020.03.013.
- (13) Fu, L-M.; Wang, Y-N.; Detection methods and applications of microfluidic paper-based analytical devices; *Trends in Anal. Chem.* **2018**, 107, 196-211; DOI: 10.1016/j.trac.2018.08.018.
- (14) Pérez Ochoa, Lara. Calidad en las determinaciones analíticas de aminas biógenas con imágenes digitales. TFG, Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza, 2020.