



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de tiras reactivas para la determinación de aminas biógenas basadas en la generación enzimática de nanopartículas de oro

Test strips for biogenic amines based on the
enzymatic generation of gold nanoparticles

Autora

Sonia Alcubierre Simón

Directora

Susana de Marcos Ruiz

Facultad de Ciencias. Grado en Química. Departamento Química Analítica.

Curso 2020/2021

Este trabajo se ha realizado gracias al Proyecto PID2019-105408GB-100 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) de España.

Resumen

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método óptico enzimático para la determinación rápida de tiramina a través de tiras. Se basa en la reacción enzimática de la tiramina con Tiramina oxidasa (TAO), en presencia de Au (III), dando lugar a la formación de nanopartículas de oro (AuNPs), que presentan una señal característica de plasmón a 560 nm y puede relacionarse directamente con la concentración de tiramina.

Para la puesta a punto del método se han optimizado tanto el soporte sólido de las tiras reactivas como las condiciones de inmovilización de los reactivos y la forma de medida.

Se ha comprobado que los mejores resultados se obtienen con soportes de celulosa al 5% y Au (III) 1 mM, [TAO] 20 U/mL y StabilCoat al 1%, a temperatura ambiente y midiendo al minuto 85. La cuantificación se lleva a cabo con una aplicación móvil, obteniendo las coordenadas RGB. En las condiciones óptimas, se ha obtenido un intervalo de respuesta línea de $3,58 \times 10^{-3}$ hasta $2,5 \times 10^{-2}$ M y LOD de $1,07 \times 10^{-3}$ M. Utilizando como parámetro analítico el cociente R_M/R_0 donde R_M es el valor de la coordenada para cada muestra y R_0 el valor del blanco.

Se estudia el método en muestras reales, utilizando vino y queso dopado, dando resultados positivos en este último. Se ha comparado mediante un test t que no existen diferencias significativas entre la concentración obtenida y el valor real, por lo que es un método adecuado para la determinación de este tipo de muestras.

Por último, se ha estudiado el efecto de la adición de otro metal (Pt (II)) en la formación de las nanopartículas, optimizando los distintos parámetros. Se observa una disminución del tiempo de medida, pero en este caso la señal no es cuantitativa.

Abstract

The objective of this work is the development of an enzymatic optical method for the rapid determination of tyramine through strips. It is based on the enzymatic reaction of tyramine with Tyramine oxidase (TAO), in presence of Au (III), giving rise to the formation of gold nanoparticles (AuNPs), which present a characteristic signal of plasmon at 560 nm, and it can be related directly with the Tyramine concentration.

For the development of the method, it has been optimized the solid support of the reactive strips and the immobilization conditions of the reagents and the form of measurement.

It has been found that the best results are obtained with cellulose supports at 5% and Au (III) 1mM, [TAO] 20 U/mL and StabilCoat at 1%, at room temperature and measuring at minute 85. The quantification is done with a mobile application, obtaining the RGB coordinates. At optimal conditions, a line response interval between $3,58 \times 10^{-3}$ and $2,5 \times 10^{-2}$ M has been obtained, and a LOD of $1,07 \times 10^{-3}$ M. Using as analytical parameter R_M/R_0 , where R_M is the value of the coordinate for each sample and R_0 is the value of the blank.

The method is studied in real samples, using wine and doped cheese, giving positive results in the last. It has been compared with a t test that there are not significant differences between the concentration obtained and the real value; therefore, it is a suitable method for the determination of this type of samples.

Finally, the effect of the addition of another metal (Pt (II)) on the formation of nanoparticles has been studied, optimizing the different parameters. A decrease of the measurement time is observed, but in this case the signal is not quantitative.

Índice

| | |
|---------------------------------------------------------|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Aminas biógenas | 1 |
| 1.1.1 Toxicología | 1 |
| 1.2 Determinación de aminas biógenas | 2 |
| 1.3 Nanomateriales en determinaciones analíticas | 3 |
| 1.3.1 Nanopartículas de oro como biosensor | 3 |
| 1.4. Imágenes digitales y su aplicación analítica | 4 |
| 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 oro | 6 |
| 3.1.3 Disoluciones de platino | 6 |
| 3.1.4 Disoluciones de enzimas | 6 |
| 3.1.5 Disoluciones de tiramina | 6 |
| 3.2. Instrumentación y material..... | 7 |
| 3.2.1 Instrumentos | 7 |
| 3.2.2 Material y aparatos | 7 |
| 3.3 Procedimiento experimental..... | 7 |
| 3.3.1 Método en disolución | 7 |
| 3.3.2 Método en soporte sólido..... | 8 |
| 3.3.2.1 Celulosa | 8 |
| 3.3.2.2 Medidas..... | 8 |
| 3.3.2.3 Papeles | 8 |
| 3.3.3 Tratamiento de la muestra de queso | 8 |
| 4. Resultados | 9 |
| 4.1 Estudio en disolución | 9 |
| 4.1.1 Calibración tiramina | 9 |
| 4.2 Estudio en soporte sólido..... | 11 |
| 4.2.1 Soportes celulosa | 11 |
| 4.2.2 Papeles | 12 |
| 4.2.3 Optimización condiciones de inmovilización | 13 |
| 4.2.3.1 Estudio porcentaje de celulosa | 13 |

| | |
|----------------------------------------------------------|----|
| 4.2.3.2 Estudio concentración de Au (III) | 13 |
| 4.2.3.3 Estudio temperatura | 13 |
| 4.2.3.4 Estudio concentración TAO | 14 |
| 4.2.3.5 Estudio estabilizantes..... | 14 |
| 4.2.3.6 Estudio tiempo medida | 16 |
| 4.2.4 Calibración tiramina | 17 |
| 4.2.5 Estudio sin TAO | 17 |
| 4.2.6 Estudio Au+Pt | 18 |
| 4.2.6.1 Ensayos previos | 18 |
| 4.2.6.2 Optimización tiempo de medida..... | 19 |
| 4.2.6.3 Estudio estabilizantes..... | 19 |
| 4.2.6.4 Estudio inmovilización y concentración TAO | 20 |
| 4.2.6.5 Calibración TAO | 21 |
| 4.2.7 Muestras reales..... | 21 |
| 4.2.7.1 Vino blanco..... | 21 |
| 4.2.7.1 Queso | 22 |
| 5. Conclusiones..... | 24 |
| 6. Bibliografía | 24 |
| Anexos..... | 26 |
| Anexo 1: Estudio regresión en disolución | 26 |
| Anexo 2: Test t..... | 27 |
| Anexo 3: Estudio regresión soporte sólido | 28 |

1. Introducción

1.1 Aminas biógenas

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular formados principalmente por descarboxilación de aminoácidos, aunque también pueden formarse por transaminación de aldehídos y cetonas. Son moléculas con funciones fisiológicas esenciales en los seres vivos, ya que actúan en la regulación del crecimiento celular, la síntesis de proteínas o reparación de tejidos, entre otros. Sin embargo en dosis altas pueden tener distintos efectos tóxicos como náuseas, vómitos, migrañas y trastornos respiratorios, ya que no pueden ser metabolizadas en su totalidad por las enzimas encargadas de ello¹.

La formación de estos compuestos en los alimentos se produce por la acción de microorganismos que producen descarboxilación de aminoácidos presentes en estos, como se muestra en la Figura 1.

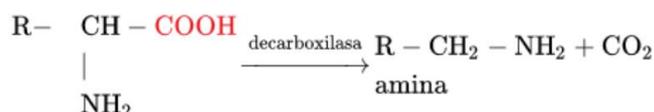


Figura 1. Reacción descarboxilación de un aminoácido libre por acción de una enzima descarboxilasa

En cuanto a su estructura química pueden clasificarse en aminas alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aminas aromáticas (tiramina, feniletilamina) o aminas heterocíclicas (histamina, feniletilamina). Además, existe otra clasificación en función del número de grupos amino, monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina) diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina)².

Las aminas biógenas se encuentran de forma natural en el organismo (endógenas), pero también pueden incorporarse a través de la dieta (exógenas). Las aminas biógenas que se encuentran con mayor frecuencia en alimentos se muestran en la Figura 2.

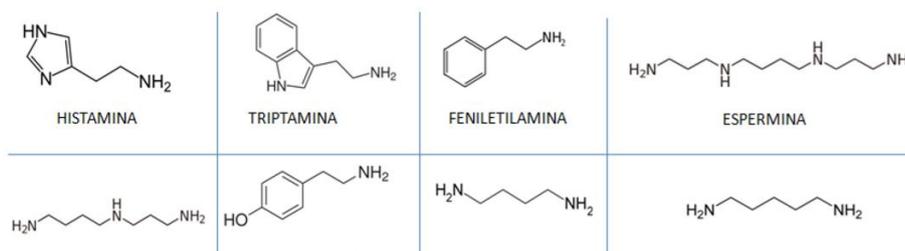


Figura 2 Estructura química de las aminas biógenas con mayor presencia en alimentos

1.1.1 Toxicología

Como se ha mencionado anteriormente, a pesar de que las aminas biógenas cumplen funciones fisiológicas esenciales en el organismo, a elevadas concentraciones pueden resultar tóxicas.

La mayoría de las intoxicaciones alimentarias están relacionadas con histamina y tiramina, cuyos aminoácidos precursores son histidina y tirosina, siendo consideradas las más tóxicas.

Pueden encontrarse grandes cantidades de estos compuestos en quesos, vino o pescado. Las concentraciones de aminas biógenas varían no solo entre alimentos, sino también dentro de un mismo tipo de alimento³.

La intoxicación por histamina es la más conocida, produciendo escombroidosis, esta enfermedad se da por el consumo de pescados escombroides (atún, bonito, caballa) en mal estado. Otro tipo de intoxicación es la que se conoce como “reacción al queso”, es la intoxicación producida por tiramina, recibe este nombre por la alta presencia de esta amina biógena en algunos quesos. Además de su toxicidad, la tiramina favorece la adhesión a la mucosa intestinal de patógenos como Escherichia coli. Diaminas como putrescina y cadaverina aumentan la toxicidad de la histamina y la tiramina, además son capaces de reaccionar con nitritos para dar nitrosaminas, que son compuestos cancerígenos³.

El epitelio intestinal de los mamíferos posee un sistema de desintoxicación de aminas biógenas exógenas, degradándolas por acción de las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y diamino oxidasa (DAO) a aldehído (oxidación de la amina biógena)⁴. Hay varios motivos por los que esta desintoxicación es insuficiente, puede darse cuando la ingesta de aminas biógenas es muy elevada, además hay personas que no las tolera bien, ya que su organismo no es capaz de producir enzimas en las cantidades necesarias (hipersensibilidad o intolerancia) o toman alguna sustancia que inhibe su acción, como pueden ser el alcohol o los fármacos antidepresivos. Por estos motivos es difícil establecer niveles tóxicos para las aminas biógenas³.

1.2 Determinación de aminas biógenas

Existe gran cantidad de métodos para la determinación de aminas biógenas, se suelen utilizar técnicas instrumentales, la mayoría son métodos electroquímicos, espectrofotométricos y cromatográficos³. Dentro de estos el más utilizado es la cromatografía HPLC de fase reversa acoplada a un detector de fluorescencia o UV-vis. En este método es necesaria una etapa previa de derivatización debido a la ausencia de cromóforos en la molécula que se determina, que no tiene propiedades fluorescentes ni absorbe en el ultravioleta o el visible. Esta derivatización se lleva a cabo con cloruro de dansilo o ortoftaldehído⁵.

Las ventajas del uso de técnicas de separación instrumentales están en la posibilidad de determinar varias aminas simultáneamente, con una mayor precisión, exactitud y especificidad. A pesar de ello, se requieren tiempos largos de análisis y costes elevados, lo que provoca la necesidad por parte de industria alimentaria, de demandar otras técnicas de respuesta más rápida y económica. En este sentido destacan los métodos ópticos en especial los biosensores enzimáticos, que destacan por su simplicidad y su bajo coste. Como inconveniente encontramos la necesidad de eliminar interferencias y la detección de una única amina biógena.

El actual desarrollo de biosensores, dispositivos que transforman información química en una señal analítica para poder determinar cuantitativamente uno o varios analitos, ha sido posible por la disponibilidad de enzimas como la tiramina oxidasa (TAO) o la diamino oxidasa (DAO), pudiendo satisfacer así la necesidad demandadas por la industria alimentaria.

Estos métodos tienen su fundamento en reacciones enzimáticas selectivas, detectando la presencia de H_2O_2 que se ha producido por la oxidación de aminas biógenas a un aldehído en presencia de la enzima oxidasa correspondiente⁶. Esta determinación requiere el acoplamiento de una segunda reacción enzimática en la que el H_2O_2 se reduce por una enzima peroxidasa, a su vez un colorante o fluoróforo se oxida generando un cambio de color que permite el seguimiento de la reacción. Existe cierta especificidad en la primera reacción, ya que existen distintos tipos de enzimas oxidasas, que actúan en función del tipo de amina. Por ejemplo la tiramina oxidasa (TAO) oxida a un analito determinado, la tiramina, mientras que otras son menos específicas, como la plasma amino oxidasa (PAO), capaz de oxidar a todas las aminas biógenas con más de un grupo amino en su estructura. Por contra, la segunda reacción no tiene esta especificidad debido a la enzima, además, la estabilidad del colorante o fluoróforo no es muy elevada.

1.3 Nanomateriales en determinaciones analíticas

La nanotecnología se ha convertido en una de las tendencias más relevantes en cuanto a ciencia de los materiales. Esta trabaja con materiales en escala nanométrica, los nanomateriales. Se caracterizan por tener un tamaño pequeño, del orden de 1 a 100nm. Forma diversos materiales nanoestructurados como nanopartículas, nanotubos, clusters, nanofibras... con una composición diversa, obteniendo como resultado materiales tanto orgánicos como inorgánicos con distintas funciones. Surgen características particulares debido a su tamaño y a la elevada proporción de átomos superficiales, dando como resultado nuevas propiedades físicas y químicas que pueden ser utilizadas en distintas aplicaciones, desde la medicina hasta la electrónica⁷. Su gran auge en los últimos años en la ciencia de los materiales abre una nueva área de investigación en Química Analítica⁸.

1.3.1 Nanopartículas de oro como biosensor

Las nanopartículas de oro (AuNPs) tienen unas propiedades ópticas únicas, una distribución de tamaño estrecha y una buena actividad biológica, lo que les da ventaja frente a otras nanopartículas. Tanto el color de las nanopartículas como la longitud de onda de absorción máxima cambia con el tamaño y espacio entre nanopartículas, lo que se usa para detectar productos químicos peligrosos como residuos de plaguicidas, metales pesados, aditivos prohibidos o biotoxinas en los alimentos⁹.

El cambio de color dependiente del tamaño de las AuNPs está asociado con la oscilación coherente de electrones de superficie en las AuNPs. Cuando la luz incide en estas, la longitud de onda resonante es absorbida por las AuNPs e induce la oscilación de electrones de superficie, a esto se le llama plasmón de superficie. Por ello Las nanopartículas de oro pequeñas (10-50 nm) son de un color rojo oscuro, mientras que AuNPs de menor tamaño (13nm de diámetro) absorben la luz verde correspondiente a una banda de absorción (banda de plasmón de superficie) de 520nm en modo dipolo, por lo que las AuNPs serán rojas. Al aumentar el tamaño de las AuNPs la luz no puede polarizar las nanopartículas de forma homogénea dominando modos de vibración de orden superior con menor energía, provocando un desplazamiento al rojo, un ensanchamiento de la banda de plasmón superficial y el cambio de las AuNPs a color morado¹⁰.

Hay gran variedad de métodos para sintetizar las AuNPs, entre ellos la síntesis de dos fases y síntesis de una fase con disolvente orgánico, aunque el más utilizado es la reducción de HAuCl_4 por citrato de sodio¹¹. Recientemente se ha demostrado el uso de aminas como agentes reductores para su formación¹².

Cadaverina y putrescina en presencia de diamino oxidasa (DAO) y tiramina en presencia de tiramina oxidasa (TAO) son capaces de reaccionar con Au (III) para dar lugar a AuNPs. En el caso de la tiramina dichas AuNPs dan como resultado una disolución morada intensa y se pueden determinar por espectroscopía UV-vis, utilizando dicho método como biosensor para la determinación de tiramina¹³.

1.4. Imágenes digitales y su aplicación analítica

El uso de detectores implementados en equipos de bajo coste como cámaras, móviles, webcams o escáneres digitales representan una nueva metodología analítica con características de lectura rápida de radiación y con procesamiento de señal directo a un coste moderado¹⁴. Actualmente este tipo de plataformas analíticas está experimentando un gran auge, compitiendo frente a determinaciones en espectrofotometría molecular o fluorescencia, gracias a la implementación de metodología analítica basada en el uso de los espacios de color¹⁵. Esta técnica está dirigida a ámbitos donde se demandan una gran cantidad de análisis y de manera rápida, como el diagnóstico clínico o el control "in situ" de alimentos¹⁶.

2. Objetivos y planteamiento

Este trabajo tiene como objetivo principal estudiar las mejores condiciones de inmovilización de reactivos para el desarrollo de un método óptico enzimático a través de tiras reactivas para la determinación rápida de tiramina, evitando el acoplamiento de la 2ª reacción enzimática. En la Figura 3 se observa la secuencia de reacciones en las que está basado el estudio.

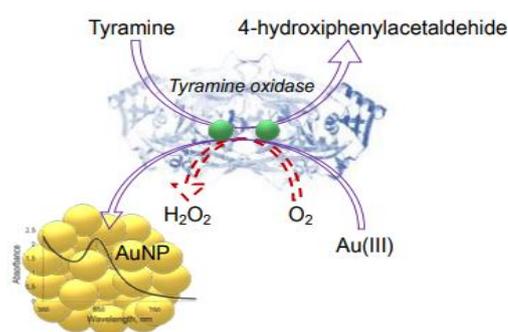


Figura 3 Reacción de formación de AuNPs¹³

El analito a estudiar, tiramina, es sustrato de la enzima tiramina oxidasa (TAO), oxida su grupo amino a un aldehído en presencia de oxígeno. Esta reacción genera peróxido de hidrógeno y amoníaco. Por estudios del grupo de investigación se sabe que las nanopartículas podrían formarse por la reacción del producto de la reacción (aldehído) con el Au (III) en presencia de la enzima reducida. Debido a la formación de las AuNPs puede determinarse la presencia del

analito mediante técnicas ópticas. Para el desarrollo de métodos rápidos se puede realizar la determinación mediante la medida de las coordenadas RGB con un Smartphone.

La determinación de tiramina en disolución ha sido estudiada en un trabajo previo del grupo de investigación, por lo que las concentraciones están optimizadas. También se realizaron las primeras medidas en soportes sólidos, obteniendo el pH adecuado y la concentración óptima de disolución amortiguadora de fosfato.

Este trabajo pretende continuar dicho estudio, obteniendo las condiciones óptimas de inmovilización de los reactivos en los soportes sólidos para su determinación colorimétrica, además de las características analíticas del método y observando su validez para muestras reales. Se dividirá en dos partes:

-Primero se estudiará la reacción en disolución mediante espectrometría de absorción molecular UV-vis para aprender a manejar el material y los reactivos y comprender el funcionamiento de la reacción.

-En la segunda parte se estudiará la reacción en soportes sólidos, realizando una serie de estudios donde se observará como afectan los distintos parámetros a la reacción. También se comprobará el método determinando tiramina en muestras reales.

El trabajo se estructura de la siguiente forma:

1. Consulta de material bibliográfico y artículos sobre el tema.
2. Comprender el funcionamiento y aprender el correcto manejo de un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis.
3. Aprender a resolver un problema en el ámbito de la Química Analítica siguiendo el método científico.
4. Estudiar el método en disolución y así comprender la reacción de formación de AuNPs.
5. Aprender a elaborar los soportes sólidos y el correcto manejo de la aplicación de Smartphone para llevar a cabo las medidas.
6. Estudiar y optimizar los diferentes parámetros que afectan a la inmovilización: %celulosa, concentración de Au (III) y TAO, momento en el que se adicionan los reactivos, uso de estabilizantes, temperatura de reacción, secado de las placas y tiempo de medida.
7. Establecer las características analíticas del método, como es el intervalo lineal o la reproducibilidad, además de cuantificar tiramina a partir de la formación de AuNPs en tiras reactivas.
8. Mejorar el tiempo de reacción acoplado Pt (II) a la reacción y optimizando las variables.
9. Validar el método a través de la determinación de muestras reales.
10. Extraer información analítica de los datos obtenidos en el laboratorio y llevar a cabo su correcto tratamiento, exponiendo los resultados debidamente.

3. Parte experimental

3-1. Reactivos y disoluciones

3.1.1 Reactivos generales

- Disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de concentración en torno a 0,1M y pH 7, preparada disolviendo aproximadamente 3,54 g de Na_2HPO_4 (Panreac 131679.1211) en 250mL de agua mili-Q y ajustando el pH con una disolución de HCl 1M.
- Celulosa microcristalina de 20 micras (Sigma-Aldrich 310697-50G).
- Ácido tricloroacético (Scharlab NS 15390100)), TCA. Se prepara una disolución al 5% pesando 5 g y diluyendo en 100 mL de agua destilada.
- StabilGuard Inmuniassay Stabilizer. Surmodics. Product (SGIS) Nº SC01-0050.299.
- StabilCoat Inmuniassay Stabilizer. Surmodics. Product (SCIS) NºSG01-0050.298.

3.1.2 Disoluciones de oro

- Chloroauric acid hydrate, $\text{HAuCl}_4\text{H}_2\text{O}$, (SIGMA REF: 254169). Se prepara una disolución 50mM con agua mili-Q.
Disoluciones de otras concentraciones se preparan a partir de diluciones de esta, diluyendo en este caso con disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 7.

3.1.3 Disoluciones de platino

- Tetracloroplatinato de potasio K_2PtCl_4 . Se prepara una disolución 50 mM, disolviendo 20,76 mg de la sal en 1 mL de agua mili-Q.
Disoluciones de otras concentraciones se preparan a partir de diluciones de esta, diluyendo en este caso con disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 7.

3.1.4 Disoluciones de enzimas

- Enzima Tiramina Oxidasa (TAO) (Asahi kasei pharma T-25) 4,600U/mg. Se prepara una disolución 50U/mL disolviendo 5,43 mg de TAO en 0,5 mL de agua mili-Q.
Disoluciones de otras concentraciones se preparan a partir de diluciones de esta, diluyendo en este caso con disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 7.

3.1.5 Disoluciones de tiramina

- Tiramina (Tiramylne hydrochloride) (TYR) (Sigma-Aldrich 53300) pureza $\geq 98\%$. Se prepara una disolución 50mM disolviendo 8,68 mg en 1 mL de disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 7.
Disoluciones de distintas concentraciones se preparan a partir de diluciones de esta, diluyendo siempre en disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 7.

3.2. Instrumentación y material

3.2.1 Instrumentos

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis SPECORD 210 Plus, lámpara de wolframio y deuterio y rango de medida entre 185 y 1200nm.
- pH-metro CRISON, Basic 20.
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión $\pm 0,01$ mg.
- Teléfono móvil Xiaomi Mi A2 con cámara dual 12+20 Megapíxeles y sistema operativo Android 10 con aplicación Color Grab™ v.3.9.2, del equipo Loomatix®, capaz de recoger, capturar y reconocer colores en código RGB.

3.2.2 Material y aparatos

- Material de vidrio: vasos precipitado, matraces.
- Micropipetas Eppendorf de volúmenes 2-20 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L.
- Material desechable: puntas de micropipetas, Eppendorf, pipetas Pasteur y tubos Falcon.
- Cubetas de cuarzo Hellma de 1 cm de paso óptico.
- Agitador magnético A-01, SBS.
- Placas de pocillos Nunc™.
- Incubadora Thermo scientific compacta Herathem
- Centrífuga HERMLE Z300 (Laboratorios SHAPIR)
- Filtros de centrifuga Amicon® Ultra-4 de 10K
- Perforadora
- Ventilador
- Papeles comerciales Ahlstrom: Grade 319 Lot 101665, Grade 238 Lot 102332, Grade 601 Lot 103335, Grade 6615 Lot 091061, Grade 142 Lot 102563.

3.3 Procedimiento experimental

3.3.1 Método en disolución

Las medidas de absorbancia se llevan a cabo en un espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis. Se utilizan cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico donde el volumen final es 2mL. Las medidas se realizan en modo barrido espectral midiendo el espectro completo desde 400 a 1200 nm tomando datos cada dos minutos hasta que la reacción transcurra completamente.

Antes de realizar las medidas se toma la referencia, para ello se coloca disolución amortiguadora de tampón fosfatos ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) a pH 7 en la cubeta de medida y en la de referencia.

Las disoluciones medidas se prepararon añadiendo sobre 1920 μ L de disolución amortiguadora 20 μ L de la disolución de tiramina correspondiente y 20 μ L de TAO de 50U/mL teniendo una actividad final en cubeta de 0,5 U/mL, transcurridos 5 minutos se adiciona 40 μ L de Au(III) 50mM para tener una concentración final en cubeta de 1 mM, la adición se hace a los 5

minutos para que haya transcurrido completamente la reacción enzimática y se consuma el O₂ disuelto. La reacción se realiza con agitación y a una temperatura de 40°C.

Una vez obtenido todo el espectro se elige el máximo de absorción para realizar la cuantificación de tiramina, en este caso corresponderá con 560 nm.

3.3.2 Método en soporte sólido

3.3.2.1 Celulosa

El procedimiento general será formar unas celulosas sobre las que se adicionarán los distintos reactivos. Se prepara una dispersión de celulosa en 2 mL de disolución amortiguadora o en una mezcla de disolución amortiguadora y Au (III) 50 mM según convenga. A continuación, se depositarán 75 µL de dicha suspensión en cada hueco de una tapa de placa de pocillos. Se deja secar en la incubadora a 40 °C durante aproximadamente 2 horas, la suspensión de celulosa se habrá convertido en un soporte sólido donde adicionar los reactivos.

Sobre la celulosa se añaden los distintos reactivos, se estudiará en que momento y en qué cantidad hay que adicionarlos para obtener mejores resultados en las señales. En cada prueba siempre se tendrá un blanco, el cual se hará siguiendo los mismos pasos que las muestras pero sustituyendo la tiramina por tampón fosfato pH 7. Tanto las muestras como los blancos se hacen por cuadruplicado.

3.3.2.2 Medidas

Se mide la señal con el teléfono móvil, en concreto con la aplicación Color Grab®, obteniendo las coordenadas RGB. Se utilizará una caja de iluminación (Figura 4) para tomar las medidas, ya que así las medidas serán tomadas en las mismas condiciones de iluminación y distancia desde la cámara hasta la muestra, de lo contrario podría cambiar la reproducibilidad en las medidas.



Figura 4. Caja de iluminación

De las tres coordenadas se elige la R, ya que ofrece mejores resultados a la hora de medir la formación de AuNPs. En concreto se utilizará el parámetro R_M/R_0 , siendo R_M el valor de la coordenada para cada muestra y R_0 el valor del blanco, ya que con este parámetro se obtienen mejores valores de DSR.

3.3.2.3 Papeles

Se cortaron los papeles estudiados de forma circular con ayuda de una perforadora, obteniendo círculos de aproximadamente 3mm de diámetro, colocándolos sobre el soporte sólido (tapas de las placas de pocillos). A ellos se añaden las distintas disoluciones de reactivos, dejándolas secar según convenga.

3.3.3 Tratamiento de la muestra de queso

El queso que se utiliza en el análisis es sometido al tratamiento de extracción que se muestra en la Figura 5.

Se pesan 10 gramos de queso y se trituran con 30 mL de ácido tricloroacético al 5 %, se deja en lixiviación durante media hora y después se introduce en el congelador otra media hora. La baja temperatura hace que las grasas se solidifiquen. La mezcla se centrifuga durante 20 minutos a temperatura ambiente y a una velocidad de 6000 rpm. La fase sólida se descarta, y la disolución sobrenadante se lleva a pH neutro mediante la adición de NaOH 2M, apareciendo cierta turbidez, por lo que se lleva a cabo una segunda centrifugación en las mismas condiciones nombradas anteriormente. En esta ocasión el sobrenadante se filtra a través de filtros de membrana de nylon de 25 mm de diámetro de poro (ALBET-NY-045-25-BL) y se recoge en un matraz aforado de 50 mL, enrasando finalmente con tampón fosfato. La disolución se introduce en un filtro de centrifuga de 10K (Amicon® Ultra-4), obteniendo así la disolución con la que se trabajará.

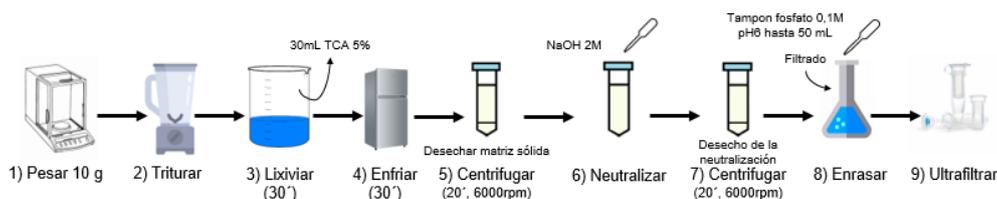


Figura 5. Esquema tratamiento queso para la extracción de tiramina

4. Resultados

Como se ha comentado en los objetivos, la finalidad del trabajo es el desarrollo de un método rápido de determinación de tiramina a través de tiras reactivas, basado en la reacción enzimática de tiramina con la enzima TAO en presencia de Au (III).

El primer paso será comprobar la reacción en disolución a través de un espectrómetro para comprobar que se da la reacción de formación de NPs de oro mediante la reacción de oxidación de la enzima TAO, previamente reducida en presencia de tiramina. Una vez comprobada la reacción se pasará al estudio en soportes sólidos, de celulosa principalmente, estudiando la reacción y optimizando las condiciones de inmovilización de los reactivos.

4.1 Estudio en disolución

4.1.1 Calibración tiramina

Estudios previos habían demostrado la posibilidad de determinar tiramina en presencia de TAO y Au (III) en disolución, por lo que el primer paso fue comprobar las condiciones experimentales en las que la reacción se lleva a cabo y obtener sus características analíticas.

Para ello se lleva a cabo una calibración para conocer el rango de respuesta lineal. Se realizan medidas de absorbancia para concentraciones de tiramina en cubeta entre 5×10^{-5} M y 5×10^{-4} M. Se registra todo el espectro entre 400 nm y 1200 nm cada 2 minutos hasta que las medidas se estabilizan como se muestra en la Figura 6.

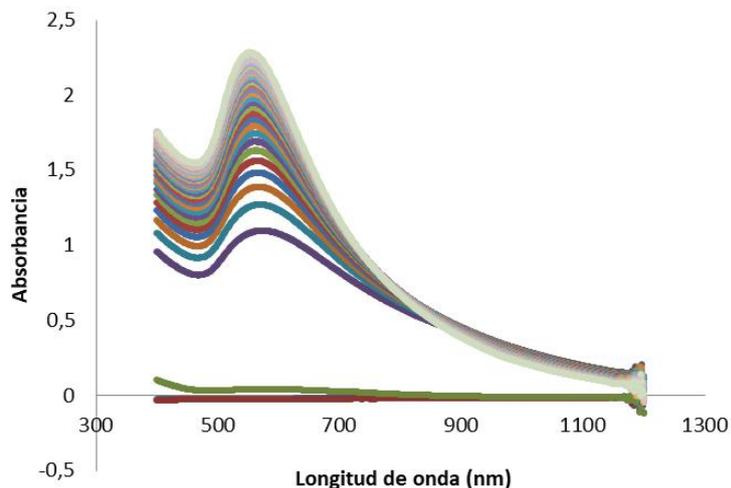


Figura 6. Espectro obtenido para una disolución de concentración 3×10^{-4} M de tiramina

Se selecciona la longitud de onda del máximo, que en este caso corresponde a 560 nm (plasmón formación AuNPs) y se obtiene la cinética de reacción para las distintas concentraciones (Figura 7). Como puede observarse, la cinética de reacción aumenta con la concentración de tiramina.

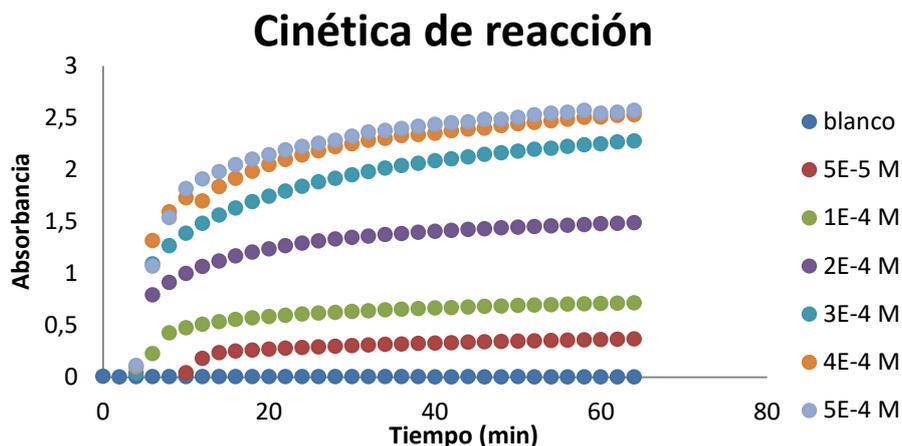


Figura 7. Variación de la absorbancia a 560nm con el tiempo a distintas concentraciones de tiramina

Se realiza la recta de calibrado (Figura 8), midiendo concentraciones hasta 5×10^{-4} M, tras hacer un análisis de regresión (Anexo 1) se obtiene un rango lineal hasta 3×10^{-4} M.

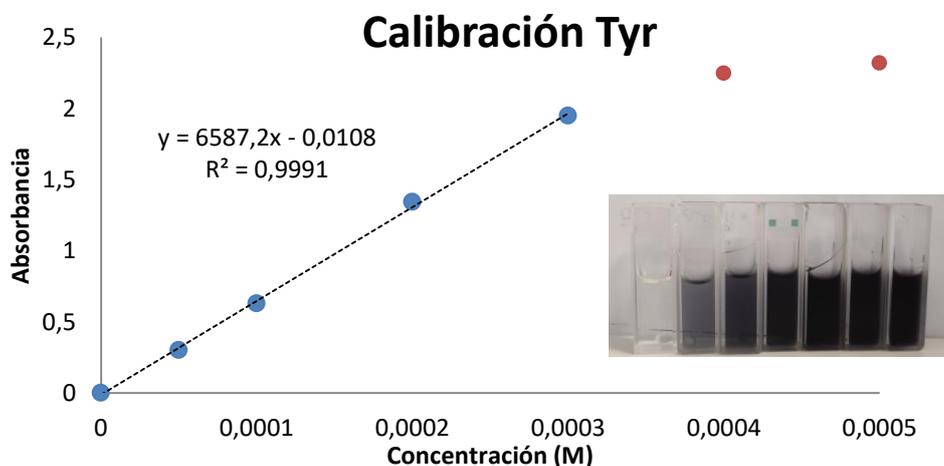


Figura 8. Recta de calibrado de tiramina a pH 7 [Au(III)]=1mM, [TAO]=0,5U/mL, $\lambda=560$ nm

Las características analíticas obtenidas a 40°C, pueden observarse en la Tabla 1.

| | |
|---------------------|------------------------------------------|
| Rango lineal | 5x10 ⁻⁵ -3x10 ⁻⁴ M |
| LOQ | 11,5x10 ⁻⁶ M |
| LOD | 3,4x1 ⁻⁶ M |
| RSD (2,5mM) | 6% |

Tabla 1. Características analíticas método en disolución a 40°C

4.2 Estudio en soporte sólido

4.2.1 Soportes celulosa

Esta parte del estudio se centra en comprobar que se produce la reacción de tiramina/TAO/Au(III) en soportes sólidos. Sobre los soportes de celulosa preparados según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2.1 se adiciona 10 µL de una disolución que previamente se ha preparado en un Eppendorf. Para dicha disolución se añaden 20 µL de tiramina 50 mM y 20 µL de TAO 50 U/mL (obteniendo una concentración final de tiramina 25 mM y una actividad de la enzima 25 U/mL) y se deja reaccionar durante cinco minutos, ya que en estudios previos se ha determinado que este es el tiempo óptimo para que haya transcurrido la reacción enzimática en su totalidad y se haya consumido el O₂ disuelto. Se observa formación de nanopartículas al reaccionar el Au (III) de la celulosa (Figura 9).

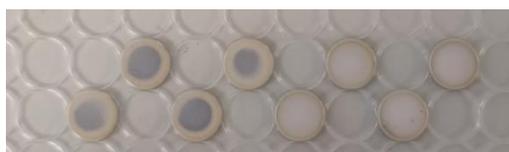


Figura 9. Señales de determinación de tiramina 25 mM y blancos

Para cuantificar la variación se midieron las coordenadas RGB mediante un Smartphone utilizando la aplicación Color Grab®, dichas coordenadas pueden verse en la Tabla 2. En la Figura 10 pueden verse los datos que se obtienen con dicha aplicación.

| | R | G | B |
|----------------|----------|----------|----------|
| muestra | 171 | 170 | 178 |
| | 160 | 160 | 173 |
| | 169 | 169 | 179 |
| | 165 | 165 | 175 |
| blanco | 214 | 210 | 207 |
| | 216 | 212 | 208 |
| | 213 | 209 | 206 |
| | 214 | 210 | 206 |

Tabla 2. Valores RGB. Celulosa 5%, [TAO]= 25U/pocillo, [Au(III)]= 1mM, [Tyr]= 25mM, pH 7

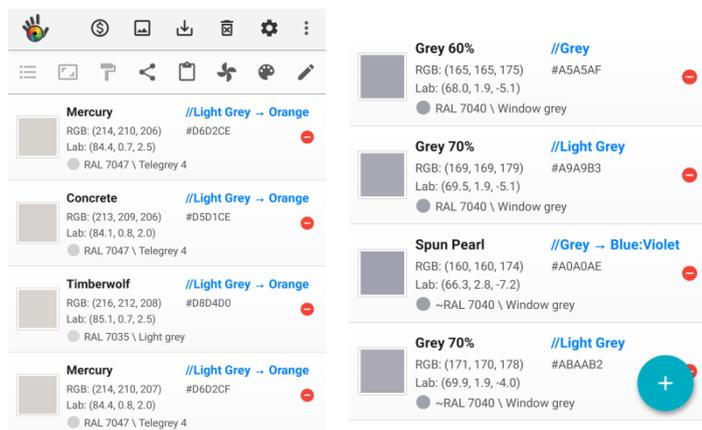


Figura 10. Aplicación Color Grab

Se elige la coordenada R, ya que se sabe por estudios previos que ofrece mejor sensibilidad a la formación de AuNPs¹³. Se estudian varios parámetros como señal, entre ellos R_M/R_0 , R_0-R_M , R_0-R_M y R_0-R_M , donde R_M es el valor de la coordenada para cada muestra y R_0 el valor del blanco.

| | valor \pm s | DSR |
|-----------------|-----------------|--------|
| R_0-R_M | 48 \pm 4,85 | 10,10% |
| $(R_0-R_M)/R_0$ | 0,25 \pm 0,02 | 8,00% |
| R_M/R_0 | 0,77 \pm 0,02 | 2,60% |

Tabla 3. Valores con su DSR para los distintos parámetros estudiados. Celulosa 5%, [TAO]= 25U/pocillo, [Au(III)]= 1mM, [Tyr]= 25mM, pH 7

Como se observa en la Tabla 3 los valores más bajos de DSR se obtienen para el parámetro R_M/R_0 , por lo que será el utilizado a lo largo de todo el estudio.

Se ha comprobado con estas primeras medidas que se produce señal (color grisáceo), la cual difiere de los blancos, por lo que es cuantificable y además reproducible.

4.2.2 Papeles

Se estudian también otros soportes, estos aparecen especificados en el apartado 3.2.2. Hay soportes de dos tipos de materiales, fibras de algodón de alta pureza (601, 319, 238) y de fibra de vidrio y material sintético (6615, 142). Se estudió la reacción en las condiciones óptimas para ambos métodos.

Los resultados fueron negativos para todos los soportes estudiados, en la mayoría de los papeles no se produjo la reacción, lo que hizo que el papel no se coloreara. Se cree que esto puede ser debido al medio de reacción entre otros factores, ya que cuando se preparan las celulosas se hacen en solución amortiguadora de fosfato 0,1 M y pH 7, lo que aporta un buen medio para que se produzca la reacción, en cambio al utilizar estos soportes ese medio no existe, lo que es negativo para la reacción.

Por el carácter hidrofóbico de esos soportes se formaba una gota que no mojaba el soporte al añadir las distintas disoluciones, otro factor negativo a la hora de usar estos papeles como soportes.

Por todos estos resultados se descartó el uso de papeles comerciales para la determinación de tiramina en soportes sólidos.

4.2.3 Optimización condiciones de inmovilización

Tras comprobar que la reacción se produce en los soportes sólidos de celulosa y se obtiene una señal medible, se pasa a la optimización de diferentes parámetros para mejorar dicha señal.

4.2.3.1 Estudio porcentaje de celulosa

Se empieza por optimizar el porcentaje de celulosa, para ello se preparan dos dispersiones del 3 y 5% de celulosa y Au (III) 1mM con la que se harán las celulosas en los soportes sólidos. Una vez secas se añade a cada pocillo 10 μ L de una disolución de TAO y tiramina que ha reaccionado durante 5 minutos. Las placas se dejan secar al aire dentro de una caja para que no reciban luz directa, ya que de lo contrario podría afectar a la formación de las AuNPs (reducción Au (III)). Una vez secas se mide la señal RGB.

Los resultados pueden verse en la Tabla 4, se observa que con un porcentaje de celulosa al 5% hay mayor señal, siendo esta más reproducible. Además, con porcentajes de celulosa menores las AuNPs no se forman, por lo que no se obtendría una señal medible. Por esto el porcentaje óptimo que se utilizará en adelante será celulosas al 5%.

| Porcentaje celulosa | 3% | 5% |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| $(R_M/R_0)\pm s$ | 0,94 \pm 0,02 | 0,79 \pm 0,01 |
| DSR | 2,44% | 1,48% |

Tabla 4. Resultados estudio %celulosa. [TAO]= 25U/pocillo, [Au(III)]= 1mM, [Tyr]= 17,5mM

4.2.3.2 Estudio concentración de Au (III)

El siguiente estudio fue la concentración de Au (III) que debe tener la dispersión de celulosa previa al secado. Para ello se preparan 3 dispersiones de celulosa al 5% con concentraciones de Au (III) de 0,5 mM, 1 mM y 2 mM con disolución amortiguadora 0,1 M y pH 7. Tras el secado del soporte se añade la disolución de TAO y tiramina que ha estado reaccionando durante 5 minutos y se deja secar tapadas de la luz del sol, una vez secas se mide las señales.

En la Tabla 5 pueden verse los resultados. Las celulosas con concentración 2 mM se descartan debido a que no se obtiene señal ya que las celulosas adquieren un color amarillo debido a la alta concentración de oro que impide que pueda medirse el color gris de las AuNPs. También se observan mejores señales trabajando con concentraciones de oro de 1mM, ya que los ratios son mejores y su dispersión menor, por lo que será la concentración que se utilizará en adelante.

| [Au(III)] | 0,5mM | 1mM | 2mM |
|------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| $(R_M/R_0)\pm s$ | 0,81 \pm 0,03 | 0,77 \pm 0,02 | no hay señal |
| DSR | 3,70% | 2,59% | |

Tabla 5. Resultados concentración Au (III). Celulosa 5%, [TAO]= 25U/pocillo, [Tyr]= 17,5mM

4.2.3.3 Estudio temperatura

El tercer factor a estudiar es la temperatura, para ello se realiza un estudio para determinar si la reacción debe realizarse a temperatura ambiente o a 40°C. Se añade a cada pocillo 10 μ L de

una disolución de TAO y tiramina que ha estado previamente reaccionando durante 5 minutos, una placa se mete a la incubadora a 40°C y la otra se guarda a temperatura ambiente en una caja para impedir que las AuNPs se dañen con la luz. Cuando las celulosas están secas se miden las coordenadas.

En la Tabla 6 pueden verse los resultados, obteniendo mejores señales para las placas a temperatura ambiente ya que se obtienen mayores diferencias entre la señal y el blanco, por lo que la reacción se llevará a cabo en estas condiciones.

| Temperatura | 40°C | ambiente |
|-------------------|-----------|-----------|
| $(R_M/R_0) \pm s$ | 0,82±0,03 | 0,77±0,03 |
| DSR | 4,66% | 3,45% |

Tabla 6. Resultados temperatura. Celulosa 5%, [TAO]= 25U/pocillo, [Tyr]= 17,5mM

4.2.3.4 Estudio concentración TAO

El siguiente paso fue el estudio del efecto de la concentración de TAO para que se produzca la formación de NPs en el soporte. Para ello se preparan 6 disoluciones de TAO 6 U/mL, 10 U/mL, 15 U/mL, 20 U/mL, 25 U/mL y 30 U/mL junto con tiramina, que ha estado reaccionando durante 5 minutos antes de añadir 10 µL a cada pocillo.

| [TAO] | 6U/mL | 10U/mL | 15U/mL | 20U/mL | 25U/mL | 30U/mL |
|-------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| $(R_M/R_0) \pm s$ | no hay señal | 0,93±0,03 | 0,90±0,02 | 0,84±0,01 | 0,80±0,03 | 0,79±0,04 |
| DSR | | 3,89% | 2,37% | 2,03% | 4,00% | 5,08% |

Tabla 7. Resultados concentración TAO. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [Tyr]= 2,5mM

En la Tabla 7 pueden verse los resultados. En las placas con una concentración de TAO 6U/mL no se observa señal medible, ya que la concentración de enzima TAO es muy baja para que se produzcan las AuNPs. Para concentraciones 20, 25 y 30 no hay casi diferencia en los ratios, por lo que se elige la concentración de 20 U/mL, además, en esta concentración se observa menor dispersión de los resultados.

4.2.3.5 Estudio estabilizantes

Una vez comprobada la formación de AuNPs en los soportes de celulosa y tras optimizar los parámetros más importantes, se quiso dar un paso más en la preparación de los soportes inmovilizando la TAO en estos, de tal forma que para que se produzca la reacción solo sería necesaria la adición de la muestra.

En estudios previos del grupo de investigación se ha comprobado que cuando se inmoviliza la TAO junto con la celulosa no se obtienen buenos resultados, ya que esta queda retenida en los poros y no se produce la reacción. Por ello se va a estudiar la posibilidad de inmovilizar la TAO junto con un estabilizante, tras la formación del soporte de celulosa y antes de añadir la tiramina.

Se realiza un estudio con dos estabilizantes, StabilCoat (SCIS) y StabilGuard (SGIS). Para ello a los soportes de celulosa y Au (III) se adicionan 10 μ L del estabilizante a distintas concentraciones, 1%, 2,5% y 3%, dejándolo secar a temperatura ambiente. Una vez seco se añade a cada pocillo 10 μ L de una disolución de TAO 20 U/mL dejándola secar. Por último sobre la celulosa seca se adicionan 10 μ L de tiramina 2,5 mM. Los resultados pueden verse en la Tabla 8. También se comparan con los resultados obtenidos sin estabilizante.

| % estabilizante | SICS | | | SGIS | | | sin |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1% | 2,50% | 3% | 1% | 2,50% | 3% | |
| $(R_M/R_0)\pm s$ | 0,81 \pm 0,01 | 0,83 \pm 0,03 | 0,90 \pm 0,04 | 0,83 \pm 0,06 | 0,90 \pm 0,07 | 0,91 \pm 0,05 | 0,83 \pm 0,03 |
| DSR | 2,12% | 4,52% | 4,45% | 8,47% | 5,90% | 3,61% | 3,61% |

Tabla 8. Resultados estabilizantes. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, [Tyr]= 2,5mM

Los mejores resultados se obtienen con StabilCoat en concentración al 1%, ya que sus señales son más reproducibles. Por el contrario, al utilizar el resto de concentraciones y el estabilizante StabilGuard la señal obtenida era menor y menos reproducible.

Como las diferencias no son muy grandes se comprueba mediante un test t que la señal no depende del estabilizante (Anexo 2). Para ello se prueban las dos concentraciones de TAO que dan mejores resultados inmovilizándola con y sin estabilizantes, los resultados pueden verse en la Tabla 9 y se comprueba mediante un test t que las señales no difieren significativamente al usar o no estabilizante, sin embargo se obtiene mejor DSR si se usa estabilizante, por lo que se comprueba que su uso mejora las condiciones de reacción y se decidió seguir trabajando en estas condiciones.

| [TAO] | Con estabilizante | | Sin estabilizante | |
|------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | 20U/mL | 25U/mL | 20U/mL | 25U/mL |
| $(R_M/R_0)\pm s$ | 0,85 \pm 0,02 | 0,85 \pm 0,02 | 0,84 \pm 0,02 | 0,83 \pm 0,03 |
| DSR | 2,84% | 2,96% | 2,96% | 3,49% |

Tabla 9. Resultados TAO con y sin estabilizante. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [Tyr]= 2,5mM, pH 7

Tras demostrarse que la TAO puede añadirse tras el secado del estabilizante se estudió la posibilidad de añadir la TAO junto con el estabilizante, de este modo se acorta el tiempo de fabricación de los soportes sólidos.

Para ello se utiliza el estabilizante StabilCoat al 1%, ya que fue el que mejor resultados proporcionó. Se añade 10 μ L de una disolución del estabilizante al 1% y TAO con una actividad 20 U/mL dejándola secar. Una vez seco se añadieron 10 μ L de una disolución de tiramina 2,5 mM y se deja secar antes de medir las coordenadas. Los resultados pueden verse en la Tabla 10 y se observa, mediante un test t (Anexo 2) que los datos no difieren significativamente respecto a la Tabla 9, por lo que este será un buen método para inmovilizar la TAO en el soporte de celulosa.

| | TAO+SCIS |
|------------------|-----------------|
| $(R_M/R_0)\pm s$ | 0,84 \pm 0,02 |
| DSR | 2,38% |

Tabla 10. Resultados inmovilizar estabilizante junto a TAO. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, [Tyr]= 2,5mM, pH 7

Además como se observa en la Figura 11 el color en la celulosa que se obtiene al inmovilizar la TAO antes de añadir la tiramina es más homogéneo que si se añade la TAO junto con la tiramina.



Figura 11. Señales determinación tiramina (2,5mM) y blancos

4.2.3.6 Estudio tiempo medida

Por último se estudia el tiempo de medida tras la adición de tiramina, para ello se realizan las placas con todo el proceso optimizado y una vez secas se toman medidas cada media hora, pasadas 3 horas se toman las medidas cada hora, los resultados pueden verse en la Tabla 11.

| horas | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $(R_M/R_0) \pm s$ | $0,87 \pm 0,01$ | $0,89 \pm 0,05$ | $0,93 \pm 0,03$ | $0,92 \pm 0,03$ | $0,90 \pm 0,2$ | $0,90 \pm 0,01$ | $0,90 \pm 0,04$ |
| DSR | 0,83% | 6,33% | 3,16% | 3,05% | 1,90% | 1,39% | 4,35% |
| horas | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| $(R_M/R_0) \pm s$ | $0,88 \pm 0,04$ | $0,87 \pm 0,03$ | $0,89 \pm 0,02$ | $0,88 \pm 0,03$ | $0,88 \pm 0,01$ | $0,87 \pm 0,01$ | $0,87 \pm 0,01$ |
| DSR | 5,18% | 3,04% | 1,88% | 2,97% | 1,13% | 1,76% | 1,97% |

Tabla 11. Resultados estudio tiempos medida. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, SCIS=1%, [Tyr]= 4mM, pH 7

Se observa que a partir de las 5 horas las medidas se estabilizan, pero no difieren de la primera medida tomada (cuando la placa se acaba de secar), como el objetivo es desarrollar un método rápido se tomará este tiempo como el óptimo.

A continuación se realiza un estudio del tiempo de medida a tiempos cortos, desde que aparece la coloración debido a la formación de las AuNPs hasta que se seca la placa, dicho estudio se puede observar en la Tabla 12.

| minutos | 0-40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $(R_M/R_0) \pm s$ | Sin señal | $0,89 \pm 0,03$ | $0,86 \pm 0,03$ | $0,91 \pm 0,03$ | $0,92 \pm 0,02$ | $0,95 \pm 0,05$ |
| DSR | significativa | 3,08% | 3,36% | 3,30% | 2,17% | 5,14% |
| minutos | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 |
| $(R_M/R_0) \pm s$ | $0,92 \pm 0,03$ | $0,83 \pm 0,04$ | $0,86 \pm 0,03$ | $0,86 \pm 0,01$ | $0,88 \pm 0,2$ | $0,88 \pm 0,03$ |
| DSR | 3,62% | 4,37% | 3,90% | 1,27% | 1,50% | 3,04% |

Tabla 12. Resultados estudio tiempos cortos. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, SCIS=1%, [Tyr]=4mM, pH 7

Hasta el minuto 45 no se observa una señal medible y significativa, ya que ahí aún no se han formado las AuNPs. A partir del minuto 45 la señal fluctúa y se obtiene una señal menos reproducible, aun así ya se puede determinar la presencia o no de tiramina visualmente por el cambio de color de las placas. Cuando se llega al minuto 85 la placa se ha acabado de secar por lo que sus medidas ya son más reproducibles, y en tiempos mayores las medidas están también estabilizadas, aunque va aumentando la DSR como hemos visto en el estudio a tiempos largos.

Como resultado de este estudio se concluye que se puede determinar de forma cualitativa la presencia o no de tiramina a partir del minuto 45 de adición del analito, para obtener datos más exactos y hacer un análisis semicuantitativo las medidas deberán tomarse en el minuto 85, una vez que las placas estén secas, ya que es el menor tiempo en el que se obtienen señales reproducibles, siendo este el tiempo óptimo, ya que mediante un test t (Anexo 2) se comprueba que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos a las 5 horas y a los 85 minutos.

4.2.4 Calibración tiramina

Una vez optimizado el procedimiento de preparación de los soportes y la forma de llevar a cabo las medidas, se realizó un estudio de calibración. Para ello se realizó una calibración en soportes de celulosa al 5% y Au (III) 1mM, con una concentración de TAO 20 U/mL, SCIS 1% y concentraciones de tiramina comprendidas entre 5×10^{-4} y $2,5 \times 10^{-2}$ M, tras realizar un análisis de regresión y eliminar dos puntos de la recta (Anexo 3) se obtiene el resultado que se muestra en la Figura 12. Se observa que la señal depende de la concentración desde $3,58 \times 10^{-3}$ M hasta $2,5 \times 10^{-2}$ M de forma lineal (LOD= $1,07 \times 10^{-3}$ M).

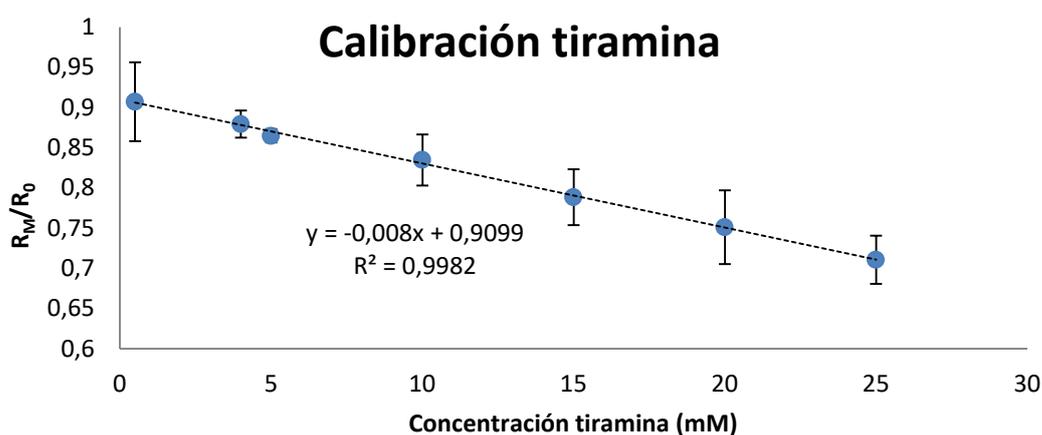


Figura 12. Calibración tiramina soporte sólido. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, SCIS=1% pH 7.

4.2.5 Estudio sin TAO

En estudios previos del grupo de investigación se observó que la reacción de tiramina con Au(III) en ausencia de enzima, daba lugar a la formación de nanoclusters de oro (AuNCs) que podrían evolucionar hacia la formación de AuNPs. Los AuNCs son nanomateriales de tamaño más pequeño que las NPs (1-2nm), suelen ser fluorescentes y no presentan plasmon. Por ello, se quiso estudiar si la reacción también se llevaba a cabo sobre soporte sólido y si se comportaba de forma similar a lo que sucede en disolución.

Para ello se lleva a cabo el mismo procedimiento de preparación de los soportes de celulosa pero eliminando la adición de TAO+SCIS. Una vez que tenemos la placa de celulosa y oro seca se añade 10 μ L de una disolución de tiramina y se deja secar antes de medir las coordenadas. Los resultados pueden verse en la Tabla 13 y se observa que no hay diferencias significativas con respecto al blanco para ninguna de las concentraciones de tiramina, por lo que se confirma que la adición de la enzima TAO es indispensable para que se produzca la reacción.

| [Tyr] | 35mM | 15mM |
|-------------------|-----------|-----------|
| $(R_M/R_0) \pm s$ | 0,96±0,03 | 0,93±0,04 |
| DSR | 3,27% | 4,31% |

Tabla 13. Resultados reacción sin TAO. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, pH 7

4.2.6 Estudio Au+Pt

Una vez optimizado el método se quiso dar un paso más y estudiar el efecto de la adición de otro metal en la formación de las NPs, en este caso Pt. Se ha observado en disolución que la reacción discurre más rápidamente si se le añade Pt (II) ya que favorece la formación de las AuNPs. Esto se utilizará para obtener unos soportes sólidos en los que se reduzca el tiempo el tiempo de reacción, obteniendo un método más rápido. Por estudios previos en disolución se sabe que debe haber el doble de concentración de Pt (II) que de Au (III), por ello se utilizan concentraciones de Au 1 mM y Pt 2 mM.

4.2.6.1 Ensayos previos

Uno de los problemas que aparecieron fue el diseño de los soportes sólidos al añadir ambos metales, ya que estos reaccionan entre sí formando un precipitado negro con el tiempo sin la presencia de TAO ni tiramina, para ello se estudian varias estrategias para su fabricación.

Se realizó una primera prueba fabricando los soportes de celulosa junto con ambos metales y secándolos en la incubadora, pero dicho procedimiento no fue viable ya que se producía la reacción, catalizada por el calor, dando el color negro correspondiente al precipitado.

El segundo procedimiento fue seguir el proceso de fabricación de las placas de oro, añadiendo el Pt (II) al final del proceso, junto con la tiramina. Para ello una vez seca la placa de celulosa y oro se añade la enzima TAO junto con el estabilizante SCIS y se deja secar, por último se añadió la tiramina junto con el Pt. En estas placas no se observan cambios de color significativos, por lo que también se descarta.

La tercera estrategia fue añadir el Pt (II) junto con la TAO a las placas secas de celulosa y Au (III), y añadir después la tiramina, por un lado, a placas donde la TAO ya se hubiera secado y por otro cuando la placa aún está mojada. En ninguna de las placas se observó una señal significativamente mejor que solo utilizando Au (III).

La siguiente estrategia que se probó fue añadir a las placas de celulosa al 5% 10 μ L de una disolución 1 mM de Au y secar con el ventilador, una vez seco añadir 10 μ L de una disolución 2 mM de Pt y secar también con un ventilador. A estas placas se le añaden 10 μ L de una disolución de TAO y tiramina que ha estado reaccionando durante cinco minutos y se deja secar al aire. Con este método se observa cambio de color a morado, aunque el color es irregular a lo largo de la placa.

Por último se probó a hacer las placas solo de celulosa al 5% y añadir 10 μ L de una disolución que fuera 1 mM de Au (III) y 2 mM de Pt (II), secándola rápidamente con un ventilador para evitar que reaccionen entre sí. Una vez seco se añadió la TAO junto con la tiramina que han estado reaccionando durante 5 minutos y se deja secar a temperatura ambiente tapada de la

luz directa. Con dicha estrategia si se observa un cambio de color apreciable, por lo que se elige como modo de fabricación de las placas para estudios posteriores. Un esquema del método elegido puede observarse en la Figura 13.

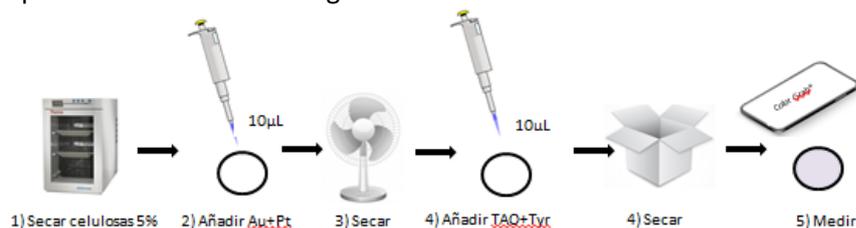


Figura 13. Esquema procedimiento

También se prueba este procedimiento utilizando los papeles comerciales especificados en el apartado 3.2.2 y se observa que en algunos papeles si se obtuvo algo de color al utilizar el método de oro y platino, pero esto fue debido a la reacción entre ambos metales, ya que se formó su precipitado negro característico.

4.2.6.2 Optimización tiempo de medida

Se observa que con el paso del tiempo las placas que contienen tiramina y los blancos evolucionan al mismo color, por lo que se realiza un estudio para saber en qué momento se obtienen mejores señales.

| tiempo | 5 minutos | 10 minutos | 15 minutos | 20 minutos | 30 minutos |
|-------------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|
| $(R_M/R_0) \pm s$ | no se observa señal | 0,69±0,01 | 0,70±0,01 | 0,72±0,02 | 0,77±0,01 |
| DSR | | 1,59% | 1,73% | 2,92% | 1,54% |

Tabla 14. Resultados señal-tiempo. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [Pt]=2mM, [TAO]=20U/ml [Tyr]= 20mM, pH 7

Como se observa en la Tabla 14 se empieza a obtener señal a partir de los 10 minutos, además este será el tiempo óptimo, ya que cuanto mayor tiempo peor ratio se obtiene porque con el tiempo todas las placas tienden a las mismas coordenadas independientemente de la concentración de tiramina. Por lo que las medidas deben tomarse a los 10 minutos de añadir la tiramina.

4.2.6.3 Estudio estabilizantes

Se estudia si para esta reacción el uso de estabilizantes es favorable. Para ello se preparan dos tipos distintos de placa, en una de ellas se le añade a la celulosa seca la disolución de Au (III) y Pt (II) y se seca con el ventilador, mientras que en la otra placa a esta disolución de Au (III) y Pt (II) se le añade también el estabilizante SCIS al 1%, secando la placa también con el ventilador. Una vez secas se añadió 10 µL de una disolución de TAO y tiramina que ha estado reaccionando durante 5 minutos. Los datos se tomaron a los 10 minutos del transcurso de la reacción, observando los resultados en la Tabla 15.

| | Sin SCIS | con SCIS |
|-------------------|-----------|-----------|
| $(R_M/R_0) \pm s$ | 0,71±0,01 | 0,81±0,05 |
| DSR | 6,68% | 2,45% |

Tabla 15. Resultados estabilizante. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [Pt]=2mM, [TAO]=20U/ml [Tyr]= 5mM, pH 7

Como se observa los resultados son mejores si no se usan estabilizantes, ya que salen ratios mejores con menor desviación, por lo que para este método no se usarán estabilizantes.

4.2.6.4 Estudio inmovilización y concentración TAO

Se quiso mejorar el método intentando inmovilizar la TAO en el soporte, para así poder añadir la tiramina sola. Como se ha demostrado anteriormente esto se ha conseguido en las placas que solo tenían Au (III), ahora se va a estudiar dicha inmovilización en las placas que contienen ambos metales.

Primero se estudia si la TAO puede inmovilizarse sola. Para ello se añaden 10 μL de una disolución de TAO de actividad 20 U/mL a una placa donde previamente se han inmovilizado los metales y se seca con el ventilador para que se produzca un secado rápido. Una vez secas se añaden 10 μL de una disolución de tiramina 5 mM, se espera 10 minutos hasta que se produce la coloración de la placa a un color morado, entonces se toman las coordenadas (Tabla 16).

| | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------|------|--------------|-------|
| Réplica | 1 | 2 | 3 | 4 | media | 0,82 |
| R_M/R₀ | 0,82 | 0,84 | 0,82 | 0,81 | s | 0,015 |
| | | | | | DSR | 1,91% |

Tabla 16. Datos medidas TAO inmovilizada previamente. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [Pt]=2mM, [TAO]=20U/ml [Tyr]= 5mM, pH 7

Como se observa se produce una señal medible, por lo que será posible inmovilizar la enzima TAO previamente a la adición del analito.

Posteriormente se estudia el efecto de la concentración de TAO añadida a la celulosa tras inmovilizar el oro junto con el platino. Para ello se preparan 6 disoluciones de TAO 5 U/mL, 10 U/mL, 15 U/mL, 20 U/mL, 25 U/mL y 35 U/mL y se adicionan 10 μL en cada pocillo, secándolo las placas con ayuda de un ventilador. Una vez seco se añadieron 10 μL de una disolución de tiramina 15 mM tomando datos a los diez minutos.

| [TAO] | 5U/mL | 10U/mL | 15U/mL | 20U/mL | 25U/mL | 35U/mL |
|-------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| (R_M/R₀)\pms | 0,83 \pm 0,02 | 0,73 \pm 0,02 | 0,76 \pm 0,04 | 0,77 \pm 0,04 | 0,82 \pm 0,03 | 0,88 \pm 0,02 |
| DSR | 2,89% | 3,11% | 5,72% | 5,85% | 3,14% | 2,24% |

Tabla 17. Resultados concentración TAO. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [Pt]=2mM, [Tyr]= 15mM, pH 7

Como se puede ver en la Tabla 17 los mejores resultados se obtienen para concentraciones de TAO de 10 U/mL, por lo que esta será la concentración óptima que se utilizará a partir de ahora, ya que se obtienen mejores ratios con menores desviaciones, es decir, los resultados son más reproducibles.

En la Figura 14 pueden verse las señales que se obtienen con el método optimizado.



Figura 14. Señales determinación tiramina 15mM y blancos

4.2.6.5 Calibración TAO

Por último se estudia si hay dependencia de la concentración de tiramina con la señal. Para ello se realizó una calibración con concentraciones comprendidas entre 5×10^{-4} y 1×10^{-2} M, obteniendo los resultados de la Figura 15.

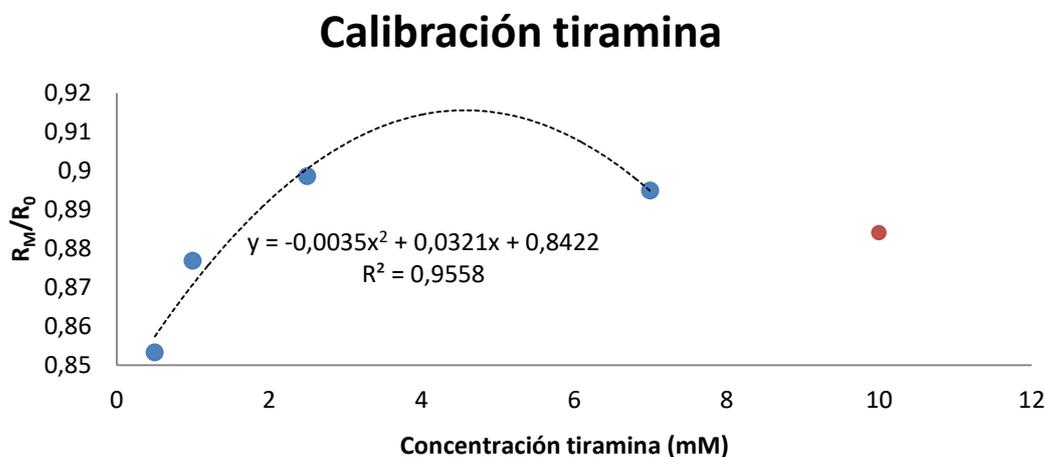


Figura 15. Calibración tiramina soporte sólido. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [Pt]=2mM [TAO]=10U/ml, pH 7

Si se elimina el punto correspondiente a 1×10^{-2} M podría ajustarse de forma polinómica, no obstante se determina que no es un buen método para cuantificar la concentración de tiramina. Si sirve para determinaciones cualitativa, ya que la reacción se produce rápidamente (10 minutos desde la adición del analito) siendo un buen método de análisis rápido. En un futuro se estudiará mejor la reacción para que pueda pasar a ser semicuantitativa.

4.2.7 Muestras reales

Por último se prueba el método con muestras reales, se utilizaron muestras de vino blanco Palacio de Vivero Verdejo (2020) y muestras de queso gouda.

4.2.7.1 Vino blanco

Primero se comprueba la presencia de tiramina utilizando las placas de oro y platino. Para ello se preparan las placas con el método optimizado y se añaden 10 μ L de la muestra de vino en cada pocillo. Pasados 10 minutos se observa cambio de color en las placas, lo que significaría presencia de tiramina en la muestra.

En segundo lugar se intenta hacer una determinación más cuantitativa de la tiramina presente en la muestra, para ello se preparan las placas solo con oro y se añaden 10 μ L de la muestra. Las señales obtenidas pueden verse en la Tabla 18.

| replica | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------|------|------|------|------|
| R_M/R_0 | 0,82 | 0,85 | 0,86 | 0,89 |

| | |
|-------|-------|
| media | 0,86 |
| s | 0,03 |
| DSR | 3,89% |

Tabla 18. Muestra vino. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, SCIS=1% pH 7

A pesar de que se obtiene señal el color de las placas no es el mismo que cuando se realiza un patrón de tiramina, por lo que se puede concluir que en dicha señal influye la matriz, que al ser tan compleja pueden existir otros compuestos que favorezcan la reducción del Au (III) y la formación de AuNPs, por lo que no se consideró un método adecuado para la determinación de la concentración de tiramina presente en el vino. Esto puede ser debido a que el vino contiene muchos oxidantes y antioxidantes, los cuales influyen en la reacción, por ello se necesitan métodos más complejos como puede ser la cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fotodiodos¹⁷.

4.2.7.1 Queso

La siguiente muestra que se prueba es el queso. Se sabe que debido a las grasas que contiene y otros componentes tiene efectos matriz que afectan a la reacción, por lo que se trabajará con muestras de queso gouda dopadas, ya que este queso se toma como blanco al no contener tiramina, sabiendo así como afecta la matriz a la determinación.

Primero se comprueba que se obtiene señal, para ello se preparan placas con oro y una vez listas se añaden 10 μ L de la disolución de queso gouda ultrafiltrado dopada con tiramina con una concentración final de 10 mM y se deja secar a temperatura ambiente. Se observa que no se obtiene una señal significativa, esto puede ser debido a que las grasas de queso impiden la reacción.

Se prueba el mismo procedimiento pero esta vez se secan las placas en la incubadora a 40°C en vez de al aire, ya que se sabe que el calor favorece la reacción en muestras de queso. Se añaden 10 μ L de una disolución de queso gouda ultrafiltrado dopada con tiramina 10 mM. Una vez secas las placas se miden las coordenadas, ya que esta vez sí se obtiene un cambio de color, los resultados pueden verse en la Tabla 19.

| | | | | | | |
|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|--------------|-------|
| réplica | 1 | 2 | 3 | 4 | media | 0,92 |
| R_M/R₀ | 0,95 | 0,92 | 0,93 | 0,86 | s | 0,03 |
| | | | | | DSR | 3,27% |

Tabla 19. Muestra queso dopado. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, SCIS=1%, [Tyr]=10mM pH7

Como se observa se obtiene señal pero no es comparable con la calibración anterior, ya que no está hecha en las mismas condiciones, por ello se realiza el mismo procedimiento con un patrón de tiramina para poder comparar los resultados. Para ello se añade a las placas de oro optimizadas 10 μ L de una disolución 10 mM de tiramina y se seca en la incubadora a 40°C, los resultados pueden verse en la Tabla 20.

| | | | | | | |
|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|--------------|-------|
| réplica | 1 | 2 | 3 | 4 | media | 0,87 |
| R_M/R₀ | 0,84 | 0,88 | 0,90 | 0,86 | s | 0,02 |
| | | | | | DSR | 2,97% |

Tabla 20. Muestra patrón tiramina. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, SCIS=1%, [Tyr]=10mM pH7

Mediante un test t (Anexo 2) se observa que los resultados entre el patrón y la muestra dopada difieren significativamente, por lo que para comprobar si hay efectos matriz se realizan dos calibraciones que se compararán posteriormente, una de ellas llevará la matriz de queso gouda ultrafiltrado con distintas concentraciones de tiramina, mientras que la otra se hará con distintas concentraciones de tiramina en disolución amortiguadora. Ambas estarán en la incubadora a 40°C después de añadir el analito. Estas calibraciones pueden verse en la Figura 16.

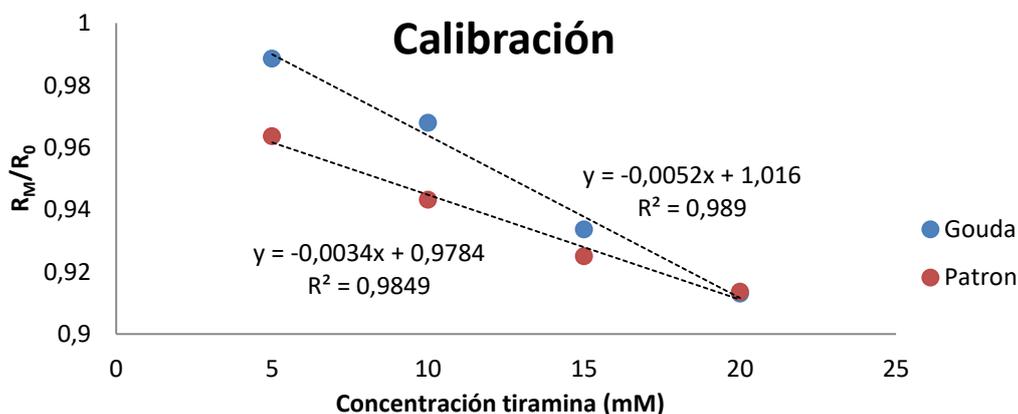


Figura 16. Calibración muestra. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, pH 7

Tras realizar las rectas de calibrado se comparan las pendientes mediante un test t al 95%.

| | Recta patrón | Recta gouda |
|---------------------------|--------------|-------------|
| Pendiente | -0,00336364 | -0,00521739 |
| Incertidumbre | 0,00038834 | 0,00029458 |
| Grados de libertad | 2 | 2 |

Tabla 21. Datos pendientes y sus incertidumbres rectas de calibrado

| t exp | t crit |
|-------|--------|
| 3,8 | 2,77 |

Tabla 22. Test t comparación pendientes

Como se observa en los datos de la Tabla 22 estadísticamente las pendientes difieren, ya que $t_{exp} > t_{crit}$, lo que significa que existe efecto matriz. Esto puede deberse a que, aunque la muestra de queso ha pasado por varios procesos para intentar eliminar la máxima cantidad de grasas e interferencias posibles, aún quedan parte de ellas, lo que afecta a la detección de tiramina.

Por último se lleva a cabo la validación del método para este tipo de queso a través de la determinación de una muestra de concentración de tiramina conocida. Para ello se realiza una disolución de tiramina 12 mM en la disolución de queso gouda ultrafiltrado y se añaden 10 µL a cada pocillo dejándolo secar en la incubadora.

Se hicieron tres réplicas obteniéndose los datos de la Tabla 23.

| Réplica | 1 | 2 | 3 |
|------------------------------------|------|------|------|
| R_m/R₀ | 0,93 | 0,95 | 0,96 |

| | |
|--------------|-------|
| media | 0,945 |
| s | 0,014 |
| DSR | 1,50% |

Tabla 23. Muestra queso dopado. Celulosa 5%, [Au(III)]= 1mM, [TAO]=20U/ml, SCIS=1%, [Tyr]=12mM pH7

La concentración se obtiene por interpolación de la señal en la recta de calibrado de queso gouda, dando un valor de **13,47±2,16 mM**. Al comparar este valor con el valor real mediante un test t (Tabla 24) se observa que no hay diferencias significativas, ya que $t_{exp} < t_{crit}$, por lo que el método es válido para analizar este tipo de muestras.

| t exp | t crit |
|-------|--------|
| 0,68 | 4,3 |

Tabla 24. Test t comparación concentración obtenida mediante el método con concentración real

5. Conclusiones

En este trabajo se ha desarrollado un método analítico rápido para la determinación de tiramina en muestras de alimentos. Las conclusiones que se han obtenido son las siguientes:

1. Se ha comprobado que la tiramina se puede determinar en disolución en presencia de la enzima TAO (0,5 U/mL) por la formación de AuNPs a partir de Au (III) (1 mM), dando una disolución morada fuertemente coloreada.
2. La reacción en los soportes sólidos puede seguirse a través de una aplicación de Smartphone capaz de leer en código RGB.
3. Se ha demostrado que el uso de papeles comerciales como soporte de inmovilización no es un buen método, ya que la reacción no se produce debido a que el medio no es el adecuado.
4. Se han estudiado los diferentes factores que afectan a la determinación de tiramina en soportes de celulosa, y se ha encontrado que la determinación cuantitativa puede llevarse a cabo en las siguientes condiciones: celulosas al 5 % con tampón fosfato 0,1 M a pH 7, concentración de Au (III) 1 mM, añadiendo 10 µL una disolución de TAO 20 U/mL junto con el estabilizante StabilCoat al 1% y dejándolo secar a temperatura ambiente tapado de la luz directa. El tiempo óptimo para la medida de las AuNPs es en el minuto 85 (cuando la placa está completamente seca).
5. Es posible una determinación cualitativa de tiramina cuando se añade a la reacción Pt (II) junto con Au (III) en las siguientes condiciones: celulosas al 5 % con tampón fosfato 0,1 M a pH 7, se añade 10 µL de una disolución Pt 2 mM y Au 1 mM que se seca con un ventilador, se añade 10 µL de una disolución de TAO 10 U/mL junto con la tiramina y se deja secar a temperatura ambiente, tomando las medidas a los 10 minutos. Con este método se consigue disminuir el tiempo de medida haciendo la reacción más rápida, sin embargo no se ha conseguido llevar a cabo una cuantificación de tiramina mediante este método.
6. Se ha comprobado que el método sirve para determinar muestras reales. En concreto, se ha realizado la determinación de tiramina en queso, aunque existen efectos matriz que hay que tener en cuenta a la hora de la cuantificación.

6. Bibliografía

- (1) Benkerroum, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15* (4), 801–826. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>.

- (2) Silla Santos, M. H. Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, 29 (2–3), 213–231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1).
- (3) FERNÁNDEZ, M.; ÁLVAREZ, M. A. Las Aminas Biógenas En Los Alimentos. *Ctc* **2015**, 1–7.
- (4) Doeun, D.; Davaatseren, M.; Chung, M. S. Biogenic Amines in Foods. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, 26 (6), 1463–1474. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0239-3>.
- (5) Vale, S. R.; Glória, M. B. Determination of Biogenic Amines in Cheese. *J. AOAC Int.* **1997**, 80 (5), 1006–1012.
- (6) Doeun, D.; Davaatseren, M.; Chung, M.-S. Biogenic Amines in Foods. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, 26 (6), 1463–1474. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0239-3>.
- (7) Cao, G.; Wang, Y. *Nanostructures and Nanomaterials*; WORLD SCIENTIFIC, 2011; Vol. Volume 2. <https://doi.org/doi:10.1142/7885>.
- (8) López-Lorente, Á. I.; Valcárcel, M. The Third Way in Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Involvement of Nanotools and Nanoanalytes in the Same Analytical Process. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, 75, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.011>.
- (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. <https://doi.org/10.3390/s18124166>.
- (10) Zhao, W.; Brook, M. A.; Li, Y. Design of Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensing Assays. *ChemBioChem* **2008**, 9 (15), 2363–2371. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800282>.
- (11) Lucioni, A. C. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS POR REDUCCIÓN DE H[AuCl₄]. *J. Clin. Rehabil. Tissue Eng. Res.* **2007**, 11 (40), 8196–8200.
- (12) Newman, J. D. S.; Blanchard, G. J. Formation of Gold Nanoparticles Using Amine Reducing Agents. *Langmuir* **2006**, 22 (13), 5882–5887. <https://doi.org/10.1021/la060045z>.
- (13) Navarro, J.; de Marcos, S.; Galbán, J. Colorimetric-Enzymatic Determination of Tyramine by Generation of Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2020**, 187 (3). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4141-y>.
- (14) Scheeline, A. Teaching, Learning, and Using Spectroscopy with Commercial, Off-the-Shelf Technology. *Appl. Spectrosc.* **2010**, 64 (9), 256A–268A.
- (15) Capitán-Vallvey, L. F.; Palma, A. J. Recent Developments in Handheld and Portable Optosensing-a Review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 696 (1–2), 27–46. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.005>.
- (16) Sun, W.; Li, H.; Wang, H.; Xiao, S.; Wang, J.; Feng, L. Sensitivity Enhancement of PH Indicator and Its Application in the Evaluation of Fish Freshness. *Talanta* **2015**, 143, 127–131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.021>.
- (17) OIV. Resolución OIV/OENO 457/2014. Método de Determinación de Las Aminas Biógenas En El Vino Por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Con Detector de Fotodiodos. **2014**, 1–12.

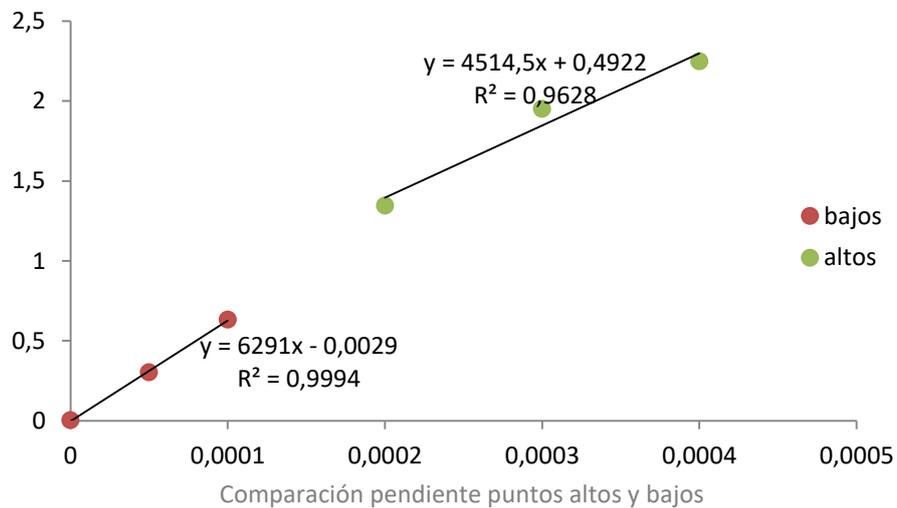
Anexos

Anexo 1: Estudio regresión en disolución

A continuación se muestra el estudio de regresión de la calibración en disolución por el que se pueden eliminar los dos últimos puntos ya que se comprueba que no pertenecen al rango lineal.

| Estadísticas de la regresión | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------|--------------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| Coefficiente | 0,9743112 | | | | | | | |
| Coefficiente | 0,9492823 | | | | | | | |
| R ² ajustado | 0,9391388 | | | | | | | |
| Error típico | 0,2356252 | | | | | | | |
| Observación | 7 | | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | | | |
| | Grados de libertad | Medio de los cuadrados | F | Valor crítico de F | | | | |
| Regresión | 1 | 5,1957635 | 5,195763458 | 93,584952 | 0,0002004 | | | |
| Residuos | 5 | 0,2775961 | 0,055519219 | | | | | |
| Total | 6 | 5,4733596 | | | | | | |
| | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% | Inferior 95,0% | Superior 95,0% |
| Intercepción | 0,1529843 | 0,1447002 | 1,057250406 | 0,3387791 | -0,2189793 | 0,5249479 | -0,2189793 | 0,5249479 |
| Variable X: | 4982,587 | 515,05295 | 9,673931555 | 0,0002004 | 3658,6013 | 6306,5728 | 3658,6013 | 6306,5728 |
| Análisis de los residuales | | | | | | | | |
| Observación | Residuo | Residuos estandarizados | | | | | | |
| 1 | 0,1529843 | -0,151284 | -0,703335938 | | | | | |
| 2 | 0,4021137 | -0,099614 | -0,463113893 | | | | | |
| 3 | 0,651243 | -0,020443 | -0,09504158 | | | | | |
| 4 | 1,1495017 | 0,1943983 | 0,903777231 | | | | | |
| 5 | 1,6477604 | 0,3012396 | 1,400493174 | | | | | |
| 6 | 2,1460191 | 0,1007809 | 0,468540488 | | | | | |
| 7 | 2,6442778 | -0,325078 | -1,511319482 | | | | | |

Análisis regresión



| | b, pendiente | ratio |
|-------|--------------|------------|
| altos | 4514,5 | 0,71761246 |
| bajos | 6291 | |

Tabla ratio pendientes

Anexo 2: Test t

A. Test t comparación con y sin estabilizadores

A continuación se muestran los resultados del test t para una actividad de 20 U/mL.

| t exp | t crit |
|-------|--------|
| 0,35 | 3,18 |

A continuación se muestran los resultados del test t para una actividad de 25 U/mL.

| t exp | t crit |
|-------|--------|
| 0,55 | 3,18 |

B. Test t comparación añadir TAO+estabilizante junto o separado

A continuación se muestran los resultados del test t al comparar los datos obtenidos cuando se añade primero el estabilizante y después la TAO frente a añadir la TAO junto con el estabilizante.

| t exp | t crit |
|-------|--------|
| 0,35 | 3,18 |

C. Test t comparación tiempos

A continuación se muestran los resultados del test t al comparar los datos obtenidos en tiempo de 5 horas y a los 85 minutos.

| t exp | t crit |
|-------|--------|
| 0,32 | 3,18 |

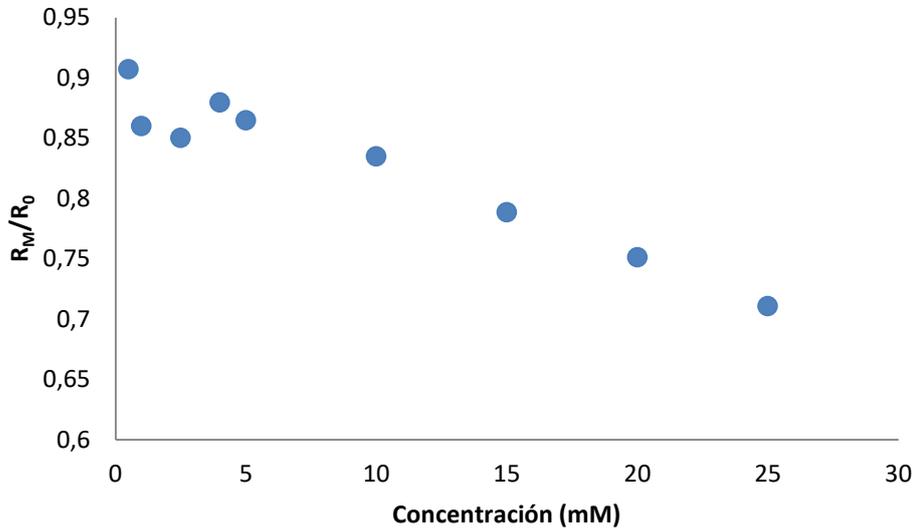
D. Test t patrón muestra dopada

A continuación se muestran los resultados del test t de los datos obtenidos al comparar el patrón de tiramina con la muestra de queso gouda dopada.

| t exp | t crit |
|-------|--------|
| 3,58 | 3,18 |

Anexo 3: Estudio regresión soporte sólido

A continuación se muestra el estudio de regresión de la calibración en soporte sólido, por el que puede eliminarse el punto 2 y 3 correspondientes con una concentración de 1mM y 2,5mM respectivamente observando los residuales



Calibración soporte sólido con todos los puntos

| Análisis de los residuales | | | |
|----------------------------|----------|------------------------|--------|
| Observación | Residual | Residual estandarizado | |
| 1 | 0,8884 | 0,0188 | 1,1654 |
| 2 | 0,8849 | -0,025 | -1,551 |
| 3 | 0,8744 | -0,024 | -1,507 |
| 4 | 0,8639 | 0,0155 | 0,9659 |
| 5 | 0,8569 | 0,0079 | 0,4898 |
| 6 | 0,822 | 0,0127 | 0,7914 |
| 7 | 0,787 | 0,0014 | 0,0886 |
| 8 | 0,752 | -8E-04 | -0,05 |
| 9 | 0,7171 | -0,006 | -0,393 |

Análisis de residuales perteneciente al análisis de regresión