

Determinación rápida y específica de tiramina. Desarrollo de tiras reactivas para el control de calidad en alimentación.

Rapid and specific determination of tyramine. Development of test strips for food quality control.

Trabajo Fin de Grado en Química
Curso 2017/2018
Sofía Oliver Ledesma

Director: Javier Galbán Bernal

Departamento de Química Analítica

Grupo de investigación: Biosensores Analíticos

Resumen

Con este trabajo se pretende desarrollar un método óptico enzimático para la determinación rápida y específica de tiramina.

El método se basa en el acoplamiento de dos reacciones enzimáticas. La primera de ellas consiste en la oxidación específica de la tiramina en presencia de O_2 gracias a la acción de la enzima tiramina oxidasa (TAO). En esta primera reacción se obtiene H_2O_2 , que participa en la segunda reacción consistente en un proceso redox catalizado por la enzima peroxidasa HRP donde tiene lugar la reducción del H_2O_2 a H_2O y paralelamente la oxidación del colorante 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). El TMB es incoloro en su forma reducida, mientras que presenta una coloración azul cuando está oxidado. El cambio en las propiedades de absorción del TMB a lo largo de la reacción se sigue con medidas de absorbancia en un espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis y es lo que permite la determinación de la tiramina.

La optimización del método se lleva a cabo en disolución. Las concentraciones óptimas de las enzimas TAO y HRP son $0,5 \text{ U mL}^{-1}$ y $0,12 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente. Para obtener la máxima señal de absorbancia posible, el TMB debe estar en una concentración al menos 10 veces superior a la del H_2O_2 formado en la reacción de oxidación de la tiramina.

Se prepara una recta de calibrado para la tiramina y se procede a la validación del método mediante la determinación de una muestra sintética. Mediante un test t, se compara la concentración obtenida con la concentración real y se obtiene que no existen diferencias significativas entre ambas.

Por último, se estudia la inmovilización del método en tres soportes sólidos diferentes: celulosa, papeles comerciales y tiras reactivas comercializadas para la determinación de H_2O_2 , obteniéndose los mejores resultados con estas últimas.

Abstract

The objective of this work is to develop an enzymatic optical method for rapid and specific determination of tyramine.

The method is based on the coupling of two enzymatic reactions. The first of them consists in the specific oxidation of tyramine in the presence of O_2 thanks to the action of the enzyme tyramine oxidase (TAO). H_2O_2 is obtained in this first reaction, and then it reacts in the second reaction consisting in a redox process catalyzed by the peroxidase enzyme HRP. In this process takes place the reduction of H_2O_2 to H_2O and concurrently, the oxidation of the colouring 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Whereas the TMB presents a blue coloration when it is oxidized, it is colorless in its reduced form. This change in optical properties of TMB in the course of the reaction, can be followed by absorption measurements in an UV-Vis molecular absorption spectrophotometer and that's what allows the determination of tyramine.

The optimization of the method is carried out in solution. The optimal concentrations of TAO and HRP enzymes are $0,5 \text{ U mL}^{-1}$ and $0,12 \text{ U mL}^{-1}$, respectively. To obtain maximum possible absorption signal, TMB must be at a concentration ten times higher than that of H_2O_2 obtained in the oxidation reaction of tyramine.

A calibration line for tyramine is prepared and the method is validated by determining a synthetic sample. By means of a t test, the obtained concentration is compared with the real concentration and the conclusion is that there are no significant differences between both.

Finally, it was studied the immobilization of the method on three different solid supports: cellulose, commercial papers and reactive strips commercialized for the determination of H_2O_2 , obtaining the best results with the latter.

Índice

1.- Introducción.....	1
1.1.- Aminas biógenas en alimentos.....	1
1.1.1.- Toxicología alimentaria.....	2
1.1.2.- Calidad de los alimentos.....	3
1.2.- Determinación de aminas biógenas.....	3
2.- Objetivos y planteamiento.....	4
3.- Parte experimental.....	5
3.1.- Reactivos y disoluciones.....	5
3.1.1.- Reactivos y disoluciones generales.....	5
3.1.2.- Disoluciones de enzimas.....	5
3.1.3.- Disoluciones de aminas.....	6
3.2.- Instrumentación y material.....	6
3.2.1.- Instrumentos.....	6
3.2.2.- Material y aparatos.....	6
3.3.- Procedimiento experimental.....	7
3.3.1.- Método en disolución.....	7
3.3.2.- Soportes sólidos.....	8
3.3.2.1.- Celulosa.....	8
3.3.2.2.- Papeles.....	8
4.- Resultados y discusión.....	8
4.1.- Método en disolución.....	8
4.1.1.- Reacción H ₂ O ₂ -HRP-TMB.....	8
4.1.1.1.- Optimización.....	9
4.1.1.2.- Calibración.....	10
4.1.2.- Acoplamiento de la reacción de oxidación de la tiramina por la enzima tiramina oxidasa (TAO).....	14
4.1.2.1.- Optimización del pH.....	14

4.1.2.2.- Calibración.....	15
4.1.2.3.- Estudios de interferencias.....	16
4.1.2.4.- Validación del método.....	19
4.2.- Implementación en soportes sólidos.....	20
4.2.1.- Tiras reactivas.....	20
4.2.1.1.- Optimización de [TAO] en tiras.....	20
4.2.1.2.- Calibración.....	21
4.2.2.- Celulosa.....	22
4.2.3.- Papeles.....	23
5.- Conclusiones.....	23
6.- Bibliografía.....	24

1.- Introducción

Las aminas biógenas (AB) son bases orgánicas nitrogenadas de bajo peso molecular formadas principalmente por descarboxilación de aminoácidos o por transaminación de aldehídos y cetonas. En concentraciones bajas, son esenciales para el correcto desempeño de muchas funciones psicológicas.

En función de su procedencia, se clasifican en endógenas, aquellas que provienen de la degradación de moléculas biológicas que llevan a cabo las células en los procesos metabólicos, o exógenas, las que se ingieren a través de los alimentos.

1.1.- Aminas biógenas en alimentos

La formación de aminas biógenas en los alimentos tiene lugar fundamentalmente por la acción de microorganismos que llevan a cabo la descarboxilación de los aminoácidos libres presentes en los mismos, según el esquema de reacción mostrado en la Figura 1.

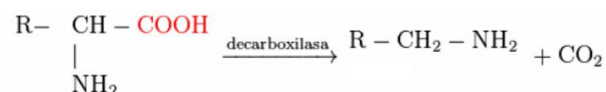


Figura 1. Esquema de la reacción de descarboxilación de un aminoácido libre por una enzima descarboxilasa

Por ello, los siguientes factores son determinantes en la concentración de aminas biógenas en los productos alimentarios¹:

- Disponibilidad de aminoácidos libres en el alimento.
- Presencia de microorganismos con enzimas descarboxilasas.
- Condiciones del medio óptimas para el crecimiento de dichos microorganismos y para su actividad descarboxilante. Se sabe que un aporte de oxígeno conlleva un incremento en la biosíntesis de aminas biógenas y que en medio ácido, la actividad descarboxilante de los microorganismos es mayor. La influencia de la temperatura es aún más decisiva, presentando un intervalo óptimo de crecimiento de los microorganismos responsables de la descarboxilación que va desde los 20 hasta los 37 °C.

Las aminas biógenas encontradas con mayor frecuencia en alimentos aparecen representadas en la figura 2.

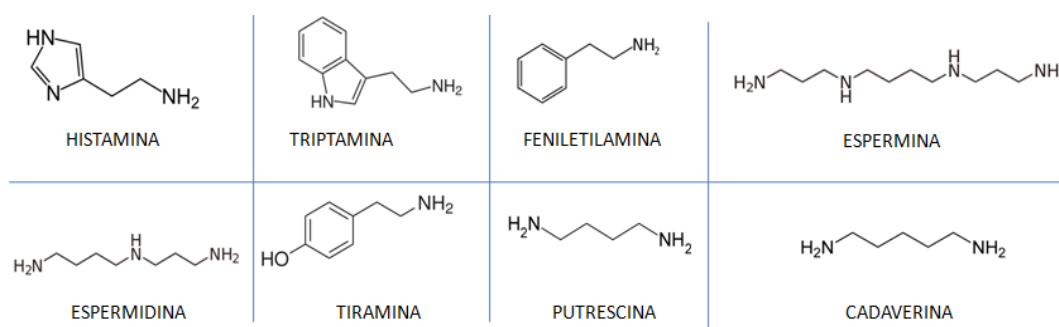


Figura 2. Estructura química de las aminas biógenas de mayor presencia en alimentos

1.1.1.-Toxicología alimentaria

Como se ha mencionado, las aminas biógenas cumplen un papel biológico importante. Sin embargo, algunos alimentos conteniendo concentraciones elevadas de estas aminas pueden resultar tóxicos para el individuo que los consume.

Se pueden encontrar altas concentraciones de aminas biógenas en alimentos como pescados, queso, vino, salchichas y vegetales fermentados².

El tracto intestinal de los mamíferos cuenta con un sistema capaz de metabolizar las aminas biógenas gracias a la acción de las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y diamino oxidasa (DAO), que están presentes en el epitelio intestinal y se encargan de su oxidación¹. La toxicidad se presenta cuando la actividad de estas enzimas es insuficiente, lo cual puede ocurrir por distintas razones:

- Problemas gastrointestinales en individuos, que suponen una actividad más baja de lo normal de las enzimas mencionadas o una producción inadecuada de MAO, lo que les convierte en individuos hipersensibles o intolerantes.
- Presencia de inhibidores de MAO y DAO. Por ejemplo, en el caso de personas con tratamientos antidepresivos basados en inhibidores de la MAO, está contraindicado el consumo de queso debido a su alto contenido en tiramina³.
- Ingesta de niveles elevados de aminas biógenas, que no pueden ser metabolizadas por las concentraciones normales de las enzimas.

La mayoría de los cuadros de intoxicación alimentaria están relacionados principalmente con histamina y tiramina.

Ciertas aminas biógenas están también implicadas en la formación de nitrosaminas carcinogénicas, teratogénicas o mutagénicas⁴, al dar lugar a la reacción esquematizada en la Figura 3.

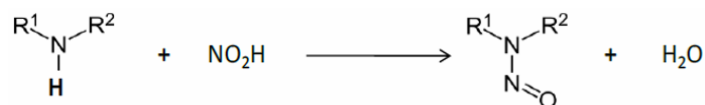


Figura 3. Esquema de la reacción de formación de nitrosaminas a partir de aminas

A pesar del aumento de la preocupación por la seguridad alimentaria y el claro riesgo que supone la presencia de aminas biógenas en los alimentos, en la Unión Europea sólo existe legislación para la concentración de histamina en pescados y productos derivados, en la cual se establece un límite de 100 mg/kg para pescados de la familia de los escómbridos y cupleidos y de 200 mg/kg para salmueras⁵.

1.1.2.- Calidad de los alimentos

La cuantificación de aminas biógenas presentes en los alimentos es también usada como un indicativo de la calidad y frescura de los mismos. Debido a que generalmente las aminas biógenas aparecen en el alimento antes de la aparición de signos organolépticos de deterioro, su presencia es considerada como un buen indicador químico para la valoración de calidad.

1.2.- Determinación de aminas biógenas

Se han desarrollado numerosos métodos para la determinación de aminas biógenas. La mayoría de los métodos analíticos usados para su separación y cuantificación están basados en cromatografía, principalmente en HPLC de fase reversa. Cuando el detector acoplado a la salida de la columna es un detector UV o de fluorescencia, es necesario llevar a cabo una derivatización, para lo cual el reactivo más ampliamente usado es el cloruro de dansilo. Esta etapa de derivatización, se hace innecesaria cuando se utiliza un detector masas (MS o MS/MS)⁶.

El desarrollo de biosensores, entendidos como dispositivos que pueden medir selectivamente un parámetro en una muestra, ha sido posible gracias a la reciente disponibilidad comercial de enzimas como la MAO o la tiramina oxidasa (TAO) y ha permitido satisfacer las necesidades más actuales de la industria alimentaria, que debido a su creciente interés en ofrecer alimentos de calidad, requería de métodos de análisis más rápidos y económicos que los utilizados hasta el momento. Los biosensores tienen su fundamento en la reacción de oxidación del H₂O₂ obtenido en la reacción de oxidación de la(s) amina(s) (Figura 4 (1)) gracias a la presencia de una enzima oxidasa.

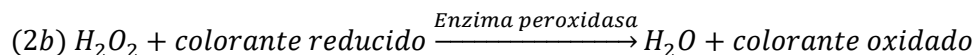
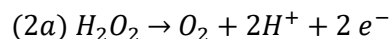
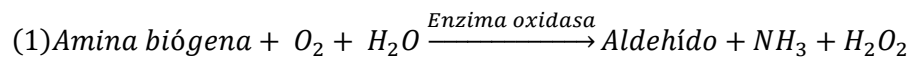


Figura 4⁷. Esquema de las reacciones en que se basan los biosensores para la determinación de ABs. 1) Reacción de oxidación de AB por una enzima oxidasa. 2a) Reacción de oxidación de H₂O₂ en un biosensor electroquímico. 2b) Reacción redox por la que se reduce el H₂O₂ y se oxida un colorante por acción de una enzima peroxidasa en un biosensor óptico.

Existen distintas enzimas oxidasas en función del tipo de amina que oxidan. Algunas de ellas oxidan a un analito determinado como es el caso de la TAO con la tiramina; mientras que otras son menos específicas, como la plasma amino oxidasa (PAO) que oxida a todas las aminas biógenas con más de un grupo amino en su estructura química.

Existen biosensores electroquímicos, que miden la señal eléctrica generada en la oxidación del H₂O₂ (Figura 4 (2)). Normalmente, utilizan un electrodo de trabajo de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl⁷. Por su parte, los biosensores ópticos se basan en la reducción del H₂O₂

por parte de una enzima peroxidasa, que va acompañada de la oxidación de un colorante cuyas propiedades ópticas de absorción cambian de la forma reducida a la oxidada.

2.- Objetivos y planteamiento

El objetivo último del trabajo es lograr el desarrollo de un método óptico enzimático que permita la determinación específica y rápida de la tiramina. La figura 5 muestra el sistema de reacciones en el que se basa el estudio.

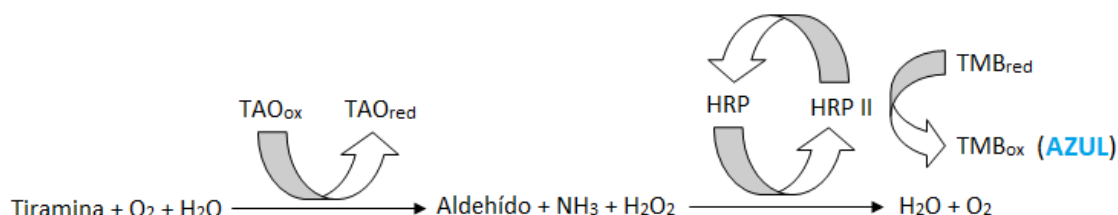


Figura 5. Esquema del sistema de reacciones en que se basa el estudio para el desarrollo del biosensor óptico

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

El trabajo se estructura de la siguiente forma:

1. Consultar material bibliográfico y artículos sobre la situación del tema hasta el momento.
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 las pautas del método científico.
4. Estudiar y optimizar los parámetros de la reacción en disolución de H₂O₂ con la enzima HRP en presencia del colorante TMB.
5. Preparar una recta de calibrado para dicha reacción a partir de distintas diluciones de una disolución comercial de H₂O₂ y calcular los parámetros analíticos asociados al método.
6. Acoplar la reacción de oxidación de la tiramina por parte de la enzima TAO en disolución en presencia de HRP y TMB, para la reproducción completa de la reacción de la Figura 5 y optimización de las variables de la reacción.
7. Hacer una calibración para la tiramina a partir de distintas diluciones de la misma preparadas con tiramina pura comercial y obtener los parámetros analíticos del método.

8. Estudio de interferencias por parte de las aminas cadaverina, putrescina e histamina.
9. Validación del método en disolución a través de la determinación de una muestra sintética que contiene tiramina en presencia de cadaverina, putrescina e histamina.
10. Inmovilización de HRP, TMB y TAO en tres soportes sólidos diferentes: celulosa, papeles comerciales y tiras reactivas para la determinación semicuantitativa de H_2O_2 . Observar los cambios de color generados tras la adición del analito sobre los mismos y en su caso, ver las posibilidades analíticas para la determinación de tiramina.
11. Extraer la información analítica de los datos obtenidos en el laboratorio, llevando a cabo los tratamientos de datos necesarios. Exponer los resultados debidamente.

3.- Parte experimental

3.1.- Reactivos y disoluciones

3.1.1.- Reactivos y disoluciones generales

- Disoluciones amortiguadoras $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ de pH 6, 7 y 8 de concentración en torno a 0,1 M preparadas disolviendo aproximadamente 4,26 g de Na_2HPO_4 (Panreac 131679.1211) en un volumen también aproximado de 300 mL de agua miliQ y ajustando el pH con una disolución de HCl 1 M.
- Disolución amortiguadora $HC_2H_3O_2/C_2H_3O_2^-$ de pH 5 y concentración aproximada de 0,1 M. Se pesan en torno a 2,46 g de $C_2H_3NaO_2$ (VWR Chemicals 27648.294) y se disuelven en un volumen aproximado de 300 mL de agua miliQ. El ajuste del pH se hace con una disolución de HCl 1 M.
- Disolución amortiguadora HCO_3^-/CO_3^{2-} de pH 9 y concentración aproximada de 0,1M preparada pesando aproximadamente 3,18 g de Na_2CO_3 (Sigma EC 207-838-8) que se disuelven en unos 300 mL de agua miliQ. Se ajusta el pH con una disolución de HCl 1 M.
- Disolución comercial de peróxido de hidrógeno, H_2O_2 33% (m/V) (Panreac 131077.1211).
Se hacen diluciones de la misma en disolución amortiguadora de pH 6.
- Disolución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma-Aldrich 860336) $\geq 99\%$. La disolución base se prepara disolviendo aproximadamente 2 mg de TMB en 1 mL de DMSO.
Se hacen diluciones mayores en DMSO de esa disolución base de TMB.

3.1.2.- Disoluciones de enzimas

- Enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma-Aldrich EC1.11.1.7) 146 U mg^{-1} (Lote #SLBF8265V)
Se prepara una primera disolución disolviendo aproximadamente 1,8 mg en un volumen de 1 mL de disolución amortiguadora de pH 6. Se anota el peso exacto para el cálculo de la concentración preparada. Se hacen diluciones mayores de la misma también en tampon de pH 6.

- Enzima Tiramina Oxidasa (TAO) (Asahi kasei pharma T-25) 4,600 U mg⁻¹. Se procede del mismo modo que para la preparación de la enzima HRP con la diferencia de que en este caso se pesan 9 mg de TAO aproximadamente.

3.1.3.- Disoluciones de aminas

- Tiramina (Tiramyne hydrochloride) (Sigma-Aldrich 53300) 98 % pureza.
- Cadaverina (Cadaverine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich C8561) 98% pureza.
- Putrescina (Putrescine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich P7505) 98% pureza.
- Histamina (Histamine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich 53300) 99% pureza.

Para la preparación de estas disoluciones se pesa una masa exacta y se disuelve en un volumen total de 1 mL de tampón de pH 6.

Para preparar las disoluciones de la concentración deseada de estas aminas se hacen las diluciones necesarias a partir de las anteriores siempre en tampón de pH 6.

3.2.- Instrumentación y material

3.2.1.- Instrumentos

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Agilent 8453A, con lámparas de wolframio y deuterio, red de fotodiodos y un rango de medida comprendido entre 190 y 1100 nm.
- pH-metro CRISON, Basic 20.
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión $\pm 0,01$ mg.

3.2.2.- Material y aparatos

- Vasos de precipitados.
- Micropipetas Socorex de volúmenes 5-50 μ L, 10-100 μ L y 100-1000 μ L.
- Material desechable: puntas de micropipetas, Eppendorf, pipetas Pasteur, tubos Falcon.
- Cubeta de vidrio Hellma de 1 cm de paso óptico.
- Agitador magnético A-01, SBS
- Tiras reactivas para la determinación semicuantitativa de peróxido de hidrógeno (Quantofix 913 19).
- Incubadora OVAN modelo OM10 E.
- Filtro óptico Kodak amarillo que corta por debajo de 390 nm.
- Papel comercial Ahlstrom Grade 320 Lote #103521.
- Papel comercial Ahlstrom Grade 142 Lote #102563.
- Papel comercial Ahlstrom Grade 141 Lote #103974.
- Papel comercial Ahlstrom Grade 270 Lote #102741.
- Placas de pocillos nunc™.

3.3.- Procedimiento experimental

3.3.1.- Método en disolución

Se llevaron a cabo las medidas de absorbancia en un espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis. Se utilizaron cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico y el volumen total puesto en las mismas para cada medida fue de 2 mL. Se utilizó un filtro óptico que absorbía la luz de longitud de onda de hasta 390 nm para evitar que la luz UV degradara al TMB oxidado.

Antes de comenzar a medir, se hacía cada día un blanco de medida que consistía en poner en la cubeta la disolución amortiguadora correspondiente (generalmente de pH 6).

Se registraron espectros (Figura 6) de una disolución que presentaba la coloración azul del TMB oxidado para conocer la longitud de onda que ofrecía la máxima absorbancia, que resultó ser 650 nm. Como se aprecia en la Figura mencionada, el seguimiento de la señal a esta longitud de onda frente al tiempo ofrecía una mayor sensibilidad. Por ello, para las medidas se seleccionó el modo "Kinetics" del programa, que permitía ver específicamente el registro cinético de absorbancia a 650 nm (aunque el equipo estaba registrando el espectro completo).

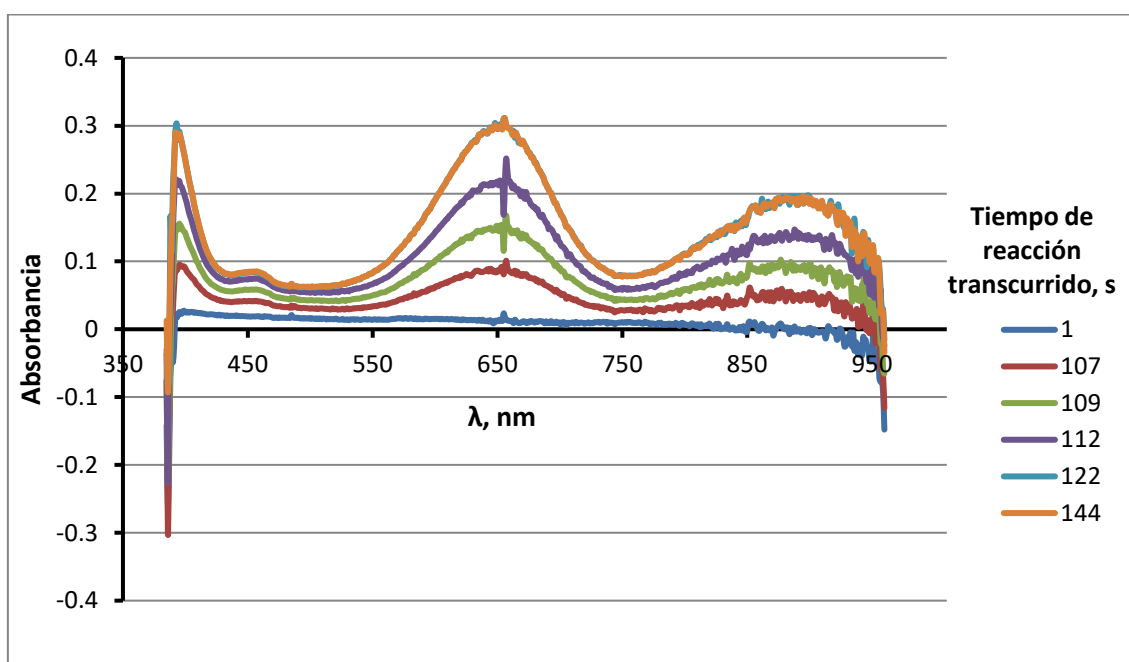


Figura 6. Espectros de absorción obtenidos a distintos tiempos desde el comienzo de la medida para una disolución con $[H_2O_2]=2,45 \cdot 10^{-6} M$; $[HRP]=0,12 U mL^{-1}$ y $[TMB]=7,28 \cdot 10^{-5} M$

Para cada medida, se añadían en la cubeta sobre disolución amortiguadora los reactivos necesarios (HRP y TMB; y TAO en caso de estar estudiando las dos reacciones conjuntamente). Se comenzaba a medir y cuando la línea base de absorbancia se había estabilizado, se adicionaba el analito. La medida se paraba cuando se había alcanzado una señal estable de absorbancia.

3.3.2.- Soportes sólidos

3.3.2.1.- Celulosa

Se utilizó una disolución de celulosa pura al 5%, que había sido preparada en el grupo de investigación. Con ella se prepararon distintas disoluciones conteniendo los reactivos HRP, TMB y TAO en distintas concentraciones, hasta un volumen total de 150 μL . De ese volumen, se tomaron 100 μL de cada una, se repartieron en una placa de pocillos y se dejaron secar a 30 $^{\circ}\text{C}$ en incubadora durante 2 horas. Tras este tiempo, la disolución de celulosa se convertía en un fino papel blanco sobre el que se añadía el analito.

3.3.2.2.- Papeles

Se cortaron los 4 papeles estudiados identificados en el apartado 3.2.2 con formas cuadradas de 6x6 mm de tamaño y se pegaron sobre un soporte plástico. Sobre ellos se pusieron disoluciones de los reactivos HRP, TMB y TAO de distintas concentraciones. Tras la adición de cada reactivo se dejaban secar los papeles en incubadora antes de añadir el siguiente. Una vez inmovilizados los tres reactivos y con los papeles secos, se adicionaba sobre ellos el analito.

4.- Resultados y discusión

4.1.- Método en disolución

4.1.1.-Reacción H_2O_2 -HRP-TMB

Se comenzó prescindiendo temporalmente de la reacción de oxidación de la tiramina para llevar a cabo el estudio de la reacción enzimática entre HRP y H_2O_2 , que deriva en la oxidación del TMB y consecuente aparición de la coloración azul en la disolución, y cuyo esquema se muestra en la figura 7.

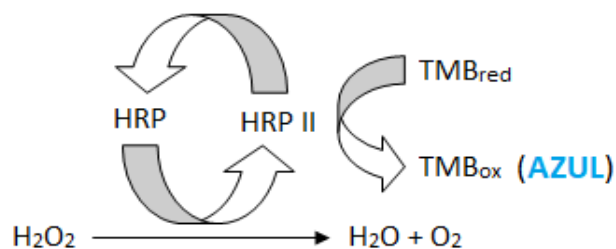


Figura 7. Esquema de la reacción HRP-TMB- H_2O_2

Aunque este trabajo está enfocado al seguimiento de la absorbancia correspondiente al color azul mencionado, cabe explicar que se sabe por estudios previos⁸ que existen dos posibles productos de oxidación del TMB, los cuales presentan dos coloraciones diferentes: azul y amarilla.

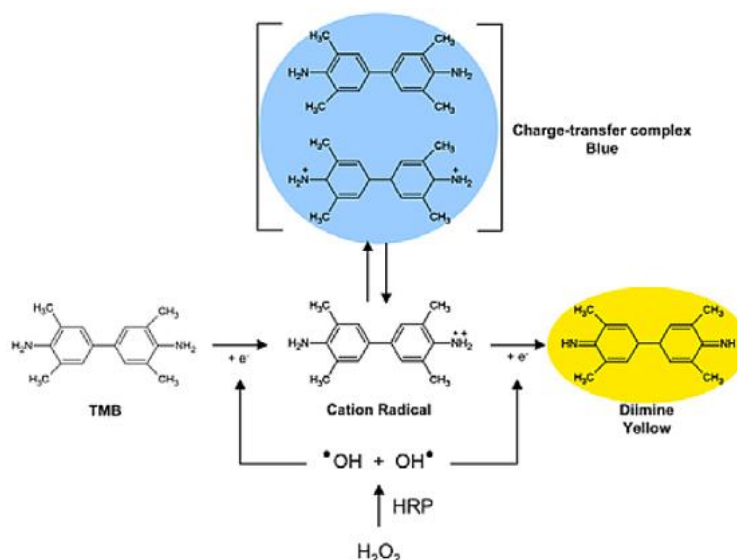


Figura 8⁸. Estructura química de los dos posibles productos de oxidación del TMB: un radical catiónico que presenta coloración amarilla y un complejo de transferencia de carga compuesto por una diamina (dador de electrones) y una diimina (aceptor de electrones), de coloración azul

La coloración amarilla se observa cuando el producto de oxidación es un radical catiónico, mientras que la azul se debe a la formación de un complejo de transferencia de carga cuyo dador de electrones es una diamina mientras que el aceptor es una diimina (Figura 8).

En los espectros de la Figura 6, el color azul corresponde con el máximo a 650 nm, mientras que el color amarillo está vinculado a la longitud de onda de 450 nm. Desde un punto de vista analítico, la percepción y detección del color azul es más ventajosa que la del amarillo, por lo que la mayoría de los resultados presentados corresponden a 650 nm.

La aparición de uno u otro producto está determinada por la relación $[\text{TMB}]:[\text{H}_2\text{O}_2]$ en la disolución, la cual se estudia en la optimización de la reacción (apartado 4.1.1.1).

4.1.1.1.- Optimización

Como paso previo a la realización de una recta de calibrado del H_2O_2 , se llevó a cabo la optimización de distintos parámetros de la reacción:

Optimización [HRP]

Se siguieron las señales de absorbancia frente al tiempo para distintas disoluciones (a pH 6) que se diferenciaron en la cantidad de HRP pero que tenían en común la concentración de H_2O_2 y TMB. La de H_2O_2 se mantuvo en $4,9 \cdot 10^{-6}$ M y la de TMB en $5,4 \cdot 10^{-5}$ M ya que en el grupo de investigación se sabía por estudios previos que con ellas se obtenían señales de absorbancia adecuadas para el estudio. La concentración de HRP se varió entre los valores $0,025 \text{ U mL}^{-1}$ y $5,0 \text{ U mL}^{-1}$. Los resultados se muestran en la Figura 9.

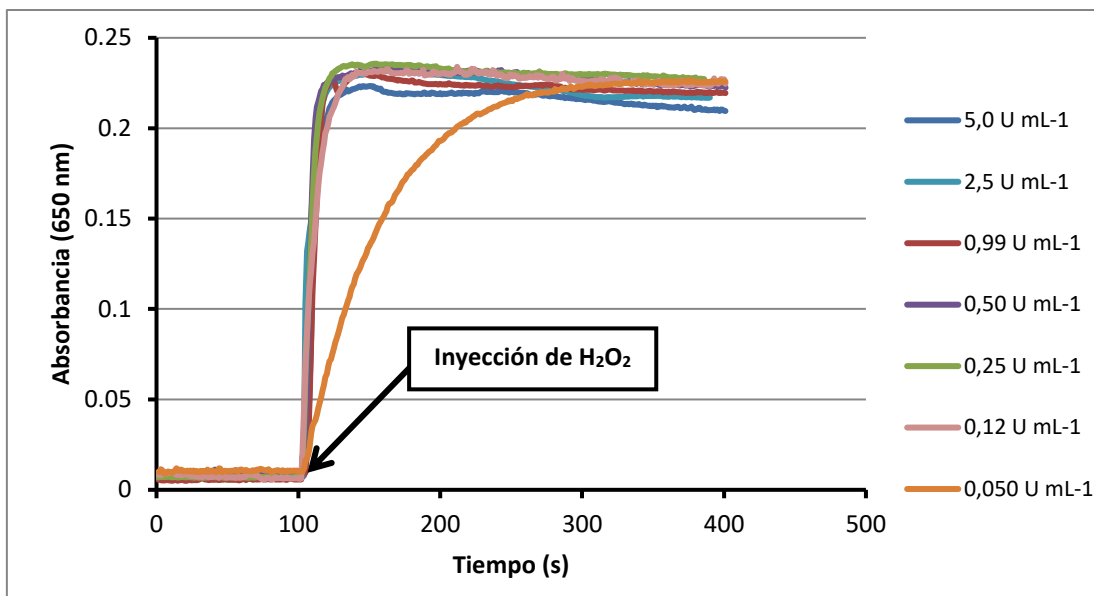


Figura 9. Señales de absorbanza frente a tiempo para las distintas [HRP] de la optimización con [TMB]= $5,4 \cdot 10^{-5}$ M y [H₂O₂]= $4,9 \cdot 10^{-6}$ M

Se observó que el cambio en la concentración de HRP no llevaba asociado un cambio en el máximo de la señal de absorbanza sino en la velocidad a la que se alcanza la misma. Sin embargo, a partir de 0,12 U mL⁻¹, dejan de observarse diferencias ya que la reacción es tan rápida que el método pasa de ser cinético a ser un método en el equilibrio.

En el registro correspondiente a la concentración de 5,0 U mL⁻¹, se observó un ligero descenso de la señal con el tiempo, lo que podría indicar que un exceso de enzima conlleva la degradación parcial del TMB oxidado. Esta suposición quedó confirmada al llevar a cabo la medida de la señal de absorbanza para una disolución en la que se ponía HRP en elevada concentración, concretamente de 25,2 U mL⁻¹, ya que se observó que pasados unos minutos tras la inyección del H₂O₂ en la cubeta, la señal desaparecía por completo (Figura 10).

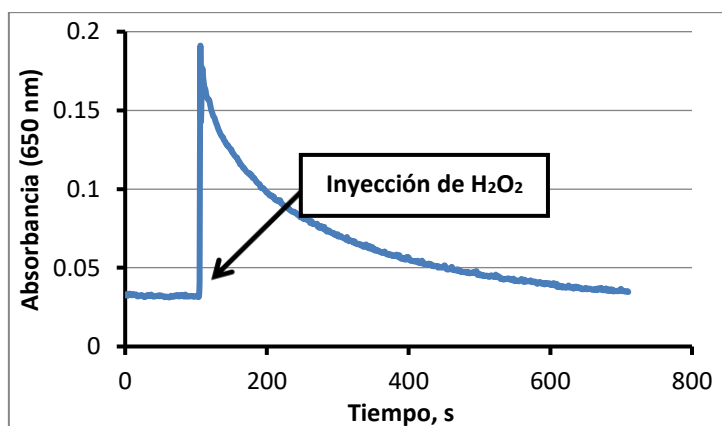


Figura 10. Descenso en la señal de absorbanza con un exceso de enzima HRP en cubeta siendo [HRP]=25,2 U mL⁻¹; [TMB]= $5,4 \cdot 10^{-5}$ M; [H₂O₂]= $4,9 \cdot 10^{-6}$ M

En definitiva, se tomó como [HRP] óptima la de **0,12 U mL⁻¹**, al ofrecer la máxima velocidad con la mínima concentración y por lo tanto, el mínimo gasto de enzima.

Optimización [TMB]:[H₂O₂]

Con este estudio, se pretendían definir las relaciones de [TMB]:[H₂O₂] con las que se obtiene cada producto de TMB oxidado, es decir, cada color.

Dejando constantes la concentración de HRP en el valor óptimo encontrado (0,12 U mL⁻¹) y la de H₂O₂ en 2,45*10⁻⁶ M; se cambió la de TMB entre los valores de 2,49*10⁻⁷ M y 5,41*10⁻⁵ M, lo que supuso cambios en la relación [TMB]:[H₂O₂] desde 1:10 hasta 22:1. Estas medidas se hicieron a pH 6 y registrando los datos tanto a 650 nm como a 450 nm (Figura 6).

En este rango de concentraciones, no se observaron cambios en la cinética de la reacción y por ello, lo que interesa no es el registro cinético sino la señal que se obtuvo para cada concentración. Esta señal se obtiene como la diferencia del máximo de absorbancia alcanzado (cuando la señal se estabiliza) y la absorbancia de la línea base antes de inyectar el H₂O₂ en la cubeta.

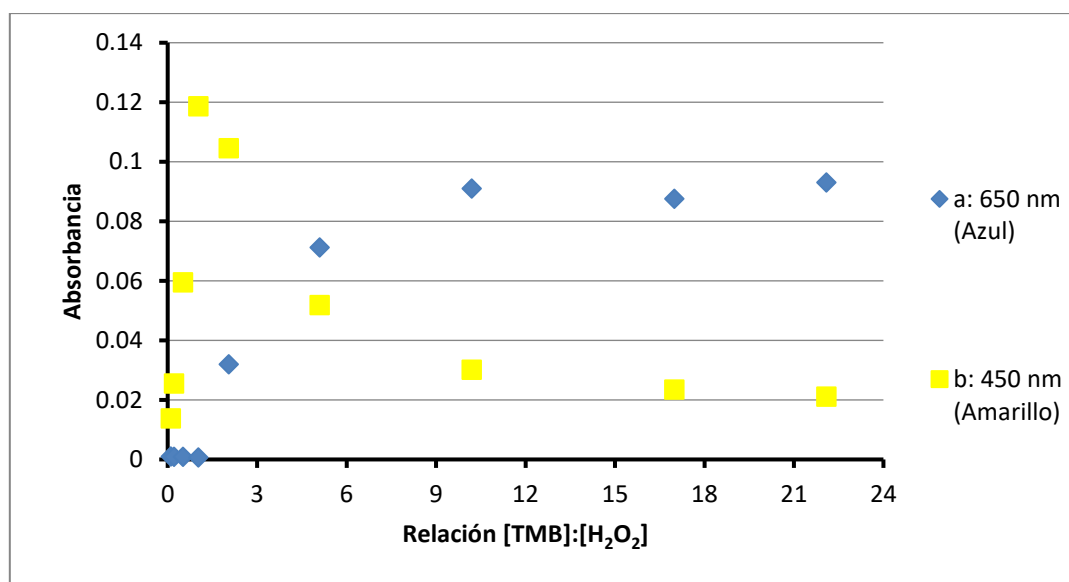


Figura 11. Señales de absorbancia a: a) 450 nm y b) 650 nm frente a la relación [TMB]:[H₂O₂], manteniendo [H₂O₂] fija en 2,45*10⁻⁶ M y con [HRP]=0,12 U mL⁻¹

Se observó que el color amarillo aparece con una relación menor o igual a 1:1, mientras que el azul aparece desde una relación 2:1 hacia valores mayores de [TMB]:[H₂O₂] (Figura 11).

Se vio además que al aumentar la concentración de TMB, la señal obtenida a 650 nm (Figura 11a) iba aumentando hasta que al llegar a un valor determinado, se mantenía constante. El primer valor de concentración que da dicha señal es 2,69*10⁻⁵ M, aproximadamente diez veces superior al de la concentración de H₂O₂. Por lo tanto, se dedujo que para obtener las mayores señales de absorbancia posibles a 650 nm, la concentración de TMB en cubeta debía ser diez veces superior a la de peróxido. En consecuencia, para hacer las medidas a esa longitud de onda, se escogió como óptima una concentración de **5,37*10⁻⁵ M**, para asegurar una relación

[TMB]:[H₂O₂] mayor de 10:1 incluso en casos en que se pusieran altas concentraciones de H₂O₂.

Optimización del pH

Se prepararon disoluciones amortiguadoras de valores de pH entre 5 y 10 y se hicieron los registros cinéticos de absorbancia a 650 nm con cada una de ellas. En la cubeta, se puso en todos los casos HRP y TMB en las concentraciones óptimas encontradas y el H₂O₂ en concentración 2,45*10⁻⁶ M.

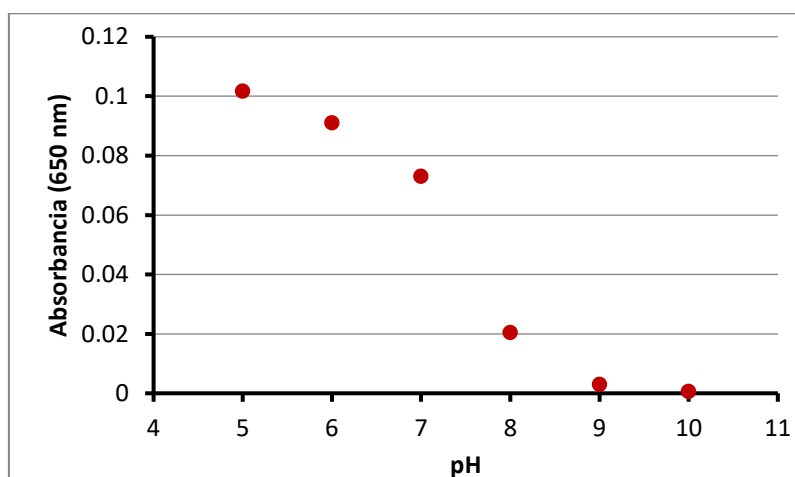


Figura 12. Señales de absorbancia para los distintos pHs estudiados en la optimización, con [TMB]=5,37*10⁻⁵ M; [HRP]=0,12 U mL⁻¹ y [H₂O₂]=2,45*10⁻⁶ M.

Se escogió el **pH 6** como óptimo, ya que a pesar de que la mayor señal se obtuvo a pH 5, la diferencia entre ambas no es muy grande (Figura 12) y en se sabía que la enzima TAO, que sería utilizada posteriormente para la oxidación de la tiramina, trabaja en un rango de pH óptimo de entre 6 y 8⁹.

4.1.1.2.- Calibración

En este apartado se pretende estudiar el rango lineal de aplicabilidad del método, con las condiciones optimizadas hasta el momento. Para ello se utilizó como parámetro analítico los cambios de absorbancia originados a 650 nm.

Para este estudio, se mantuvo la concentración de HRP en el valor óptimo encontrado. Por el contrario, la concentración de TMB se varió con respecto a la encontrada como óptima en su estudio de optimización. Esto se debe a que se pretendió aprovechar el hecho de que a partir de la relación 10:1 de [TMB]:[H₂O₂], la señal de absorbancia mantiene un valor constante, que para una determinada concentración de peróxido es independiente de la de TMB. Por esta razón, se pensó que poniendo concentraciones mayores de TMB en la cubeta, los valores de la señal no se verían afectados mientras que el rango lineal de la recta de calibrado sería mayor ya que sería necesaria una concentración de H₂O₂ mayor para alcanzar la relación 10:1, donde se perdería esa constancia en la absorbancia (Figura 11).

Para corroborar esto, se hicieron dos rectas de calibrado diferentes, que se diferenciaban en la concentración de TMB en cubeta:

- Recta de calibrado 1: [TMB]= $7,28 \cdot 10^{-5}$ M
- Recta de calibrado 2: [TMB]= $4,81 \cdot 10^{-4}$ M

Consecuentemente, se diferenciaban en la relación [TMB]:[H₂O₂] con respecto a la menor concentración de H₂O₂ analizada, siendo de 30:1 en la recta 1 y de 200:1 en la 2 aproximadamente.

[H ₂ O ₂]/ M	Señal (Recta 1)	Señal (Recta 2)
$2,45 \cdot 10^{-6}$	0,0649	0,0963
$2,94 \cdot 10^{-6}$	0,0767	0,1122
$3,68 \cdot 10^{-6}$	0,0978	0,1497
$4,90 \cdot 10^{-6}$	0,1489	0,1931
$7,35 \cdot 10^{-6}$	0,2423	0,2640
$9,80 \cdot 10^{-6}$	0,3070	0,3624
$1,47 \cdot 10^{-5}$	0,4726	0,5340
$3,43 \cdot 10^{-5}$	1,123	0,0914
$4,90 \cdot 10^{-5}$	1,582	-

Tabla 1. Datos de [H₂O₂] (M) y absorbancia de las rectas de calibrado de H₂O₂ 1 y 2.

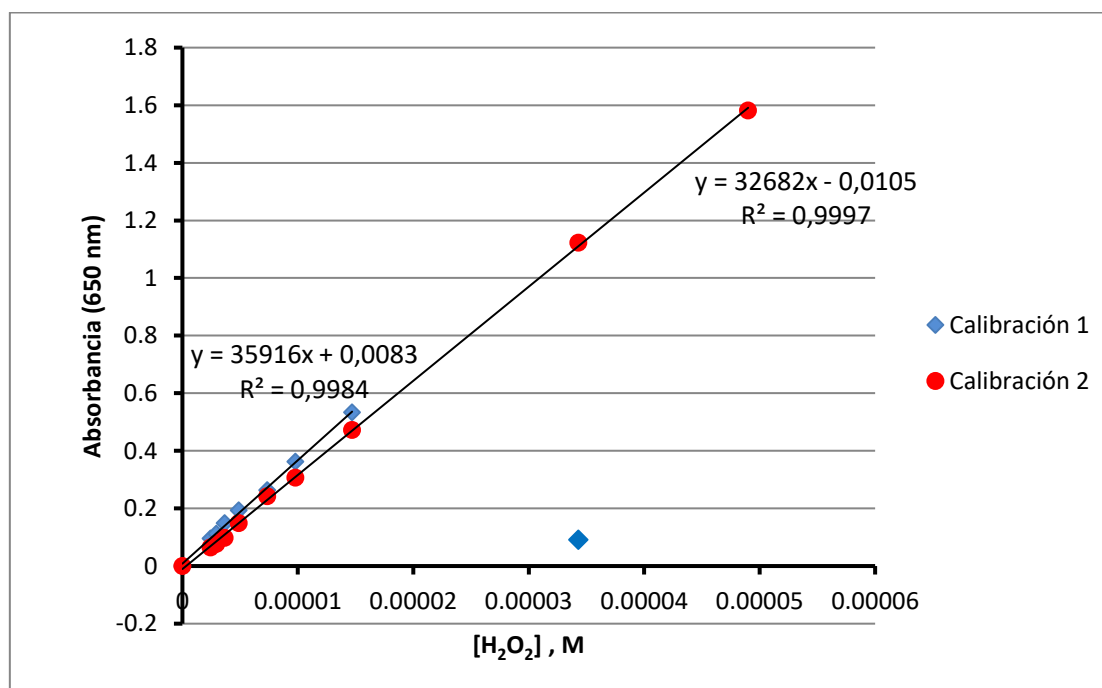


Figura 13. Rectas de calibrado 1 y 2 representadas conjuntamente. [HRP]=0,12 U/mL. [TMB]calibración 1= $7,28 \cdot 10^{-5}$ M; [TMB]calibración 2= $4,81 \cdot 10^{-4}$ M

La representación de las dos rectas de calibrado en una misma gráfica (Figura 12) mostró que efectivamente se obtenía un mayor rango lineal para la recta de calibrado cuando la concentración de TMB en cubeta era mayor:

- Rango lineal de la recta de calibrado 1: $2,45 \cdot 10^{-6} \text{ M} - 1,47 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.
- Rango lineal de la recta de calibrado 2: $2,45 \cdot 10^{-6} \text{ M} - 4,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Por otra parte, para asegurar la independencia de las señales con respecto a la concentración de TMB, se compararon las pendientes de las rectas de regresión lineal obtenidas para los datos de concentración de hasta $1,47 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, ya que hasta esa concentración se obtuvieron las señales para ambas concentraciones de TMB. Esto se hizo aplicando el test t, cuyos resultados mostraron que ambas pendientes no son significativamente diferentes al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$ (Tabla 2)

t crítico	t experimental
2,31	2,05

Tabla 2. Resultados del test t para la comparación de las pendientes de las rectas de regresión de los puntos de concentración de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ de hasta $1,47 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de las rectas de calibrado 1 y 2.

La recta de calibrado 1 se tomó como punto de partida para estudiar una posible calibración a 450 nm, basada en el color amarillo. Al aumentar la concentración de H_2O_2 donde acababa el rango lineal de la calibración a 650 nm, se conseguirían relaciones $[\text{TMB}]:[\text{H}_2\text{O}_2]$ cada vez más bajas. Como se sabía por los resultados de la optimización de la mencionada relación de concentraciones, una relación 1:1 presentaría ya la coloración amarilla buscada (Figura 11). Sin embargo, la calibración no fue viable debido a que la disolución con esa relación 1:1, correspondiente con una concentración de H_2O_2 de $2,41 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, dio una absorbancia de 2,1; valor muy alto para el que no es aplicable la ley de Lambert-Beer.

4.1.2.-Acoplamiento de la reacción de oxidación de la tiramina por la enzima tiramina oxidasa (TAO)

El acoplamiento de la reacción de oxidación de la tiramina, supone que el estudio pasa a basarse en el esquema de la reacción completa (Figura 5).

4.1.2.1.- Optimización del pH

El primer estudio que se llevó a cabo fue la optimización del pH. Como se ha mencionado en el punto 4.1.1.1, se sabía que el pH óptimo para la actividad de la TAO está comprendido entre 6 y 8⁹, por lo que se hicieron medidas a pH 6, 7 y 8 poniendo en cubeta las concentraciones óptimas encontradas de HRP y TMB (apartado 4.1.1.1).

La concentración de TAO puesta fue de $0,52 \text{ U mL}^{-1}$, ya que había sido optimizada en estudios anteriores en el grupo de investigación de biosensores obteniéndose un valor óptimo de $0,5 \text{ U mL}^{-1}$ ¹⁰. En cuanto a la tiramina, se puso una concentración de $6,09 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, ya que se sabía que con la misma se obtendrían buenas señales de absorbancia.

Se escogió como óptimo el pH 6 al obtenerse con el mismo la mayor absorbancia (Figura 14).

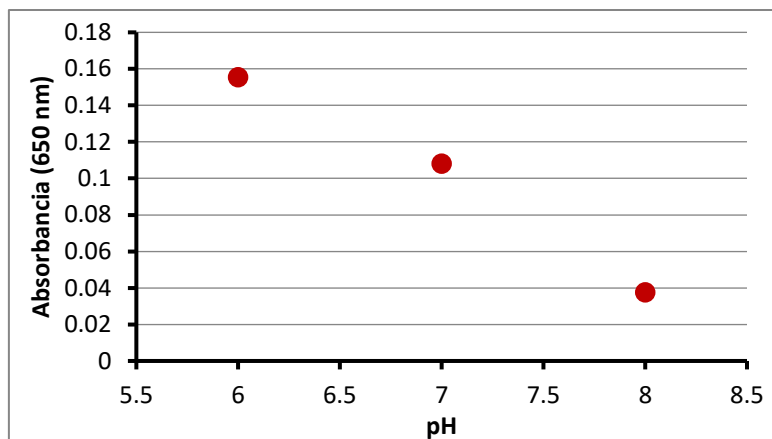


Figura 14. Señales de absorción frente al pH estudiado en la optimización, con [TMB]= $5,37 \cdot 10^{-5}$ M, [HRP]= $0,12$ U mL⁻¹ y [TAO]= $0,52$ U mL⁻¹

4.1.2.2.- Calibración

En la calibración, se mantuvieron las concentraciones de TMB, HRP y TAO utilizadas en el estudio de optimización del pH.

[Tiramina] / M	Absorbancia	S _{absorbancia}	DER %
0	0,0004	0,0011	269,6
$5,18 \cdot 10^{-7}$	0,013	0,0005	3,7
$7,77 \cdot 10^{-7}$	0,020	0,0003	1,6
$1,04 \cdot 10^{-6}$	0,026	0,0004	1,5
$1,29 \cdot 10^{-6}$	0,034	0,0004	1,2
$2,6 \cdot 10^{-6}$	0,094	0,002	1,8
$4,06 \cdot 10^{-6}$	0,133	0,001	1,1
$5,95 \cdot 10^{-6}$	0,208	0,001	0,6
$8,12 \cdot 10^{-6}$	0,269	0,001	0,4
$1,04 \cdot 10^{-5}$	0,355	0,004	1,0

Tabla 3. Datos de [Tiramina] (M), absorbancia, S_{absorbancia} y DER% de la recta de calibrado de la tiramina

Se hicieron tres réplicas para cada uno de los puntos de la recta de calibrado. Las desviaciones estándar relativas y DSR% para cada punto aparecen en la Tabla 3 y se han representado las desviaciones como barras de error en los puntos de la recta de calibrado (Figura 15).

Los datos de DSR% se correspondieron con lo esperado para un método de absorción ya que muestran poca variación en el rango de concentraciones de tiramina de entre $7,77 \cdot 10^{-7}$ M y $1,04 \cdot 10^{-5}$ M. Haciendo un promedio de los valores de DSR% obtenidos en ese rango se obtiene que la reproducibilidad del método es de **1,3%**.

El rango lineal del método va desde **$5,18 \cdot 10^{-7}$ M** hasta **$1,04 \cdot 10^{-5}$ M** (Figura 15).

El cálculo de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se hace multiplicando la relación entre la señal del blanco y la pendiente por 3 y 10, respectivamente, obteniéndose un LD de **$1,10 \cdot 10^{-7}$ M** y un LC de **$3,39 \cdot 10^{-7}$ M**.

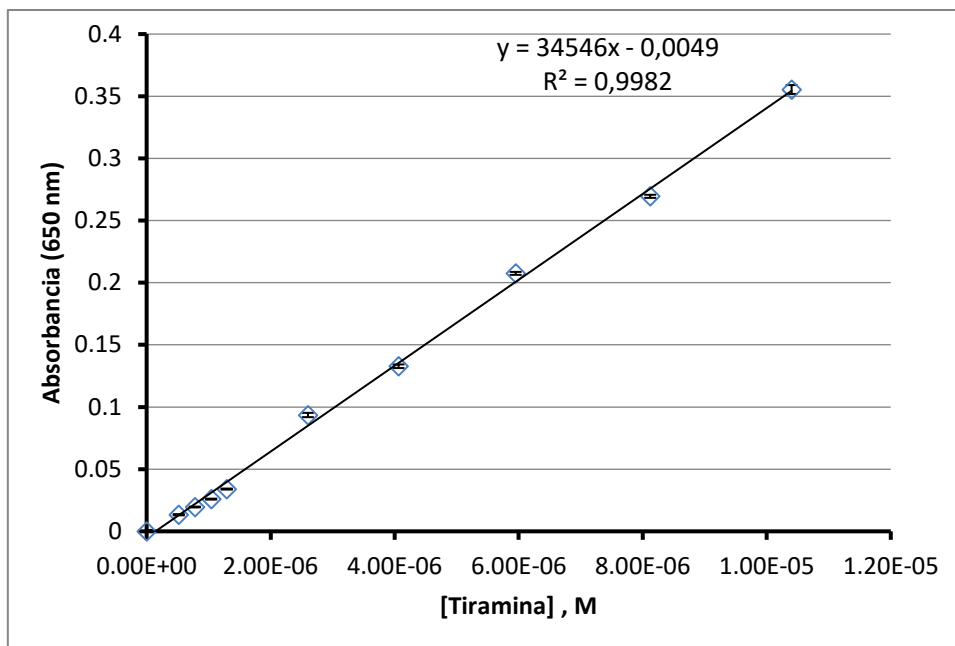


Figura 15. Recta de calibrado de la tiramina. [HRP]=0,12 U mL⁻¹, [TAO]=0,52 U mL⁻¹, [TMB]=5,37*10⁻⁵ M

t crítico	t experimental
1,78	1,14

Tabla 4. Resultados del test t para la comparación de las pendientes de la recta de calibrado de la tiramina (Figura 15) y la recta 1 de calibración del H₂O₂ (Figura 13).

Se comparó la pendiente de la recta con las obtenidas en la calibración del H₂O₂. Se podía comparar con cualquiera de ellas al haberse obtenido que no existían entre una y otra diferencias significativas y se escogió la recta 1. Esta comparación se hizo de nuevo con el test t y los resultados (Tabla 4), mostraron que en este caso tampoco había diferencias significativas entre las pendientes, por lo que se concluyó que toda la tiramina se convierte en H₂O₂, es decir, la reacción es cuantitativa.

4.1.2.3.- Estudios de interferencias

En muestras reales, la tiramina se encuentra en presencia de otras aminas biógenas, siendo las más relevantes en cuanto a concentración la cadaverina, la putrescina y la histamina. Por esa razón, se hicieron estudios de interferencias para comprobar que dicha presencia no alteraba las señales obtenidas en la determinación de la tiramina.

Se llevaron a cabo distintos ensayos, comenzando todos ellos con el registro de la señal que daba la tiramina en concentración de 1*10⁻⁵ M, la cual se tomaría como señal de referencia. Dichos ensayos se pueden clasificar en dos tipos:

a) Ensayos de interferencias individuales

Con éstos, se pretendía dilucidar si la TAO era o no específica en la oxidación de la tiramina.

Para ello, se pusieron en cubeta las concentraciones habituales de HRP, TMB y TAO y se hicieron diferentes ensayos, los cuales aparecen sintetizados en la Tabla 5.

Ensayo	[Aminas biógenas] / M
1 (referencia)	[Tiramina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M
2	[Cadaverina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M
3	[Histamina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M
4	[Putrescina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M
5	[Cadaverina]= $2 \cdot 10^{-5}$ M
6	[Histamina]= $2 \cdot 10^{-5}$ M
7	[Putrescina]= $2 \cdot 10^{-5}$ M
8	[Cadaverina]= $5 \cdot 10^{-5}$ M
9	[Histamina]= $5 \cdot 10^{-5}$ M
10	[Putrescina]= $5 \cdot 10^{-5}$ M
11	[Cadaverina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M
12	[Histamina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M
13	[Putrescina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M

Tabla 5. Concentraciones de las aminas biógenas en el estudio de interferencias individuales

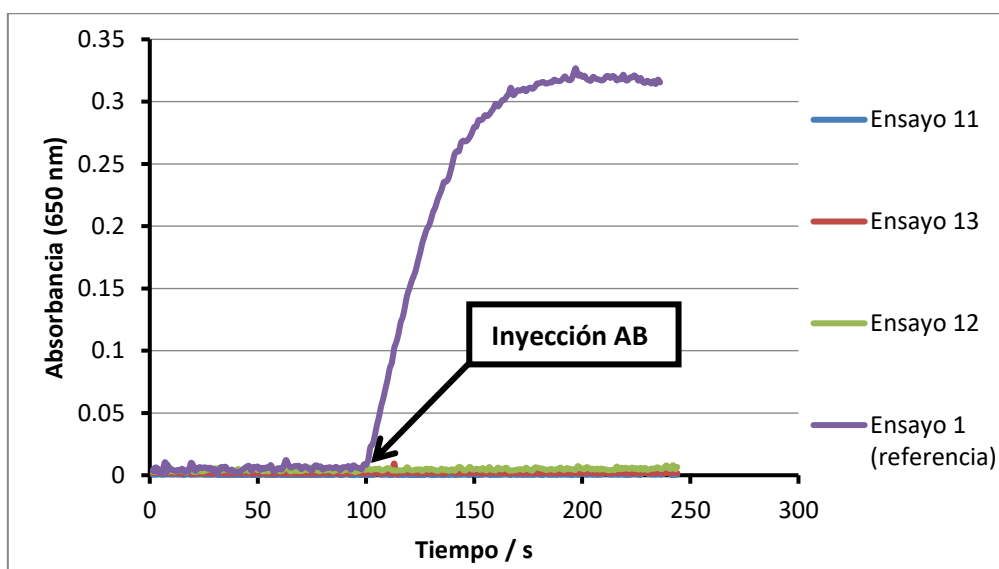


Figura 16. Señales de absorbancia para ensayos de interferencias individuales. [TMB]= $5,37 \cdot 10^{-5}$ M, [HRP]= $0,12$ U mL⁻¹, [TAO]= $0,52$ U mL⁻¹

En la Figura 16, se muestran los registros cinéticos de los ensayos en que se pusieron las AB con la mayor concentración, $1 \cdot 10^{-4}$ M (y por lo tanto, en los que más probabilidades había de que interfirieran) junto con el de la tiramina que se toma como referencia. El resultado para el resto de ensayos fue el mismo.

Tras la inyección de las AB potencialmente interferentes, en ninguno de los ensayos se observó un aumento de absorbancia con respecto a la de la línea base (Figura 16), lo que indica que no hay generación de H₂O₂ y que por lo tanto, la TAO no está oxidando a la putrescina, cadaverina o histamina. Se demostró así que la enzima TAO presenta una alta especificidad para la oxidación de tiramina.

b) Ensayos de interferencias dobles

El objetivo de este tipo de ensayos de interferencias era demostrar que la presencia en la disolución de otras aminas biógenas diferentes a la tiramina, no afectaba a la señal, ya fuera por inhibición de la reacción de la TAO con la misma o por la degradación del TMB oxidado con el tiempo.

El modo de operación en este caso fue inyectar la tiramina junto con cadaverina, putrescina o histamina por separado, es decir, por parejas. La tiramina se mantuvo en una concentración de $1 \cdot 10^{-5}$ M en todos los ensayos. Las concentraciones del resto de aminas aparecen recogidas en la Tabla 6.

Ensayo	[Aminas biógenas] / M	Relación [AB]:[Tir]
1 (referencia)	[Tiramina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M	-
2	[Cadaverina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M	1:1
3	[Histamina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M	1:1
4	[Putrescina]= $1 \cdot 10^{-5}$ M	1:1
5	[Cadaverina]= $2 \cdot 10^{-5}$ M	2:1
6	[Histamina]= $2 \cdot 10^{-5}$ M	2:1
7	[Putrescina]= $2 \cdot 10^{-5}$ M	2:1
8	[Cadaverina]= $5 \cdot 10^{-5}$ M	5:1
9	[Histamina]= $5 \cdot 10^{-5}$ M	5:1
10	[Putrescina]= $5 \cdot 10^{-5}$ M	5:1
11	[Cadaverina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M	10:1
12	[Histamina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M	10:1
13	[Putrescina]= $1 \cdot 10^{-4}$ M	10:1

Tabla 6. Concentraciones de las aminas biógenas y relaciones [AB]:[Tir] en el estudio de interferencias dobles

Para las relaciones 1:1, 1:2 y 1:5 se observaron los mismos resultados. En la Figura 17 aparecen representados los registros cinéticos obtenidos para los ensayos de relación 2:1.

En ella se vio que la señal de absorbancia llegaba a un mismo valor independientemente de la presencia (ensayos 5, 6 y 7) o ausencia de ABs distintas a la tiramina.

Sin embargo, cuando las concentraciones de cadaverina, putrescina e histamina superaban en 10 veces la de tiramina, se observó una disminución de la señal a lo largo del tiempo (Figura 18).

Se concluyó entonces que la presencia de las AB cadaverina, putrescina e histamina supone una interferencia en la determinación de tiramina sólo cuando éstas están en elevadas concentraciones con respecto a la misma, en cuyo caso degradan el TMB oxidado.

Lo más habitual en muestras reales es que las concentraciones de aminas biógenas sean similares entre ellas, por lo que el método no presentaría problemas de interferencias a la hora de determinar tiramina en las mismas.

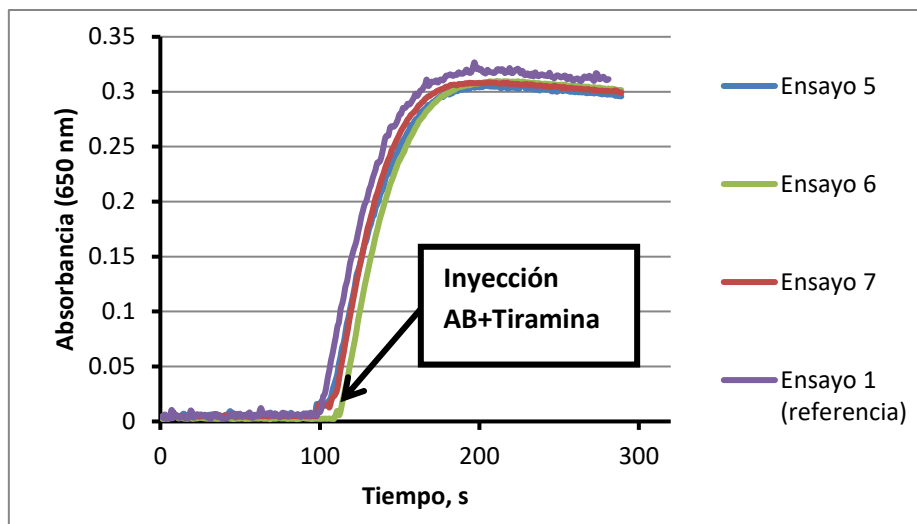


Figura 17. Señales de absorbanza para los ensayos de interferencia dobles con relación $[AB]:[Tiramina]$ de 2:1 junto con la señal de referencia. $[TMB]=5,37 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[HRP]=0,12 \text{ U mL}^{-1}$, $[TAO]=0,52 \text{ U mL}^{-1}$

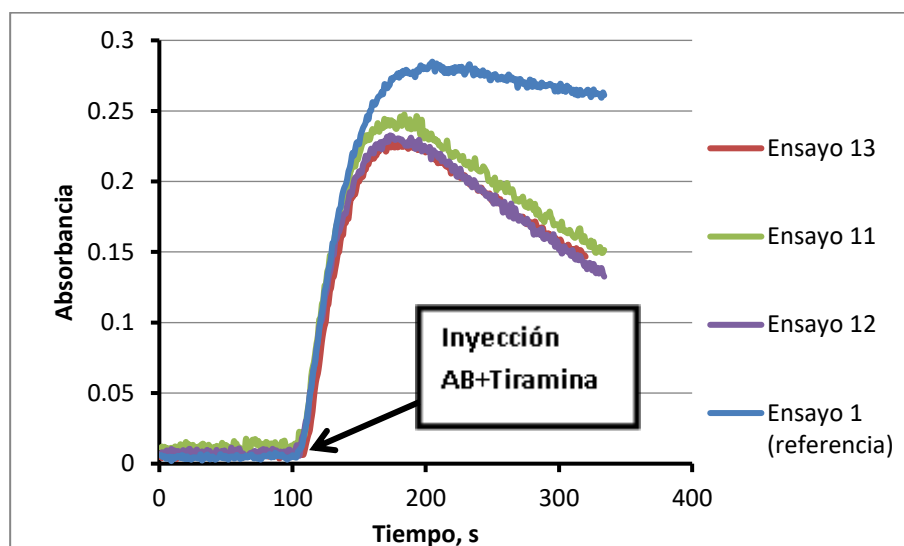


Figura 18. Registro cinético para los ensayos de interferencias dobles cuando $[AB]:[Tiramina]$ es 10:1. $[TMB]=5,37 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[HRP]=0,12 \text{ U mL}^{-1}$, $[TAO]=0,52 \text{ U mL}^{-1}$

4.1.2.4.- Validación del método

Se llevó a cabo la validación del método a través de la determinación de una muestra sintética de concentraciones conocidas de tiramina, putrescina, cadaverina e histamina. La muestra preparada contiene las mismas relaciones molares entre aminas que una muestra real de atún analizada por el servicio de Salud Pública de Aragón.

Se llevaron 20 μL de la disolución de muestra a un volumen total de 2 mL en la cubeta de medida. Las concentraciones en cubeta de las cuatro aminas aparecen recogidas en la Tabla 7.

Concentraciones reales de las aminas en la cubeta / M	
[Tiramina]	2,975*10 ⁻⁶
[Histamina]	1,112*10 ⁻⁵
[Putrescina]	1,570*10 ⁻⁵
[Cadaverina]	5,124*10 ⁻⁶

Tabla 7. Concentración real de las AB en cubeta

A pesar de que la determinación se llevó a cabo sólo para la tiramina, las concentraciones del resto de aminas son relevantes para asegurar que el método analítico propuesto no presenta problemas de interferencias.

Se hicieron tres réplicas de la medida de la muestra, obteniéndose las señales recogidas en la Tabla 8.

Réplica	Señal
1	0,1017
2	0,1007
3	0,092
Promedio	0,098

Tabla 8. Señales de las medidas de la muestra

t crítico	t experimental
4,3	2,9*10 ⁻⁶

Tabla 9. Resultados del test t para la comparación de la concentración obtenida por el método con la concentración real

Con estos resultados, la concentración que se obtiene por interpolación de la señal media en la recta de calibrado es de **(2,984±0,153)*10⁻⁶ M**. Al comparar este valor con el de concentración real mediante un test t (Tabla 9), se vio que no había diferencias significativas entre ambas y por lo tanto, el método es válido para la determinación de aminas en muestras reales.

4.2.- Implementación en soportes sólidos

Tras la optimización del método en disolución, el siguiente objetivo del trabajo en el laboratorio fue implementar la determinación colorimétrica de tiramina en un soporte sólido. Para ello, se debían inmovilizar los distintos reactivos en los diferentes soportes, para posteriormente añadir sobre ellos directamente la tiramina o la muestra. Los cambios de color observables en el soporte, se relacionarían con la concentración de analito, permitiendo una determinación semicuantitativa rápida y económica de la tiramina.

4.2.1.- Tiras reactivas

En primer lugar, se llevó a cabo la implementación en tiras reactivas, tiras comercializadas para la determinación de H₂O₂, que contienen ya el HRP y el TMB en concentraciones optimizadas.

4.2.1.1.- Optimización de [TAO] en tiras

Se tomaron siete tiras reactivas sobre las cuales se pusieron 10 µL de disoluciones de TAO de diferentes concentraciones (Tabla 10). Las tiras se dejaron secar al aire, tras lo cual se añadió en cada una de ellas 10 µL de tiramina de concentración de 8 ppm.

Tira	[TAO] / (U mL ⁻¹)
1	46,5
2	23,2
3	11,6
4	5,81
5	2,91
6	1,45
7	0,73

Tabla 10. Concentraciones de TAO en las tiras preparadas

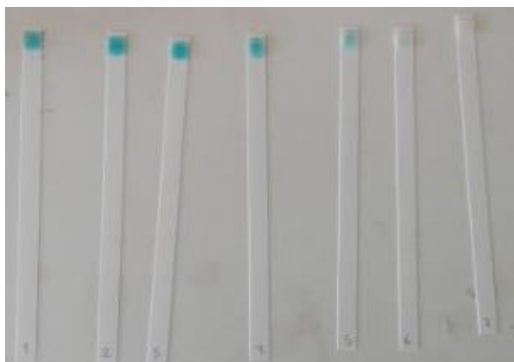


Figura 19. Coloración de las tiras con las concentraciones de TAO recogidas en la Tabla 4 tras la adición sobre las mismas de Tiramina en concentración 8 ppm

Se observó que las tres primeras tiras reactivas daban la misma intensidad de coloración, por lo que se tomó como óptima la concentración de la tira 3 (**11,6 U mL⁻¹**), que daba la coloración más intensa con el menor gasto de enzima (Figura 19).

Se prepararon otras siete tiras con las mismas concentraciones de TAO (Tabla), pero esta vez se dejaron secar en incubadora a 30 °C durante media hora para comprobar si la forma de secado afecta o no a los resultados de coloración obtenidos.

Tira	[TAO] / (U mL ⁻¹)
7	46,5
8	23,2
9	11,6
10	5,81
11	2,91
12	1,45
13	0,73

Tabla 11. Concentraciones de TAO en las tiras preparadas

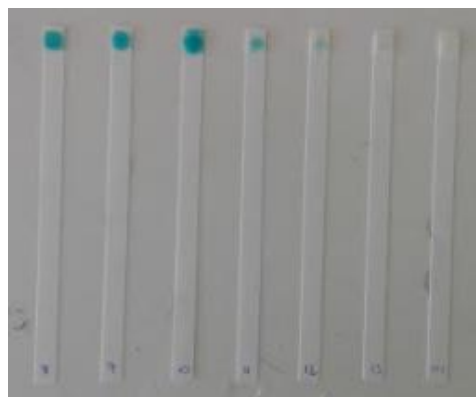


Figura 20. Resultados de coloración en las tiras reactivas secadas en incubadora

La coloración obtenida en las tiras secadas en incubadora (Figura 20) resultó ser la misma que la de las tiras secadas al aire, por lo que se concluyó que la forma de secado no es influyente en la coloración.

4.2.1.2.- Calibración

El primer paso en la calibración, fue incorporar la TAO en la concentración óptima encontrada en cada una de las tiras.

Las concentraciones de tiramina que se emplearon en la calibración (Tabla 12), se hicieron coincidir con las concentraciones de H₂O₂ empleadas en la calibración del color de las tiras por parte de la casa comercial.

Tira	[Tiramina] / M
1	0
2	$1,5 \cdot 10^{-5}$
3	$6,0 \cdot 10^{-5}$
4	$1,5 \cdot 10^{-4}$
5	$3,0 \cdot 10^{-4}$
6	$7,5 \cdot 10^{-4}$

Tabla 12. Concentraciones de tiramina en la calibración



Figura 20.

Comparativa del color obtenido en la calibración de la tiramina con las tiras reactivas con la coloración de la calibración de H_2O_2 ofrecida por la casa comercial

Las tiras reactivas constituyen un buen soporte para la determinación semicuantitativa de tiramina (Figura 20). Sin embargo, con ellas no es posible mover las concentraciones de HRP y TMB para llevar a cabo una optimización del método estudiado en disolución.

4.2.2.- Celulosa

Se pasó a estudiar la celulosa como soporte, ya que entre otras cosas ofrecía la ventaja de poder llevar a cabo una optimización de las concentraciones de HRP y TMB y no solo de TAO como ocurría con las tiras comerciales. Los rangos de concentraciones que se estudiaron para cada reactivo se muestran en la Tabla 13.

Reactivo	Rango de concentraciones estudiadas
HRP	$0,5-6 \text{ U mL}^{-1}$
TMB	$5 \cdot 10^{-5}-2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
TAO	$0,1-4 \text{ U mL}^{-1}$

Se estudió un total de 56 combinaciones de concentraciones de los tres reactivos. Sin embargo, en ninguno de ellos se consiguió observar el color azul.

Tabla 13. Rango de concentraciones estudiadas de HRP, TMB y TAO en los papeles de celulosa preparados

Para acotar el problema, se prescindió de la enzima TAO y se estudió la reacción entre TMB y H_2O_2 comercial en presencia del HRP (Figura 7). Para ello, se preparó un único papel con TMB y HRP inmovilizados en concentraciones de $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ y $0,5 \text{ U mL}^{-1}$ respectivamente. Al adicionar $10 \mu\text{L}$ de H_2O_2 de concentración $2,45 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, en este caso sí se observó la aparición del color, tal como se muestra en la Figura 21.



Figura 21. Imagen comparativa de dos papeles preparados con las mismas concentraciones de HRP ($0,5 \text{ U mL}^{-1}$) y TMB ($6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Sobre el de arriba se añadió H_2O_2 en concentración $2,45 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, mientras que el de abajo, sigue intacto.

A raíz de esta observación, se dedujo que era la TAO la que daba problemas para la aparición del azul. Algunas de las posibles causas que se propusieron para explicar el problema de la TAO fueron las siguientes:

- Un cambio en la conformación de la enzima en el estado sólido con respecto al del estado líquido.
- Imposibilidad de la TAO para acceder al centro activo de la tiramina por quedar retenida en los poros de la celulosa.

Para estudiar si la segunda causa podría ser cierta, se hizo otra prueba que consistió en preparar un papel idéntico al que se preparó para el estudio con el H₂O₂ comercial y una vez seco, se añadieron sobre él 10 µL de TAO en concentración de 1 U mL⁻¹. De este modo, la TAO no se entraparía en los poros de la celulosa. El resultado al añadir tiramina en concentración de 8 ppm fue positivo, se observó el color en el papel (Figura 22).



Figura 22. Foto del resultado obtenido en el laboratorio tras añadir TAO 0,1 U mL⁻¹ sobre un papel con TMB y HRP inmovilizados y al que se le añade tiramina.

Este resultado concordaba con la posibilidad de que la TAO estuviera siendo inmovilizada en los poros de la celulosa. En futuros estudios, se podrían preparar papeles utilizando disoluciones de celulosa con un tamaño de poro mayor, que permitieran una mayor libertad de movilidad a la enzima.

4.2.3.- Papeles

Se han estudiado cuatro soportes diferentes, los cuales aparecen especificados en el apartado 3.2.2 del trabajo. Se estudiaron distintas combinaciones de concentraciones de HRP, TAO y TMB, las cuales estuvieron comprendidas en los mismos rangos de concentraciones que en el estudio de la celulosa (Tabla 5).

De nuevo los resultados fueron negativos y no se obtuvo coloración para ninguno de los papeles preparados. Se piensa que el problema es el mismo que el encontrado en la celulosa.

5.- Conclusiones

Se ha logrado el desarrollo de un método analítico útil para la determinación de tiramina para el control de calidad en alimentación. Las conclusiones a las que se ha llegado se enumeran a continuación:

1. Los resultados obtenidos demuestran que es posible acoplar la reacción H₂O₂/HRP/TMB con la enzima TAO para desarrollar el método de determinación de la tiramina en un rango lineal de 5,18*10⁻⁷ M hasta 1,04*10⁻⁵ M.
2. Se ha comparado la pendiente de la recta de calibrado del método con la obtenida en la calibración del H₂O₂ en la reacción HRP-TMB-H₂O₂ y se ha visto que no existen

- diferencias significativas entre ellas, por lo que se concluye que toda la tiramina pasa a H_2O_2 , es decir, que la reacción es cuantitativa.
3. Se ha demostrado a través de los ensayos de interferencias que la enzima TAO es altamente específica para la oxidación de la tiramina, y que además su actividad no se ve inhibida por la presencia en disolución de las aminas cadaverina, putrescina e histamina.
 4. Se ha demostrado la validez del método mediante la determinación de una muestra sintética que contenía tiramina, cadaverina, putrescina e histamina en las mismas relaciones molares presentes en una muestra real de atún. La comparación de la concentración obtenida con la real mediante un test t ha mostrado que no existen diferencias significativas entre ambas.
 5. La inmovilización de TAO en tiras comerciales para peróxido ha dado buenos resultados y puede utilizarse para la determinación semicuantitativa y rápida de la misma.
 6. No se ha conseguido ver la coloración azul en la celulosa ni en los papeles comerciales estudiados para la inmovilización. Se piensa que el problema es que la TAO queda entrampada en los poros de dichos soportes, lo que impide el funcionamiento de la reacción. Esta teoría podría ser un punto de partida para futuros estudios de inmovilización.

6.-Bibliografía

1. Karovicová, J.; Kohajdova, Z. Biogenic Amines in Food. *Chem. Pap.* **2003**, 59 (1), 70-79.
2. Zhai, H.; Yang, X.; Li, L.; Xia, G.; Cen, J.; Huang, H.; Hao, S. Biogenic amines in comercial fish products sold in southern China. *Elsevier* **2011**, Food Control 25 (2012) 303-308.
3. Fernández, M.; Álvarez, M. A. Las aminas biógenas en los alimentos. CTC Alimentación 26:84-90 (2005). (ISBN: 1577-5917; <http://hdl.handle.net/10268/5771>)
4. Önal, A.; Evrim, S.; Önal, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Elsevier* **2012**, Food Chemistry 138 (2013), 509-515.
5. Directiva 91/439/EEC. Directive of 22 July 1991 establishing standards to be applied to the production and commercialization of fishery products. Official Journal of the European Communities L268:15-34.
6. Önal, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Elsevier* **2006**, Food Chemistry 103 (2007) 1475-1486.
7. Lange, J.; Wittmann, C. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Special Issue Paper* **2001**, Anal Bioanal Chem 372 (2002), 276-283; DOI 10.1007/s00216-001-1130-9.
8. Josephy, P. D.; Eling, T.; Mason, P. The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine. *The Journal of Biological Chemistry* **1982**, 257 (7), 3669-3675.
9. Sekisui diagnostics. <https://www.sekisuidiagnostics.com/products/115-tyramine-oxidase>. (Último acceso el 20/04/2018).

10. Navarro, J.; de Marcos, S.; Villuendas M.; Galbán, J. Exposición del póster “Síntesis in situ de nanopartículas de oro acoplada a la determinación enzimática de aminos biógenas” en la XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA). Valencia 5-7 Septiembre 2017.