



AMINAS BIÓGENAS:

Estudio de nuevos colorantes para su determinación enzimática.



Universidad
Zaragoza

Rivero Trullén, Irina
Trabajo de Final de Grado en Química
Departamento de Química Analítica
Grupo de Biosensores Analíticos (GBA)
Directora: Sanz Vicente, Isabel

Abstract:

Biogenic amines are nitrogen compounds with low molecular weight that are derived from amino acids and are present in all natural products in which the degradation has taken place. The most common biogenic amines are cadaverine, putrescine, histamine, tyramine, 2-phenylethylamine and tryptamine. Those compounds are produced by bacterial actions and play an important role in many biologic processes, like neurotransmitters.

Histamine is the most famous amine due to food poisoning. Because of that, is necessary to take control measures in order to prevent it and to know about the food quality. Many test methods exist for determination of histamine levels in fish like spectrofluorometric or the most popular: HPLC (high performance liquid chromatography); but all of them are usually expensive and it takes time to get the results.

The main objective of this work is to perform a new method for the determination of biogenic amines with reagent strips using AmplexRed as dye. This will assure industry that they will not waste time and money.

The method will be using the diamine oxidase (DAO) reaction side product, H_2O_2 , to oxidize AmplexRed to resorufin, a reaction mediated by horseradish peroxidase (HRP). The absorption spectra of Amplex Red change during the enzymatic reaction. It's possible to measure the difference of absorption between before and after it and developing a calibration curve.

Resumen:

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular derivados de los aminoácidos que se encuentran presentes en productos naturales que han sufrido una degradación. Las aminas biógenas más comunes son: cadaverina, putrescina, histamina, tiramina, 2-feniletilamina y triptamina. Estos compuestos son producidos por la actividad biológica de bacterias y microorganismos y son de vital importancia para diversos procesos biológicos, como por ejemplo su uso como neurotransmisores.

La histamina es la más conocida debido a su efecto tóxico que provoca intoxicaciones alimenticias. Por ello, es necesario llevar un control para prevenir las intoxicaciones y para asegurar la frescura de los alimentos. Existen muchos métodos de determinación para las aminas como las basadas en la fluorescencia o la más utilizada: HPLC (high performance liquid chromatography). Pero algo importante a destacar son los altos costos y periodos de tiempo que conllevan estas técnicas.

El principal objetivo de este trabajo es desarrollar un nuevo método para la determinación de aminas biógenas a través del uso de tiras reactivas con el AmplexRed (AR) como colorante. Este nuevo método pretende ahorrar dinero y tiempo a la industria y laboratorios.

El método utiliza el subproducto de la reacción de la diamino oxidasa (DAO) con las aminas, el H_2O_2 , para oxidar el colorante AR a resorrufina, reacción en la cual interviene la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). El espectro de absorción del AR cambia a lo largo de la reacción enzimática haciendo posible la medida de la señal inicial y final y permitiendo obtener una recta de calibrado posteriormente con los resultados.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Las aminas biógenas.....	1
1.2. Determinación de aminas biógenas con ABTS	2
1.3. Método propuesto de mejora con AmplexRed como colorante.....	4
2. Objetivos	5
3. Experimental	6
3.1. Reactivos y disoluciones.....	6
3.2. Instrumentos y materiales.....	6
3.3. Procedimientos de medida.....	7
3.3.1.HRP + H ₂ O ₂	7
3.3.2.HRP + H ₂ O ₂ + colorante	7
3.3.3.HRP + DAO + colorante + amina.....	7
4. Resultados y Discusiones	8
4.1. Estudios previos	8
4.2. AR: espectros de absorción y fluorescencia	11
4.3. Optimización de la concentración de AR	11
4.4. Optimización de la concentración de HRP	12
4.5. Calibración de H ₂ O ₂	13
4.6. HRP + DAO + AR + aminas	14
4.6.1.Calibrado con cadaverina	17
4.6.2.Calibrado con putrescina	18
4.6.3.Histamina	18
4.7. AR y la influencia de la luz	19
4.8. AR y sus reacciones secundarias.....	20
4.9. Calibración de la histamina	21
4.10. Rectas de calibrado de fluorescencia para cadaverina y putrescina	22
5. Conclusiones	24
6. Bibliografía	25

1. Introducción

1.1. Las aminas biógenas

Las aminas biógenas o biogénicas son compuestos nitrogenados formados por descarboxilación de aminoácidos o por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas. Se trata de bases orgánicas de bajo peso molecular sintetizadas a través de rutas metabólicas de organismos microbianos, vegetales y animales.

Según su estructura química se pueden clasificar de diversas maneras. Una de ellas es: aminas alifáticas (putrescina y cadaverina), aminas aromáticas (histamina, triptamina y tiramina) y poli-aminas (espermidina y espermina). *Figura 1.*

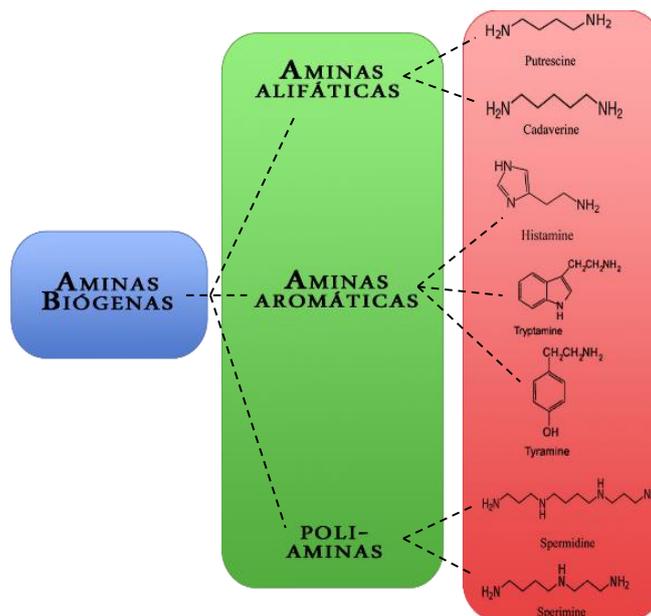


Figura 1: Aminas biógenas: tipos.

Biológicamente las aminas biógenas (AB) tienen un papel fundamental en diversas actividades biológicas de diferentes organismos¹. En vegetales algunas AB intervienen en procesos celulares como el de respuesta al estrés o envejecimiento. En animales intervienen en la transmisión nerviosa o el control de la presión sanguínea. Entre ellas, la histamina es de vital importancia como neurotransmisor.

A pesar de la necesidad vital de estos compuestos, se sabe que la descarboxilación de los aminoácidos debida a algunos microorganismos y la posterior ingestión en altas concentraciones produce efectos tóxicos para los seres vivos. Las intoxicaciones alimentarias más comunes son las provocadas por la histamina, que proviene del aminoácido histidina, y principalmente la observamos en pescados. Otra AB que también se suele relacionar con intoxicaciones alimenticias es la tiramina, procedente de la tirosina, y que se presenta en quesos, en su gran mayoría. Que aumente la cantidad de aminas biógenas en los alimentos a lo largo del tiempo es un indicativo de la frescura de estos y/o de las materias primas.

A pesar de que cualquier AB que se encuentre en altas concentraciones puede ser perjudicial para el ser humano, como la cadaverina y la putrescina que además potencian la acción del resto y dan lugar a la formación de nitrosamidas, tan solo la histamina se encuentra regulada por ley, Reglamento (UE) N° 1019/2013 de la comisión de 23 de octubre de 2013.

1.2. Determinación de aminas biógenas con ABTS

Como se ha explicado anteriormente, es imprescindible el seguimiento de la concentración de las AB en los alimentos para garantizar tanto la calidad como la ingesta segura de los mismo.

Es por esto que tanto las administraciones públicas como la industria alimentaria necesitan métodos rápidos de control “in situ” de estas aminas frente a los existentes, que fundamentalmente se basan en técnicas de separación con HPLC². En este sentido, sería de mucha utilidad el poder disponer de tiras reactivas que pudieran indicar la presencia de aminas biógenas por encima de una determinada concentración o incluso hacer una determinación semicuantitativa de las mismas, ahorrando costes y tiempo, proporcionando una respuesta rápida para una primera categorización que eliminase los resultados negativos, por ejemplo.

En el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo este trabajo se había propuesto un método colorimétrico para determinar aminas biógenas basado en la siguiente secuencia de reacciones:

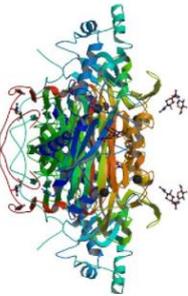
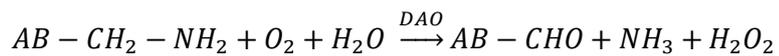


Figura 2: Enzima DAO

La primera reacción se da con la enzima diamino oxidasa o DAO; esta utiliza como sustrato las AB para transformar su grupo amino en un aldehído en presencia de oxígeno y agua.



Los peróxidos obtenidos en este paso serán los que posteriormente sean el sustrato de la reacción enzimática de la HRP.

En la segunda reacción de la secuencia tenemos a la enzima peroxidasa de rábano picante o HRP. Se trata de una oxidoreductasa hemoprotéica que, en su estado natural, HRP, el grupo hemo tiene Fe (III), una vez que reacciona con el sustrato H₂O₂ se oxida de Fe(III) a Fe(V) y forma HRPI. Gracias a otros sustratos reductores, la enzima HRPI es capaz de pasar a su forma HRPII y en otra reacción de reducción pasar a su forma inicial, HRP. La forma HRPII contiene Fe(IV) que proviene de la reducción del Fe (V) de la forma HRPI, y en la siguiente reacción pasa de Fe(IV) a Fe(III), como se encontraba el grupo hemo inicialmente. El ciclo se encuentra representado en la figura 3.

Toda la reacción de la enzima HRP³ se puede seguir gracias a un espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis fijando las longitudes de ondas a las cuales absorben las diferentes formas oxidadas y reducidas de esta. La forma HRP presenta un máximo a 400 nm y conforme se reduce a la forma HRPI, la absorbancia presentada desaparece para dar otra con un máximo a 415 nm, que dependiendo de la velocidad de la cinética a la cual ocurra podría no ser apreciable; para finalmente presentar un máximo a 420 nm para la forma HRPII. La forma típica de la representación obtenida con el instrumento de medida sería la presentada en la figura 4.

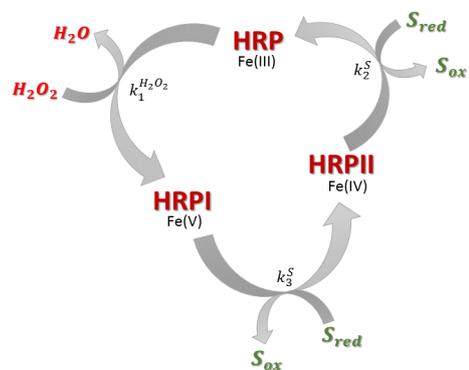


Figura 3: Mecanismo de reacción de la enzima HRP

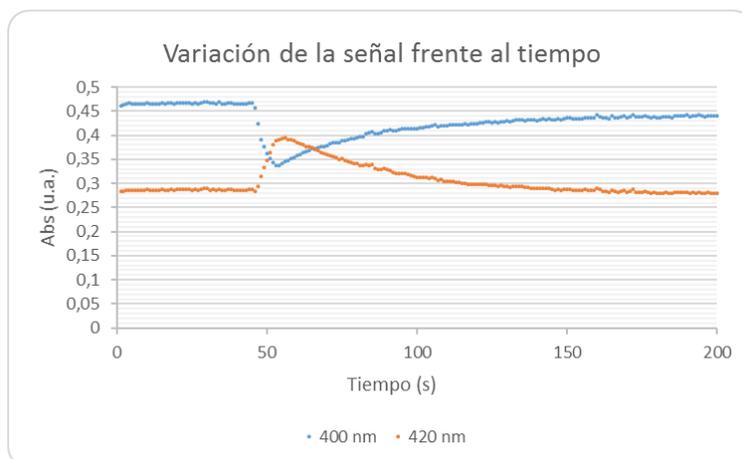


Figura 4: Representación de la señal para 20,4 U/mL de HRP, $5,5 \cdot 10^{-7}$ M de H_2O_2 y tamponada con fosfatos a pH 6.

Es sabido que trabajando en exceso de peroxidasa se obtiene una relación lineal con la concentración de peróxidos según el modelo matemático que proporciona la ecuación 1:

$$\frac{1}{\Delta Abs_{t,\lambda}} = \frac{k_{\alpha}^{HRP}}{\Delta \epsilon_{\lambda} A} \cdot (1 - 10^{-At}) + \frac{10^{-At}}{\Delta \epsilon_{\lambda}} \cdot \frac{1}{[H_2O_2]_0}$$

Ecuación 1: Relación entre la variación de absorbancia y la concentración de peróxidos.

Midiendo el cambio de absorbancia de las señales obtenidas se puede conocer la concentración de amina presente en la muestra. Cuando esta secuencia de reacciones se lleva a cabo en presencia de ciertos colorantes, como el ABTS, estos cambian de color durante la misma y se pueden desarrollar métodos colorimétricos para determinar aminas, que serían la base de las tiras reactivas.

El ABTS⁴ se acopla en las anteriores reacciones de manera que actúa como sustrato reductor para la enzima HRP, por lo tanto, se puede seguir la reacción gracias a las propiedades ópticas que presenta el colorante. El ABTS es oxidado a ABTS⁺, un catión que absorbe en la zona de espectro visible presentando unos máximos a 645 nm, 734 nm y 815 nm. El de mayor absorbancia y por tanto el más sensible es el de 734 nm, el cual se tomará para seguir la reacción. El ABTS es un colorante que sufre reacciones fotoquímicas debido a la incidencia del haz de luz por lo que se ha de trabajar con un filtro.

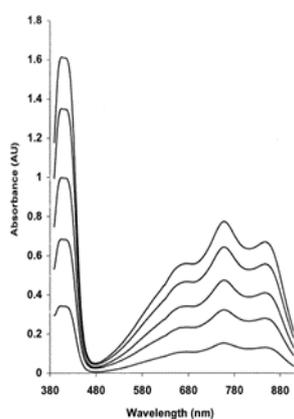


Figura 5a



Figura 5b

Figura 5a: Espectro característico del ABTS. Figura 5b: Señal para 2.5 U/mL de HRP, $3,4 \cdot 10^{-3}$ M de ABTS, $3,06 \cdot 10^{-6}$ M de H_2O_2 y pH 6.

La metodología utilizada para la obtención de la figura 6 fue desarrollada en un trabajo anterior. Como se puede observar, tanto cadaverina como putrescina son determinaciones rápidas, en cambio, para la histamina se observa una regeneración del colorante porque la señal decrece tras llegar a un máximo. Esta reacción secundaria de reducción del ion $ABTS^{+}$ impide la obtención de una señal estable con el tiempo que dificulta el desarrollo de tiras reactivas puesto que la señal no permanece estable. Para el resto de AB se obtienen resultados de cinéticas muy lentas, velocidades incompatibles con la idea de un método analítico de respuesta rápida⁵.

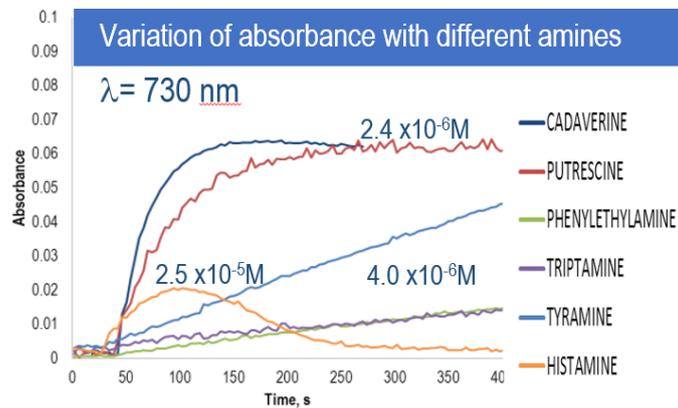


Figura 6: Representación de la señal de absorbancia de las diversas aminas biógenas con ABTS como colorante.⁵

1.3. Método propuesto de mejora con AmplexRed como colorante

La implementación del AmplexRed como nuevo colorante, sustituyendo así al ABTS, pretende no solo solucionar el problema presente con la regeneración de este último por parte de la histamina, sino mejorar tanto la sensibilidad como la cinética de las reacciones más lentas, haciendo posible categorizar a este nuevo método como un método analítico de respuesta rápida.

2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo es el estudio de un nuevo colorante y su aplicación en un método para la determinación de aminas biógenas que pueda sustituir al ya utilizado en el que se usaba ABTS, con el objetivo de eliminar interferencias.

- Primero se estudiará la reacción enzimática del peróxido de hidrógeno con la HRP.
- Seguidamente se intentarán reproducir los resultados del anterior estudio con el ABTS.
- Se estudiará el colorante alternativo, AmplexRed.
- Se aplicará el colorante a la reacción de los peróxidos y la enzima HRP optimizando las concentraciones de los diferentes reactivos.
- Se añadirá a la reacción anterior la enzima DAO y se comprobará que no hay interferencias.
- Se comprobará de nuevo el correcto funcionamiento del colorante con la DAO, la HRP y las aminas.
- Se realizarán las rectas de calibrado para cada una de las diferentes aminas estableciendo las características analíticas.
- Se llevará a cabo la discusión y evaluación de los resultados obtenidos.
- A lo largo de todo el trabajo se aprenderá a manejar correctamente diferentes instrumentos como espectrofotómetro de absorción molecular Uv-Visible, espectrofluorímetro y fluorímetro portátil.
- Se revisará la bibliografía sobre el tema.

3. Experimental

3.1. Reactivos y disoluciones

➤ **Disoluciones:**

- Tampon $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=6: se pesan 4,26 g de Na_2HPO_4 (Panreac 131679.1211) y se disuelven en 300 mL de agua MilliQ. Se ajusta el pH con una disolución de HCl 1M
- Ácido clorhídrico 35-38% (POCH 575283115)
- Disolución de peróxido de hidrógeno, H_2O_2 30% (Sigma-Aldrich Lote #SZBF1960V)
- Disoluciones de H_2O_2 preparadas por dilución de la comercial en disolución tampon de fosfatos.
- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (Sigma-Aldrich Lote #SLBH2992V): se pesan 5,56 mg en 1,5 mL de tampon de fosfatos.
- Ampliflu™ Red (AR) (Sigma-Aldrich Lote #BCBQ0525V): disolución de 5 mg de AR en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)
- Disolución de dimetilsulfóxido (DMSO): (Panreac 131954.1611) Pureza del 98%.
- Cadaverine dihydrochloride: (Sigma Lote #BCBR1640V) Pureza del 98%.
- Putrescine dihydrochloride: (Aldrich Chemistry Lote #BCBL6699V) Pureza del 98%.
- Histamine dihydrochloride: (Sigma Lote #WXBC3407V) Pureza del 98%.
- Tyramine dihydrochloride: (Sigma Lote #BCBP6976V) Pureza del 98%.
- 4-hydroxybenzaldehyde: (Aldrich Chemistry Lote #BCB55400V) Pureza del 98%.
- 2-Phenylethylamine hydrochloride (Aldrich Chemistry Lote #SLBM0632V) Pureza del 98%.
- L-thyroxine (Sigma Lote #1426011 11409204) Pureza del 98%.

➤ **Enzimas:**

- Peroxidase from horseradish (HRP) 146 U/mg (Sigma Lote #SLBF8265V)
- HRP 2U/mL: se pesan 1,37 mg de enzima y se disuelven en 2 mL con tampon de fosfatos.
- Diamine oxidase from plant origin(DAO): (Bio-Research Products Inc.) Nº catálogo: 903X (DAO-B14602)

3.2. Instrumentos y materiales

- Cary Eclipse Fluorescence Spectro photometer. Agilent Technologies equipado con lámpara de Xenon y monocromadores de excitación y emisión.
- Espectrofotómetro de AM UV-VIS Agilent 8453A equipado con una red de fotodiodos y lámpara de deuterio que permite espectros en el rango de longitudes de onda de 180 a 1100 nm cada 0,1 segundos
- Fluorescence Spectro photometer Aquafluor de Turner Desings (Modelo portátil)
- pH-metro BasicC de Crison calibrado todos los días de uso
- Balanza A&D Instruments LTD. Modelo GR-202-EC
- Ultrasonidos de J.P. Selecta s.a.
- MiniSpin de Eppendorf

3.3. Procedimientos de medida

3.3.1. HRP + H₂O₂

Inicialmente se hace un blanco con una cubeta de 1 cm de paso óptico y una disolución de tampón de fosfatos a las longitudes de medida, que serán 400 nm y 420 nm, características de la HRP.

Para realizar la medida de peróxidos en disolución se procede tomando la cubeta y añadiendo una cantidad de tampón de fosfatos suficiente para que, tras la adición de los siguientes reactivos, el volumen total final sea de 2 mL. Seguidamente se añade HRP para tener 2 U/mL y se empieza a medir en el programa para medir cinética, el cual permite adquirir valores de absorbancia a lo largo del tiempo cada cierto intervalo de tiempo, todo ello programable. Tras obtener durante unos segundos una línea base estable, se añade una disolución de H₂O₂, preparada por dilución de la comercial. Se registrará la variación de la señal. Se puede parar la medida una vez que la absorbancia vuelva a ser de un valor constante durante un tiempo, que será mayor que la inicial para la longitud de onda de 420 nm y menor para la de 400 nm.

3.3.2. HRP + H₂O₂ + colorante

Debido a que los colorantes sufren reacciones fotoquímicas, se coloca un filtro delante del haz para realizar todas las medidas. Primero se procede con un blanco de tampón de fosfatos. Para comenzar la medida, se añade una cantidad de tampón de fosfatos suficiente para tener finalmente los 2 mL tras todas las adiciones. Para las diferentes medidas se adicionan los reactivos para tener como concentración final: 2 U/mL HRP y 5·10⁻⁶M de colorante. De nuevo, se espera tras añadir la HRP y el colorante a tener una línea de señal constante y, entonces, se añade la disolución de H₂O₂ obtenida por dilución de la comercial. Se detiene el programa una vez terminada la reacción, es decir, que se aprecie que ha ocurrido la variación de la señal y se encuentre de nuevo estable a lo largo del tiempo. En estas medidas se fija la longitud de onda a las propias del colorante, para el ABTS será 720 nm y para el AR será 570 nm.

3.3.3. HRP + DAO + colorante + amina

Con el filtro colocado ya que se trabaja con un colorante, se hace un blanco con tampón de fosfatos. Se añade en una cubeta limpia tampón para tener un volumen final de 2 mL como anteriormente y luego, en un mismo orden siempre, se añaden los siguientes reactivos para tener una concentración final determinada: 1,8 U/mL de DAO, 2 U/mL de HRP y 5·10⁻⁶M de colorante. Cuando se obtenga la línea constante se puede añadir la disolución de amina obtenida por pesada y dilución, y cuando termine de aumentar la señal y vuelva a ser constante se puede detener la medida. Las longitudes de onda fijadas serán: 720 nm para el ABTS y 570 nm para el AR.

4. Resultados y Discusiones

4.1. Estudios previos

Como se ha comentado en la introducción, la metodología que se propone se basa en una secuencia de reacciones enzimáticas. Una de ellas es la reacción de peroxidasa con peróxido de hidrógeno. La enzima peroxidasa utilizada en este trabajo es de un lote y características diferentes a la usada hasta la fecha en el laboratorio por lo que el trabajo se comenzó por el estudio de esta enzima.

La figura 7 muestra la señal que se obtiene al hacer reaccionar la enzima con peróxido de hidrogeno según el procedimiento de medida descrito en el apartado 3.3.1.

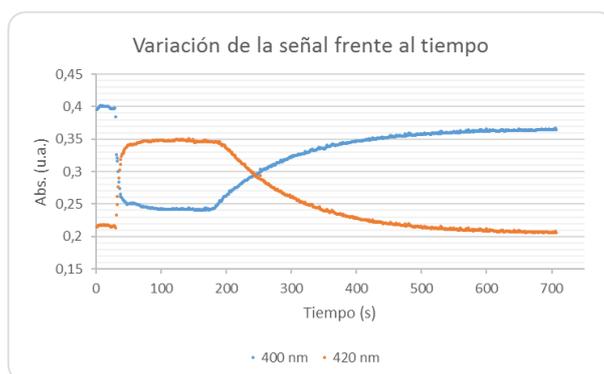


Figura 7: Representación de la variación de la señal frente al tiempo para una reacción de 37,5 U/mL de enzima HRP y $9,8 \cdot 10^{-7}$ M de H_2O_2 en un medio tamponado con disolución de fosfatos a pH 6.

Como se observa, se comporta según lo explicado en punto 1.2. de la introducción, produciendo un aumento de absorbancia a la longitud de onda de 420 nm y una disminución a la de 400 nm.

Se realizó un estudio sobre la relación de la variación de la señal con las unidades de la enzima HRP añadidas para una concentración de H_2O_2 de $9,98 \cdot 10^{-7}$ M, fijando a las longitudes de onda propias de la HRP. Los resultados obtenidos se pueden ver en la figura 8.

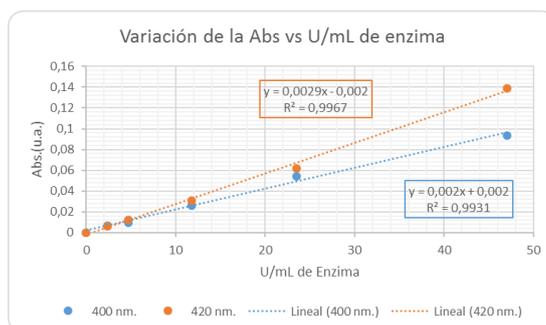


Figura 8 Variación de la señal de absorbancia para diferentes cantidades de HRP valoradas con una concentración de H_2O_2 de $9,98 \cdot 10^{-7}$ M y disolución amortiguadora de fosfatos de pH 6.

Hay una relación lineal, en el intervalo de HRP estudiado, entre la señal obtenida (a ambas longitudes de onda) y las unidades de enzima en disolución. Se eligió 25 U/mL como concentración de enzima a añadir para continuar con el estudio.

La recta anterior sirve también para poder conocer la actividad de la enzima peroxidasa y con ello poder comprobar la actividad dada por el fabricante. Además, una vez registrados estos datos se pueden comparar diferentes lotes de enzima que lleguen al laboratorio.

Una vez cerciorados de que se produce adecuadamente la reacción entre la enzima y los peróxidos se ensayaron diferentes concentraciones para ver si la respuesta cambiaba con la concentración. Estos resultados se pueden observar en la figura 9, medidos a una longitud de onda de 400 nm. Para la longitud de onda de 420 nm se obtuvieron valores similares.

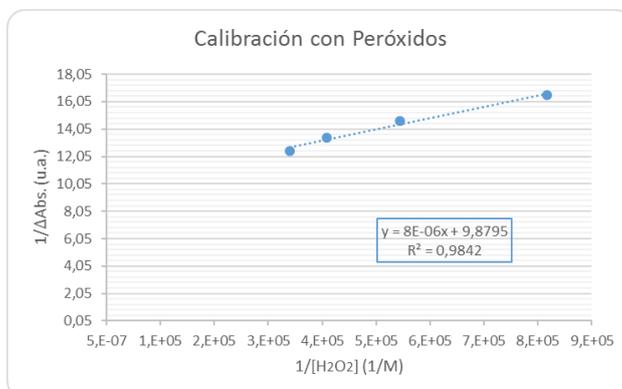


Figura 9: Variación de la señal de absorbancia frente a la concentración de H₂O₂ añadida para 24.4 U/mL de HRP en disolución de tampon de fosfatos de pH 6.

Existe una relación lineal hasta $3 \cdot 10^{-6}$ M siendo la concentración menor ensayada $1,2 \cdot 10^{-6}$ M. Se cumple el modelo mostrado en la ecuación 1 de la introducción.

El siguiente paso fue añadir el colorante ABTS. Se volvió a optimizar la relación entre el colorante y la enzima HRP, seleccionando para trabajar esta vez 2.5 U/mL de HRP para $3,2 \cdot 10^{-4}$ M de ABTS. Se siguió el procedimiento de medida descrito en el apartado 3.3.2. y se obtuvo la señal de la figura 10 al valorar una disolución $4,29 \cdot 10^{-7}$ M de peróxidos.



Figura 10: Representación de la variación de la señal de absorbancia frente al tiempo para una valoración con $4,29 \cdot 10^{-7}$ M de H₂O₂, 2,5 U/mL, y disolución de tampon de fosfatos a pH 6.

Se puede observar como la absorbancia aumenta a la longitud de trabajo, 740 nm., describiendo una curva casi vertical en la subida, llegando a un máximo y descendiendo ligeramente al final. Para obtener el resultado de la variación de la señal se toma el valor menor de la línea inicial estable y se resta al valor del máximo de la señal. Ese resultado será el representado en la recta de calibrado.

Se realiza el mismo procedimiento para diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno para obtener una recta de calibrado que indique el rango lineal del método. La recta de calibrado se puede observar en la figura 11.

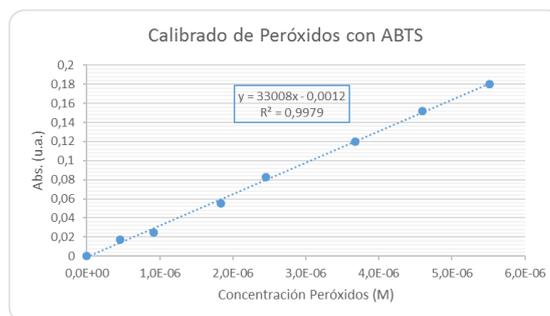


Figura 11: Variación de la señal para distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno de disoluciones con 2.33 U/mL de HRP y $3,41 \cdot 10^{-4}$ M de ABTS en medio de tampon de fosfatos pH 6.

El rango lineal del método va hasta $4,59 \cdot 10^{-6}$ M, siendo la concentración menor medida de $4,59 \cdot 10^{-7}$ M. En la tabla 1 se puede ver la reproducibilidad con medidas tomadas en diferentes días.

Concentración	Señal
2,49E-06	0,078
2,49E-06	0,076
2,49E-06	0,071
Media	0,075
DER	4,8%

Tabla 1: Repeticiones para un punto de la recta de calibrado en diferentes días para una concentración de $2,49 \cdot 10^{-6}$ M de H_2O_2 , 2,5 U/mL de HRP y $3,48 \cdot 10^{-4}$ M de ABTS. Media de las medidas y desviación en u.a.

Finalmente, probaremos la nueva enzima DAO. En el estudio realizado anteriormente en el laboratorio se utilizaba otro lote de enzima DAO, además la que se va a tratar en este trabajo procede de un organismo totalmente diferente, por lo que es importante verificar el comportamiento de esta y relacionar los resultados con los esperados.

Se realizó el procedimiento de medida que se indica en el apartado 3.3.3. Se obtuvieron las señales representadas en la figura 12, del mismo tipo a las obtenidas con anterioridad como se ven en la figura 6, lo que pone de manifiesto que la enzima funciona. Se puede observar que cadaverina y putrescina dan señales estables mientras que la histamina no, como era de esperar. Al compararlas con las que se conocían se pudo observar también, que la cinética de la reacción era mucho más lenta teniendo que ser añadidas 3,6 U/mL de DAO en vez de 1,8 U/mL.

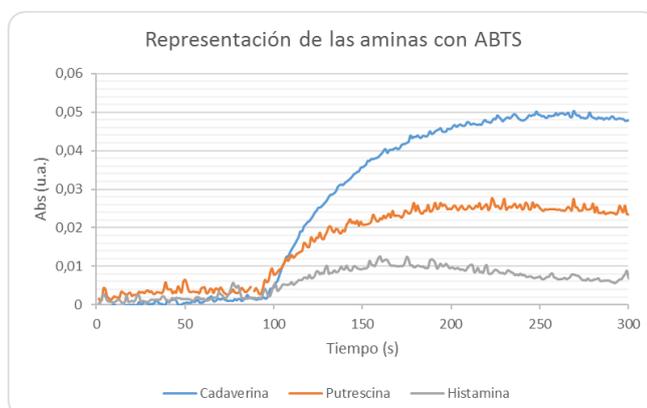


Figura 12: Representación de la señal de absorbancia para las diferentes aminas en una disolución de con 3,6 U/mL de DAO, 2.33 U/mL de HRP y $3,41 \cdot 10^{-4}$ M de ABTS en medio de tampon de fosfatos pH. Cadaverina: $1 \cdot 10^{-6}$ M, putrescina $1 \cdot 10^{-6}$ M e histamina $1 \cdot 10^{-5}$ M.

4.2. AR: espectros de absorción y fluorescencia

Para comenzar el estudio con el AmplexRed (AR) se obtienen primero sus espectros, figura 13, tanto de absorción como de fluorescencia ya que este colorante permite seguir la reacción por ambas técnicas.

En el espectro de absorción del colorante AR presentado en la figura 13a se pueden distinguir tres máximos; se elegirá el de mayor sensibilidad que es el que se encuentra en 570 nm. En la figura 13b podemos ver tanto el máximo de excitación a 570 nm, espectro obtenido fijando la longitud de emisión a 585 nm, y el de fluorescencia a 585 nm, obtenido fijando 570 nm como longitud de excitación.

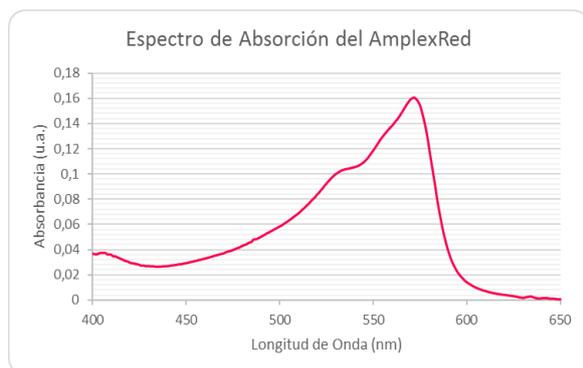


Figura 13a

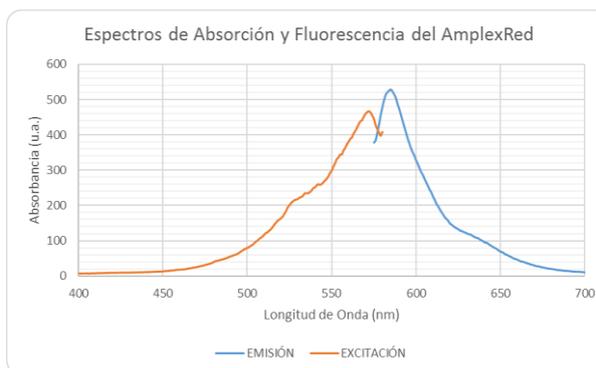


Figura 13b

Figura 13a: Espectro de absorción para el colorante AR con una concentración $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR. Tamponado a pH 6.

Figura 13b: Espectros de emisión y absorción del colorante AR para una concentración $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR. Tamponado a pH 6.

Como primera prueba con el AR se aseguró que la reacción del colorante con la enzima HRP y los peróxidos transcurría de manera adecuada y según lo que se había planteado⁷. El procedimiento utilizado es el descrito en el apartado 3.3.2.



Figura 14: Variación de la señal de absorbancia frente al tiempo para una concentración de AR de $5 \cdot 10^{-6} M$, 2,28 U/mL de HRP y $9,8 \cdot 10^{-7} M$ de peróxido de hidrógeno. Longitud de onda: 570 nm. Disolución amortiguada con tampon fosfatos a pH 6.

En la figura 14 se representa esta prueba donde se comprueba la correcta reacción entre el colorante y la enzima HRP, produciendo un cambio en la señal a la longitud de onda del máximo seleccionada anteriormente. El colorante pasa de su forma inicial, la cual no absorbe, a su producto que presenta absorción en el visible y es fluorescente: la resorufina.

4.3. Optimización de la concentración de AR

En la bibliografía encontrada⁶ y leída se habla de una relación entre el colorante AR y la enzima HRP de 1:1 tras una incubación de 7 minutos. En este trabajo se decidió no incubar porque en el método final para el cual estudiábamos el colorante no estaba previsto tratamiento previo de muestra.

Se comienza por representar la señal obtenida de absorbancia para distintas cantidades de colorante y una concentración tanto de peróxidos como de HRP fija. La figura 15 expone los resultados de esta parte del estudio.

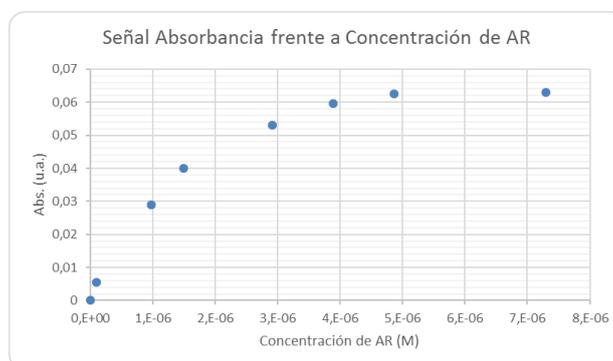


Figura 15: Variación de la absorbancia para el colorante AR según su concentración en una disolución con 2 U/mL de enzima HRP y $9,8 \cdot 10^{-7} M$ de H_2O_2 . Disolución amortiguada con tampon fosfatos a pH 6.

En la figura 15 se puede observar como a mayor cantidad de AmplexRed añadido se obtiene una mayor señal de absorbancia hasta llegar a un máximo en una concentración de $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR. A partir de esta concentración la señal máxima de absorción no aumenta, sino que permanece constante. A vistas de estos resultados se elige una relación 1:5 de peróxidos y colorante, respectivamente. Se podría añadir más colorante pero no se obtendrían señales con mayor variación de absorbancia.

4.4. Optimización de la concentración de HRP.

Otro punto a tener en cuenta es la cantidad mínima a añadir de HRP para obtener la mayor variación de la señal posible al igual que se ha estudiado con la relación para el colorante y los peróxidos. Para ello se utiliza el procedimiento experimental del apartado 3.3.2. y se realizan experiencias en las cuales se varía la concentración de HRP fijando la de AR y la de peróxidos.

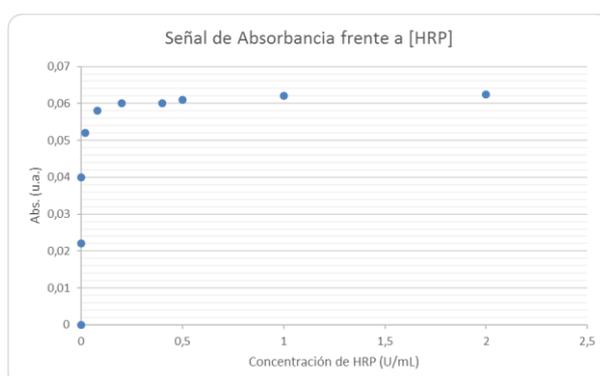


Figura 16: Variación de la señal de absorbancia para disoluciones de distintas concentraciones de HRP, con $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR y $9,8 \cdot 10^{-7} M$ de H_2O_2 , amortiguadas con tampon fosfatos a pH 6.

Interpretando la figura 16 se puede tomar 0,2 U/mL de HRP como la menor cantidad de enzima para la mayor variación de absorbancia, pudiéndose tomar cantidades superiores sin afectar a la señal. Además, se puede apreciar que a bajas concentraciones existe un intervalo lineal entre la cantidad de enzima HRP y la señal, pudiendo ser utilizada para estudiar nuevos lotes de enzima HRP que llegasen al laboratorio. En la figura 17 se representa ese rango lineal.

El rango lineal se establecería hasta $1 \cdot 10^{-3}$ U/mL de HRP, siendo la concentración menor cuantificada de $5 \cdot 10^{-4}$ U/mL de HRP⁹.

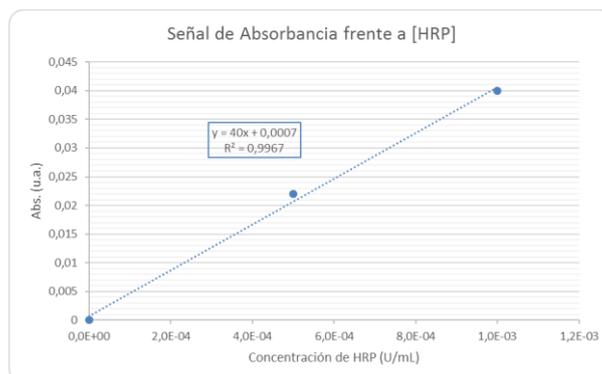


Figura 17: Representación aumentada para la zona de rango lineal de la figura 16. Variación de la señal para distintas concentraciones de HRP, con $5 \cdot 10^{-6}$ M de AR y $9,8 \cdot 10^{-7}$ M de H_2O_2 , amortiguadas con tampon fosfatos a pH 6.

4.5. Calibración de H_2O_2 .

Lo siguiente es encontrar el valor mínimo que se puede cuantificar, para ello se construye una recta de calibrado. En la figura 18 se puede ver una recta de calibrado en la que se observa el rango lineal. La concentración máxima es de 10^{-6} M, siendo la relación de H_2O_2 :AR 1:5, a pesar de que todos los estudios publicados⁶ hablaban de una relación 1:1. El límite superior de la recta de calibrado viene dado por la cantidad de colorante que añadamos; si se aumenta esa cantidad, en principio, se podría medir cinco veces menos esa concentración añadida de AR en peróxidos. A pesar de ello se realizaron pruebas con una mayor concentración de AR y a partir de $2 \cdot 10^{-6}$ M se sale del rango lineal del colorante.

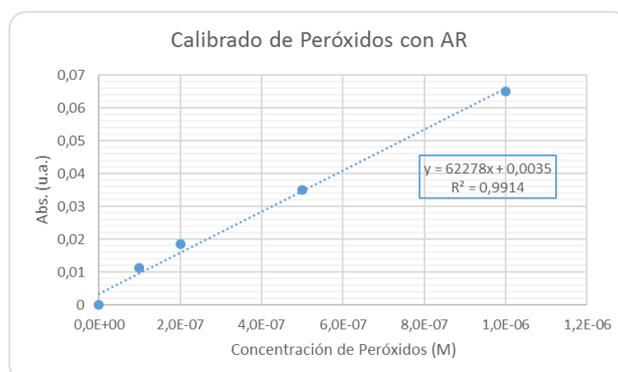


Figura 18: Variación de la señal de absorbancia para disoluciones de concentraciones de peróxidos diferentes con 0,2 U/mL de HRP y $5 \cdot 10^{-6}$ M de AR en medio tamponado con fosfatos a pH 6.

El rango lineal va hasta $1 \cdot 10^{-6}$ M de peróxidos, siendo la cantidad mínima determinada de $1 \cdot 10^{-7}$ M. La reproducibilidad se puede ver en la tabla 2.

Concentración	Señal
9,88E-07	0,065
9,88E-07	0,063
9,88E-07	0,06
Media	0,063
DER	4,0%

Tabla 2: Repeticiones para un punto de la recta de calibrado en diferentes días para una concentración de $9,98 \cdot 10^{-7}$ M de H_2O_2 , 2 U/mL de HRP y $5 \cdot 10^{-6}$ M de AR. Media de las medidas y desviación en u.a.

4.6. HRP + DAO + AR + aminos

Una vez estudiadas todas las relaciones con el colorante, tanto de los peróxidos como de la enzima HRP, se comprueba que acoplado esta reacción con la de la DAO se obtiene una señal reproducible, al igual que se hizo al comenzar a utilizar el colorante con la HRP. En la figura 19 se representa la primera prueba de ambas reacciones con su señal. El método que se utilizó es el explicado en el apartado 3.3.3.



Figura 19: Variación de la señal de absorción para una concentración de DAO 3,6 U/mL, 0,2 U/mL de HRP, $5 \cdot 10^{-6}$ M de AR y $1,16 \cdot 10^{-6}$ M de cadaverina, todo ello tamponado con disolución fosfatos a pH 6.

En la gráfica 19 se puede observar que tras añadir la cadaverina la señal aumenta. Tras un tiempo termina manteniéndose constante, uno de los objetivos que se buscaba en el trabajo. También se pudo comparar esta reacción con las que se tenían con condiciones similares y el colorante ABTS concluyendo que la cinética era más lenta de lo esperado.

Para conocer la cantidad de DAO que se debe añadir se realizaron una serie de pruebas. No solo se buscaba que fuera la mínima posible para un máximo de variación de la señal de absorción, sino que, tras apreciar la baja velocidad de la reacción, aumentarla de manera que fuese más rápida.

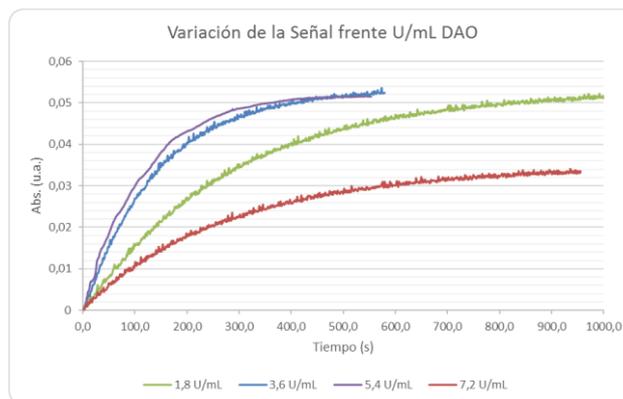


Figura 20: Variación de la señal de absorción para distintas concentraciones de DAO en disoluciones de 0,2 U/mL de HRP, $5 \cdot 10^{-6}$ M de AR y $1,16 \cdot 10^{-6}$ M de cadaverina, todo ello tamponado con disolución fosfatos a pH 6.

De los resultados obtenidos, representados en la figura 20, se puede concluir que: a mayor concentración de DAO la reacción es más rápida. Para 3,6 U/mL se observa más velocidad que para 1,8 U/mL. Cuando se aumenta a 5,4 U/mL la diferencia ya no es tan notoria comparándola con la de 3,6 U/mL. Para 7,2 U/mL se ve una cinética más lenta y la señal final desciende.

Este cambio en la cinética de la reacción con la DAO respecto a lo encontrado con el colorante ABTS puede suponer un tipo de interacción entre la enzima DAO y el nuevo colorante, el AR. Por ello se procedió a la comparación de esta experiencia con una igual, pero con ABTS. En la figura 21 se ve como la pendiente de subida es igual para ambos colorantes, por tanto, se planteó una desactivación de la enzima DAO.

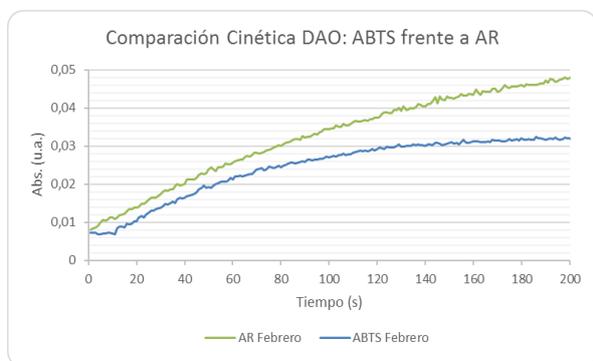


Figura 21

Figura 21: Variación de la señal frente al tiempo de dos disoluciones, una con $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, $0,2 U/mL$ de HRP y $1,16 \cdot 10^{-6} M$ de cadaverina y otra con $3,42 \cdot 10^{-4} M$ de ABTS, $0,2 U/mL$ de HRP y $1,16 \cdot 10^{-6} M$ de cadaverina. Ambas tamponadas con fosfatos a pH 6.

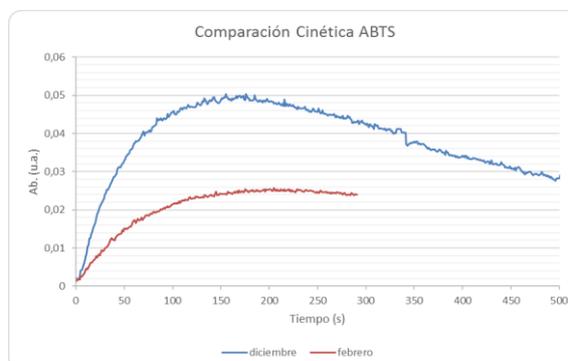


Figura 22

Figura 22: Variación de la señal de absorbancia para el colorante ABTS respecto al tiempo para dos disoluciones con: $3,42 \cdot 10^{-4} M$ de ABTS, $0,2 U/mL$ de HRP, $1,8 U/mL$ de DAO y $1 \cdot 10^{-6} M$ de cadaverina; tamponadas con fosfatos pH 6. Una realizada en febrero y otra en diciembre.

Para comprobar que existía una desactivación de enzima DAO se comparó la señal obtenida con el ABTS con otra de idénticas características pero dos meses antes. Ambas se representan en la figura 22 que tal y como se puede apreciar se puede decir que la actividad de la enzima ha ido en descenso a lo largo del tiempo lo cual también parece estar influyendo en la señal máxima. Para conocer la señal máxima que se podía obtener se llevó a cabo la incubación, comentada en el punto 4.3., como había planteado la bibliografía⁶, pero tras incubar más de 10 minutos y añadir el colorante y la HRP no se producía ningún tipo de variación de la señal.

Tras consultar la bibliografía¹⁰, se encontró que la DAO podía tener catalasa, hecho que no pudo ser confirmado por el suministrador. Si la enzima DAO contuviese catalasa, esto provocaría que parte de los peróxidos generados fuesen sustraídos por ella, por tanto, el HRP tiene menos sustrato y por ello la cantidad de resorufina generada sería menor, se observaría menos señal o incluso nula.

Para comprobar si tenía catalasa se hicieron diversas pruebas. Se incubaron durante distintos tiempos varias disoluciones de iguales características. En la figura 23 se pueden observar dos experiencias. Una fue sometida a 10 minutos de incubación y tras añadir la enzima HRP y el colorante no se vio cambio en la señal. Otra se incubó durante seis minutos, tras los cuales se adicionó la HRP y el colorante, en esta sí se observó un aumento de la señal, pero no se obtenía la señal máxima que se había visto anteriormente para esta concentración sino una menor. También se realizaron las mismas pruebas, pero incubando $9,8 \cdot 10^{-7} M$ de peróxidos con la DAO y añadiendo posteriormente el colorante y la HRP, de igual manera se observaron descensos en el valor de la señal final o incluso que la señal no variaba. Se comprobaron ambos colorantes para asegurar que se debía únicamente a la DAO y no al AR.

Tras estas experiencias se puede afirmar que la DAO que se utiliza en el trabajo contiene catalasa. Esto podría explicar el fenómeno que ocurre en la figura 20 para una concentración de DAO de $7,2$

U/mL donde se observa una disminución de la señal final, atribuible a que hay más catalasa que para concentraciones menores y sustrae una mayor cantidad de peróxidos, de manera que la HRP tiene menos sustrato.

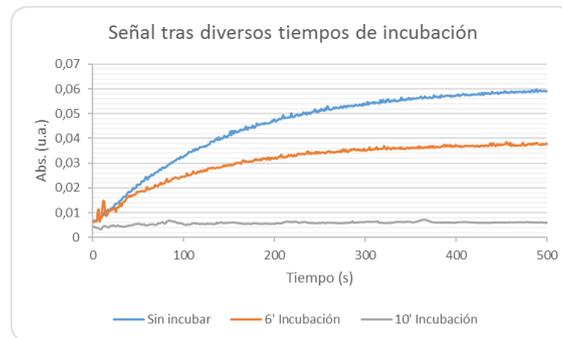


Figura 23: Variación de la señal de absorbancia para disolución incubadas diversos tiempos con $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, 0,2 U/mL de HRP, 1,8 U/mL de DAO y $1,16 \cdot 10^{-6} M$ de cadaverina.

Además de catalasa, la enzima DAO contenía piridoxal como cofactor, por ello también fue estudiada su influencia en la cinética de la reacción. El tamaño de la enzima DAO, su peso molecular, es mucho mayor que el del piridoxal, que es una molécula inorgánica, por tanto, realizando una centrifugación se consigue que con un centricon de una membrana que no deje pasar la enzima separemos ambas moléculas.

Para poder separar el piridoxal se adiciona en un centricon de 10 kDa la disolución de DAO y sometiéndola a un centrifugado de 4500 rpm durante 10 minutos a $15^{\circ}C$ y repitiendo esto dos veces se obtiene una disolución únicamente con la enzima y otra con el piridoxal. Los resultados se pueden ver en la figura 24; la presencia de piridoxal no influye en la señal final, aunque si se observan cambios en cuanto a la velocidad. Estos cambios se pueden atribuir a una pérdida de enzima a la hora de la separación. Se prosiguió el trabajo realizando las medidas sin separar el piridoxal de la DAO.

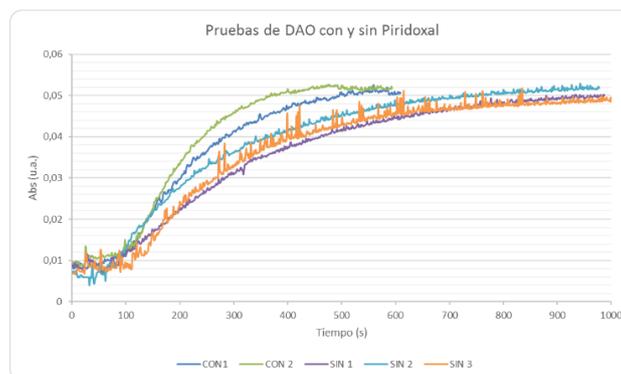


Figura 24: Variación de la señal de absorbancia respecto al tiempo para disoluciones de 1,8 U/mL de DAO, $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, 0,2 U/mL de HRP y $1 \cdot 10^{-6} M$ de putrescina, tamponadas con fosfatos a pH 6. Dos de ellas contienen piridoxal y a tres se les añadió DAO sometida anteriormente a una centrifugación para eliminar el piridoxal.

Otro punto que se estudió fue el hecho de que al añadir la amina biógena la señal no empezaba a subir en ese momento, revisar figura 19. Esto es debido de nuevo a la catalasa, su sustrato son los peróxidos al igual que la HRP por lo que existe una competencia entre ambas. Para intentar solucionar este problema se intentó añadir más HRP de tal manera que al tener más cantidad de esta la competencia frente a la catalasa fuera menor. Tomando la figura 16 se eligieron 2 U/mL para las siguientes experiencias.

En la figura 25 se puede observar el cambio entre una disolución con 0,2 U/mL de HRP y otra con 2 U/mL. Ambas producen señales igual de buenas pero la segunda no presenta ese lapso de tiempo durante el cual no asciende la señal. Y la pendiente de subida es un poco mayor para 2 U/mL que para 0,2 U/mL, por lo que se siguió con esta cantidad de HRP

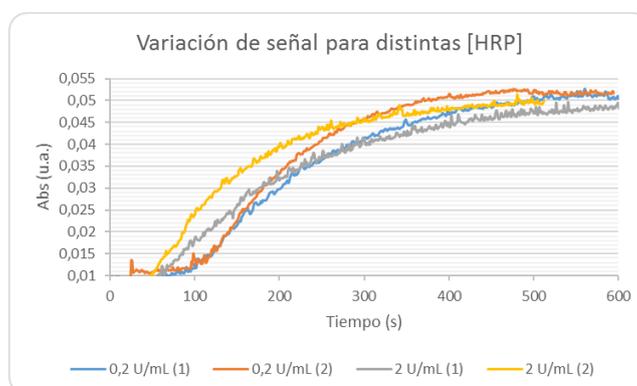


Figura 25: Variación de la señal de absorbanza para disoluciones con: $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, $1,16 \cdot 10^{-6} M$ de putrescina y 1,8 U/mL de DAO tamponadas con tampon fosfatos a pH 6. Dos de ellas con 2 U/mL de HRP y otras dos con 0,2 U/mL.

4.6.1. Calibrado con cadaverina

Una vez adecuadas las cantidades de cada reactivo se realizó un calibrado con cadaverina representado en la figura 26. Se utilizó el procedimiento explicado en el apartado 3.3.3.

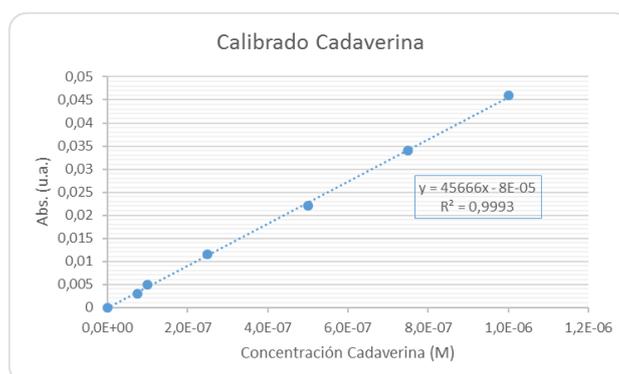


Figura 26: Variación de la señal de absorbanza para disoluciones de concentración de cadaverina diferentes, todas ellas con 1,8 U/mL de DAO, $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, 2,45 U/mL de HRP y tamponadas a pH 6 con fosfatos.

El rango lineal obtenido es hasta una concentración de $1 \cdot 10^{-6} M$ de cadaverina, con una concentración mínima medida de $7,5 \cdot 10^{-8} M$. La repetibilidad del método se observa en la tabla 3.

Concentración	Señal
2,5E-07	0,013
2,5E-07	0,011
2,5E-07	0,011
2,5E-07	0,012
2,5E-07	0,011
2,5E-07	0,0116
Media	0,012
DER	6,9%

Tabla 3: Repeticiones para un punto de la recta de calibrado de absorción en un día para una concentración de $2,5 \cdot 10^{-7} M$ de cadaverina, 2 U/mL de HRP, 1,8 U/mL de DAO y $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR. Media de las medidas y desviación en u.a.

4.6.2. Calibrado con putrescina

A continuación, se prosiguió con un calibrado con putrescina de igual manera que el anterior, utilizando el procedimiento explicado en el apartado 3.3.3. La calibración se puede ver en la figura 27.

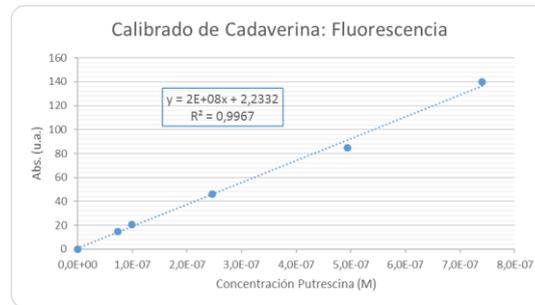


Figura 27: Variación de la absorbancia para disoluciones de concentración de putrescina diferentes, todas ellas con 1,8 U/mL de DAO, $5 \cdot 10^{-6}$ M de AR, 1.91 U/mL de HRP y tamponadas a pH 6 con fosfatos

El rango lineal obtenido es hasta una concentración de $7,41 \cdot 10^{-7}$ M de putrescina, con una concentración mínima medida de $7,41 \cdot 10^{-8}$ M.

Concentración	Señal
1,00E-06	0,041
1,00E-06	0,04
1,00E-06	0,041
Media	0,041
DER	1,4%

Tabla 4: Repeticiones para un punto de la recta de calibrado de absorción en diferentes días para una concentración de $1 \cdot 10^{-6}$ M de putrescina, 2 U/mL de HRP, 1,8 U/mL de DAO y $5 \cdot 10^{-6}$ M de AR. Media de las medidas y desviación en u.a.

4.6.3. Histamina

Una vez estudiada la reacción con las anteriores aminas se pasó a estudiar la histamina.

Inicialmente se empezó como con el colorante ABTS, para el cual la histamina se valoraba con un orden de magnitud superior en concentración al de la cadaverina y putrescina. La señal obtenida se puede ver en la figura 28.

Como se observa en la señal la absorbancia sube a lo largo de la reacción y se mantiene constante, no desciende. Este resultado obtenido era uno de los objetivos del trabajo, que se ha conseguido. A pesar de ello, la reacción es muy lenta y tras 3 horas no se había estabilizado.

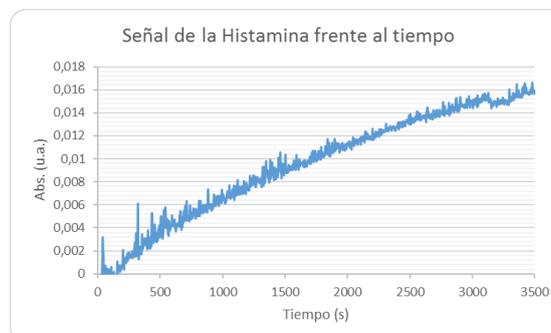


Figura 28: Señal de absorbancia para $9,87 \cdot 10^{-6}$ M de histamina con 1,8 U/mL de DAO, $5 \cdot 10^{-6}$ M de AR y 2 U/mL de HRP, todo en un tampon de fosfatos a pH 6.

A continuación, se intentaron medir disoluciones de menor concentración, en la figura 29 se puede ver un ejemplo para una de $2,5 \cdot 10^{-7} M$.

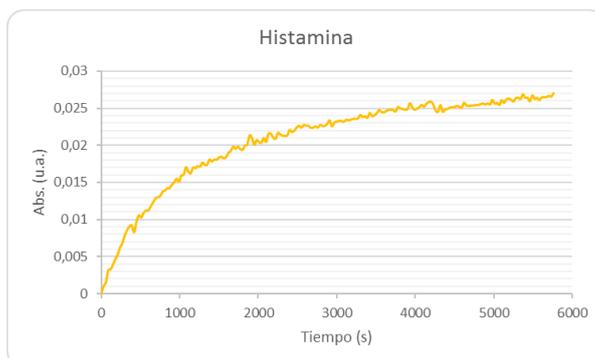


Figura 29: Variación de la absorbancia para una disolución de $2,5 \cdot 10^{-7} M$ de histamina, $1,8 U/mL$ DAO, $2,19 U/mL$ de HRP y $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR tamponada a pH 6 con tampon fosfatos.

Se puede observar como cuando comienza la reacción la señal aumenta y cuando parece que quiere permanecer constante aparece una deriva. Se pueden diferenciar dos pendientes distintas, la primera debida al aumento de la señal hasta los 2000 segundos y la segunda debida a la deriva a partir de los 3000.

Si bien esta deriva no dificultaba la utilización del método se plantearon unas hipótesis para intentar explicarla. Una de ellas fue la de un efecto fotoquímico que se explica en el apartado 4.7. Otra fue que podría ser debida a alguna reacción secundaria con el aldehído de la histamina, apartado 4.8.

4.7. AR y la influencia de la luz

Cuando se observó la deriva en la señal en la histamina se propuso una reacción fotoquímica del colorante debido a la exposición al haz de luz. Para ello se realizaron medidas únicamente con el colorante en disolución exponiéndolo a la luz ambiente, figura 30, y otras tapándolo de la luz. Además, en vez de medir cada segundo con el instrumento se configuró el programa para hacerlo cada treinta segundos y así exponerlo menos al haz. Tanto tapar la cubeta como medir en intervalos de tiempo más amplios permitieron reducir la influencia de la luz sobre el colorante, si bien no lo redujo del todo.



Figura 30: Variación de la señal de una disolución de $5 \cdot 10^{-6} M$ de colorante AR en un medio tamponado con fosfatos a pH 6 expuesta a la luz y realizando medidas cada 5 segundos.

Se buscaron estudios sobre la influencia de la luz en el AR y se encontraron publicaciones que se habían realizado^{7,8} y que coincidían con los resultados obtenidos.

4.8. AR y sus reacciones secundarias

Cuando se llevó a cabo la calibración de la histamina y se vio la deriva, se propuso la hipótesis de una interacción fotoquímica y la de reacciones secundarias con el aldehído. Esta segunda hipótesis se planteó ya que cuando ocurre la reacción con la DAO como se explica en el apartado 1.2. se generan peróxidos que serán el sustrato del HRP y el aldehído que es lo único que queda en disolución, además de las enzimas.

Para comprobar si afectaba el aldehído al colorante y puesto que no se disponía del aldehído de la histamina, se propuso añadir en una cubeta: tampon, DAO y la histamina, de tal manera que tras dejarlo durante un tiempo se formarán los peróxidos y serán consumidos por la catalasa, dejando únicamente con el aldehído de la histamina. Si se añade HRP y AR a la cubeta tras ese tiempo se puede medir la variación de la señal a lo largo del tiempo, que no tendría que cambiar y ser constante porque no hay peróxidos. A pesar de esto la señal sube conforme avanza el tiempo, figura 31.

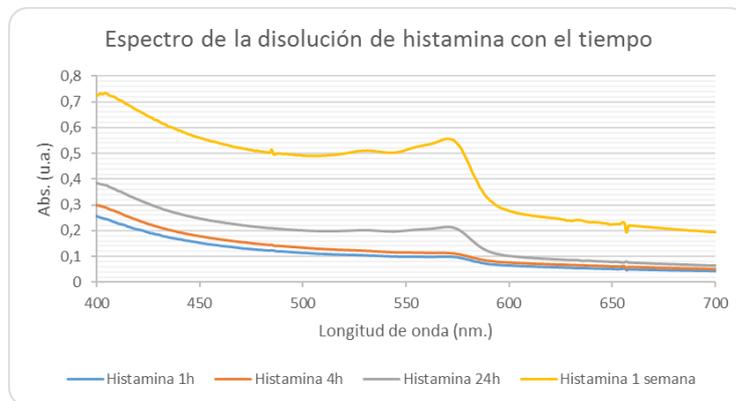


Figura 31: Espectros de la disolución de $1,12 \cdot 10^{-6} M$ de histamina, 2 U/mL de HRP, 1,8 U/mL de DAO y $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR tamponada con fosfatos a pH 6 obtenidos a lo largo del tiempo.

Presentados estos resultados nos replanteamos si ocurre lo mismo con la cadaverina y la putrescina, por lo que, procedemos de igual manera con estas aminas. La señal no varía en los primeros momentos, pero si lo dejamos lo suficiente podemos observar que a las horas la señal si empieza a subir. Podemos afirmar que podría existir una reacción secundaria que provoca una deriva de la señal debido a la presencia de los aldehídos.

Otra amina que también puede ser sustrato de la DAO es la tiramina que al reaccionar se transforma en 4-hidroxibenzaldehído, aldehído que sí se tenía en el laboratorio. Ambos se utilizaron para realizar un estudio y así intentar confirmar el motivo de la deriva. Para cerciorarse de la posible reacción entre el aldehído y el colorante se realizaron varias pruebas experimentales.

Se prepararon seis cubetas:

- En la 1ª se añadió: 1.8 U/mL DAO, 2 U/mL de HRP, $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, $10^{-6} M$ de tiramina y tampon hasta 2 mL.
- En la 2ª: 1.8 U/mL DAO, $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, $10^{-6} M$ de 4-hidroxibenzaldehído y tampon hasta 2 mL.
- En la 3ª: $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, $10^{-6} M$ de 4-hidroxibenzaldehído y tampon hasta 2 mL.
- En la 4ª: 1.8 U/mL DAO, 2 U/mL de HRP, $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, $10^{-6} M$ de 4-hidroxibenzaldehído y tampon hasta 2 mL.

- En la 5ª: 2 U/mL de HRP, $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, $10^{-6} M$ de 4-hidroxibenzaldehído y tampon hasta 2 mL.
- En la 6ª: 1.8 U/mL DAO, $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR, $10^{-6} M$ de 4-hidroxibenzaldehído y tampon hasta 2 mL.

En las experiencias en las cuales teníamos el aldehído de la tiramina (4-hidroxibenzaldehído) y no estaba presente la DAO, a lo largo del tiempo la señal subía muy despacio, del orden de los valores encontrados en el apartado 4.7. En cambio, tanto en la experiencia 1 como la 2, la 4 y la 6 sí se observaba que se producía una deriva de mayores dimensiones a la que se puede ver en los casos por influencia de la luz sobre el AR y parecidas a las representadas en la figura 30. Atribuimos esta deriva a una reacción secundaria entre la DAO, el aldehído y el colorante. De igual manera podría estar ocurriendo con la histamina.

A pesar de esta deriva, se intentó obtener un calibrado de la histamina. La deriva no supone un problema en sí, sino que intensifica la señal y dificulta elegir dónde tomar el punto de señal máxima para calcular la variación de esta.

4.9. Calibración de la histamina

Después de todos los estudios anteriores se realizaron varios intentos de calibrar la histamina, pero cada vez la reacción era más lenta, la DAO estaba menos activa y la diferencia entre las dos pendientes comentada en el apartado 4.6.3. era menos notoria.

Se pensó en aumentar la temperatura para intentar que la reacción fuese más rápida y que permitiese tomar el punto de mayor absorbancia, que la diferencia entre ambas pendientes fuese distinguible. Como se observa en la figura 32 no se vio ningún cambio que indicase una mejora.

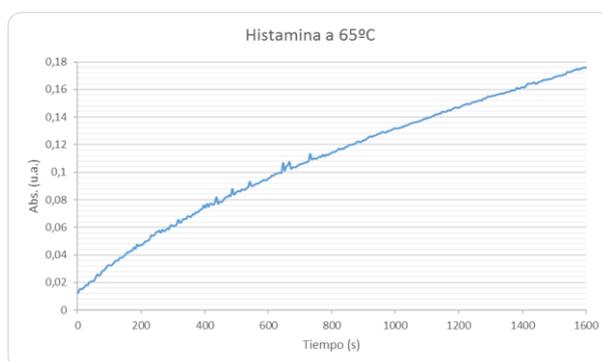


Figura 32: Variación de la señal de absorbancia para una disolución de $1,06 \cdot 10^{-6} M$ de histamina, 1,8 U/mL DAO, 2,7 U/mL de HRP, $5 \cdot 10^{-6} M$ de AR y tamponada con fosfatos a pH 6.

Otra solución que se planteó fue el añadir 3,6 U/mL de enzima DAO para favorecer la cinética de la reacción ya que tal como se había visto en el apartado 4.6., para 3,6 U/mL de DAO no se apreciaba el efecto de la catalasa como si ocurría para 7,2 U/mL. Tras obtener los nuevos estudios con esta concentración de DAO y comparándolos con los que se tenían de 1,8 U/mL tampoco se vieron resultados favorables. La comparación de las pendientes se encuentra en la figura 32 donde se puede ver como para mayor cantidad de DAO la cinética es más rápida. A pesar de ello no se pudo discernir entre la pendiente propia de la reacción y la de la deriva de nuevo. La figura 33 presenta ese perfil fluctuante debido a que se medía la señal cada 30 segundos y no cada 1 como todas las anteriores.

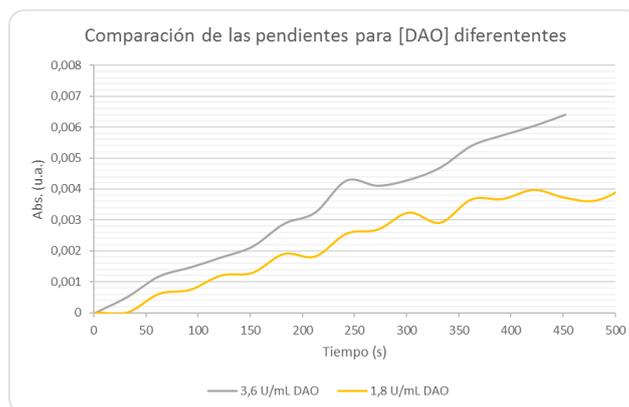


Figura 33: Representación de las pendientes iniciales de dos disoluciones de concentración de DAO distintas con 1,75 U/mL de HRP, $5 \cdot 10^{-6}M$ de AR, $9,78 \cdot 10^{-7}M$ de histamina y tamponadas con fosfatos a pH 6.

Se hizo un calibrado por absorción con diferentes concentraciones de histamina, pero no se pudo calcular las variaciones de señal. Todo este problema se debe a la desactivación de la DAO porque en pruebas realizadas varios meses antes con la misma amina la reacción secundaria no era tan perceptible y se podían calcular las variaciones de señal. Por ello se pidió una nueva enzima DAO en el laboratorio que solucionaría estos problemas y que se podría utilizar en futuros estudios con este colorante.

4.10. Rectas de calibrado de fluorescencia para cadaverina y putrescina.

Como se ha explicado en el apartado 4.2., el colorante AmplexRed en su forma oxidada, la resorrufina, además de absorber también presenta fluorescencia. Con la intención de evaluar la posibilidad de utilizar un equipo portátil de fluorescencia en el futuro para medir las tiras reactivas se estudiaron las rectas de calibrado para la cadaverina y la putrescina en el fluorímetro portátil. Se trata de un equipo muy sencillo equipado con dos LEDs (uno verde y otro azul), dos detectores y con una anchura de rendija fija. De los dos LEDs se escogió el verde. En la figura 34 se representa la de la cadaverina y en la 35 la de la putrescina.

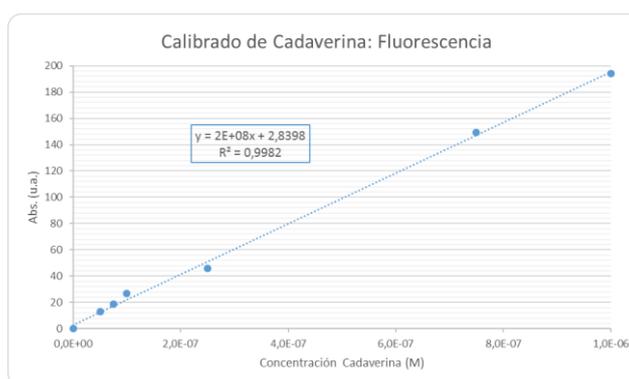


Figura 34: Recta de calibrado de fluorescencia para diferentes concentraciones de cadaverina con 1,8 U/mL de DAO, $5 \cdot 10^{-6}M$ de AR, 2,45 U/mL de HRP y tamponadas a pH 6 con fosfatos.

El rango lineal continúa siendo hasta una concentración $1 \cdot 10^{-6}M$ de cadaverina, pero para la fluorescencia la concentración mínima que se ha podido medir es de $5 \cdot 10^{-8}M$ frente a la de $7,5 \cdot 10^{-8}M$ de la recta de absorción. El rango lineal ha aumentado. En la tabla 5 vemos la repetibilidad del método.

Concentración	Señal
7,50E-07	150
7,50E-07	148,9
7,50E-07	148,9
7,50E-07	148,8
7,50E-07	148,9
Media	149,1
DER	0,34%

Tabla 5: Repeticiones para un punto de la recta de calibrado de fluorescencia en un día para una concentración de $7,50 \cdot 10^{-7} \text{M}$ de cadaverina, 2 U/mL de HRP, 1,8 U/mL de DAO y $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ de AR. Media de las medidas y desviación en u.a.

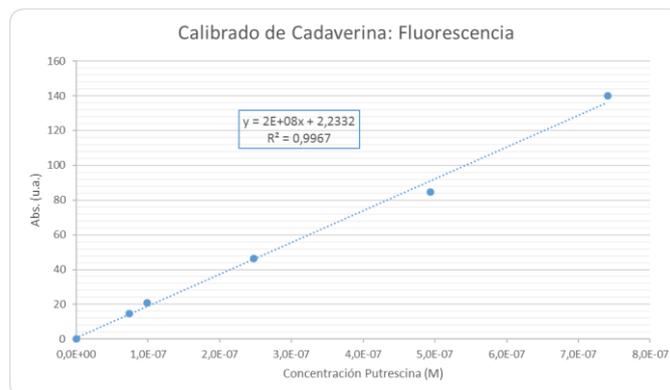


Figura 35: Recta de calibrado de fluorescencia para diferentes concentraciones de putrescina con 1,8 U/mL de DAO, $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ de AR, 1,91 U/mL de HRP y tamponadas a pH 6 con disolución fosfatos.

El rango lineal continúa siendo hasta una concentración $7,41 \cdot 10^{-7} \text{M}$ de putrescina, con una concentración mínima medida de $7,41 \cdot 10^{-8} \text{M}$. En la tabla 6 se muestra la repetibilidad de método.

Concentración	Señal
7,41E-07	140,1
7,41E-07	139,2
7,41E-07	142,0
7,41E-07	141,3
7,41E-07	139,2
Media	140,4
DER	0,90%

Tabla 6: Repeticiones para un punto de la recta de calibrado de fluorescencia en un día para una concentración de $7,41 \cdot 10^{-7} \text{M}$ de putrescina, 2 U/mL de HRP, 1,8 U/mL de DAO y $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ de AR. Media de las medidas y desviación en u.a.

5. Conclusiones

En este trabajo se ha estudiado un nuevo colorante para su implementación en la determinación de aminas biógenas. Las conclusiones que se pueden extraer tras todo el estudio son:

- Se consiguió reproducir los resultados obtenidos para el estudio anteriormente realizado en el laboratorio con el ABTS a pesar de que la cinética de la reacción fuese más lenta. Tanto la cadaverina y como la putrescina proporcionaban señales que aumentaban hasta un máximo donde se estacaban y permanecían constantes, en cambio la histamina aumentaba su señal y llegado un momento descendía de nuevo, se regeneraba el colorante ABTS.
- Se realizaron varias calibraciones con la HRP midiendo a sus longitudes de onda para comparar en futuros estudios con otras nuevas y utilizarlas como referencia.
- Se ha conseguido obtener una respuesta lineal entre la cantidad de peróxidos y la señal de absorbancia en presencia de HRP.
- Se ha encontrado la relación óptima entre el colorante y los peróxidos para la cual se daba la señal máxima, esta fue de 1:5 con un exceso de colorante sobre los peróxidos.
- Se ha encontrado la cantidad mínima de enzima HRP para la cual la señal es máxima en presencia de peróxidos y AR. Esta fue de 0,2 U/mL.
- Se ha conseguido la linealidad de los peróxidos en presencia de HRP y el nuevo colorante en un rango lineal hasta una concentración de $1 \cdot 10^{-6}$ M de peróxidos siendo la mínima determinable de $1 \cdot 10^{-7}$ M.
- Se consiguió la adecuada reacción entre el colorante, la DAO, la HRP y las aminas a pesar de la cinética lenta.
- Se observó que la DAO estaba perdiendo actividad a lo largo del tiempo.
- Con la amina cadaverina se obtuvo una recta de calibrado tanto por absorbancia, con un máximo de $1 \cdot 10^{-6}$ M, como por fluorescencia con un máximo de $1 \cdot 10^{-6}$ M. En fluorescencia se consiguió bajar la cantidad mínima de cadaverina determinable de $7,5 \cdot 10^{-8}$ a $5,0 \cdot 10^{-8}$ M.
- Con la putrescina se obtuvo tanto para el calibrado en absorción como en el de fluorescencia un máximo de $7,41 \cdot 10^{-7}$ M y una cantidad mínima de $7,41 \cdot 10^{-8}$ M.
- Para la histamina no se consiguió un calibrado, pero si se consiguió que la señal permaneciese constante solucionando así el problema que existía con el anterior colorante.
- Se vio que la enzima DAO contenía catalasa y que afectaba a la señal final obtenida.
- También se estudió la influencia del piridoxal de la DAO en la cinética de la reacción, la cual no era importante.
- Se ha encontrado una reacción secundaria que ocurre con el aldehído de las aminas en presencia de DAO.
- Se estudió la influencia de la luz sobre el colorante siendo esta perceptible, pero de órdenes menores a la que provocaba el aldehído.
- Se observó que la variación de la temperatura en la reacción no era importante.
- Se vio que la adición de tan solo 0,2 U/mL de HRP provocaba que la reacción tardase en comenzar y se tuvieron que añadir 2 U/mL finalmente.

6. Bibliografía

1. M.H. Silla Santos. *Int J Food Microbiol.* **1996**; 29(2-3):213-31.
2. Armagăñ Önal. *Food Chemistry* 103. **2007**, 1475–1486
3. V. Sanz, S. de Marcos, J.R Castillo, J. Galbán. *J.Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1038-1048.
4. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans. *Free Radical Biology & Medicine.* **1998**. Vol. 26, Nos. 9/10, 1231–1237.
5. I. Sanz-Vicente, S. de Marcos, J. Navarro, R. Lozano, J. Galbán. XXV National Spectroscopy meeting (XXV RNE) & IX Iberian Spectroscopy conference (IX CIE). **2016**, Alicante.
6. M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, and R. P. Haugland Paper. *Analytical Biochemistry.* **1997**. 253, 162–168.
7. K. J. Reszka, B. A. Wagner, C. P. Burns, B. E. Britigan. *Analytical Biochemistry.* **2005**. 342 327–337.
8. B. Zhao, F. A. Summers, R. P. Mason. *Free Radic Biol Med.* **2012**. 53(5): 1080–1087
9. P. Held. *BioTek Instruments, Inc.* **2006**.
10. A. Isoai, H. Kimura, A. Reichert, K. Schörgendorfer, K. Nikaido, H. Tohda, Y. Giga-Hama, N. Mutoh, H. Kumagai *Biotechnol. Bioeng.* **2002**. 80(1):22-32.