

PO-AL-28: HACIA LA DETERMINACIÓN *IN SITU* DE AMINAS BIÓGENAS

J. Navarro, I. Sanz-Vicente, R. Lozano, I. Rivero, A. López, S. de Marcos, J. Galbán
Grupo de Biosensores Analíticos (GBA), Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza.

1.- Introducción

Las aminas biógenas (AB) son una familia muy amplia de biomoléculas de bajo peso molecular que poseen en su estructura al menos un grupo amino. Realizan múltiples funciones, especialmente neurotransmisoras y hormonales, por lo que el organismo dispone de una ruta para su síntesis a partir de los aminoácidos precursores (descarboxilación con Aminoácido Descarboxilasa, AAD); sin embargo, su exceso puede provocar problemas de intolerancia o intoxicaciones, por lo que también tiene mecanismos para su regulación (oxidación metabólica con Diamino Oxidasa, (DAO), o la ruta de la Monoaminoxidasa (MAO) [1].

Las AB se encuentran igualmente presentes en productos alimenticios, consecuencia de que los microorganismos presentes en ellos también las sintetizan (ruta AAD). La concentración de las diferentes AB en alimentos depende mucho de sus condiciones de conservación (pH, temperatura...) y procesado (las AB pueden, durante el cocinado, reaccionar con nitritos dando nitrosamidas, un potencial cancerígeno). Las más abundantes en este tipo de muestras son (ver figura 1), Tiramina (Tir), particularmente en queso (aunque está presente en otros alimentos); Histamina (His), especialmente en pescados de la familia de los escómbridos como el bonito o el atún (de hecho, solo hay legislación para el contenido máximo de His en pescado), Triptamina (Trp) y Feniletilamina (Fen), que aun siendo habituales se encuentran en baja concentración, pero sobre todo la Cadaverina (Cad) y la Putrescina (Put). Estas dos AB presentan toxicidad si se ingieren en altas dosis, pero además potencian la toxicidad de las anteriores (His) y son una fuente potencial de nitrosamidas.

En los últimos años ha crecido el interés por monitorizar la concentración de AB en alimentos; por un lado, como indicador de su calidad y frescura (el contenido en algunas AB aumenta con la degradación del alimento) y, por otro, como criterio para evaluar los posibles efectos adversos derivados de su ingestión. Este interés ha llevado, tanto a las administraciones públicas como a empresas del sector de la alimentación, a demandar métodos analíticos rápidos de control (screening) "in situ" de estos analitos, que complementen los habitualmente utilizados en los laboratorios, generalmente basados en técnicas de separación instrumentales (HPLC, electroforesis capilar, cromatografía de gases-masas y cromatografía en capa fina) [2,3], más largos y laboriosos. Guiados por esta demanda, nuestro grupo de investigación (Grupo de

Biosensores Analíticos, GBA) ha iniciado un proyecto cuyo objetivo principal es el desarrollo de métodos ópticos-enzimáticos de determinación "in situ" de AB en alimentos.

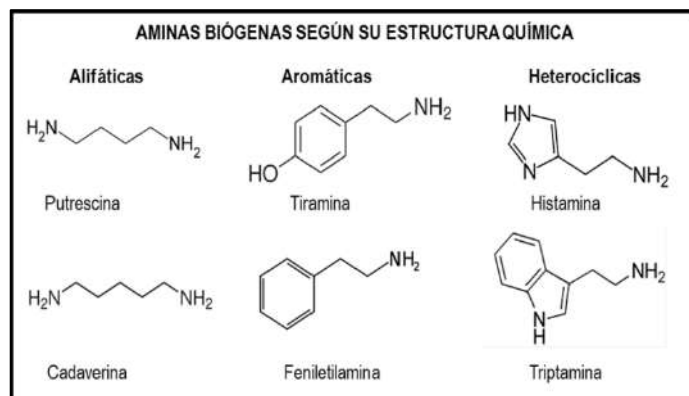


Figura 1. Estructura de las principales AB consideradas en este artículo.

2.- Planteamiento general

En este trabajo, se muestran los primeros resultados en el desarrollo de tiras reactivas colorimétricas-enzimáticas para el control de Cad y Put directamente en alimentos, mediante métodos visuales y de imagen. Están basados en una secuencia clásica de reacciones enzimáticas: una primera de oxidación para generar H_2O_2 y una segunda indicadora (figura 2). Para la primera hay diferentes tipos de enzimas que se pueden usar (DAO, MAO) pero la que, a priori, es más selectiva para la Put y Cad es la DAO [4], dado que reacciona preferentemente con diaminas.

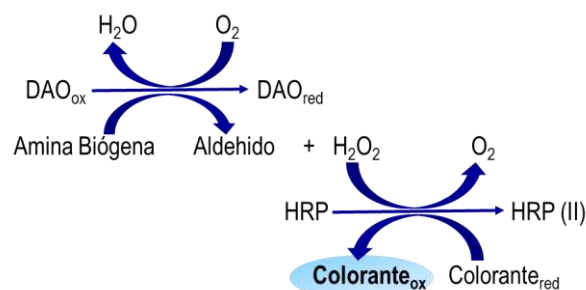
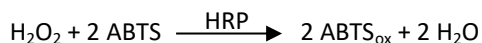


Figura 2. Esquema de reacción de las aminas biógenas con DAO y HRP en presencia de un colorante.

En la reacción indicadora el H_2O_2 formado oxida a un cromógeno, reacción catalizada por la enzima peroxidasa

(HRP), dando lugar a un producto coloreado; el cromógeno elegido fue el ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), que se oxida a un radical catiónico ABTS_{ox} [2] de color azul de acuerdo a la siguiente estequiometría:



Se eligió el ABTS por las buenas propiedades de absorción de su forma oxidada (máximos intensos a 415 nm y 730 nm, con valores de absorptividad molar de $35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $13000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivamente), y porque es un cromógeno habitualmente utilizado en tiras reactivas comerciales.

3.- Estudio espectrofotométrico en disolución

Los primeros estudios se realizaron en disolución, utilizando un espectrofotómetro de red de diodos Agilent 8453, y evaluando el comportamiento de cada una de las seis AB citadas anteriormente. Aunque la combinación ABTS/HRP se usa con mucha frecuencia para la detección del H_2O_2 , hay un problema importante asociado con su uso y es que la señal del ABTS_{ox} desaparece con el tiempo. Puesto que el objetivo final de este trabajo es el desarrollo de tiras reactivas, se estudió en detalle como afectaba la concentración de ambos reactivos y su relación mutua a la estabilidad del color. Los resultados indican que cuanto mayor es la concentración de HRP y menor la de ABTS, menos estable es la señal, debido a que la propia HRP puede reducir el ABTS_{ox} de nuevo a ABTS. Con una relación ABTS/HRP igual o mayor de 40 se evita este problema; la concentración de ABTS debe ser unas 20 veces mayor que la concentración de H_2O_2 más alta formada.

En las condiciones optimizadas, la figura 3 muestra los perfiles de señal encontrados para las distintas aminas. Cad y Put, como se esperaba, producen un aumento rápido de absorbancia dando lugar a una señal estable. Tir, Trp y Fen producen también un aumento de señal, pero al ser la velocidad de reacción con la DAO muy baja, no producirán interferencia sobre Put y Cad (más aún, si se considera que estas tres AB suelen estar en concentraciones más bajas que la Put y Cad).

Por último, His tiene un perfil diferente ya que tras un aumento inicial de la absorbancia, luego desciende hasta el origen. Los estudios realizados permitieron demostrar que este comportamiento era debido a que el aldehído producto de la reacción (ver figura 1) regeneraba al ABTS_{ox} haciendo desaparecer el color azul. El resultado es que la His supone una interferencia en la determinación de Cad y Put, puesto que si está presente, el aldehído (que forma al reaccionar con la DAO) eliminará el ABTS_{ox} producido, haciendo que su señal no sea estable. Para corregir el problema, se realizó un nuevo estudio de optimización de condiciones experimentales (ajuste de la concentración de ABTS) que permitió resolverlo siempre y cuando la concentración de His no fuera superior a 10 veces la de

Cad+Put, situación que, al ser la habitual en este tipo de determinaciones, permite eliminar la interferencia.

Las calibraciones llevadas a cabo dieron un rango lineal para putrescina desde $7,2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ hasta $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ y para cadaverina desde $7,2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ hasta $2,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ con DER del 5,1 y del 4,8 % respectivamente ($n=4$), no habiendo diferencias significativas entre las pendientes de ambas AB.

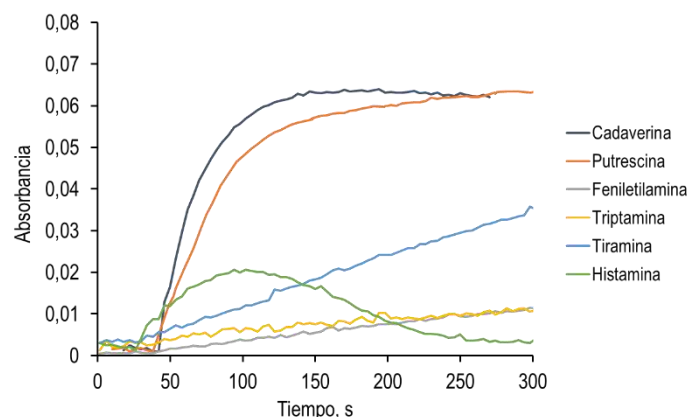


Figura 3. Variación de absorbancia a 730 nm durante la reacción de las aminas con DAO, HRP y ABTS a pH=6. $[\text{ABTS}] = 4,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{HRP}] = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{DAO}] = 1,8 \text{ U mL}^{-1}$, $[\text{Cad}] = [\text{Put}] = [\text{His}] = 2,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{Tir}] = [\text{Trp}] = [\text{Fen}] = 4,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

4.- Desarrollo de tiras reactivas para la determinación colorimétrica de putrescina y cadaverina

Metodología general

En la segunda parte de este trabajo se presentan los primeros resultados sobre el acoplamiento de la secuencia anterior a tiras reactivas para análisis rápidos semi-cuantitativos de Put y/o Cad, primero mediante detección visual, y después mediante detección por imagen (coordenadas RGB) utilizando tanto un smartphone como una cámara fotográfica. Los resultados que se muestran corresponden a los de un método sin optimizar y se centran en la determinación de Put, dado que su sensibilidad es similar a la Cad.

Para desarrollar estas tiras reactivas sensibles se partió de unas comerciales ya existentes para H_2O_2 (Quantofix Peroxid 25[®]). Estas tiras tienen inmovilizados tanto el colorante como la enzima HRP (es decir los reactivos necesarios para la reacción indicadora), aunque en concentraciones desconocidas, y tienen un intervalo de respuesta a H_2O_2 entre 0,5 y 25 mg L^{-1} . Para hacerlas sensibles a Put se inmovilizó la DAO (de *Lathyrus cicera*) por adsorción, adicionando 5 μL de una disolución 50 U mL^{-1} de la misma, y dejándola secar durante un minuto. Pasado ese tiempo se adicionaron 5 μL de Put de concentraciones comprendidas entre 2,5 y 122 mg/L (que,

de acuerdo con estudios previos realizados, generarían concentraciones de H₂O₂ entre 0,5 y 25 mg/L y se dejó desarrollar la reacción durante 30 segundos, obteniéndose resultados como los que se indican en la figura 4.

Detección visual

Como se observa, la intensidad del color aumentó paralelamente a la concentración de Put. También se prepararon 3 muestras cuyas concentraciones estaban comprendidas entre las anteriores para validar el método, observando visualmente que los colores eran los adecuados al rango de concentraciones utilizado.



Figura 4. Procedimiento de obtención de señal con las tiras reactivas. Calibración de putrescina.

Detección colorimétrica I: Smartphone

Se utilizó la cámara de fotos de un iPhone 6 y una aplicación comercial del mismo que descompone los colores en coordenadas RGB ("RGB Color Value"). Con objeto de mantener las condiciones de iluminación constantes, se mantuvo fija la posición del dispositivo y se hicieron pasar las tiras por debajo (figura 5).

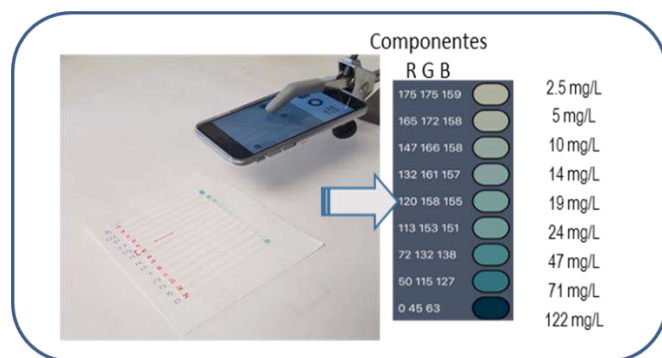


Figura 5. Procedimiento de detección de señales de las tiras reactivas usando un Smartphone.

Se inició la aplicación y se hizo una foto sobre cada una de las tiras reactivas, antes de adicionar el analito (obteniendo las señales de referencia R₀, G₀ y B₀). A continuación, se añadió la Put y pasados 30 s se volvió a realizar la medida (obteniendo las coordenadas R_n, G_n y B_n). El tiempo que se necesitó para adquirir todas las señales de calibración fue de unos 2 minutos. La figura 5 muestra también la descomposición en coordenadas RGB que se obtuvo al aplicar "RGB Color Value" a las imágenes.

A la hora de hacer las calibraciones se utilizó como señal analítica el cambio en el valor de cada coordenada (R-R₀, G-G₀ y B-B₀). Los resultados se recogen en la figura 6 (el eje y denominado V-V₀ representa la diferencia de valores para cada componente). Se encontró que la coordenada B, como cabría esperar, no dependía de la concentración de Put, mientras que las otras dos componentes sí que dependían, con mejor linealidad para la componente R (hasta 19 mg/L) que fue la finalmente propuesta.

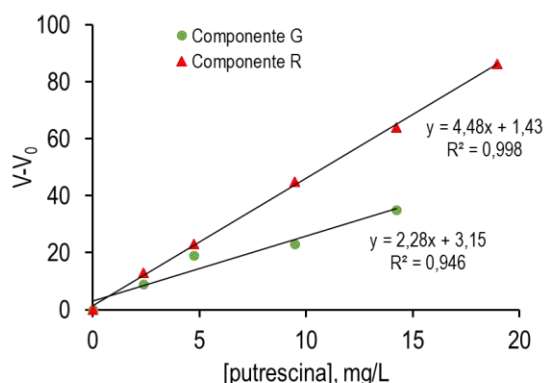


Figura 6. Calibración de putrescina con Smartphone.

Se analizaron también tres muestras sintéticas con contenidos conocidos de Put, para validar el método. Las muestras preparadas se interpolaron en la recta obtenida con la componente R, obteniendo los resultados que se indican en la tabla 1; la muestra 3 no se interpoló por estar fuera de rango de respuesta lineal.

Detección colorimétrica II: Cámara fotográfica

Las imágenes se tomaron utilizando una cámara Nikon D3400 reflex, instalada en el interior de una estructura diseñada para conseguir iluminación homogénea. De las diferentes fuentes de luz ensayadas, se consiguieron los resultados óptimos usando luz blanca D-65, dado que fue la que justificó la mayor cantidad de la varianza observada.

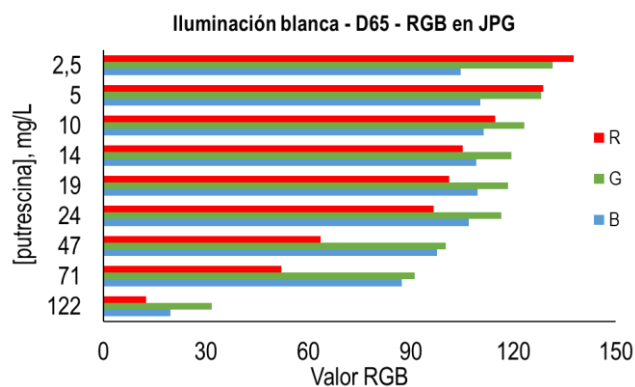


Figura 7. Coordenadas RGB obtenidas con la cámara fotográfica.

En este caso no hizo falta obtener una señal de referencia, por lo que el archivo de imagen, sin alterar, obtenido durante el estudio de calibración de Put (raw data) se trató con Matlab® para extraer los valores de las coordenadas RGB de cada una. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.

Al igual que ocurrió usando el Smartphone, la componente B no dependía de la concentración de analito. Para las otras dos componentes se obtuvo un rango lineal superior que con el dispositivo anterior (hasta 120 mg L⁻¹ con R y hasta 70 mg L⁻¹ con G) (figura 8).

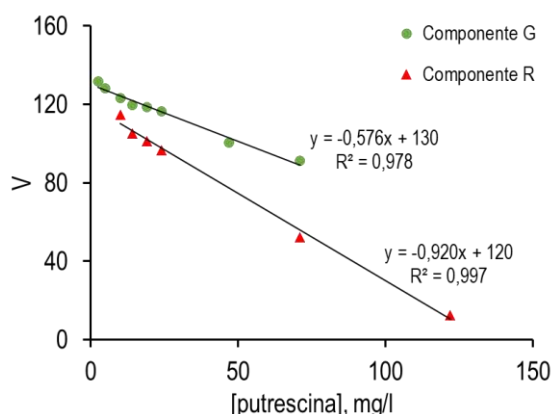


Figura 8. Calibración de putrescina con cámara de fotos.

También en este caso se eligió la componente R para la caracterización analítica del método y su posterior validación, usando las tres mismas muestras que en el caso anterior (ver Tabla 1).

Muestras	[putrescina] real	calculado smartphone	% error	calculado cámara	% error
M 1	5,7 mg/L	6,8 mg/L	20	5,2 mg/L	-8
M 2	17,0 mg/L	14,9 mg/L	-14	19,7 mg/L	16
M 3	80,5 mg/L	-	-	75,5 mg/L	-6

Tabla 1. Resultados obtenidos durante la validación de los métodos.

5.- Conclusiones

Estos primeros resultados obtenidos son muy alentadores, si se considera que se trata de la aplicación de un método sin optimizar, ya que han permitido determinar la Put de forma semi-cuantitativa de una manera rápida y sencilla, que es lo que se pretende al utilizar estas metodologías. Además, sientan las bases para el desarrollo de tiras optimizadas para Put, así como para otras AB, aspecto que se está llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio.

6.- Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación Mineco España CTQ 2016-76846R. J. Navarro agradece al Gobierno de Aragón por el contrato en formación dentro del programa “Construyendo Europa desde Aragón”.

7.- Referencias

- [1] Alvarez, M. A., & Moreno-Arribas, M. V. *Trends in food science & technology*, 39 (2014), 146-155.
- [2] Erim, F. B. *Trends in Analytical Chemistry*, 52, (2013) 239-247.
- [3] Ordóñez, J. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. D. C., & Callejón, R. M. *Analytica Chimica Acta*, 939 (2016) 10-25.
- [4] P. Pietrangeli, R. Federico, B. Mondovi, L. Morpurgo. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 101, (2007) 997-1004.

