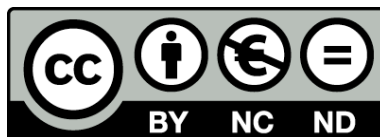




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análisis, formación y evolución de aminas biógenas en cervezas

María Luz Izquierdo Pulido



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

**ANALISIS, FORMACION Y EVOLUCION DE
AMINAS BIOGENAS EN CERVEZAS**

Memoria presentada por María Luz
Izquierdo Pulido, para aspirar al
grado de Doctor en Farmacia.

Director: Dra. Carmen Vidal Carou

Barcelona, Mayo de 1991

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700081299

Este trabajo ha sido subvencionado por las siguientes becas y ayudas:

- Beca de Iniciación a la Investigación del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, del Ministerio de Sanidad y Consumo (Expediente nº 88/518), durante los años 1988 y 1989.
- Subvención de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) del Ministerio de Educación y Ciencia. Proyecto nº PA85/0354.
- Ajuts de la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT) de la Generalitat de Catalunya. Proyectos AR87, AR88, AR89 y AR90.
- Ayuda de la empresa S.A. DAMM. Proyectos 258 y 747 de la Fundació Bosch i Gimpera.

No sería justo si olvidara escribir una página más para agradecer,

A la Dra. M. Carmen Vidal Carou, directora de este trabajo, su ilusión, dedicación y amistad.

Al Dr. Abel Mariné Font, su estímulo y apoyo.

Al Sr. Manuel Ferrer Martín, su atención y las facilidades ofrecidas para la realización de este trabajo.

Al Sr. Josep Miquel Carceller Rosa, su interés y su ayuda en el campo de la microbiología.

A Judit Font Fàbregas y a Maria Betriu Català, su inestimable cooperación, sobre todo en la toma de muestras y en las determinaciones microbiológicas.

Al Dr. Joan Sentís, sus consejos en los cálculos estadísticos.

A Teresa Veciana Nogués, su complicidad y sus buenos ratos.

A Aurora Benaiges Benaiges, su "nerviosa" ayuda.

A las otras "aminas", su presencia y su buen humor, y a las verdaderas aminas, su existencia.

A mis compañeros de Departamento, por algo tan importante como es la compañía.

A mis amigos, su amistad.

A mi familia, su cariño, comprensión y enorme paciencia.

A todos vosotros y a los que posiblemente he olvidado sin querer muchas gracias.

INDICE GENERAL

	Pag.
I. INTRODUCCION	
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	
1. AMINAS BIOGENAS EN ALIMENTOS.....	1
1.1. Origen, formación y contenidos.....	6
1.1.1. Alimentos fermentados y/o madurados.....	11
1.1.1.1. Bebidas alcohólicas fermentadas.....	11
1.1.1.2. Productos lácteos.....	21
1.1.1.3. Productos cárnicos.....	29
1.1.2. Alimentos en los que las aminas biógenas son consecuencia de procesos deterioro/descomposición.....	33
1.1.2.1. Pescados y productos derivados.....	33
1.1.2.2. Carnes y derivados.....	42
1.1.3. Alimentos con aminas biógenas preformadas...	43
1.2. Aminas biógenas y calidad higiéxico-sanitaria de los procesos de elaboración.....	46
1.3. Significación toxicológica de las aminas biógenas.....	55
1.3.1. Efectos tóxicos directos.....	56
1.3.1.1. Intoxicaciones histamínicas.....	56
1.3.1.2. Migrañas de origen alimentario.....	64
1.3.1.3. Otros efectos tóxicos.....	70
1.3.2. Efectos tóxicos indirectos.....	73
1.3.2.1. Interacciones alimentos-medicamentos IMAO.....	73
1.3.2.2. Formación de nitrosaminas.....	80
1.4. Determinación de aminas biógenas por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).....	82
1.4.1. Métodos por CLAE sin derivatización.....	90
1.4.2. Métodos por CLAE con derivatización.....	90
1.4.3. Tratamiento de muestras: Preparación y extracción.....	94
2. LA CERVEZA	
2.1. Definición y tipos.....	97
2.2. Elaboración de la cerveza.....	100
2.2.1. Materias primas.....	100
2.2.2. Etapas de la elaboración.....	103

2.2.2.1. Malteado: Obtención de la malta.....	103
2.2.2.2. Braceado: Obtención del mosto.....	107
2.2.2.3. Cocción y lupulado del mosto.....	109
2.2.2.4. Fermentación principal.....	111
2.2.2.5. Fermentación secundaria.....	112
2.2.2.6. Clarificación, pasteurización y envasado.....	112
 2.3. Microorganismos contaminantes de la cerveza.....	 114
2.3.1. Microorganismos contaminantes de las materias primas: cebada y malta.....	118
2.3.2. Microorganismos contaminantes durante la elaboración de la cerveza.....	120
2.3.2.1. Bacterias Gram-positivas.....	121
2.3.2.2. Bacterias Gram-negativas.....	122
2.3.2.3. Levaduras salvajes.....	125
2.3.3. Control de la contaminación bacteriana	127
 3. AMINAS BIOGENAS EN CERVEZAS	
3.1. Antecedentes y contenidos.....	128
3.2. Aminas biógenas en las materias primas.....	135
3.2.1. Cebada.....	135
3.2.2. Malta.....	136
3.2.3. Cereales secundarios.....	137
3.2.4. Lúpulo.....	138
3.3. Formación de aminas biógenas durante la elaboración.....	139
3.3.1. Braceado.....	139
3.3.2. Fermentación.....	140
3.4. Factores que pueden influir en la formación de aminas biógenas en cervezas.....	142
3.4.1. Levadura de cultivo.....	142
3.4.2. Microorganismos contaminantes.....	144
3.4.3. Aminoácidos precursores.....	145
3.5. Aminas biógenas y calidad higiénica-sanitaria de los procesos de elaboración de cerveza.....	150
3.6. Relación entre aminas biógenas y algunas características del producto acabado.....	153
3.6.1. Grado alcohólico.....	153
3.6.2. Extracto seco primitivo.....	153
3.6.3. Grado de fermentación.....	154
3.6.4. Acidez total.....	155
3.6.5. pH.....	155

III. OBJETIVOS E HIPOTESIS A ESTUDIAR.....	157
IV. PARTE EXPERIMENTAL	
4. DETERMINACION DE AMINAS BIOGENAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA.	
4.1. Material y reactivos.....	161
4.2. Fundamentos y descripción del método.....	162
4.2.1. Condiciones cromatográficas.....	164
4.2.2. Preparación de las muestras.....	166
4.2.3. Identificación de los picos cromatográficos	167
4.2.4. Cuantificación.....	176
4.3. Estudio de la validez del método.....	177
4.3.1. Linealidad.....	177
4.3.1.1. Significación de los coeficientes de correlación y de determinación.....	183
4.3.1.2. Test de linealidad.....	183
4.3.2. Influencia de la filtración.....	185
4.3.3. Precisión (Repetibilidad).....	186
4.3.4. Exactitud (Recuperación).....	194
4.3.5. Sensibilidad (Límites de detección y cuantificación).....	200
5. DETERMINACION DE HISTAMINA Y DE TIRAMINA POR METODOS ESPECTROFLUORIMETRICOS.	
5.1. Determinación de histamina.....	204
5.1.1. Material y reactivos.....	204
5.1.2. Descripción del método.....	205
5.1.3. Validez del método.....	207
5.2. Determinación de tiramina.....	208
5.2.1. Material y reactivos.....	208
5.2.2. Descripción del método.....	209
5.2.3. Validez del método.....	211
6. DETERMINACION DE AMINOACIDOS	
6.1. Determinación de aminoácidos por autoanalizador.....	212
6.2. Determinación de la tirosina por un método espectrofluorimétrico.....	216
6.2.1. Material y reactivos.....	216
6.2.2. Descripción del método.....	217
7. DETERMINACION DE OTROS PARAMETROS ANALITICOS	
7.1. Acidez total.....	220
7.2. pH.....	220
7.3. Grado alcohólico, extracto real, extracto aparente, extracto seco primitivo y densidad.....	221

7.4. Grado de fermentación.....	221
8. DETERMINACIONES ANALITICAS MICROBIOLOGICAS	
8.1. Recuento de células con la cámara de Thoma.....	222
8.1.1. Material y reactivos.....	223
8.1.2. Descripción de la técnica.....	223
8.2. Recuento de bacterias del ácido láctico.....	225
8.2.1. Material y reactivos.....	225
8.2.2. Descripción de la técnica.....	225
8.3. Recuento de levaduras salvajes.....	227
8.3.1. Material y reactivos.....	227
8.3.2. Descripción de la técnica.....	227
8.4. Aislamiento, mantenimiento e identificación de microorganismos.....	229
9. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE FERMENTACION EN COLUMNAS EBC.....	
	231
10. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PROCEDENTES DE PROCESOS DE FERMENTACION.....	
	236
10.1. Muestras de fermentación primaria.....	236
10.2. Muestras de fermentación secundaria.....	237
11. RESULTADOS Y DISCUSION	
11.1 Contenidos de aminas biógenas en cervezas.....	238
11.1.1. Distribución y significación de los contenidos de aminas biógenas.....	258
11.1.1.1. Comparación de los contenidos de aminas biógenas en cervezas de dife- rente origen tipo de elaboración.....	264
11.1.2. Relaciones entre aminas biógenas y con otros parámetros analíticos.....	277
11.1.2.1. Relaciones entre aminas biógenas.....	277
11.1.2.2. Relaciones entre aminas biógenas y grado alcohólico, extracto seco primitivo, grado de fermentación, acidez total y pH.....	285
11.1.3. Significación toxicológica de los conte- nidos de aminas biógenas en cervezas.....	292

11.2. Origen de las aminas biógenas durante la elaboración de cerveza.....	296
11.2.1. Estudio de la influencia de las materias primas en el contenido de aminas biógenas en cervezas.....	298
11.2.1.1. Malta.....	298
11.2.1.2. Malteado.....	302
11.2.1.3. Lúpulo.....	308
11.2.1.4. Estimación del aporte de aminas biógenas de la malta y del lúpulo al mosto y a la cerveza.....	311
11.2.2. Estudio de la evolución de las aminas biógenas durante la fermentación principal...	320
11.2.3. Estudio de la evolución de los aminoácidos precursores de las aminas biógenas durante la fermentación principal.....	329
11.2.4. Estudio de la formación de tiramina y de histamina por la levadura de cultivo.....	339
11.2.4.1. Influencia de la generación de la levadura de cultivo.....	344
11.2.5. Estudio de la formación de histamina y de tiramina por microorganismos contaminantes	349
11.2.5.1. Fermentación principal.....	349
11.2.5.1.1. Relación entre formación de tiramina y bacterias del ácido láctico.....	363
11.2.5.1.2. Relación entre formación de tiramina y levaduras salvajes...	376
11.2.5.2. Fermentación secundaria.....	380
11.2.5.3. Identificación de los microorganismos relacionados con la formación de tiramina.....	383
11.2.6. Estudio de la relación entre tirosina y tiramina durante la fermentación principal	384
11.2.7. Estudio de la formación de tiramina en fermentaciones contaminadas en el laboratorio con cepas de <u>Pediococcus</u> sp.....	401
11.2.8. Estudio del efecto del lavado de la levadura con ácido fosfórico.....	413

11.3. Estudio de la evolución de las aminas biógenas durante el almacenamiento de la cerveza.....	415
11.4. Variabilidad de los contenidos de aminas biógenas en cervezas españolas.....	422
11.4.1. Cervezas del mismo tipo y marca comercial.	423
11.4.2. Cervezas del mismo tipo pero distinta marca comercial.....	429
V. CONCLUSIONES.....	438
VI. BIBLIOGRAFIA.....	448
VII. INDICE DE FIGURAS.....	474
VIII. INDICE DE TABLAS.....	478
VIII. ANEXOS	
Anexo I.....	482
Anexo II.....	487
Anexo III.....	491

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTA MEMORIA

Agmn:.....	Agmatina
Arg:.....	Arginina
A.T.:.....	Acidez total
Cadn:.....	Cadaverina
Cél/mL:.....	Células por mL
CV:.....	Coefficiente de variación
DE:.....	Desviación estándar
Derivatiz:.....	Derivatización
E.R.:.....	Extracto real
E.S.P.:.....	Extracto seco primitivo
Espd:.....	Espemidina
Espm:.....	Espemina
F.:.....	Fermentación
Fenl:.....	β -Feniletilamina
Flujo post:.....	Flujo post-columna
Flur:.....	Fluorescencia
G.A.:.....	Grado alcohólico
G.F.:.....	Grado de fermentación
GL:.....	Grados de libertad
Gln:.....	Glutamina
h:.....	Horas
His:.....	Histidina
Hisn:.....	Histamina
IC (95%):.....	Intervalo de confianza del 95%
IC ₁ :.....	Intervalo de confianza individual
IC ₂ :.....	Intervalo de confianza de la media
Lys:.....	Lisina
min:.....	Minutos
nd:.....	No detectado
Orn:.....	Ornitina
p.e.:.....	Por ejemplo
Phe:.....	Fenilalanina
Putn:.....	Putrescina
rpm:.....	Revoluciones por minuto
Sern:.....	Serotonina
Temp:.....	Temperatura
THF:.....	Tetrahydrofurano
Tirn:.....	Tiramina
tr:.....	Trazas
Tripn:.....	Triptamina
Trp:.....	Tritófano
Tyr:.....	Tirosina
UFC/mL:.....	Unidades formadoras de células por mL

I. INTRODUCCION

El interés por las aminas biógenas, presentes en algunos tipos de alimentos y bebidas, surgió por su posible acción tóxica directa o indirecta, tras el consumo de productos que las contengan en cantidades relativamente elevadas.

Como efectos tóxicos directos cabe destacar las intoxicaciones histamínicas, atribuidas en su mayor parte al consumo de conservas y derivados de atún, que pueden contener cantidades elevadas de histamina, ya sea porque proceden de materias primas que a su vez tenían niveles elevados de esta amina o porque se ha formado durante el acondicionamiento o almacenamiento de estos productos. Algunos autores han señalado que, si bien estas intoxicaciones son debidas principalmente a niveles elevados de histamina, no deben descartarse los efectos potenciadores que sobre su toxicidad pueden ejercer otras aminas, como cadaverina y putrescina, también presentes en estos alimentos. Para la tiramina y la β -feniletilamina el efecto directo más conocido es su posible relación con las migrañas alimentarias, tras el consumo de alimentos como quesos, chocolate y vinos sobre todo.

Si bien las acciones toxicológicas anteriores no cursan, en general, con síntomas graves, no sucede lo mismo con las interacciones que pueden presentarse entre medicamentos inhibidores del enzima monoamino-oxidasa (IMAO) y alimentos con contenidos elevados de aminas biógenas, ya que pueden desarrollarse crisis hipertensivas graves, que incluso, en algunos casos, han llegado a ser mortales. Precisamente esta interacción, cuyos síntomas se agruparon inicialmente bajo la denominación de "síndrome del queso" contribuyó decisivamente a profundizar en la problemática general de las interacciones entre alimentos y medicamentos.

Otro punto de interés de las aminas biógenas es su posible significación higiénico-sanitaria, debido a que se ha señalado que los contenidos de estas aminas pueden tener relación con la calidad de la materia prima y con las condiciones del proceso tecnológico al que ha sido sometido el alimento. En este sentido, se ha propuesto la determinación analítica de estas sustancias como criterio de estimación de la calidad higiénica y del grado de conservación de ciertos alimentos, sobre todo pescados y derivados.

Estas aminas se encuentran fundamentalmente en alimentos cuya elaboración requiere la actividad de ciertos microorganismos, que intervienen en procesos de fermentación y/o maduración, y también en productos (de naturaleza esencialmente proteica) que por sus propias características presentan una relativa facilidad para el desarrollo de procesos de descomposición y/o degradación de origen microbiológico. En ambos casos la formación de las aminas se relaciona con la presencia de microorganismos con capacidad para descarboxilar a sus aminoácidos precursores.

El estudio más detallado de la presencia de aminas biógenas en los alimentos ha ampliado el campo de interés de estas sustancias en Bromatología, Toxicología y Salud Pública, pero quedan aún muchos aspectos sin resolver. Siguen pendientes de resolución cuestiones de metodología analítica, que permitan obtener datos fiables de contenidos e igualmente no se conocen con seguridad los factores que determinan la aparición y la evolución de las aminas biógenas en los alimentos y la verdadera significación de su presencia en los mismos.

Las cervezas son productos susceptibles de contener aminas biógenas, debido a que en su elaboración intervienen procesos fermentativos. No obstante, son muy escasos los trabajos destinados a estudiar la incidencia de las aminas biógenas en estas bebidas y las causas que explican su presencia en estos productos. En este trabajo se plantea aportar nuevos datos que ayuden a conocer los contenidos de estas sustancias en cervezas consumidas en nuestro país y su significación, así como estudiar los factores que pueden influir en la formación y evolución de las aminas durante la elaboración de las cervezas, estudiando todas las etapas del proceso desde materias primas hasta producto acabado.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. AMINAS BIOGENAS EN ALIMENTOS

La presencia de aminos biógenas en algunos alimentos está ampliamente demostrada, pero todavía se cuestiona si su presencia debe considerarse como habitual e inevitable, por lo que estas sustancias podrían ser "microcomponentes normales" o bien si su aparición puede indicar procesos de elaboración defectuosa y/o procesos de deterioro.

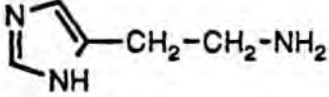
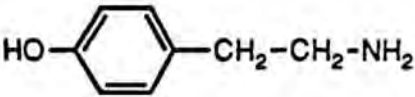
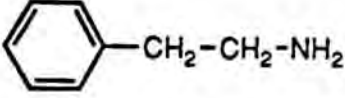
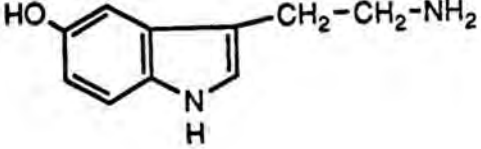
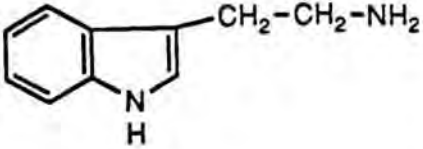
Entre las aminos biógenas que con mayor frecuencia aparecen en los alimentos destacan: histamina, tiramina, serotonina, β -feniletilamina y triptamina, todas ellas aminos aromáticas. También se han podido detectar otras aminos como putrescina y cadaverina, ambas diaminas y agmatina, espermina y espermidina, que son poliaminas (figura 1).

Las aminos biógenas se definen como bases orgánicas de bajo peso molecular que aparecen en animales, plantas y microorganismos como consecuencia de procesos metabólicos (RICE y col., 1976). En esta definición se incluirían todas las aminos citadas anteriormente, ya que todas ellas tienen un origen biótico. Por otra parte, algunas de estas aminos biógenas tienen una reconocida actividad fisiológica muy activa en el hombre, como la histamina, la tiramina o la serotonina. Por el contrario y al menos de momento, no se ha encontrado una posible actividad biológica ejercida por las diaminas y las poliaminas en el ser humano. Ahora bien, estas últimas sustancias no han sido muy estudiadas y se conoce muy poco sobre el papel que ejercen en los seres vivos. Con el objeto de evitar confusiones, cuando hablemos de aminos biógenas en general nos referiremos siempre al término más amplio de la definición, es decir a todas aquellas aminos que tienen un origen biótico.

Las aminos biógenas aromáticas pueden ejercer sobre el organismo humano efectos vasoactivos y psicoactivos (RICE y col., 1976; EITENMILLER y col., 1978):

- a. aminos vasoactivas, que pueden actuar directa o indirectamente sobre el sistema vascular.
- b. aminos psicoactivas, que pueden actuar como neurotransmisores en el sistema nervioso central.

Figura 1. Estructura química de las aminas biógenas.

 <p>HISTAMINA</p>	 <p>TIRAMINA</p>
 <p>B-FENILETILAMINA</p>	 <p>SEROTONINA</p>
 <p>TRIPTAMINA</p>	<p>$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$</p> <p>CADAVERINA</p>
<p>$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$</p> <p>PUTRESCINA</p>	<p>$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$</p> <p>AGMATINA</p>
<p>$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$</p> <p>ESPERMINA</p>	
<p>$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$</p> <p>ESPERMINIDA</p>	

La tiramina, la β -feniletilamina y la triptamina provocan un aumento de la presión sanguínea, incrementan la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción del corazón. Tienen por tanto una acción hipertensiva (SMITH, 1980). Por el contrario la histamina provoca hipotensión. La serotonina y la dopamina son aminas psicoactivas. No obstante cabe recordar que también se han señalado como posibles neurotransmisores a la histamina y a la tiramina.

La putrescina y las poliaminas (espermina y espermidina) se encuentran probablemente en todos los animales y plantas, y la putrescina y la espermidina se hallan en la mayoría de bacterias. SMITH (1981) señala que estas aminas son importantes en la regulación de la síntesis del ácido nucleico y de proteínas, y también probablemente en la estabilización de membranas. También se les ha atribuido a las poliaminas un cierto papel o relación con los procesos cancerígenos o neoplásicos (PECHANEK y col., 1980b).

Las aminas biógenas se encuentran en los alimentos como consecuencia final de una acción microbiana sobre las proteínas de los mismos. La acción de los microorganismos comporta en primer lugar reacciones de lisis sobre las proteínas, con la liberación de los aminoácidos que las forman y, en una última etapa, provocan la descarboxilación de los aminoácidos precursores de las correspondientes aminas. Por ejemplo, la histamina procede de la descarboxilación de la histidina y la tiramina de la de la tirosina.

En base a lo anteriormente señalado, podemos establecer el origen de las aminas biógenas considerando tres grupos de alimentos:

- ALIMENTOS (Grupo I) para cuya elaboración se requiere la actividad de ciertos microorganismos que intervienen en procesos de fermentación y/o maduración. En este primer grupo estarían incluidos: bebidas alcohólicas fermentadas (vinos, cervezas, sidras, cavas,...), algunos productos cárnicos (embutidos y otros derivados), ciertos productos lácteos (quesos y otros derivados), etc. Las aminas biógenas se formarían como consecuencia (se desconoce si inevitables) de una actividad microbiana buscada y deseada. Ahora bien, hay que considerar la posibilidad de que estos alimentos que se obtienen por procesos de fermentación y/o maduración hayan sufrido algún tipo de contaminación durante su elaboración o almacenaje, que haya provocado la formación de aminas en cantidades superiores a las que podrían considerarse como normales si el

proceso hubiera transcurrido en condiciones óptimas desde un punto de vista higiénico. También, sobre todo en el caso de productos cárnicos y lácteos, hay que tener en cuenta la calidad higiénico-sanitaria de la materia prima empleada, ya que ésta puede presentar de partida niveles elevados de aminas biógenas si su estado no era el más idóneo.

- **ALIMENTOS (Grupo II)** que por sus propias características presentan una relativa facilidad para el desarrollo de procesos de descomposición y/o de deterioro. Se incluyen en este grupo el pescado y productos derivados, tanto frescos como conservas y semiconservas que pueden haberse manufacturado en condiciones poco apropiadas. También puede incluirse las carnes y derivados. La formación de aminas sería debida en estos alimentos, a una actividad microbiana que en ningún momento puede considerarse buscada o deseada.

- **ALIMENTOS (Grupo III)** en los que ya se pueden encontrar ciertas cantidades de aminas preformadas. En este caso, su presencia no es atribuible, en principio, a una actividad microbiana. En este grupo se incluyen: alimentos en cuya composición intervenga hígado, vísceras.... (HENRY, 1960) y algunas frutas como plátano, aguacate, tomate.... (GARCIA-MORENO, 1981; SMITH, 1980).

El contenido final de aminas en los alimentos puede no ser sólo el resultado de la actividad descarboxilásica de microorganismos, sino que también pueden existir variaciones e incluso disminuciones en los niveles de estas aminas a lo largo de la elaboración de los alimentos, ya sea por la aplicación de ciertos procesos tecnológicos, como por ejemplo filtración a través de medios adsorbentes, o por la presencia de microorganismos con capacidad para destruir aminas biógenas. En este sentido, la cantidad de aminas biógenas presente en un alimento se debería considerar como una "magnitud dinámica", es decir como el resultado de una producción y de una degradación de las mismas (JANZ y col., 1983; AERNY, 1985; BRAVO-ABAD, 1990).

La posible destrucción de la histamina preformada fue ya señalada por Gale en 1942, mediante la acción de enzimas histaminásicos. De todas maneras, se disponen de pocos datos sobre esta cuestión.

Diversos microorganismos se han relacionado con una actividad destructiva sobre las aminas biógenas. Entre éstos se puede destacar para la histamina: Escherichia coli, Proteus vulgaris, Serratia flava y Clostridium fasseri (RICE y col., 1976; BALDRATI y col., 1980) y para la tiramina: Sarcina lutea, Aspergillus niger y Trichosporum sp. (RICE y col., 1976).

Todos ellos parecen actuar por mecanismos de desaminación oxidativa y podrían formar parte de la microflora habitual de los alimentos o bien ser contaminantes externos (RICE y col., 1976).

1.1. ORIGEN, FORMACION Y CONTENIDOS

Señalar un origen único y común para todas las aminos biógenas es ciertamente complicado. Mayoritariamente se acepta que las aminos biógenas proceden de la descarboxilación de sus aminoácidos precursores (Figuras 2 y 3) y que esta reacción se realiza mediante la intervención de microorganismos, pero existen discrepancias sobre los agentes responsables y sobre las condiciones en que se desarrollan estas reacciones. Por otra parte, y sobre todo en las plantas superiores, algunas de estas aminos se sintetizan en rutas metabólicas que se desarrollan en determinados momentos de su ciclo biológico.

Además del mecanismo de descarboxilación enzimática para la formación de aminos, algunos autores (PECHANECK y col., 1980b; SMITH, 1980; BINDER y BRANDL, 1983; JANZ y col., 1983; ALLISON y MacFARLANE, 1989) señalan que estas sustancias también podrían ser producidas por:

- Reacciones de aminación de metabolitos que no contengan nitrógeno en su molécula (p.e. aminación de aldehídos y cetonas),
- Ruptura hidrolítica de compuestos nitrógenados, como poliaminas,
- Reacciones de N-desalquilación de aminos secundarias o terciarias,
- Descarboxilación de aminoácidos por acción del calor.

Los factores que se consideran necesarios para la formación de aminos en alimentos por la vía de la descarboxilación enzimática de origen microbiano son (RICE y KOEHLER, 1976; RICE y col., 1976):

1. Disponibilidad de aminoácidos precursores libres.
2. Presencia de microorganismos con capacidad descarboxilásica de estos aminoácidos.
3. Condiciones favorables para el crecimiento de los microorganismos y para el desarrollo por parte de éstos de su actividad descarboxilásica.

Figura 2. Estructura química de los aminoácidos precursores de aminas biógenas.

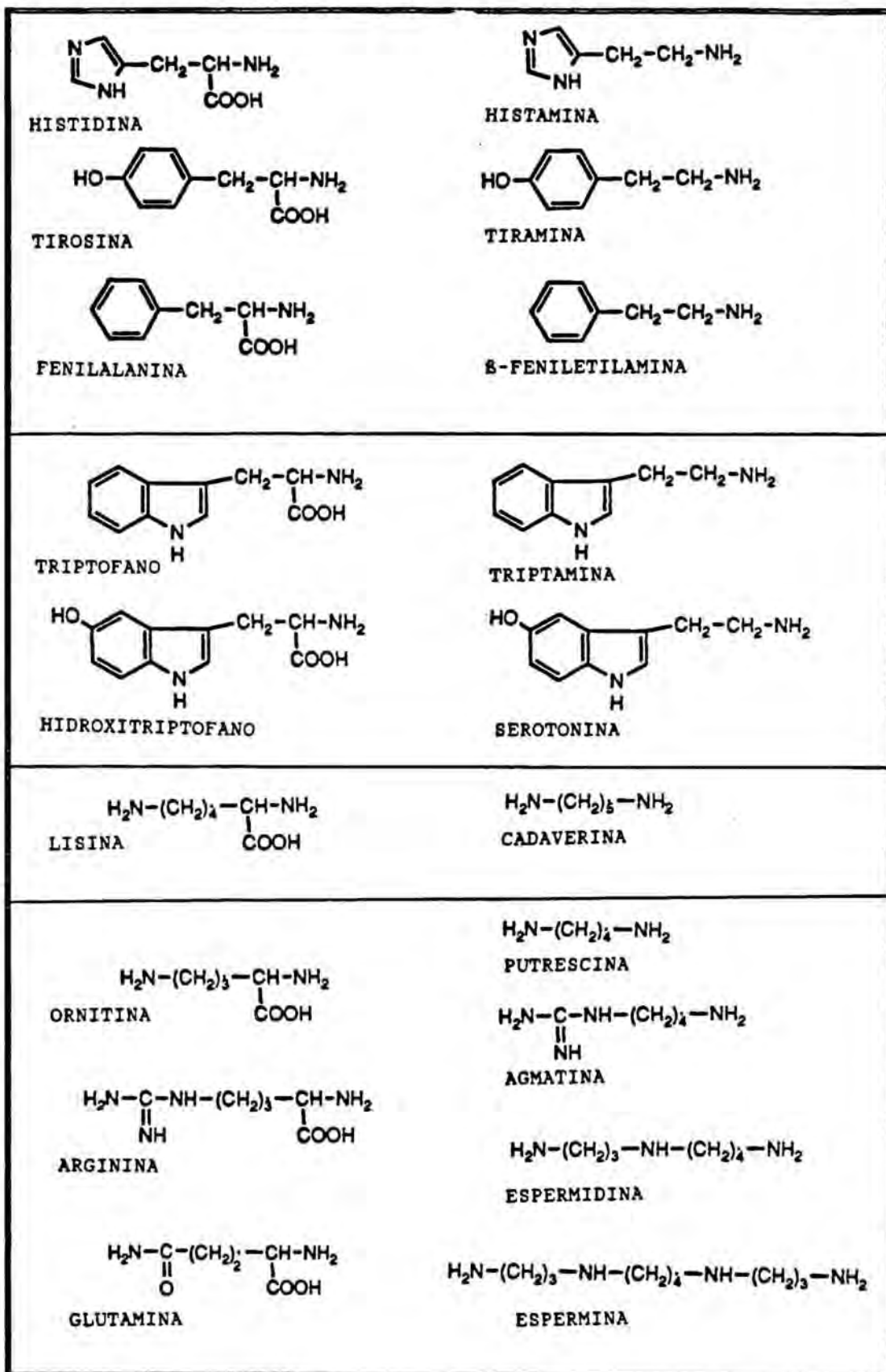
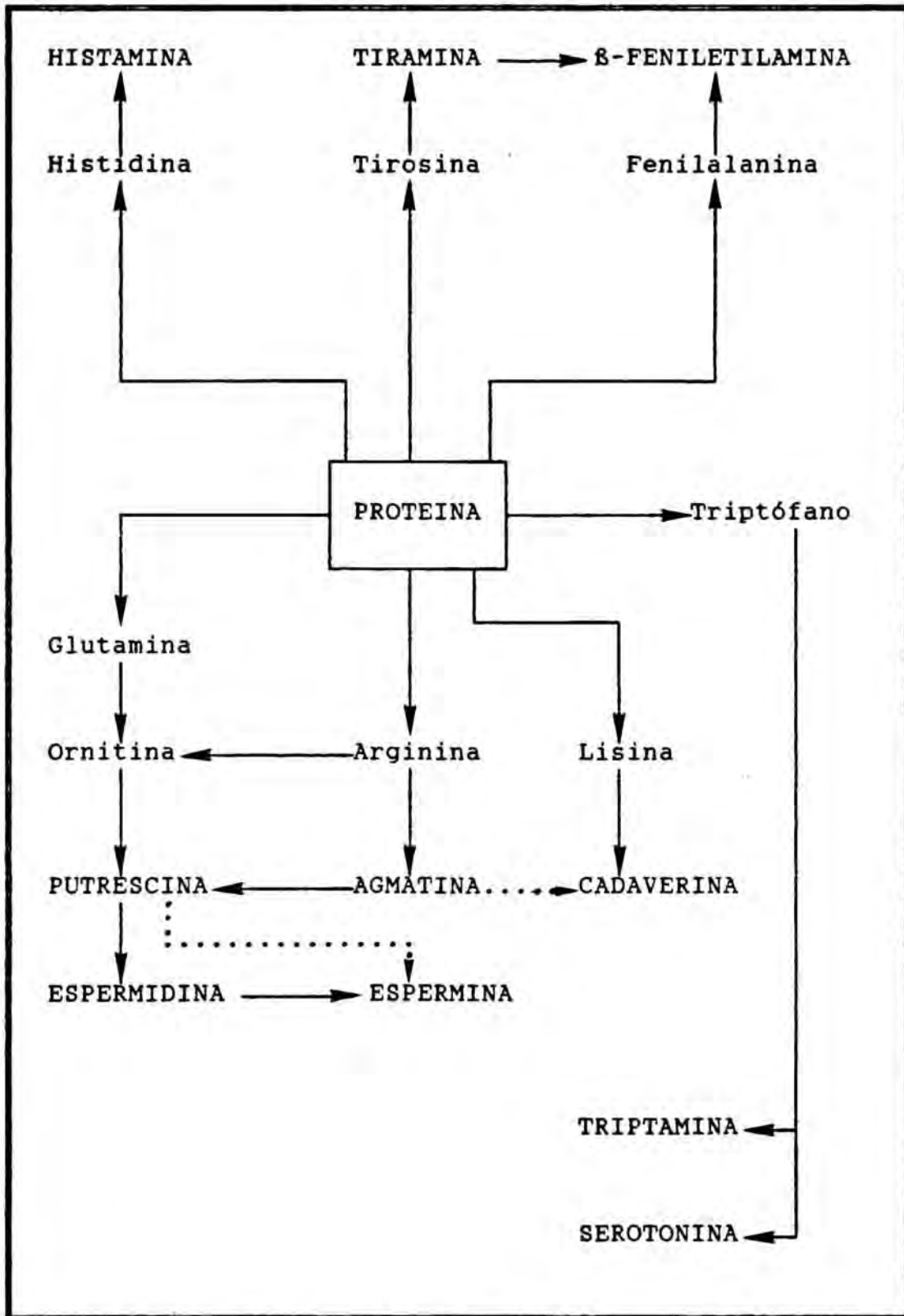


Figura 3. Esquema de las rutas de síntesis de aminas biógenas a partir de sus aminoácidos precursores en alimentos.



VOIGT y EITENMILLER (1977) señalan que, en definitiva, un incremento de aminas biógenas en un alimento sería el resultado del crecimiento de bacterias con capacidad descarboxilásica bajo unas condiciones favorables para la síntesis y la actividad de sus enzimas descarboxiladores.

Ante la pregunta de que por qué los microorganismos sintetizan estos enzimas con capacidad descarboxilásica, Koessler y col. en 1928 (VOIGT y EITENMILLER, 1977) postulaban que la descarboxilación podría ser un mecanismo de protección de las bacterias frente a la acidez del medio. De esta forma, cuando la concentración de hidrogeniones fuera lo suficientemente elevada para amenazar la supervivencia de los microorganismos, éstos sintetizarían enzimas cuya acción provocaría la aparición de compuestos con carácter básico. Compatible con esta idea es que, en contraste con los enzimas descarboxiladores de aminoácidos de plantas y animales, los enzimas bacterianos presentan un pH óptimo de actividad ácido (EDWARDS y SANDINE, 1981).

Gale en 1946 (EITENMILLER y de SOUZA, 1984) señaló que los factores que influyen, de una forma más acentuada, para que un microorganismo sintetice enzimas descarboxiladores son los siguientes:

1. El organismo debe poseer la información genética para la síntesis de estos enzimas.
2. Es necesario que el aminoácido precursor (substrato específico) esté presente en el medio de crecimiento.
3. Se requiere la presencia de ciertos cofactores como, por ejemplo, la piridoxina y el ácido nicotínico.
4. La actividad enzimática es normalmente mayor durante el periodo de tiempo en que la división celular ha cesado.
5. La mayor actividad descarboxilásica ocurre normalmente a pH ácidos.
6. Temperaturas menores a 30⁰C son normalmente óptimas para la síntesis de enzimas descarboxiladores.

Investigaciones posteriores han revelado que existen otros muchos factores como: tensión de O_2 y de CO_2 , iones metálicos, ciertos aminoácidos,... que también influyen en la formación de estas descarboxilasas. ALLISON y MacFARLANE (1989) indican que, bajo condiciones de crecimiento adecuadas, las bacterias también pueden formar aminas biógenas durante la etapa de crecimiento exponencial.

Respecto a la presencia de microorganismos con capacidad para descarboxilar aminoácidos, es difícil plantear consideraciones generales, ya que la flora microbiana que se puede desarrollar es distinta según el alimento de que se trate. Por esta razón, a continuación se comentarán los microorganismos que más frecuentemente se ven implicados como causantes de la formación de aminas biógenas en los distintos tipos de alimentos. Para facilitar la exposición de estos datos los alimentos se presentan divididos en los tres grupos de alimentos considerados en función del origen de las aminas biógenas, de acuerdo con la clasificación establecida en el apartado anterior.

En general, cabe señalar que parece bastante complicado realizar estudios que demuestren de una manera taxativa el papel real que juegan unas determinadas especies microbianas en la formación de aminas biógenas. Muchas veces el simple hecho de cambiar el microambiente del microorganismo, p. e. el procedimiento de aislamiento, puede provocar que el microorganismo pierda la capacidad descarboxilásica que manifestaba en el alimento. Además, los microorganismos no se comportan de igual forma en un medio aislado que en la matriz de donde fueron aislados (EITENMILLER y col., 1981). VOIGT y EITENMILLER (1977) indican que incluso el método de medida de la actividad descarboxilásica utilizado puede dar lugar a una gran variabilidad en los resultados que se obtengan

1.1.1. ALIMENTOS FERMENTADOS Y/O MADURADOS (Grupo I)

1.1.1.1. Bebidas alcohólicas fermentadas (VIDAL-CAROU, 1987).

Las aminas biógenas en los vinos pueden proceder de cuatro fuentes diferentes (LAFON-LAFOURCADE, 1975):

1. Encontrarse de forma natural en el mosto.
2. Formarse durante la fermentación alcohólica, como consecuencia de la actividad de las levaduras responsables de esta fermentación.

ZAPPAVIGNA y col. (1974), tras estudiar el contenido de histamina y de tiramina en 138 muestras de vino, vinagre, zumos de fruta y cervezas, confirmaron el origen fermentativo de estas sustancias y concluyeron además que las condiciones tecnológicas influyen en la intensidad del proceso de biogénesis.

BUTEAU y col. (1984) señalan que durante la fermentación alcohólica se producen cantidades importantes de histamina y tiramina, así como de agmatina, cadaverina y putrescina. Sin embargo, ello no implica necesariamente que estas aminas se formen como consecuencia de la actividad de las levaduras. Se han realizado estudios (LAFON-LAFOURCADE, 1975; SOMAVILLA y col., 1986) con distintos tipos de levaduras, utilizadas normalmente en la elaboración de vino, en los que se comprobó que la formación de histamina en el vino era distinta según el tipo de levadura empleada, y que la mayoría de levaduras alcohógenas tenían una capacidad reducida para producir estas sustancias.

Por su parte AERNY (1985) y OUGH y col. (1987) señalaron que las levaduras no tienen capacidad para descarboxilar aminoácidos.

3. Formación de aminas biógenas durante la fermentación malo-láctica (FML).

Algunos autores coinciden en que la formación de aminas tiene lugar mayoritariamente tras la fermentación alcohólica, durante la fermentación malo-láctica o degradación biológica del vino y que la intensidad de este proceso puede influir en el contenido final de aminas (ZAPPAVIGNA y col., 1974).

Los microorganismos responsables de este proceso son las denominadas "bacterias del ácido láctico", que para su crecimiento necesitan la presencia de aminoácidos tales como histidina, tirosina y triptófano (SCHNEYDER, 1973).

La relación entre bacterias de la FML y producción de aminas en vinos está basada en que los vinos que han sufrido este proceso contienen niveles de aminas superiores a los que no lo han sufrido (BUTEAU y col., 1984). Sin embargo, esta relación no está demasiado clara y en definitiva no se conocen las condiciones que determinan dicha producción.

MARQUARDT y WERRINGLOER (1965) y SCHNEYDER (1973) señalaron que las bacterias del ácido láctico son las principales responsables de la formación de histamina a partir de histidina en el vino. Leuconostoc oenos y Pediococcus cerevisiae (ambas bacterias lácticas) son los microorganismos que más frecuentemente se señalan como responsables de la formación de histamina durante la FML (PECHANECK y col., 1980b; BUTEAU y col., 1984; AERNY, 1985; MAYER y PAUSE, 1987). AERNY (1985) y MAYER y PAUSE (1987) indican que estos mismos microorganismos son los responsables de la formación de tiramina, β -feniletilamina, putrescina y cadaverina. No obstante, también se ha señalado (AERNY, 1985) que un desarrollo de Pediococcus cerevisiae en el vino no conduce sistemáticamente a la formación de histamina, ya que para ello deben darse además otras condiciones.

LAFON-LAFOURCADE (1975) realizó un estudio en un medio sintético a fin de confirmar si realmente las bacterias lácticas del vino tenían capacidad para sintetizar histamina. Concluyó que la histaminogénesis por bacterias del ácido láctico en un medio de cultivo (mosto pasteurizado, diluido y enriquecido con extracto de levadura e histidina) era muy limitada.

También se han realizado (BRAVO y col., 1983; SUAREZ y col., 1983) estudios sobre la formación de histamina en vino y en medios de cultivo semisintéticos y sintéticos, con y sin adición de histidina, por asociaciones de bacterias lácticas y diversas levaduras. Estas asociaciones mostraron también una capacidad muy reducida para formar histamina, que no se modificó al adicionar histidina.

SOMAVILLA y col. (1986) sugirieron que la histaminogénesis en vinos es un proceso complejo, resultante de la interacción de distintas especies microbianas, en determinadas condiciones físico-químicas y con la posible participación de reacciones de transaminación de α -ceto-ácidos.

Otros autores señalan que la histamina puede formarse al final de la FML e incluso después de que ésta haya acabado (PECHANNEK y col., 1980b; AERNY, 1985).

OUGH y col. (1987) tras realizar estudios con diferentes cepas de bacterias relacionadas con el desarrollo de la FML (Leuconostoc oenos, brevis, delbrueckii, caseii, plantarum, mesenteroides, Pediococcus cerevisiae y Pediococcus sp.) en medios sintéticos y en medios elaborados a base de zumo de uva enriquecido con levadura, tiamina e histidina, concluyen que la FML no está relacionada con la producción de histamina durante la elaboración del vino. Además, señalan que la presencia de histamina en vinos se debe seguramente a contaminaciones o incluso a veces a fallos analíticos, por problemas de separación de compuestos interferentes. Esta última es a nuestro juicio demasiado simplista.

DELFINI (1989) estudió en un medio sintético que contenía histidina, un pH ácido y una elevada concentración de ácido málico, la capacidad histaminogénica de Leuconostoc oenos, Leuconostoc sp., Lactobacillus sp. y Pediococcus cerevisiae. Todos estos microorganismos formaron histamina (entre 0.5 mg/L y 2.8 mg/L) siendo el que presentaba una menor producción Leuconostoc oenos. En base a estos datos recomienda, desde un punto de vista higiénico, el uso de L. oenos como cepa "starter" para el desarrollo de la FML, ya que esta especie por su mínima producción de histamina sería más adecuada que Lactobacillus y Pediococcus. Sin embargo, CERUTTI y col. (1987b) Y VECCHIO y col. (1989) concluyeron, en estudios realizados con vinos italianos, que no existe una relación clara entre FML y biogénesis.

4. Formación de aminas biógenas por microorganismos contaminantes.

BUTEAU y col. (1984) admiten la posibilidad de que las aminas se formen en el vino, durante su elaboración, como consecuencia de una contaminación por enterobacteriaceas, como Klebsiella y Proteus y por levaduras salvajes.

Sin embargo, no se han encontrado niveles más elevados de aminas biógenas en vinos alterados por desarrollos bacterianos, con niveles de acetato de etilo y de acidez volátil elevados (LAFON-LAFOURCADE, 1975; INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES, 1976). Así, las bacterias del ácido acético no parecen tener la propiedad de formar histamina.

CERUTTI y col. (1986) señalan que se ha tener en cuenta el papel que juega toda la microflora presente durante la elaboración del vino sobre la formación de aminas biógenas, y no sólo la concreta responsable de la FML.

Factores que influyen en la formación de aminas biógenas.

1. Contenido de aminoácidos precursores.

Se ha señalado que cantidades elevadas de tirosina o de histidina (aminoácidos precursores), pueden ejercer un efecto inductor en la formación de tiramina o de histamina, respectivamente. Por ello, estos aminoácidos pueden condicionar de alguna manera la mayor o menor formación de las aminas (GONZALEZ y col., 1977; EITENMILLER y col. 1978).

Durante la vinificación RIVAS y col. (1981 y 1983) comprobaron que aumentos de los contenidos de tiramina se correspondían con descensos en los de tirosina, si bien estos cambios no eran proporcionales y por tanto no se podía afirmar que la aparición de tiramina fuera debida a una transformación directa de la tirosina. La misma conclusión fue indicada por ULLA y col. (1989).

Al respecto, BUTEAU y col. (1984) realizaron un estudio sobre la relación entre formación de aminas y desaparición de aminoácidos precursores (histidina-histamina, tirosina-tiramina, lisina-cadaverina, ornitina-putrescina, arginina-putrescina, arginina-agmatina y serina-etanolamina). Concluyeron que no podían establecerse correlaciones estadísticamente significativas entre la disminución del aminoácido y la formación de la amina, aunque es destacable que la peor relación la encontraron entre histidina e histamina y la mayor entre tirosina y tiramina.

2. Condiciones en que se realiza la vinificación

A continuación, se señalan diferentes aspectos que pueden influir en mayor o menor grado sobre la formación de aminas biógenas durante la elaboración del vino:

- La calidad de la materia prima empleada (ZAPPAVIGNA y col. 1974).
- La intensidad de la FML (ZAPPAVIGNA y col. 1974).
- La adición de SO₂, ya que este conservante ejerce una acción selectiva sobre la flora bacteriana incluida la que puede realizar la FML (RIVAS y col. 1983; AERNY, 1985). VIDAL-CAROU y col. (1990) observaron que el SO₂ parecía ejercer una acción inhibitoria mayor sobre la formación de tiramina que sobre la de histamina.
- El pH del vino puede representar una dificultad para la transformación de los aminoácidos en aminas (CERUTTI y REMONDI, 1972) ya que ésta tiene lugar en condiciones óptimas a un pH más elevado que el normal de los vinos. Diversos autores han comprobado que a valores de pH entre 3 y 4 los lactobacilos no descarboxilan aminoácidos y que la actividad aminoácido-descarboxilásica de Streptococcus sp. tiene un pH óptimo superior a 4 (SOMAVILLA y col., 1986).
- La temperatura a la que se realice la vinificación. SOMAVILLA y col. (1986) comprobaron que un aumento de la temperatura después de la fermentación provocaba un aumento de la concentración de histamina. Por el contrario, OUGH (1971) no encontró ninguna relación entre contenido de histamina y temperatura durante el proceso de vinificación.
- La duración de la fermentación en contacto con la piel de las uvas (hollejo) (QUEVAUVILLER y MAZIERE, 1969; SUBDEN y col., 1979; INIGO y BRAVO, 1980). Este factor podría explicar el hecho de que algunas bodegas produzcan sistemáticamente vinos con contenidos más elevados de histamina que otras (OUGH, 1971). MAYER y PAUSE (1987) señalaron que ciertas aminas biógenas aparecen en determinados vinos de una forma sistemática en función de la "bodega" elaboradora.

- Tipo de vinificación. La vinificación sobre lías podría ser el origen de la formación de aminas en vinos por autólisis de las levaduras (BUTEAU y col., 1984; CERUTTI y col., 1987b). Sin embargo, Marcher y col. en 1984 (AERNY, 1984) señalaron que la autólisis es un proceso lento y por ello cabría dudar de su papel en la biogénesis de aminas.

No se ha establecido una relación entre el contenido de aminas y eventuales variaciones climáticas. Igualmente, el área geográfica de producción no parece influir en el contenido final de aminas biógenas en el vino. A estas conclusiones llegaron CERUTTI y REMONDI (1972) en vinos italianos, OUGH (1971) en vinos californianos, SUBDEN y col. (1979) en canadienses y BURDASPAL y col. (1979) en españoles. La edad del vino tampoco parece tener importancia respecto al contenido en histamina en vinos de diferentes cosechas (LAFON-LAFOURCADE, 1975; GONZALEZ y col., 1977).

Finalmente en la tabla 1 se incluyen los valores de aminas biógenas aromáticas, diaminas y poliaminas, hallados en vinos y otras bebidas alcohólicas por diversos autores. Se observa, en primer lugar, la ausencia de datos para triptamina, serotonina y poliaminas, ya que en la bibliografía consultada no se han encontrado trabajos sobre el estudio de estas sustancias en este tipo de bebidas. Para histamina y tiramina, en general, los contenidos señalados son relativamente bajos, en la mayoría de los casos no se han superado los 10mg/L. Muchos autores coinciden al señalar que en los vinos tintos el contenido de aminas biógenas es más elevado que en los blancos (LAFON-LAFOURCADE, 1975; BUTEAU y col., 1984; VIDAL-CAROU, 1987). AERNY (1985) señala que ello puede ser debido a que los microorganismos de la fermentación malo-láctica en los vinos tintos pueden ser las responsables de que existan estas diferencias respecto a los blancos. También se ha indicado que en los vinos los contenidos de tiramina son menores que los de histamina, si bien, en base, a los datos recogidos no parece observarse una tendencia clara.

Cervezas

Debido a que el estudio de las aminas biógenas en cervezas es el objeto principal de este trabajo, el origen y formación de estas sustancias en las cervezas, será expuesto en apartados sucesivos de forma más amplia.

Tabla 1. Contenidos (mg/L) de aminos biógenas en bebidas alcohólicas (I).

Tipo	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Ref. Bibliografica
VB	?	0.3-11.4	--	--	--	--	
VR	?	0.6-2.8	--	--	--	--	OUGH Y col., 1971
VT	?	0.2-15.5	--	--	--	--	
VB	?	0.05-1.2	0.08-0.71	--	--	--	
VR	?	0.05-0.35	0.06-0.54	--	--	--	SPETTOLI, 1971
V	?	0.7-5.1	4.8-5.0	--	--	--	Mayer y Pause, 1973 (ZEE Y col., 1983)
V	?	nd-2	nd-20	--	--	--	ZAPPAVIGNA Y col., 1974
VB	27	nd-0.8	--	--	--	--	
VT	65	nd-21	--	--	--	--	LAFON-LAFOURCADE, 1975
VE	6	0.1-6.3	--	--	--	--	
VB	?	0.3-5.0	--	--	--	--	
VT	?	2.8-8.8	--	--	--	--	TEJEDOR Y MARINE, 1979
VB	?	nd-1.8	--	--	--	--	
VT	?	0.2-2.4	--	--	--	--	
VE	?	nd-0.05	--	--	--	--	
VM	?	0.4-0.6	--	--	--	--	BURDASPAL Y col., 1979
VB	6	0.09-6.11	--	--	--	--	
VR	3	0.09-1.09	--	--	--	--	
VT	12	0.22-4.20	--	--	--	--	SUBDEN Y col., 1979

V: Vino; VB: Vino blanco; VR: Vino rosado; VT: Vino tinto; VM: Vermut; VE: Vino espumoso.

Tabla 1. Contenidos (mg/L) de aminas biógenas en bebidas alcohólicas (II).

Tipo	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Ref. Bibliografica
VB	?	0.4-2.2	--	--	--	--	INIGO Y BRAVO, 1980
VT	?	0.2-6.4	--	--	--	--	
VG	?	1.5-6.4	--	--	--	--	
VT	8	nd-7.9	nd-15.6	nd-5.12	--	--	PECHANEK Y col., 1980
VB	34	--	tr-10.1	--	--	--	
VR	6	--	tr-2.7	--	--	--	
VT	27	--	0.2-7.7	--	--	--	
VE	3	--	0.5-2.7	--	--	--	RIVAS Y col., 1982
VM	3	--	0.6-0.9	--	--	--	
S	3	--	0.3-0.7	--	--	--	
VB	99	3.35±0.32	4.41±0.48	--	--	--	
VT	102	5.73±0.59	5.18±0.43	--	--	--	ZEE Y col., 1983
VG	17	3.48±0.70	2.17±0.82	--	--	--	
VG	3	5.48±2.16	nd	--	--	--	
S	9	nd	nd	--	--	--	
VB	1	nd	0.1	0.1	--	--	INGLES Y col., 1985
VR	1	0.4	0.8	nd	--	--	
VB	24	0.2-9.9	nd-0.5	--	--	--	
VT	15	1.1-11.1	nd-0.2	--	--	--	BAUCOM Y col., 1986
VE	4	0.5-1.0	nd-0.7	--	--	--	
V	71	nd-10	nd-7.3	nd-8.9	--	--	CERUTTI Y col., 1986

V: Vino; VB: Vino blanco; VR: Vino rosado; VT: Vino tinto; VM: Vermut; VE: Vino espumoso.
 VG: Vino generoso; S: Sidra.

Tabla 1. Contenidos (mg/L) de aminos biógenas en bebidas alcohólicas (III).

Tipo	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Ref. Bibliografica
VB	51	1.5*	7.5*	1.7*	nd	nd	MAYER y PAUSE, 1987
VT	151	2.0*	2.8*	1.7*	nd	nd	
VB	71	0.20-4.80	tr-5.10	--	--	--	VIDAL-CAROU, 1987
VR	26	0.15-4.00	0.15-5.40	--	--	--	
VT	127	0.20-34.25	0.45-7.80	--	--	--	
VB	4	0.9-13	0.50-7.50	--	--	--	
VR	6	0.22-0.89	0.75-1.70	--	--	--	LAHOZ-PORTOLES, 1989
VT	20	1.53-15.0	2.52-15.85	--	--	--	
V	33	<0.05-2.6	<0.05-5.4	<0.05-2.4	--	--	VECCHIO y col., 1989
VE	38	tr-3.31	0.36-2.36	--	--	--	
VM	15	0.21-2.65	tr-6.66	--	--	--	VIDAL-CAROU y col. 1989
S	10	tr-1.42	tr-2.93	--	--	--	

V: Vino; VB: Vino blanco; VR: Vino rosado; VT: Vino tinto; VM: Vermut; VE: Vino espumoso.
 * Valores medios

Tabla 1. Contenidos (mg/L) de aminos biógenas en bebidas alcohólicas (IV).

Tipo	nº	CADV	PUTN	AGMN	EPSM	ESPD	Ref. Bibliografica
VT	8	nd-3.02	0.73-16.2	--	--	--	PECHANEK y col., 1980
VB	99	0.92±0.17	1.94±0.18	--	--	--	
VT	102	0.66±0.11	1.94±0.18	--	--	--	ZEE y col., 1983
VG	17	0.23±0.16	3.33±1.28	--	--	--	
VG	3	nd	0.73±0.09	--	--	--	
S	9	nd	0.20±0.13	--	--	--	
VB	1	0.1	nd	--	--	--	INGLES y col., 1985
VR	1	0.8	0.3	--	--	--	
VB	24	3.2-108	0.7-11.7	--	--	--	
VT	15	4.0-47.0	0.6-5.5	--	--	--	BAUCOM y col., 1986
VE	4	9.0-13.6	2.0-3.0	--	--	--	
V	71	nd-1.2	0.2-15.0	--	--	--	CERUTTI y col., 1986
VB	51	0.3*	21.4*	--	--	--	MAYER y PAUSE, 1987
VT	151	0.1*	11.1*	--	--	--	

V: Vino; VB: Vino blanco; VR: Vino rosado; VT: Vino tinto; VG: Vino generoso; S: Sidra.
* Valores medios

1.1.1.2. Productos lácteos

VOIGT y EITENMILLER (1977), ANTILA y col., (1984) y JOOSTEN y STADHOUDERS (1987) coinciden en que los microorganismos "starters" utilizados para la fabricación del queso no son los responsables de las elevadas cantidades de aminas biógenas que eventualmente se pueden encontrar en este tipo de alimentos. Puntualizan también, que un queso elaborado con "starters" controlados no debería presentar niveles altos de aminas biógenas altos. VOIGT y EITENMILLER (1977) señalan que los fabricantes de "starters" comerciales deberían controlar las cepas y eliminar aquellas que presentaran una actividad descarboxilásica notable.

JOOSTEN y NORTHOLT (1987) señalan que la formación de aminas en el queso se debe exclusivamente a la acción de una microflora "advenediza", es decir contaminante. Concretamente, bacterias del ácido láctico [Lactobacillus, Streptococcus (Enterococos) y Pediococcus] y bacterias Gram-negativas (Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae) podrían ser consideradas como las responsables de la formación de aminas biógenas durante la elaboración de estos productos lácteos.

Estos mismos autores al realizar estudios sobre elaboración del queso en planta piloto y formación de aminas biógenas en planta piloto, observaron que:

1. El género Lactobacillus era uno de los más importantes respecto a la formación de aminas biógenas en el queso. Comprobaron que estos microorganismos eran capaces de generar elevadas cantidades de histamina y de tiramina, a lo largo de la maduración de un queso holandés, independientemente del tamaño del inóculo.
2. Los estreptococos eran capaces de formar cantidades relativamente elevadas de tiramina e incluso, a ciertos niveles de contaminación, podrían producir también β -feniletilamina.
3. Las enterobacterias fueron también grandes productoras de aminas (sobre todo cadaverina y putrescina), incluso a niveles de contaminación inferiores a los de los estreptococos.
4. La presencia de niveles elevados de Pediococcus parece no estar relacionada con niveles elevados de aminas biógenas y sobre todo de histamina.

ANTILA y col. (1984b) determinaron que la mayor formación de aminas biógenas se producía en quesos elaborados a partir de leches de baja calidad higiénica (con recuentos elevados de psicrotrofos y coliformes). Las aminas formadas en mayor cantidad fueron histamina, tiramina y cadaverina, mientras que fue menor la formación de 8-feniletilamina y putrescina.

Sin embargo, THAM (1988) afirma que los enterococos (Streptococcus faecium y faecalis) parecen no tener relevancia desde el punto de vista de formación de histamina en el queso. Sobre todo si su producción histamínica se compara con otras bacterias Gram-negativas, como por ejemplo Proteus morgani, que produce histamina en cantidades mucho más elevadas, en unas condiciones de crecimiento idénticas (medio y temperatura).

Por otra parte, SUMMER y col. (1985) señalan que los microorganismos entéricos histamino-productores, comunmente asociados con el deterioro del pescado, en general no proliferan en el queso. No obstante, deben existir otras bacterias histamino-productoras propias de los productos lácteos. Su desconocimiento puede ser debido a los pocos trabajos destinados a investigar la formación de aminas en quesos desde un punto de vista microbiológico.

Es interesante comentar, y no sólo para el caso de los quesos sino para todos los alimentos en general, el hecho de que determinadas especies bacterianas son halladas por algunos autores como grandes productoras de aminas, mientras que otros autores obtienen con las mismas especies resultados negativos, utilizando incluso condiciones de cultivo y de crecimiento similares. Esto en parte demuestra la dificultad que existe en realizar estos estudios y la gran variabilidad respecto a la actividad descarboxilásica que hay entre cepas microbianas de la misma especie. En la tabla 1 se muestran las propiedades descarboxilásicas para algunos aminoácidos de microorganismos halladas en quesos por algunos autores (JOOSTEN y NORTHOLT, 1987; SUMMER y TAYLOR, 1989; CHANDER y col., 1989; VOIGT y EITENMILLER, 1977; EDWARDS y SANDINE, 1981).

Tabla 2. Propiedades descarboxilasas de microorganismos aislados en el queso.

MICROORGANISMO	AMINOACIDO
<u>Lactobacillus buchneri</u>	His
<u>Lactobacillus 30a</u>	His
<u>Lactobacillus delbrueckii</u>	His
<u>Lactobacillus brevis</u>	His, Tyr
<u>Lactobacillus pentoaceticus</u>	His
<u>Lactobacillus bifidus</u>	His
<u>Lactobacillus plantarum</u>	His, Tyr, Trp
<u>Lactobacillus bulgaricus</u>	His, Tyr, Trp
<u>Streptococcus faecalis</u>	Tyr
<u>Streptococcus durans</u>	Tyr
<u>Streptococcus lactis</u>	His, Tyr
<u>Streptococcus liquefaciens</u>	His, Tyr
<u>Streptococcus faecium</u>	His, Tyr, Trp
<u>Streptococcus mitis</u>	His, Tyr, Trp
<u>Leuconostoc cremoris</u>	His, Tyr
<u>Micrococcus luteus</u>	His, Tyr
<u>Hafnia alvei</u>	Orn, Lys
<u>Escherichia coli</u>	Orn, Lys

Factores que influyen en la formación de aminas biógenas.

1. Grado de proteolisis

Es uno de los factores más importantes (EDWARDS y SANDINE, 1981; JOOSTEN, 1988; SUMMER Y TAYLOR, 1989) ya que determina el contenido de aminoácidos libres presentes en el queso. Las proteinasas que más influyen en este proceso son las del propio cuajo, las de las bacterias "starters" y las de posibles contaminantes. A su vez la proteolisis está influenciada por (JOOSTEN, 1988):

- La temperatura, el pH, la concentración de sal (ClNa), la actividad de agua, la microflora del queso (sobre todo los "starters"), los enzimas del cuajo y la pasteurización.

Todos los factores que favorezcan la proteolisis, y por tanto un aumento de los aminoácidos libres, favorecerán en principio la formación de aminas (JOOSTEN, 1988).

2. Concentración de piridoxina

EDWARDS y SANDINE (1981) señalan que este es un cofactor necesario para la reacción de descarboxilación y que está presente en el queso en concentración suficiente.

3. Concentración de aminoácidos precursores

La influencia de la concentración del substrato no parece ser igual para todas las aminas (JOOSTEN, 1988). La formación de tiramina y de β -feniletilamina no parece que sea aminoácido-dependiente, ya que la tirosina se encuentra en suficiente concentración en el queso, sino que parece estar más relacionada con el tipo de microorganismos. Por el contrario, la formación de triptamina parece ser dependiente de la concentración de su aminoácido precursor, lo que explicaría los niveles bajos de triptamina hallados en el queso, ya que la caseína es pobre en triptófano. La biogénesis de putrescina y de cadaverina, formadas por la acción de enterobacterias, se encuentra en parte limitada por la concentración del aminoácido precursor (ornitina y lisina, respectivamente) y en parte por la adición de nitrato, que provoca una disminución del crecimiento de los coliformes.

4. Factores físico-químicos

El pH del queso parece ser apropiado para la producción de aminas (entre 5 y 6.5, dependiendo del tipo y edad). La temperatura durante la elaboración y la actividad de agua del producto parece ser que tampoco evitarían o disminuirían substancialmente la producción de aminas. La concentración de sal puede ser un factor que limite el crecimiento de determinados microorganismos y por tanto el desarrollo de su actividad descarboxilásica (EDWARDS y SANDINE, 1981).

VOIGT y EITENMILLER (1977) añaden que las aminas biógenas se podrían formar por actividades enzimáticas no específicas, que estuvieran incrementadas durante los periodos de maduración.

Respecto a posibles reacciones de catabolismo, una vez las aminas se han formado, la mayoría de autores coinciden al señalar que en el queso no se observan reacciones de destrucción de aminas biógenas (VOIGT y EITENMILLER, 1977; EDWARDS y SANDINE, 1981; JOOSTEN, 1988).

Finalmente, JOOSTEN y VAN BOEKEL (1988) han propuesto un modelo cinético para predecir la eventual formación de histamina en el queso. Los autores diseñaron este modelo en base a una serie de suposiciones, como por ejemplo que la proporción de histidina liberada en un queso no contaminado es la misma que la que se produce en un queso contaminado por Lactobacillus. Para comprobar la validez del modelo, compararon experimentalmente las concentraciones de histamina y de histidina encontradas en un queso con las que predice el modelo cinético. Los resultados de los cálculos mostraron una buena correspondencia entre los valores teóricos y los determinados experimentalmente, al menos para el centro de la pieza de queso.

Aplicando este modelo cinético los autores concluyeron que la degradación de histamina no ocurre en el queso y que la concentración del aminoácido precursor es determinante para la formación de histamina en un queso contaminado con unos niveles de 10^8 UFC/g. También calcularon la cantidad de histamina que se puede formar en un queso contaminado con diferentes niveles de Lactobacillus. Los resultados obtenidos demuestran que, por ejemplo, en un queso Gouda con unos niveles máximos de contaminación 10^6 UFC/g, sólo se formarían 0.5 mmol/Kg de histamina en un año de maduración.

Los contenidos de aminas aromáticas y de diaminas y poliaminas hallados por varios autores en productos lácteos, se muestran en la tablas 3. En ellas, destacan los elevados contenidos de tiramina que se han hallado, en general, en los quesos, ya que en muchas muestras se superan los 1000 mg/Kg de esta amina. Recordemos que en 1903 Van Slikje y Hart, tras aislarla del queso, le asignaron el nombre de tiramina, del griego "tyros", que significa queso. Por otra parte, se aprecia en base a los datos aportados por los autores, que las cifras de histamina señaladas son también, en algunos casos, relativamente elevadas, del orden de 4000 mg/Kg, lo cual representaría una ingesta de 200 mg de esta amina al consumir 100 g de queso. Sin embargo, en el yogur, producto lácteo que también sufre un proceso de fermentación en su elaboración, la mayoría de los datos señalados demuestran la baja significación de estas aminas en estos alimentos.

Tabla 2. Contenidos (mg/Kg) de aminos biógenas en productos lácteos (I).

Tipo	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Ref. Bibliografica
Q	4	--	178-753	--	--	--	Blackwell y Mabbit, 1965 (JANZ y col., 1983)
Q	16	--	16-1710	--	--	--	Sen, 1969 (JANZ y col. 1983)
Q	11	280-2300	nd-1100	--	<10-1110	--	Voigt y col., 1974 (JANZ y col., 1983)
Q	?	tr-4100	tr-1085	--	--	--	De Vuyst y col., 1976 (SMITH, 1980)
Q	61	--	nd-1320	nd-435	nd-108	--	KOEHLER y EITENMILLER, 1978
Q	68	0.8-650	--	--	--	--	DEL PRETE y col., 1979
Q	4	nd-110	nd-77.5	--	--	--	PECHANEK y col., 1980
Q	76	--	tr-1480	--	--	--	MUÑOZ-ALCON y col. 1981
Q	31	10-2500	--	--	--	--	STARUSZKIEWICZ y BOND, 1981
Q	2	nd-5	nd-140	--	--	--	WORTBERG y col., 1981
Q	3	4.4-85.3	nd-98.8	nd	nd	--	HUI y TAYLOR, 1983
Q	76	1-935	nd-726	0-157	0-20	--	ANTILA y col., 1984
Q	11	nd-5630	nd-1520	--	nd-15	--	CHANG y col., 1985

Q: Queso

Tabla 2. Contenidos (mg/Kg) de aminos biógenas en productos lácteos (II).

Tipo	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Ref.Bibliografica
Q	4	nd-106	nd-166	nd-10	--	--	INGLES Y col., 1985
Q	4	--	nd-223	--	--	--	REUVERS Y col., 1986
Q	28	100-2120	50-850	--	nd	--	LALEYE Y col., 1986
Q	30	--	nd-4200	--	--	--	ADAMS Y col., 1988
Q	63	<22-1135	<22-1098	--	<64	--	JOOSTEN, 1988
Y	1	nd	nd	--	--	--	WORTBERG Y col., 1981
Y	2	nd	tr	--	--	--	MUNOZ-ALCON Y col.1981
Y	1	13	8.5	--	--	--	Suhren y col., 1982 (JANZ Y col., 1983)
Y	2	nd	nd	nd	--	--	INGLES Y col., 1985
Y	4	--	nd	--	--	--	REUVERS Y col., 1986

Q: Queso; Y: Yogur

Tabla 2. Contenidos (mg/Kg) de aminas biógenas en productos lácteos (III).

Tipo	nº	CADN	PUTN	AGMN	ESPM	ESPD	Ref. Bibliografica
Q	4	11.5-42.5	nd-40.6	--	--	--	PECHANEK Y col., 1980
Q	31	0.2-368.7	0.1-683.7	--	--	--	STARUSZKIEWICZ Y BOND, 1981
Q	3	nd-34.6	nd-29.1	--	--	--	HUI Y TAYLOR, 1983
Q	76	2-405	nd-271	--	--	--	ANTILA Y col., 1984
Q	4	nd-42	nd-44	--	--	--	INGLES Y col., 1985
Q	28	nd-350	nd-520	--	--	--	LALEYE Y col., 1987
Q	63	<40-572.3	<18-589	--	--	--	JOOSTEN Y col., 1988
Y	2	nd	nd	--	--	--	INGLES Y col., 1985

Q: Queso; Y: Yogur

1.1.1.3. Productos cárnicos.

Los microorganismos comunes en los procesos de fermentación/maduración de los embutidos son fundamentalmente bacterias del ácido láctico Pediococcus, Lactobacillus, Streptococcus y Micrococcus. (RICE y KOEHLER, 1976).

Con la finalidad de conocer el papel de este tipo de flora en la formación de aminas biógenas durante la elaboración de embutidos, RICE y KOEHLER (1976) realizaron estudios sobre la actividad descarboxilásica de esta flora, tanto a nivel de laboratorio como en un proceso real de maduración de un embutido. Comprobaron que Pediococcus cerevisiae y Lactobacillus sp. no mostraban actividad tirosina- ni histidina-descarboxilásica apreciable, cuando crecían en medios de cultivo a base de triptona, extracto de levadura, glucosa y enriquecidos con tirosina o histidina, según los casos. Tampoco demostraron actividad descarboxilásica cuando se cultivaron mezclas de estas dos especies bacterianas.

Por el contrario, BAUER y col. (1989) señalaron que los lactobacilos (L.brevis y L.curvatus) son los principales reponsables de la formación de histamina durante la fermentación de embutidos, ya que la concentración de estos microorganismos aumenta, al igual que la de histamina, en las primeras semanas de la maduración. También observaron una notable capacidad para formar histamina en la familia Enterobacteriaceae (Klebsiella sp, Proteus morganii y Edwardsiella sp.).

En cuanto a los Streptococcus sp., RICE y KOEHLER (1976) comprobaron que no presentaban actividad histidina-descarboxilásica detectable, mientras que sí apreciaba por parte de estos enterococos un gran actividad tirosina-descarboxilásica. Calcularon que con un buen substrato y un suficiente número de microorganismos (10^8 UFC/g) se podrían formar de 300 a 900 µg/g de tiramina entre 9 y 26 horas.

Respecto al uso de cultivos "starters", RICE y KOEHLER (1976) y EITENMILLER y col. (1978) señalaron que su empleo disminuye mucho la posibilidad de que se formen elevadas concentraciones de aminas biógenas. Además estos cultivos también evitan que se desarrollen microfloras paralelas, que podrían presentar actividades descarboxilásicas elevadas. Estos mismos autores señalaron que la formación de grandes cantidades de tiramina durante la maduración de un embutido crudo-curado se explica fundamentalmente por la microflora natural o "contaminante" que allí se desarrolla. Cuando el embutido se elabora utilizan-

do cultivos "starters" de Pediococcus o de Lactobacillus controlados, que provocan el desarrollo de una flora sin capacidad tirosina-descarboxilásica, se obtienen productos con niveles bajos de tiramina.

Factores que influyen en la formación de aminas biógenas.

1. Concentración del aminoácido precursor

RICE y KOEHLER (1976) y EITENMILLER y col. (1978) señalan que la concentración de tirosina es el factor que más influye en la formación de tiramina.

La disponibilidad de tirosina viene a su vez influenciada por la calidad de las materias primas empleadas y por el grado de proteolisis que se produzca durante la fermentación/maduración.

2. Condiciones físico-químicas

El pH ácido que se genera durante la fermentación del embutido es un factor favorable para la descarboxilación de aminoácidos (RICE y KOEHLER, 1976).

3. Microflora presente

La concentración de microorganismos y la actividad tirosina-descarboxilásica que manifiesten, pueden ser según RICE y KOEHLER (1976) un factor limitante importante para la formación de aminas biógenas.

La mayoría de datos sobre contenidos de aminas biógenas señalados para los embutidos se refieren a histamina y tiramina, como se observa en las tabla 4. La tiramina parece ser la amina mayoritaria en estos productos, ya que, en general, se observan contenidos más elevados de esta amina que de las otras. Además, se aprecia que los embutidos madurados-curados, como señalan varios autores (VANDEKERCKHOVE y DEMEYER, 1976; SANTOS-BUELGA, 1981; VIDAL-CAROU y col., 1990), presentan contenidos mucho más elevados de aminas biógenas, en general, que los embutidos cocidos, que sólo han sido sometidos a un tratamiento térmico. Por último, cabe destacar que en productos lácteos y derivados cárnicos se puede constatar que la amina mayoritaria en estos productos podría ser la tiramina (a falta de datos para otras aminas aromáticas, diaminas y poliaminas), mientras que el vino, producto obtenido también por procesos de fermentación, la amina mayoritaria parece ser la histamina, si bien esta amina ha sido la más ampliamente estudiada en este tipo de bebidas.

Tabla 3. Contenidos (mg/Kg) de aminas biógenas embutidos (I).

Tipo	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Ref. Bibliografica
M	49	0.7-7.8	nd-1237	--	--	--	RICE Y col., 1975
C	44	0.5-4.7	nd	--	--	--	RICE Y col., 1975
M	41	tr-197.4	101.8-1506.3	nd-60.6	--	--	VANDEKERCKHOVE Y DEMEYER, 1976
M	13	--	nd-374	nd-696	nd-66	--	KOEHLER Y EITENMILLER, 1978
?	20	2.7-450	--	--	--	--	DEL PRETE Y col., 1979
C	3	--	2.6-4.9	--	--	--	SANTOS-BUELGA Y col. 1981
M	17	--	4.9-301.2	--	--	--	SANTOS-BUELGA Y col. 1981
?	13	5-75	nd-175	--	--	--	WORTBERG Y col., 1981
M	?	10	101	--	--	nd	ROGOWSKI Y DÖHLA, 1984
M	20	3.2-94.6	114.5-267.9	nd-7.0	nd-26.3	5.9-38.7	TIECCO Y col., 1985
C	19	--	5.3-33.2	--	--	--	VIDAUD Y col., 1988
M	182	--	1.3-67.6	--	--	--	VIDAUD Y col., 1988
C	16	0.25-3.90	0.5-25.6	--	--	--	VIDAL-CAROU Y col., 1990
M	47	0.25-249.1	0.45-509.5	--	--	--	VIDAL-CAROU Y col., 1990

M: Embutido madurado-curado; C: Embutido cocido; ?: No especificado.

Tabla 3.		Contenidos	(mg/Kg)	de	aminas	biógenas	en	embutidos	(II).
Tipo	nº	CADN	PUTN	AGMN	ESPM	ESPD	Ref.	Bibliografica	
M	41	tr-55.7	31.3-395.7	--	--	--	VANDEKERCKHOVE Y DEMEYER, 1976		
M	10	nd-7	nd-1	--	20-69	1-9	NAKAMURA y col., 1979		
M	+4	nd-47	nd-111	--	34-69	tr-9	ROGOWSKI Y DÖHLA, 1984		
M	20	3.7-266.7	42.6-256.8	--	0.9-32.6	1.1-12.4	TIECCO y col., 1985		

M: Embutido madurado-curado.

1.1.2. ALIMENTOS EN LOS QUE LAS AMINAS BIOGENAS SON CONSECUENCIA DE PROCESOS DE DETERIORO/DESCOMPOSICION (Grupo II)

1.1.2.1. Pescados y productos derivados

La presencia de aminas biógenas en pescado es consecuencia en general de una actividad microbiana no deseada, pues implica un deterioro (excepto en aquellos derivados que requieran para su obtención procesos fermentativos, como por ejemplo semiconservas de anchoa).

La higiene puede ser el factor más importante que condiciona la formación de aminas biógenas en pescado. La flora microbiana normal del pescado (Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium, Vibrio, Micrococcus y Bacillus) no parece tener gran capacidad aminoácido-descarboxilásica (NIVEN y col. 1981; TAYLOR, 1985).

La actividad descarboxilásica se relaciona más con microorganismos que pueden encontrarse en pescados como consecuencia de contaminaciones externas, p.e. enterobacterias (KAROLUS y col., 1985) o por microorganismos de los géneros Clostridium, Lactobacillus (YOSHINAGA y FRANK, 1982; EITENMILLER y de SOUZA, 1984; TAYLOR, 1985; MIDDLEBROOKS y col., 1988).

Las enterobacterias Proteus morgani, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes y Hafnia alvei son las más comúnmente relacionadas con la formación de histamina en pescados (EITENMILLER y col., 1981; NIVEN y col., 1981; TAYLOR y WOYCHIK, 1982; EITENMILLER y de SOUZA, 1984; TAYLOR, 1985). Hevelka en 1967 comprobó que un 71.47% de las enterobacterias aisladas del pescado tenían capacidad para producir histamina (EITENMILLER y de SOUZA, 1984). Respecto a otras aminas, ALLISON y MACFARLANE (1989) señalan a Clostridium perfringens como productor de putrescina y cadaverina.

Los microorganismos productores de aminas biógenas podrían contaminar el pescado a través de:

- el contacto con superficies no limpias (NIVEN y col. 1981),
- el propio manipulador, durante la captura o bien durante el procesado (TAYLOR, 1985; MIDDLEBROOKS y col., 1988),

- el medio ambiente (aguas contaminadas) (MIDDLEBROOKS y col., 1988) y
- la piel, las agallas y los intestinos (YOSHINAGA y FRANK, 1982). El intestino es la mayor fuente de bacterias responsables de la formación de histamina en el atún. La degradación post-mortem del intestino libera su contenido de microorganismos dentro de la cavidad visceral y en el tejido muscular adyacente.

BEHLING y TAYLOR (1982) señalan que los microorganismos productores de histamina pueden dividirse en dos grupos, atendiendo a la capacidad de formación de esta amina:

- a. Bacterias formadoras de grandes cantidades de histamina (>100 mg/100 mL), en un medio de cultivo adecuado y durante un periodo corto de incubación (<24h) a una temperatura mayor a 15⁰C. En este grupo se hallarían incluidas Proteus morganii, Klebsiella pneumonia y Enterobacter aerogenes y destacaría por su gran capacidad de producción Proteus morganii (TAYLOR y SPECKHARD, 1978; MACKIE y FERNANDEZ, 1979; EITENMILLER y col., 1981).
- b. Bacterias formadoras de bajas cantidades de histamina (<25 mg/ 100 mL), en el mismo medio de cultivo pero tras una incubación de 48h y una temperatura de 30⁰C. Entre éstas se pueden citar Hafnia alvei, Citrobacter freundii y Escherichia coli.

Debido a la elevada capacidad de producción de histamina de las bacterias incluidas en el primer grupo, un pescado contaminado con estos microorganismos, puede presentar una elevada concentración de histamina incluso después de un periodo corto de almacenamiento (deterioro) (TAYLOR y WOYCHIK, 1982).

BEUTLING y SCHEIBER (1986) han señalado que una cepa microbiana posee interés higiénico-alimentario cuando es capaz de producir en el pescado más de 50 µg de histamina por gramo.

Un pescado con signos de alteración evidente y con un contenido de histamina elevado, probablemente no será consumido, mientras que un pescado con una buena apariencia y un posible nivel elevado de histamina podría ser consumido. Consecuentemente, bacterias como Proteus morgani y Klebsiella pneumoniae, capaces de producir grandes cantidades de histamina en un periodo de tiempo corto, son las que hay que tener más en cuenta (BEHLING y TAYLOR, 1982; TAYLOR y WOYCHIK, 1982). La contaminación del pescado por parte de estas bacterias debe ser controlada durante su manipulación, almacenamiento, procesado y preparación.

La producción de histamina por Hafnia alvei, Clostridium freundii y Escherichia coli a 30°C y 37°C puede tener poca importancia debido a la rápida descomposición del pescado a estas temperaturas. La capacidad de Klebsiella pneumoniae y Proteus morgani de producir niveles significativos de histamina, a temperaturas de incubación de 15°C e incluso de 7°C, puede ser importante debido a que la descomposición del pescado a estas temperaturas es más lenta (BEHLING y TAYLOR, 1982). Se ha comprobado que Klebsiella pneumoniae puede crecer y producir enzimas con capacidad descarboxilásica a temperaturas relativamente bajas (BARANOWSKY y col., 1985). Por tanto, la formación de aminas biógenas se podría producir en el mismo buque, durante el viaje de vuelta, si el pescado se guarda bajo unas condiciones higiénicas y de refrigeración inadecuadas.

Las bacterias amino-productoras pueden ser difíciles de aislar, debido a que generalmente representan una minoría de la flora bacteriana presente en un pescado recién capturado. También su crecimiento puede ser detenido rápidamente como consecuencia de la refrigeración o congelación a que es sometido el pescado (NIVEN y col., 1981).

Además existen también otros factores que pueden provocar variabilidad en los resultados obtenidos por los diferentes autores al intentar aislar los microorganismos productores de aminas. Así pueden influir la cepa o cepas de bacterias, el inóculo inicial, el tipo de medio de cultivo, las condiciones de crecimiento (temperatura y tiempo), entre otros, escogidos para el estudio (BEHLING y TAYLOR, 1982; BARANOWSKI y col., 1985).

La formación de cantidades elevadas de histamina se ha relacionado sobre todo con pescados de las familias Scombridae y Scomberesocidae, comunmente agrupadas bajo el nombre de "Escómbridos". Respecto a otras especies de pescado, diferentes de los escómbridos, STEDE y STOCKEMAR (1982) estudiaron la formación de amins biógenas en pescados "blancos" del atlántico norte como la Gallineta nórdica (Sebastes marinus) y el bacalao, entre otros, y observaron una flora predominante psicrófila con actividad lisina- y ornitina-d Descarboxilásica. Comprobaron que se formaban elevadas cantidades de cadaverina durante el almacenamiento, siempre que existiera lisina libre. Esta formación fue observada incluso a temperaturas cercanas al punto de congelación y no iba acompañada de una formación paralela de histamina.

Factores que influyen en la formación de amins biógenas

1. Concentración de aminoácidos precursores

LOHS y KÄMPKE (1980) señalaron que sólo se puede esperar formación de amins biógenas en aquellos pescados cuya carne contenga aminoácidos precursores libres.

En el tejido muscular de los Escómbridos se encuentran cantidades relativamente elevadas de aminoácidos básicos, y entre ellos la histidina, siendo esta la razón por la que más frecuentemente se relacionan con contenidos elevados de histamina (EITENMILLER y de SOUZA, 1984; TAYLOR, 1985).

La cantidad presente de aminoácidos precursores en el músculo del pescado dependerá fundamentalmente del grado de proteólisis, ya sea por enzimas endógenos propios del pescado o por la actividad de flora contaminante.

2. pH

Se considera óptimo para la formación de histamina un valor de pH entre 5.1 y 6.5, siendo el pH del tejido muscular de los escómbridos entre 6.0 y 6.5 (BALDRATI y col., 1980). Para Proteus morgani se ha señalado un pH óptimo entre 6 y 6.5, para Clostridium perfringens y Escherichia coli un valor entre 2.5 y 3.2 y para Klebsiella pneumoniae un pH de 4, aunque se menciona que a pH de 6 mantiene todavía un 70% de su actividad Descarboxilásica (BARANOWSKY y col., 1984).

3. Tiempo, temperatura y condiciones del almacenamiento del pescado desde su captura hasta su tratamiento (industrial o culinario).

YOSHIDA y NAKAMURA (1982) y YAMANAKA y col. (1984) comprobaron que a partir de pescado fresco, en el que no se detectaba histamina, fueron suficientes 24 h, a temperatura ambiente, para que se formaran 28.4 mg/Kg de histamina y 48 h para que se alcanzaran 1540 mg/Kg.

FRANK y YOSHIHAGA (1984) señalaron que cuanto más baja sea la temperatura mayor será el tiempo necesario para que se alcancen cifras elevadas de aminos. VECIANA-NOGUES y col. (1989) observaron que en anchoas se formaban cantidades del orden de 100 mg/Kg de tiramina y de histamina tras 8 h de almacenamiento a temperatura ambiente (18-22°C), mientras que a una temperatura de 4°C eran necesarias del orden de 60 h, para alcanzar los mismos niveles de ambas aminos.

Si bien en general al aumentar la temperatura se favorece el desarrollo de la flora bacteriana y su actividad enzimática, ésta última puede descender por desnaturalización del enzima. Para tener unas condiciones de producción máxima sería necesario establecer una temperatura de compromiso entre estos dos parámetros (EITENMILLER y col., 1981).

Los contenidos más elevados de aminos biógenas se han señalado sobre todo para las semiconservas de pescado, como se observa en la tabla 5. Para las conservas los contenidos de histamina son, en general, superiores a los de tiramina en las mismas muestras, si bien se observa, como en otros alimentos, una gran variabilidad que en las cifras, lo cual dificulta el conocer la verdadera significación de estas sustancias en los alimentos. En el pescado fresco (o congelado) los contenidos de histamina y de tiramina señalados son variables, aunque se aprecia que en la mayoría de los casos son más bajos que los señalados para las conservas, si bien los estudios realizados en pescado fresco son relativamente escasos.

A diferencia de otros alimentos susceptibles de contener niveles elevados de aminos, el pescado es el producto en el que se ha estudiado más la significación de otras aminos biógenas, como cadaverina y putrescina y sobre todo espermina y espermidina. Se observa que para conservas, en base a los datos aportados por algunos autores, los contenidos de estas aminos son relativamente bajos y, en general, inferiores a los de histamina señalados en las mismas muestras.

Tabla 4. Contenidos (mg/Kg) de aminos biógenas en pescado y derivados (I).

Tipo	nº	HISTN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Ref.Bibliografica
CONSERVAS							
A	141	0.28-507.3	--	--	--	--	MIETZ Y KARMAS, 1977
A	11	16-74.1	--	--	--	--	
S	10	3.1-13.8	--	--	--	--	TAYLOR Y col., 1978
C	18	12-45	--	--	--	--	
A	60	0.60-9.50	--	--	--	--	DEL PRETE Y col., 1979
B							
S							
A	34	1.0-17.0	--	--	--	--	KIM Y BJELDANES, 1979
A*	15	9.7-200	--	--	--	--	
S	?	25-48	--	--	--	--	YAMANAKA Y col. 1980
S	10	10-850	5-600	--	--	--	WORTBERG Y col., 1981
A	2	60-640	<50	--	--	--	
C	7	5-10	nd	--	--	--	
S	?	22.4	--	--	--	--	KOH Y PARK, 1982
C	?	113-288	--	--	--	--	
S	?	613-1440	--	--	--	--	WAAD Y col., 1982
S	3	1100-2400	--	--	--	--	PAN Y JAMES, 1983

A: Atún; A*: Atún deteriorado; S: sardina; B: Bonito; C: Caballa.

Tabla 4. Contenidos (mg/Kg) de aminas biógenas en pescado y derivados (II).

Tipo	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Ref. Bibliografica
CONSERVAS							
S	10	<0.1-374	--	--	--	--	PECHANEK Y col., 1983
S	9	--	nd-1.9	--	--	--	SANTOS-BUELGA Y col.1984
A	4	nd-3	--	--	--	--	WALTERS, 1984
A	10	nd-5	--	--	--	--	FERNANDEZ-SALGUERO Y MACKIE, 1987
C	11	nd-5	--	--	--	--	COGUL-ARDEVOL, 1988
S	11	nd-5	--	--	--	--	VECIANA-NOGUES Y col. 1989
A	21	--	tr-7.75	--	--	--	BENAIGES-BENAIGES, 1990
S	18	--	0.65-5.35	--	--	--	
AQ	3	--	0.90-8.45	--	--	--	
C	3	--	1.10-2.65	--	--	--	
A	12	1.50-30.95	0.45-7.75	--	--	--	
S	12	4.40-20.80	0.70-8.90	--	--	--	
C	5	6.60-28.30	0.60-2.60	--	--	--	
AQ	5	1.35-9.30	0.15-9.50	--	--	--	
S	62	0.45-25.80	nd-41.15	--	--	--	
SEMICONSERVAS							
PP	6	78-640	nd-160	nd-600	nd-163	--	FARDIAZ Y MARKAKIS, 1979

A: Atún; A*: Atún deteriorado; S: Sardina; B: Bonito; C: Caballa. AQ: Arenque;
PP: Pasta de pescado.

Tabla 4. Contenidos de aminos biógenas en pescado y derivados (III).

Tipo	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Ref. Bibliografica
SEMICONSERVAS							
C Y AQ	12	5-40	nd-30	--	--	--	WORTBERG Y col., 1981
PP	6	nd-1050.5	--	--	--	--	YOSHIDA Y NAKAMURA, 1982
AN	10	--	9.6-66.4	--	--	--	COGUL-ARDEVOL, 1988
AN	13	7.70-219.2	14.3-66.4	--	--	--	VECIANA-NOGUES Y col. 1989
PESCADO (fresco y congelado)							
PB	9	0.12-1.58	--	--	--	--	
SM	9	0.34-4.20	--	--	--	--	MIETZ Y KARMAS, 1978
CR	6	nd-0.38	--	--	--	--	
A Y S	18	0.06-9.0	--	--	--	--	DEL PRETE Y col., 1979
PB	5	nd-6.58	--	--	--	--	PECHANEK Y col., 1980
PB	5	nd-894	--	--	--	--	WALTERS, 1984
PB	2	nd-10	nd-2	nd-2	--	--	INGLES Y col., 1985
S	10	tr-3.20	nd-0.15	--	--	--	BENAIGES-BENAIGES, 1990

A: Atún; S: Sardina; B: Bonito; C: Caballa. AQ: Arenque; AN: Anchoa; PB: Pescado blanco; SM: Salmón; CR: Crustáceos (langostinos y gambas); PP: Pasta de pescado.

Tabla 4. Contenidos (mg/L) de aminos biógenas en pescado y derivados (IV).

Tipo	nº	CADN	PUTN	AGMN	ESPM	ESPD	Ref. Bibliografica
CONSERVAS							
A	141	nd-56.42	nd-7.62	--	nd-19.0	nd-7.38	MIETZ Y KARMAS, 1977
A	34	nd-3.70	nd-2.50	--	0.2-2.9	0.5-7.90	KIM Y BJELDANES, 1979
A*	15	2.4-21	nd-5.60	--	nd-2.2	nd-4.90	
S	10	<10-270	<10-115	--	--	--	WORTBERG Y col., 1981
A	2	<50-50	<50-90	--	--	--	
C	7	nd	nd	--	--	--	
A	10	nd-5	nd-5	--	5-25	nd-15	
C	11	nd-15	nd-15	--	5-25	nd-25	FERNANDEZ-SALGUERO Y
S	11	nd-5	nd-15	--	5-15	nd-15	MACKIE, 1987
PESCADO (fresco y congelado)							
PB	9	0.9-62.6	0.5-30.3	--	0.4-1.8	0.3-0.7	
SM	9	3.3-114.2	4.8-21.6	--	3.0-9.3	4.4-39	MIETZ Y KARMAS, 1978
CR	6	0.5-65.7	1.4-308	--	nd-2.5	nd-0.6	
PB	5	nd-34.3	nd-6.2	--	6.8-24.0	--	PECHANEK Y col., 1980
PB	2	nd	nd	--	--	--	INGLES Y col., 1985

A: Atún; A*: Atún deteriorado; S: Sardina; B: Bonito; C: Caballa. AQ: Arenque; AN: Anchoa;
 PB: Pescado blanco; SM: Salmón; CR: Crustáceos (langostinos y gambas); PP: Pasta de pescado.

1.1.2.2. Carnes y derivados

Slemr en 1981 (SAYEM-EL-DAHER y SIMARD, 1985) estudió la evolución de putrescina, cadaverina, histamina, espermidina y espermina en carne de ternera y de cerdo en descomposición. Encontró una relación entre Pseudomonas y formación de putrescina y entre enterobacterias y cadaverina. Sin embargo, no fue hallada ninguna correlación entre histamina, espermina, espermidina y los microorganismos presentes.

Baugmart y col. en 1979 (SAYEM-EL-DAHER y SIMARD, 1985) estudiaron la correlación entre histamina, tiramina y flora bacteriana en ensaladas de carne durante su descomposición, observando que Lactobacillus brevis parecía ser el responsable de la producción de histamina y de tiramina y Pediococcus cerevisiae el de histamina.

Sin embargo, no se han realizado muchos más estudios destinados a conocer la actividad descarboxilásica de microorganismos relacionados con procesos de descomposición de la carne, a diferencia de los relativamente abundantes trabajos realizados para estudiar este tema.

SAYEM-EL-DAHER y SIMARD (1985) encontraron un elevado coeficiente de correlación ($r=0.91$) entre coliformes y formación de cadaverina, aunque era necesaria una presencia considerable de coliformes ($\geq 10^5$ UFC/g) para que se formara esta amina. Estos autores también siguieron la evolución de la actividad lisina-descarboxilásica en carne de ternera almacenada a 4°C . Observaron que en una carne contaminada con bacterias lisina-descarboxilásica positivas, éstas sólo son susceptibles de producir cadaverina durante un intervalo de tiempo corto y a una temperatura de 4°C , ya que posteriormente la actividad descarboxiladora decrece y también paralelamente la formación de esta amina. Para la putrescina, espermidina y tiramina, observaron que su formación estaba correlacionada con los recuentos totales de aeróbicos y con los de psicrófilos, siendo el coeficiente de correlación de la putrescina el más elevado. Por el contrario, no se pudo relacionar la formación de histamina y de espermina con ninguno de los microorganismos detectados en ese estudio.

Se han descrito también incrementos en la concentración de aminas (EDWARDS y col., 1985) durante el almacenamiento a 5°C de porciones de carne de vacuno empacutada al vacío. En concreto, se ha podido comprobar que la formación de diaminas en esta carne, almacenada a 1°C , parece estar relacionada con la actividad de Hafnia

alvei y Serratia liquefaciens (EDWARDS y col., 1985; DAINTY y col., 1986). Las bacterias del ácido láctico, como Leuconostoc y Streptococcus, no parecen producir ni cadaverina ni putrescina en la carne.

DAINTY y col. (1986) propusieron dos hipótesis para explicar la formación de diaminas en carne envasada al vacío durante su almacenamiento:

1. La cadaverina se formaría a partir de la descarboxilación de la lisina por acción de enterobacterias, y no se requiere la presencia de otros microorganismos.
2. La formación de putrescina posiblemente requiera el crecimiento de otros microorganismos, como por ejemplo bacterias del ácido láctico, que incrementarían la producción de ornitina, y ésta sería finalmente descarboxilada a putrescina por acción de las enterobacterias.

1.2.3. ALIMENTOS CON AMINAS BIOGENAS PREFORMADAS (Grupo III)

En los alimentos puede existir una cierta cantidad de aminas biógenas preformadas, es decir no atribuible a la actividad microbiana. Se ha citado que la histamina puede encontrarse de esta forma en alimentos en cuya composición intervenga hígado, sangre, piel e intestinos. En estos casos la histamina procedería de la materia prima (productos de origen animal) empleada en la elaboración del alimento (HENRY, 1960).

En alimentos sometidos a tratamientos térmicos energéticos, algunas aminas se pueden formar por descarboxilación térmica de los aminoácidos precursores (SMITH, 1980). La β -feniletilamina presente en el chocolate se puede formar por descarboxilación durante el tostado de los granos de cacao (SMITH, 1980).

También se encuentran de forma natural ciertas cantidades de aminas biógenas (tiramina, serotonina, triptamina) en varios productos de origen vegetal, como limón, aguacate, frambuesa, espinacas, plátano, cereales, etc... (SMITH, 1980 y 1981; GARCIA-MORENO, 1981). Se han detectado cantidades considerables de putrescina, cadaverina, espermidina y espermina en granos de cebada, arroz, avena y maíz, siendo las semillas de cebada las que presentan mayores contenidos de diaminas y poliaminas (SMITH, 1981).

En los cereales la putrescina se forma a partir de la arginina, con la agmatina como metabolito intermedio. La espermina y la espermidina se sintetizan a partir de la putrescina por transferencia de 1 o 2 grupos de aminopropilo, respectivamente, donados por la S-adenosil-metionina (Figura 4). La mayoría de estas aminas se producen en periodos en los que el crecimiento de la planta está estimulado, como es el caso de la germinación del embrión que es cuando existe una actividad biosintética máxima (SMITH, 1970; SMITH y col., 1979; SMITH, 1981). En condiciones de deficiencia de potasio y magnesio y especialmente con elevadas concentraciones de iones amonio en la tierra, la agmatina y la putrescina se acumulan en las plantas (SMITH, 1980-81; ADAMS y col. 1990). La explicación a este fenómeno podría ser que las aminas sean formados por la planta como cationes inorgánicos para controlar el pH intracelular.

También la actividad arginina-d Descarboxilásica, con la consecuente producción de cadaverina, presenta una actividad máxima durante la época de crecimiento de las plantas (SMITH, 1981).

La triptamina, frecuente en leguminosas, y la serotonina, en aguacates, plátanos, tomates, ciruelas, ... se sintetizan a partir del triptófano (Figura 5). Sin embargo, estas aminas no se han podido relacionar con ninguna función fisiológica en las plantas (SMITH, 1977; SMITH, 1980; GARCIA-MORENO, 1981).

A partir de la tirosina se forman tiramina, octopamina y hordenina, amina esta última que se encuentra comunmente en las semillas de cebada (SMITH, 1981).

Figura 4. Síntesis de putrescina, espermidina y espermina en plantas superiores (SMITH, 1981).

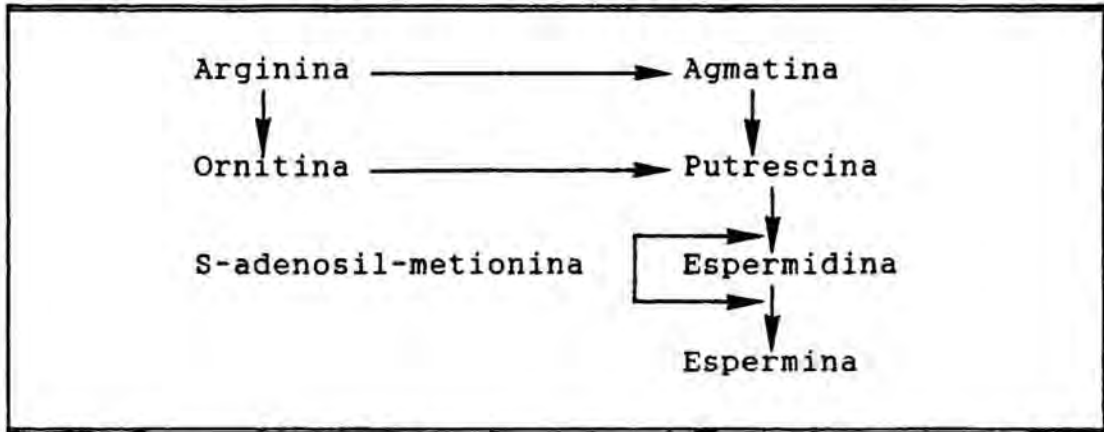
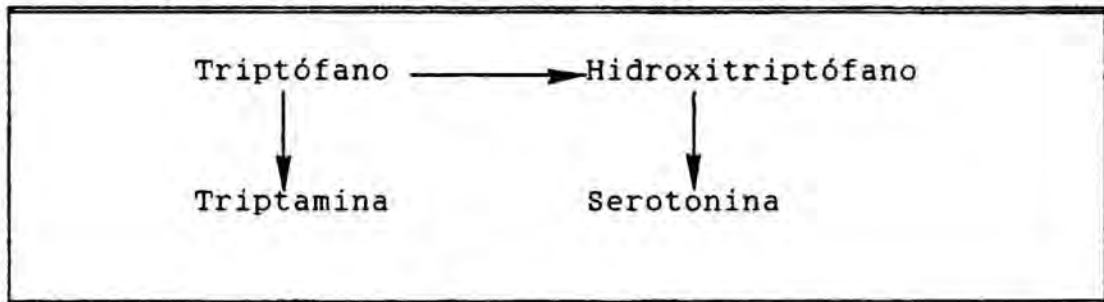


Figura 5. Síntesis de triptamina y serotonina en plantas superiores (SMITH, 1981).



1.2. AMINAS BIOGENAS Y CALIDAD HIGIENICO-SANITARIA DE LOS PROCESOS DE ELABORACION

La presencia de contenidos elevados de aminos biógenas en ciertos alimentos ricos en proteínas (carne, pescado,...) parece ser consecuencia de una actividad microbiana relacionada con procesos de deterioro. También, la formación de aminos biógenas, en productos que se obtienen por fermentación, puede ser consecuencia de la instauración de microorganismos contaminantes, con actividad descarboxilásica, ajenos a la propia flora microbiana implicada en la elaboración de los alimentos.

Atendiendo a este planteamiento, numerosos autores han propuesto la determinación analítica de estas aminos como criterio de evaluación de la calidad higiénica durante el proceso de elaboración, desde la obtención de materias primas hasta el producto final. En definitiva, las aminos biógenas podrían ser "indicadoras" de la "bondad" del proceso tecnológico aplicado en la elaboración de los alimentos.

No obstante, el empleo de estas aminos biógenas como "indicadores" de la calidad higiénico-sanitaria estaría condicionado por dos puntos claves (VIDAL-CAROU, 1987):

1. que se conocieran sus niveles en productos aceptables para el consumo, para así poder realizar comparaciones,
2. que se estableciera su evolución durante los procesos de descomposición bacteriana y durante los de fermentación/maduración, y que esta evolución no obedeciera a causas aleatorias y esporádicas .

Otro punto a considerar es la posibilidad que la ausencia de niveles importantes de aminos biógenas en un alimento no indique necesariamente su elaboración ha sido correcta, ya que han podido existir contaminaciones bacterianas no productoras de aminos. Mossel en 1970 (BINDER y BRANDL, 1983) señaló que existen toda una serie de bacterias higiénicamente importantes que no poseen enzimas descarboxiladores de aminoácidos.

Es necesario hacer una distinción entre productos obtenidos por fermentación y los alimentos en los que la aparición de aminos sería el resultado de procesos de deterioro.

A. Alimentos fermentados y/o madurados (Grupo I)

La presencia de niveles relativamente elevados de aminas biógenas en un alimento de este grupo (quesos, embutidos, bebidas alcohólicas fermentadas) podría indicar:

- Uso de materias primas en un estado deficiente, como consecuencia del desarrollo de procesos de descomposición bacteriana; o bien de la aplicación de tratamientos que han favorecido la formación de estas aminas durante la obtención de las materias primas.

- Desarrollo del proceso de fermentación/maduración en condiciones no óptimas desde un punto de vista higiénico, que hayan provocado la presencia de microorganismos contaminantes con actividad aminoácido-descarboxilasa, paralelamente a la microflora propia del proceso de elaboración. Señalaremos que este punto es especialmente importante si se acepta que las levaduras y microorganismos implicados en los procesos de fermentación/maduración ejercen una influencia mínima sobre la presencia de aminas biógenas en este tipo de alimentos, tal y como señalan la mayoría de los autores.

- Almacenamiento y conservación de los productos en unas condiciones no idóneas, que puedan ocasionar una eventual contaminación con microorganismos productores de aminas.

RICE y KOEHLER (1976) y CERUTTI (1986) recomiendan las siguientes medidas tecnológicas para evitar o disminuir la formación de aminas, durante la elaboración de productos fermentados/madurados:

- a. Higiene adecuada en las plantas de producción.
- b. Empleo de periodos cortos de fermentación (siempre que sea posible).
- c. Tratamientos térmicos sobre la materia prima, para asegurar la ausencia de microorganismos contaminantes.
- d. Empleo de cultivos iniciadores de la fermentación ("starters") con baja o nula actividad descarboxilásica.

Respecto al último punto señalado, EITENMILLER y col. (1978) indican que el uso de "starters" en la elaboración de embutidos implica que descienda la posibilidad de que se desarrolle una microflora ajena, con capacidad tirosina-descarboxilásica.

EDWARDS y SANDINE (1981) y JOOSTEN (1988) señalan que la pasteurización de la leche conduce a quesos con un menor contenido de aminos. Por tanto, el control de la calidad bacteriológica de la leche puede ser un factor que ayude a disminuir el riesgo de la formación de aminos biógenas en estos productos.

Respecto al vino y a otras bebidas alcohólicas de origen fermentativo, se ha señalado que la higiene durante la elaboración de estas bebidas puede ser uno de los factores más importantes que condicionan la formación de aminos biógenas. Incluso se ha llegado a afirmar textualmente que "un vino elaborado en condiciones óptimas desde un punto de vista higiénico debería estar prácticamente exento de aminos" (CERUTTI y REMONDI, 1972). BATTAGLIA y FRÖHLICH (1978) y AERNY (1985) señalan que la presencia de histamina y de otras aminos "indeseables" (tiramina, β -feniletilamina,....) podría ser considerada como indicadora de una elaboración defectuosa en los vinos.

DESSER y BANDION (1985) señalan además el interés de la determinación de las aminos biógenas para conocer el estado de conservación del vino, pues comprobaron que durante su almacenaje en botellas se producían variaciones cuantitativas en los contenidos de las mismas y en base a sus resultados señalan que debe atribuirse un papel importante a las aminos biógenas como parámetros de calidad. Por el contrario, VIDAL-CAROU y col. (1991) no observaron formación de histamina ni de tiramina durante el deterioro de cuatro vinos.

CERUTTI (1989a) en un artículo en el cual propone unos "nuevos índices de calidad para los alimentos y bebidas", manifiesta que en las bebidas alcohólicas, como vino, cerveza y sidra, los contenidos de histamina y de tiramina no deberían ser superiores a 1mg/L y los de otras aminos (triptamina, β -feniletilamina,...) no superiores a 5 mg/L. En cuanto a los quesos, la tiramina no debería sobrepasar los 100 mg/Kg y la histamina los 25 mg/Kg. Este autor indica que si se siguen unas "buenas técnicas de elaboración", el no sobrepasar estas cifras no ha de representar para el fabricante ningún tipo de problema.

B. Alimentos en los que las aminas biógenas son consecuencia de procesos de deterioro/descomposición (Grupo II).

La presencia de aminas biógenas en carne o en pescado que se consumen frescos o "presuntamente" frescos podría implicar:

- El desarrollo de procesos de deterioro/descomposición bacteriana durante su almacenamiento o procesado.

DEL PRETE y col. (1979) señalan como posibles causas de contaminación y de la instauración de procesos degenerativos de la materia prima: el transporte a largas distancias en condiciones de conservación inadecuadas, desde el lugar de captura o sacrificio hasta la planta procesadora, y la producción a gran escala, que conlleva en muchos casos almacenamientos masivos y prolongados.

En conservas de pescado o de productos cárnicos, niveles elevados de aminas podrían indicar que:

- El pescado o la carne de partida no se encontraban en las condiciones bacteriológicas más idóneas, aunque los microorganismos no se detecten en el producto final, ya que pueden haber sido destruidos en diversas etapas del proceso de elaboración (DEL PRETE y col., 1979). Las aminas son compuestos fijos (no volátiles) y por tanto permanecerán en el alimento, independientemente de que se realicen procesos de esterilización destinados a destruir la flora microbiana (VIDAL-CAROU, 1987).

Las **semiconservas de pescado** (como las de anchoa o los productos ahumados) pueden mostrar contenidos elevados de aminas biógenas debido a la posibilidad de que se utilicen materias primas de baja calidad. Además, en este tipo de productos, también es posible que las aminas aparezcan a lo largo de su elaboración, ya que en la misma se incluyen procesos de maduración que pueden involucrar microorganismos con capacidad aminoácido-descarboxilásica. En las semiconservas no se aplica un tratamiento térmico final estabilizador y por ello en principio puede continuar la formación de aminas por acción microbiana, sobre todo si no se mantienen en condiciones de refrigeración) (SANTOS-BUELGA y col., 1986; VECIANA-NOGUES y col., 1990). A este respecto JÖCKEL y col. (1986) señalaron que para

evitar el desarrollo de flora bacteriana formadora de aminas en pescados ahumados (trucha, salmón y caballa) se ha de mantener de una forma estricta la cadena del frío de los productos envasados, en todas las fases del comercio, y se ha de limitar el plazo de consumo preferente a un máximo de 3 semanas.

La mayoría de autores están de acuerdo en que durante el almacenamiento/deterioro de la carne de vacuno o porcino se forman aminas biógenas (NAKAMURA y col., 1979; WORTBERG y WOLLER, 1982; EDWARDS y col., 1983; VIDAL-CAROU, y col., 1990b). No obstante, no parece existir tanta unanimidad en lo que se refiere a que amina (o aminas) sería la más idónea como indicadora de que aquel producto ha sufrido algún tipo de deterioro y por tanto no es apto para su utilización y/o comercialización.

EDWARDS y col. (1985) y SAYEM-EL-DAHER y col. (1984) señalaron que la presencia elevada de diaminas en la carne podría ser utilizada como criterio para determinar, de una forma objetiva, el grado de deterioro de la carne. Asimismo, indicaron que esta práctica presentaría una cierta ventaja respecto a los métodos que se utilizan actualmente para juzgar el estado de una carne, como son la observación del olor y del aspecto, dado su carácter subjetivo.

SAYEM-EL-DAHER y col. (1984) añaden que la putrescina sería la amina biógena que podría tener más importancia como indicador de la frescura de la carne, ya que presenta una muy buena correlación con el crecimiento de las bacterias implicadas en el proceso de descomposición de la carne. La cadaverina, sin embargo, podría ser un buen indicador de la temperatura de almacenamiento de la carne, ya que se ha observado que su comportamiento varía en función de la misma.

Respecto a la histamina, se ha señalado que no es un buen indicador del grado de deterioro de la carne, ya que su formación es escasa, incluso cuando se presenta un claro deterioro. Una posible explicación sería que los niveles de histidina presentes en la carne son menores a los de los escómbridos (SAYEM-EL-DAHER y col., 1984). Sin embargo, VIDAL-CAROU y col. (1990b) observaron una formación elevada de histamina durante el almacenamiento/deterioro de carne de cerdo y de ternera, incluso a temperaturas de refrigeración.

La evolución de la espermidina y espermina durante el deterioro no muestra un comportamiento similar al del resto de las aminas biógenas, ya que la mayoría de trabajos publicados al respecto señalan que el nivel de estas aminas durante el deterioro de la carne desciende (NAKAMURA, 1979; SAYEM-EL-DAHER y col., 1984). En pescado también se ha señalado que la concentración de espermidina y espermina desciende conforme aumenta la descomposición (MIETZ y KARMAS, 1977)

Por lo que respecta a pescados, existen numerosos trabajos que demuestran la formación de aminas biógenas a medida que aumenta su estado de descomposición. Como ejemplo citaremos los realizados por:

- FARN y SIMS (1986): observaron formación de cadaverina, putrescina e histamina en atún.
- FERNANDEZ-SALGUERO y MACKIE (1987): formación de histamina, cadaverina y putrescina en arenque.
- VECIANA-NOGUES y col. (1990): formación de histamina y de tiramina en anchoas.
- BENAIGES-BENAIGES (1990): formación de histamina y tiramina en sardinas.

La histamina ha sido la amina biógena más citada por los autores como posible parámetro de calidad de los productos pesqueros. EDMUNDS y EITENMILLER (1975), STARUSZKIEWICZ (1977) y PAN y JAMES (1985) señalaron la relación de esta amina con el estado de deterioro del pescado y destacaron su posible importancia como indicador, ya que resiste los procesos tecnológicos en virtud de su elevada estabilidad térmica.

Sin embargo, otros autores (JHAVERI y col., 1982) plantean dudas sobre la validez de esta amina como indicador y en este sentido, MIETZ y KARMAS (1977) son partidarios de tener en cuenta más de una amina para definir un índice de "calidad". Consideran que la histamina por sí sola no es adecuada debido a la variabilidad que ofrece su concentración, circunstancia también observada por YAMANAKA y col. (1986). MIETZ y KARMAS (1977) proponen un índice de frescura para el pescado basado en la siguiente fórmula:

$$I = \frac{\text{Hist} + \text{Cad} + \text{Put}}{1 + \text{Esm} + \text{Esd}}$$

Siendo Hist., la concentración de histamina, Cad., la de cadaverina, Put., la de putrescina, Esm., la de espermina y Esd., la de espermidina.

Así, cuanto mayor es el valor alcanzado por el cociente, más avanzado está el deterioro del producto. Las aminas que figuran en el denominador han sido encontradas en atún en buenas condiciones y se ha comprobado que su concentración no aumentaba al avanzar el estado de descomposición (MIETZ y KARMAS, 1977; RITCHIE y MACKIE, 1980; BALDINI, 1982; YAMANAKA y col., 1987). Por ello, su presencia es un factor que disminuye el valor del índice propuesto.

Otros autores (YAMANAKA y col., 1987 y 1989) han señalado a la cadaverina como indicador más idóneo del deterioro del pescado, concretamente para sardina y salmón. Estos autores realizaron seguimientos de la evolución de las diaminas y poliaminas durante el almacenamiento/descomposición de especies de sardina y de salmón, comprobando que la cadaverina era la amina que mejor se correlacionaba con los tests sensoriales. Así, proponen los siguientes niveles de cadaverina como indicadores de deterioro en el pescado:

Niveles de cadaverina	Estado de pescado
< 1 mg/Kg	Aceptable
1 a 10 mg/Kg	Descomposición inicial
> 10 mg/Kg	Descomposición avanzada

STARUSZKIEWICZ y BOND (1981) indicaron que los niveles de cadaverina en productos derivados del pescado de una calidad aceptable deben ser menores que 5 mg/Kg.

Para especies invertebradas, como crustáceos y moluscos, se ha señalado (YAMANAKA y col., 1987) a la agmatina como índice de frescura, ya que estas especies presentan concentraciones relativamente elevadas de su aminoácido precursor, la arginina, y por tanto es más factible la formación esta amina que de otras, como histamina o tiramina.

No obstante, y a pesar de que no está definitivamente resuelta y aceptada la relación entre contenidos de histamina y el grado de descomposición, en algunas industrias se utiliza la determinación de esta amina como parámetro de "calidad" (LIEBER y TAYLOR, 1978; PAN y JAMES, 1985). De hecho, han sido retirados del mercado lotes de productos que contenían niveles excesivamente elevados de histamina (SCHUTZ y col., 1976).

El COMMITTEE on FOOD PROTECTION (1985) señala que la práctica de muchas industrias pesqueras de examinar rutinariamente el pescado, susceptible de contener niveles elevados de histamina, debería extenderse a todas las industrias, como medio para prevenir al consumidor de posibles efectos toxicológico derivados del consumo de pescado.

A este respecto señalaremos que existen ya países, como EEUU, URSS, Suecia, Suiza y Alemania que tienen reglamentado el control de la histamina en pescados y productos derivados (PECHANEK y col., 1983). Así, la FDA (Food and Drug Administration) considera a la histamina como "índice de deterioro" para las conservas de atún y de caballa. Un lote controlado se rechaza si 2 o más muestras de un total de 24 presentan un contenido en histamina superior a 200 mg/Kg (I.C.A.C.Q., 1986).

Alemania (país de la Comunidad Europea) en un decreto sobre exigencias sanitarias para pescados y moluscos de 1988, considera que un lote es aceptable si 10 muestras homogéneas y representativas han dado los siguientes resultados (VARONA, 1988):

- un valor medio no superior a 100 mg de histamina por 100 g de pescado.
- no más de 2 muestras con contenidos entre 100 y 200 mg de histamina por 100 g de pescado.
- ninguna de las 10 muestras deben presentar contenidos superiores a 200 mg de histamina por 100 g de pescado.

PECHANÉK y col. (1983) destacan la posibilidad de que cuantos más países fijen valores límites o directrices sobre el control de la histamina en pescados, será mayor el peligro de que la mercancía de una calidad "sospechosa" se envíe hacia aquellos países que aún no tengan limitaciones de este tipo. En este sentido puntualizan que se debe proteger al consumidor de intoxicaciones, pero que al mismo tiempo debe evitarse la fijación de valores límites injustificados basados más en políticas proteccionistas que en verdaderas medidas sanitarias de control.

TAYLOR (1986) señala que se pueden tomar algunas medidas preventivas destinadas a evitar la formación de histamina y otras aminas biógenas en pescados, como son el uso de temperaturas de almacenamiento bajas y la aplicación de unas buenas prácticas higiénicas durante la manipulación y el procesado. BEHLING y TAYLOR (1982) consideran que, una vez capturado, el pescado debe enfriarse rápidamente y que deben controlarse los tiempos de almacenamiento para evitar que sean demasiado prolongados.

TAYLOR (1986) indica que, si las bacterias productoras de histamina y de otras aminas provienen realmente de una contaminación post-captura, la formación de estas sustancias podría ser controlada de una forma efectiva mejorando las condiciones higiénicas de los procesos tecnológicos a que se somete el pescado.

1.3. SIGNIFICACION TOXICOLOGICA DE LAS AMINAS BIOGENAS

Las aminas biógenas, ingeridas por vía oral presentan en principio efectos tóxicos de escasa intensidad, debido a que pueden ser destruidas a nivel del tracto gastrointestinal, por fijación a mucoproteínas y degradación por la acción de diversos enzimas, y también a nivel hepático (SMITH, 1980; CABANIS, 1985). Sin embargo esta protección puede ser insuficiente si (RAMANTANIS, 1984; CABANIS, 1985):

1. La actividad enzimática está disminuida por causas hereditarias o por patologías adquiridas.
2. El aporte de aminas biógenas es muy elevado. Este puede ser exógeno, a través de la alimentación, o endógeno, por instauración de determinadas colopatías.
3. Las aminas se ingieren conjuntamente con medicamentos inhibidores del enzima mono-aminoxidasa (IMAO), responsables de la metabolización de las aminas biógenas en el organismo, o bien si se ingieren conjuntamente con sustancias que potencien su toxicidad.

El consumo de alimentos que contengan elevadas cantidades de aminas biógenas, puede provocar principalmente:

Efectos tóxicos directos: Intoxicaciones histamínicas y migrañas de origen alimentario.

Efectos tóxicos indirectos: Interacciones entre alimentos y medicamentos IMAO.

También, cabe la posibilidad de que se presenten otros efectos tóxicos de evolución crónica, sin olvidar, además el potencial riesgo de las aminas biógenas como posibles precursoras de nitrosaminas, las cuales tienen una reconocida acción carcinogénica.

1.3.1. EFECTOS TOXICOS DIRECTOS.

1.3.1.1. Intoxicaciones histamínicas

Antes de recibir el nombre de "intoxicación histamínica", estas afecciones se denominaron "scombroid fish poisoning" (envenenamiento por escómbridos), ya que se atribuían exclusivamente al consumo de pescados de las familias Scomberesocidae y Scombridae (atún, bonito, caballa, arenque,...) (TAYLOR, 1988). Posteriormente, se han descrito intoxicaciones de este tipo tras el consumo de otras especies de pescados y de otros alimentos, como por ejemplo:

- sardinas, "bluefish" (Pomatomus saltatrix), "mahimahi" (Coryphaena hippurus) y anchoas, entre otros pescados (TAYLOR, 1985; TAYLOR, 1986),
- queso (DOEGLAS y col., 1967; CHAMBERS y STARUSKIEWICZ, 1978; EDWARDS y SANDINE, 1981; TAYLOR, 1985),
- extractos de levadura (BLACKWELL, 1963),
- chucrut (Mayer y Pause, 1972 en TAYLOR, 1986; TAYLOR y col., 1978),
- vino (OUGH, 1971; SCHNEYDER, 1973),
- embutidos crudos/madurados (TAYLOR y col., 1978; Dierick y col., 1974 en TAYLOR, 1985).

Por ello, TAYLOR (1985) considera que la denominación de "envenenamiento por escómbridos" no es la más apropiada y sugiere la denominación de "intoxicación histamínica".

Sintomatología

Las intoxicaciones histamínicas cursan con síntomas digestivos y extradigestivos. Suelen ser bastante espectaculares, pero generalmente no son graves y remiten a las pocas horas espontáneamente. Los síntomas que pueden presentarse son (BINDER y BRANDL, 1983; TAYLOR y col., 1984; CABANIS, 1985; TAYLOR, 1986):

CUTANEOS	CIRCULATORIOS
Erupciones Urticaria Inflamación local	Hipotensión Edemas
GASTROINTESTINALES	NEUROLOGICOS
Náuseas Vómitos Diarreas Dolor abdominal	Cefalea Palpitaciones Rubor Ardor Prúrigo

Si la intoxicación es ligera, los síntomas pueden pasar desapercibidos o incluso ser atribuidos a una ligera insuficiencia hepática o a una alergia alimentaria. Los sujetos alérgicos y ansiosos suelen presentar la sintomatología con mayor intensidad. Es relativamente frecuente que la mayoría de pacientes que han sufrido una intoxicación histamínica sólo hayan padecido unos cuantos de los síntomas señalados, ya que la severidad de la sintomatología puede variar no sólo por la cantidad de histamina consumida sino también por la sensibilidad individual del paciente que ha ingerido el alimento con niveles elevados de esta amina (BINDER y BRANDL, 1983; TAYLOR, 1986). Se ha señalado que variaciones de pH en la mucosa intestinal, de la actividad histaminolítica del organismo (principalmente del riñón) y del estado de funcionamiento de la corteza suprarrenal influyen sobre la respuesta del organismo frente a la histamina ingerida por vía oral (HENRY, 1960; DEL PRETE y col., 1979; PECHANEK y col., 1983).

Las variabilidad interindividual en la respuesta del organismo frente a la histamina contribuye a la dificultad de establecer unas cifras "tóxicas" de contenido de histamina en alimentos, que permitieran conocer cuando un alimento puede considerarse "peligroso" para el organismo humano y, por tanto, no apto para su consumo. No obstante, y pese a esta dificultad, algunos autores han señalado niveles tóxicos de histamina en alimentos. Algunos de los niveles señalados se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Niveles "tóxicos" de histamina citados para alimentos en general, pescados y vinos.

ALIMENTOS EN GENERAL	HISTAMINA	EFFECTOS
Ienistea (1973) (TAYLOR, 1985)	8-40mg 70-1000mg 1500-4000mg	.ligeramente tóxicos .bastante tóxicos .muy tóxicos
DEL PRETE y col. (1979)	5-6 mg/100g 6-70mg/100g > 70mg/100g	.tolerables .ligeramente tóxicos .muy tóxicos
PECHANEK y col. (1980)	5-8mg 10-100mg	.ligeramente tóxicos .muy tóxicos
LÜTHY y SCHLATTER (1983)	>100-200mg	.tóxicos
Center for Disease Control-USA (KAROLUS y col., 1985)	20mg/100g	.tóxicos
PESCADOS		
SCHNEYDER (1973)	50-100mg >50mg/100g	.asintomáticos .tóxicos
FDA 1982 (PAN y JAMES, 1985) (en atún)	>50mg/100g	.tóxicos
TAYLOR y col. (1984)	20mg/100g	.tóxicos
VINOS		
QUEVAUVILLER y MAZIERE (1969); LAFON-LAFOURCADE (1975); BATTAGLIA y FRÖHLICH (1978) y MATTHEY (1979)	2-10mg/L	. de ligeramente tóxicos a tóxicos, teniendo en cuenta la potenciación del alcohol.

Las intoxicaciones histamínicas probablemente ocurren más a menudo de lo que se declaran, pero no se les da importancia, por su sintomatología poco grave y su corta duración, o bien cabe destacar que se las clasifica como alergias alimentarias. Los síntomas en una alergia alimentaria y en una intoxicación histamínica son similares y ambos remiten con tratamiento con antihistamínicos (DOEGLAS y col., 1967; TAYLOR, 1986). RICE y col. (1976) señalan que muchos de los casos que se han descrito como alergias al atún, probablemente han sido intoxicaciones de este tipo.

Según TAYLOR (1985), las intoxicaciones histamínicas se pueden distinguir fácilmente de las alergias alimentarias por:

1. Presentarse en forma de brotes epidémicos,
2. No haberse presentado anteriormente alergia al alimento causante de la intoxicación,
3. La presencia de niveles elevados de histamina en el alimento implicado,

Epidemiología

Los datos que se poseen sobre la incidencia de estas intoxicaciones son relativamente escasos pues, como ya hemos comentado, en la mayoría de los casos pueden pasar desapercibidas o bien ser erróneamente diagnosticadas.

TAYLOR (1985) señala que debería darse mayor importancia a estas intoxicaciones y considera que sería adecuada su declaración obligatoria a las Autoridades Sanitarias competentes. De esta manera se podría disponer de datos estadísticos fiables sobre la incidencia de estas intoxicaciones, que ayudarían a realizar evaluaciones reales del estado sanitario de alimentos de amplio consumo.

BRYAN en 1980 (MATCHES y ABEYTA, 1983) y en 1986 recopiló datos sobre los brotes de intoxicaciones histamínicas ocurridos en EEUU entre los años 1970-1978 y 1979-1984. Su trabajo demuestra que las intoxicaciones alimentarias atribuidas al consumo de pescado, en un 25% de los casos, entre 1970 y 1978, y un 44%, entre 1979 y 1984, correspondían a intoxicaciones histamínicas (Tabla 7). Estas cifras indican que estas intoxicaciones son más frecuentes de lo que habitualmente se cree y que igualan o superan a otras intoxicaciones mucho más conocidas, como la ciguatera.

Tabla 7. Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias atribuidas al consumo de pescado* en EEUU, entre 1970-1978 y 1979-1984 (Bryan, 1980 en MATCHES y ABEYTA, 1983; BRYAN, 1986).

AGENTE CAUSAL	Nº BROTES 1970-1978	Nº BROTES 1979-1984
Botulismo	19	12
Enteritis por <u>Clostridium perfringens</u>	3	1
Salmonellosis	2	3
INTOXICACION HISTAMINICA	58	76
Shigelosis	3	5
Intoxicación estafilococica	5	1
Cigüatera	72	56
Varios	10	4
Envenenamiento químico	--	2
Desconocido	61	12
TOTAL	233	172

(*) no se incluyen moluscos ni crustáceos.

El COMITE de "FOOD PROTECTION" del "FOOD NUTRITION BOARD" del "NATIONAL RESEARCH COUNCIL-USA" (1985) señala también que la intoxicación por escómbridos es, en cuanto a incidencia, la segunda en importancia en los EEUU y la incluye, en función del riesgo toxicológico que conlleva para los consumidores, en el mismo grupo que las intoxicaciones producidas por Staphilococcus aureus, Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Vibrio parahae-molyticus, Yersinia enterocolitica,... etc, si bien señala que se trata de intoxicaciones moderadamente peligrosas y con una expansión limitada en el futuro.

Japón es el país que ha mostrado una mayor preocupación sobre el tema, debido fundamentalmente al elevado consumo de pescado de sus habitantes. Igualmente, es el país en donde se poseen más datos sobre la aparición de brotes de intoxicación histamínica, desde principios de los años 50 (Tabla 8). Estados Unidos y Gran Bretaña realizan seguimientos de estas intoxicaciones desde los años 70 y progresivamente otros países como Canadá, Francia, Países Nórdicos, Alemania y Checoslovaquia, entre otros, realizan evaluaciones de la aparición de casos y personas afectadas por esta intoxicación (TAYLOR, 1986).

Tabla 8. Incidencia de intoxicaciones histamínicas en distintos países (TAYLOR, 1985; TAYLOR, 1986).

PAIS	PERIODO DE TIEMPO	Nº de BROTES	Nº de CASOS
Canadá	1975-1981	6	12
Dinamarca	1976-1982	33	?
EEUU	1968-1981	110	888
Francia	1980-1983	10	?
Gran Bretaña	1976-1982	136	439
Japón	1951-1954 1970-1980	14 42	1215 4122

En España, hasta la fecha, no se poseen datos sobre la incidencia de intoxicaciones histamínicas, aunque ello no signifique que no se produzcan, dado el importante consumo de pescados y derivados que existe en nuestro país.

Potenciación de la toxicidad de la histamina

A. Efecto potenciador de otras aminas biógenas

Mediante estudios experimentales, se ha podido comprobar que el organismo humano responde de manera diferente ante la administración por vía oral de la histamina pura y de la histamina contenida en los alimentos. Se ha observado que una determinada dosis encontrada en un alimento implicado en una intoxicación no producía, sin embargo, efecto alguno cuando se administraba pura a voluntarios humanos (TAYLOR, 1986). Esta paradoja entre la ausencia de toxicidad de la histamina pura y la toxicidad evidente, de niveles incluso menores, de histamina en alimentos, han hecho considerar que debe existir una potenciación de la toxicidad de la histamina, por parte de sustancias presentes conjuntamente con ella en los alimentos (RICE y col., 1976; TAYLOR, 1986).

Así, se señala que otras aminas biógenas presentes también en alimentos, como la tiramina, β -feniletilamina, triptamina, cadaverina y putrescina, podrían actuar como potenciadores de la toxicidad de la histamina (BLONZ y OLCOTT, 1978; PECHANEK y col., 1983).

El mecanismo de esta potenciación no se conoce con precisión, pero se han indicado dos hipótesis:

1. **Inhibición de los enzimas intestinales de degradación (diaminooxidasa-DAO e histamina-N-metil-transferasa-HMT) de la histamina.**

Se ha comprobado que la β -feniletilamina y la triptamina son inhibidores de la HMT y la cadaverina y la putrescina de la DAO. La tiramina y la agmatina se han señalado como inhibidores de ambos complejos enzimáticos (TAYLOR, 1986; JOOSTEN, 1988). Al producirse esta inhibición de los enzimas detoxificantes, se provocaría un aumento de la absorción de la histamina e igualmente un aumento de la vida media de esta amina (TAYLOR y SUMMER, 1986).

2. **Competencia por los lugares de unión a la mucina intestinal o hipótesis de la "interrupción de la barrera".**

Parrot y Nicot en 1966 (TAYLOR, 1986) sugirieron que sustancias, como putrescina y cadaverina podrían interferir en la función protectora de la mucina intestinal. Estas sustancias se unirían preferentemente a la mucina, impidiendo su unión con la histamina, y favoreciendo por tanto la absorción de esta última. Esta hipótesis predice que el total de compuestos imidazólicos transportados a través de la barrera intestinal se incrementa en presencia de las citadas sustancias potenciadoras.

Esta teoría no está, sin embargo, totalmente apoyada por datos experimentales, sino que existen datos bastante contradictorios. Se ha observado "in vitro" que la unión histamina-mucina es inhibida por la presencia de espermina, espermidina, putrescina y cadaverina en un extracto de atún (CHU y BJELDANES, 1981). No obstante, para que se produzca la inhibición se requieren concentraciones de aminas muy elevadas. Se ha comprobado que un extracto de atún rico en aminas biógenas causaría sólo un 23% de inhibición de la unión histamina-mucina intestinal y que todavía quedaría mucha más mucina libre en el intestino que histamina presente. Estos datos podrían indicar que esta inhibición debe jugar un papel secundario en la potenciación de la toxicidad de la histamina (TAYLOR, 1986).

B. Efecto potenciador del alcohol

Se ha señalado que el alcohol y el acetaldehído pueden aumentar la capacidad tóxica de la histamina, por favorecer su absorción en el tracto intestinal o bien porque disminuye su degradación al inhibir el enzima MAO (monoamino-oxidasa) intestinal, y consecuentemente favorecer su absorción (SCHNEYDER, 1973).

MARQUARDT y WERRINGLOER (1965) demostraron, en animales de laboratorio, que la efecto de la histamina se potencia cuando se administra en solución alcohólica. Sin embargo, LOWEMBERG y col. (1981) tras realizar una experiencia con voluntarios humanos manifestaron que el alcohol actúa estimulando la liberación de histamina endógena, siendo por tanto indiferente el contenido de histamina en vinos.

El fenómeno de la potenciación de los efectos tóxicos de la histamina por alcohol es especialmente interesante en bebidas como vinos y cervezas. JOOSTEN (1988) señala que una combinación de vino y queso, ambos con niveles relativamente elevados de histamina, puede aumentar considerablemente el riesgo de intoxicación histamínica.

Implicaciones de la potenciación de la toxicidad de la histamina

La existencia de sustancias que potencian la acción de la histamina puede alterar el umbral tóxico de la misma en los alimentos. Los alimentos pueden contener diferentes sustancias potenciadoras, que además pueden encontrarse en niveles variables de un alimento a otro. Consecuentemente, la dosis tóxica umbral de la histamina diferirá de un alimento a otro, en función del tipo y de los niveles de potenciadores (TAYLOR, 1986). Por ejemplo, el perfil de cadaverina, putrescina, espermina y espermidina del queso será probablemente muy diferente al del atún. En las bebidas alcohólicas se han de tener en consideración los niveles de alcohol, además de la presencia de otras aminas biógenas.

TAYLOR (1986) llega a manifestar que aunque se puede establecer que existe un potencial riesgo de intoxicación al ingerir un atún con 50 mg de histamina por 100 g, el peligro asociado a similares niveles de histamina en otro pescado o en otro alimento está todavía por determinar. Asimismo señala que es prematuro establecer límites "peligrosos" para la histamina en alimentos hasta que no se hayan estudiado con mayor profundidad el tipo, nivel e intensidad del efecto de sustancias potenciadoras de la toxicidad de la histamina.

JOOSTEN (1988) señala que es más adecuado elaborar un "índice de aminas biógenas" que basarse sólo en el contenido de una única amina, como la histamina, para establecer límites reguladores sobre niveles máximos o tolerables, de estas sustancias en los alimentos.

1.3.1.2. Migrañas de origen alimentario

Trush en 1978 (CROOK, 1981) definió la migraña como una cefalea caracterizada por episodios dolorosos recurrentes, típicamente hemicraneales, que se pueden presentar acompañados por náuseas, vómitos, alteraciones visuales y neurológicas, estreñimiento y depresión. Además, es frecuente que los pacientes presenten antecedentes familiares de migraña e historias clínicas que incluyen ataques biliares, asma, eczema o fiebre del heno. Los accesos dolorosos suelen tener una duración entre 2 a 72 horas, con intervalos totalmente asintomáticos entre las crisis (BLAU, 1984).

Smith y col. en 1971 estimaron que la migraña afecta a un 10-15% de la población y de esta proporción un amplio subgrupo tendría un origen alimentario (SANTOS-BUELGA, 1984). LITTLEWOOD y col. (1988) señalaron que alrededor del 25% de pacientes migrañosos consideran que sus crisis pueden ser desencadenadas por los alimentos. MONRO y col. (1980) sugieren que muchos pacientes migrañosos podrían ver mejorada su sintomatología si se les prescribiera una "dieta de exclusión" idónea.

BRIGGS y col. (1979) señalaron que los propios pacientes migrañosos, por propia iniciativa, excluyen de sus dietas los alimentos que relacionan con la aparición del dolor de cabeza tras su ingestión. Los alimentos que con más frecuencia se citan por los pacientes migrañosos, como desencadenantes de ataques son quesos, chocolate, bebidas alcohólicas, embutidos y café, entre otros. (HANINGTON, 1967; SMITH y col., 1970; PALMERO-BECARES, 1986; LITTLEWOOD y col., 1988).

SMITH y col. (1970) tras realizar una encuesta a 400 pacientes, en cuanto a la aparición de migraña tras el consumo de un determinado alimento, elaboró una lista, que se muestra en la tabla 9, de productos alimenticios relacionados con ataques de migraña y los porcentajes de atribución obtenidos.

Tabla 9. Alimentos relacionados con la aparición de migrañas (SMITH y col., 1970).

Alimento considerado como posible desencadenante de migraña	% de atribuciones
Chocolate.....	74
Productos lácteos (queso).....	46
Frutas (cítricos).....	30
Bebidas alcohólicas.....	25
Hortalizas y verduras (cebollas).....	17
Alimentos grasos fritos.....	18
Carne (cerdo).....	14
Té y café.....	14
Alimentos de origen marino.....	10

Las teorías e hipótesis que intentan explicar la aparición de migrañas, tras la ingesta de determinados alimentos, son diversas.

HANINGTON (1967) señalaba que un 30% de las migrañas podían ser provocadas por la tiramina presente en los alimentos. Igualmente, CROOK (1981) atribuye un papel importante a la tiramina en el desarrollo de migrañas, ya sea de procedencia endógena o bien exógena a partir de la alimentación.

Sin embargo, la relación existente entre la tiramina y la inducción de migraña no se conoce con exactitud (BRIGGS y col., 1979) y parece ser que podrían intervenir factores genéticos, tratándose de otro ejemplo más de "errores innatos de metabolismo" (SMITH y col., 1970).

Tiramina e inducción de migraña

SANDLER (1974) y CROOK (1981) señalan que una posible hipótesis, que explicaría la aparición de migrañas en individuos sensibles, sería un defecto en la metabolización de tiramina. Ello se traduciría en una dificultad para la eliminación de esta amina, permaneciendo durante más tiempo en la circulación sanguínea (VIDAL-CAROU, 1987).

Para explicar esta deficiencia en el metabolismo de la tiramina se han señalado dos posibles causas:

- a) **Disminución del enzima mono-aminoxidasa (MAO)**, lo cual provocaría un aumento de los niveles sanguíneos de tiramina (SANDLER y col., 1970; YODIM y col., 1971; CROOK, 1981).

Si la actividad del enzima MAO desciende por debajo de ciertos niveles, que pueden variar entre unas personas y otras, es menor la concentración de aminas biógenas necesaria para producir ataques de migraña. Por otra parte, es interesante destacar que los niveles de MAO aumentan con la edad y que con la misma disminuyen la frecuencia y la severidad de los ataques (CROOK, 1981).

También se ha señalado que la relación entre niveles bajos de MAO y ataques de migraña es más compleja de lo que puede parecer a simple vista, ya que no se ha determinado exactamente si los niveles bajos de MAO corresponden a cambios transitorios durante el ataque migrañoso, o bien si existen realmente individuos que poseen una actividad permanentemente baja de MAO (GLOVER y col., 1981).

- b) **Déficit del enzima responsable de la conjugación de tiramina con sulfatos** (YODIM y col., 1971; CROOK, 1981), que posiblemente obedece a causas genéticas.

El mecanismo por el cual se puede precipitar una migraña parece ser que es múltiple, en el que se conjugan una serie de factores que dan como resultado final la aparición del ataque migrañoso. Los mecanismos que más comunmente se citan son:

- La tiramina puede liberar noradrenalina que provocaría a su vez vasoconstricción en los vasos cerebrales. Al agotarse la noradrenalina se produciría por "efecto rebote" vasodilatación, dando lugar a la migraña (FORSYTHE y REDMON, 1974).
- La tiramina puede desplazar a la serotonina de sus lugares de almacenamiento en las plaquetas y la serotonina liberada puede ser la responsable de los efectos vasculares que conducen a la migraña (CROOK, 1981).
- La tiramina puede ser metabolizada a octopamina provocando esta última una liberación plaquetaria de la serotonina. A su vez, la octopamina puede actuar como un falso neurotransmisor (CROOK, 1981).
- La tiramina puede provocar la liberación de otras sustancias, además de la serotonina, como prostaglandinas y quininas, que serían las responsables de producir los citados efectos vasculares (SANDLER, 1970 y 1972).
- Por último, dado que la tiramina posee actividad vasoconstrictora puede ser directamente la responsable de la vasoconstricción inicial de la migraña (VIDAL-CAROU, 1987).

Respecto a la cantidad de tiramina necesaria para provocar un ataque de migraña, Hanington y col. en 1971 (CROOK, 1981) comprobaron que 125 mg de tiramina por vía oral producen migraña en individuos susceptibles, pero no en los individuos control. Posteriormente, FORSYTHE y REMOND (1974) indicaron que 100 mg de esta amina son ya suficientes para que se inicie un ataque de este tipo en personas sensibles.

Otras aminas biógenas e inducción de migraña

HISTAMINA. Se han observado cambios en los niveles sanguíneos de esta amina durante el periodo migrañoso, siendo más elevados al final del mismo. Se ha sugerido que esta amina puede ser la responsable de la vasodilatación que tiene lugar en los ataques de migraña. No obstante, parece más probable que la liberación de histamina sea secundaria al dolor de cabeza (CROOK, 1981).

β-FENILETILAMINA. Al igual que la tiramina, esta amina es capaz de provocar la liberación de la serotonina plaquetaria y de las catecolaminas almacenadas. También posee una acción vasoconstrictora directa sobre los vasos sanguíneos cerebrales (CROOK, 1981). Se ha observado que inicialmente y, a dosis bajas, la β-feniletilamina provoca un aumento del flujo sanguíneo cerebral y del consumo de oxígeno. A dosis más elevadas causa vasoconstricción de los vasos sanguíneos cerebrales.

Los resultados de los estudios destinados a conocer la relación entre el consumo de ciertos alimentos y la aparición de migraña son poco constantes. BRIGGS y col. (1979) señalan que una de las posibles causas que pueden justificar esta variabilidad es la disparidad de contenidos de aminas en los alimentos, ya que se pueden encontrar cifras distintas según el tipo concreto de alimento e incluso dentro de un mismo tipo.

LÜTHY y SCHLATTER (1983) estudiaron los efectos de 25 mg de histamina y de 25 mg de tiramina administrados con zumo de manzana en seres humanos voluntarios, realizando el experimento por el método del "doble ciego". Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a síntomas presentados (dolor de cabeza, sensación de calor, náuseas, mareo o diarrea), entre los grupos problema y control tras la ingestión del zumo adicionado de aminas. Los mismos autores realizaron también este ensayo con 5 mg de β-feniletilamina, observando que en este caso sí se producían diferencias significativas entre el grupo problema y el control.

La β-feniletilamina provoca la liberación de noradrenalina de los nervios simpáticos, lo que podría explicar los síntomas. Sin embargo, no puede aceptarse esta hipótesis como único mecanismo para explicar la migraña porque, desde el punto de vista de liberación de noradrenalina, la tiramina es 10 veces más potente que la β-feniletilamina (VIDAL-CAROU, 1987).

LITTLEWOOD y col. (1988), tras realizar un estudio con pacientes aquejados de migraña, concluyeron que el vino tinto contiene un agente que provoca ataques migrañosos, que no es el alcohol ni la tiramina. Estos autores señalan como posibles inductores de la migraña, tras el consumo de vino, a los flavonoides fenólicos (catequinas y antocianinas).

Los flavonoides fenólicos provocarían la migraña como consecuencia de la inhibición del enzima fenil-sulfotransferasa (FST). Este enzima, presente en el organismo humano, metaboliza una amplia gama de fenoles endógenos y exógenos, como la tiramina. Una actividad baja de la FST podría dar lugar a un aumento de sustancias fenólicas, que serían capaces de ejercer por si mismas efectos nocivos. No obstante, los mismos autores reconocen que hasta la fecha el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos como causantes de migraña sigue siendo bastante especulativo. Esta teoría no explicaría, por otra parte, la relación entre alimentos como quesos, embutidos, o chocolate y la aparición de migrañas, ya que estos productos no contienen estos compuesto fenólicos.

Respecto a este trabajo KAUFMAN (1988), en una carta dirigida a LITTLEWOOD y col., señala que Singleton y col. en 1978 indicaron que los compuestos fenólicos no eran los causantes de la cefalea producida por el vino. Asimismo, KAUFMAN señala que la teoría de Littlewood y col. no explica el hecho de que los fármacos inhibidores de la prostaglaninas-sintetasas prevengan las migrañas inducidas por el vino tinto.

PALMERO-BECARES (1986) realizó un estudio clínico con pacientes migrañosos obesos a los que se les prescribieron dietas hipocalóricas, en las que se habían eliminado aquellos alimentos que con más frecuencia se identifican como posibles inductores de migrañas. Paralelamente, un grupo de pacientes migrañosos no obesos siguió "dietas de exclusión" para estos alimentos inductores de migrañas. Se observó que el 90.62% de los pacientes migrañosos obesos y el 89.47% de los no obesos, permanecían asintomáticos durante el periodo de estudio y que un 9.37% y un 10.52%, respectivamente, presentaban una clara mejoría. Tanto los pacientes obesos como los no obesos mostraron la misma mejoría con la dieta de exclusión. Se identificaron, mediante reintroducción secuencial, los productos alimenticios inductores de migraña en 98 de los 104 casos estudiados. La mayoría de los pacientes eran sensible a varios alimentos, siendo más escasos los que respondían a uno o a casi todos de ellos (tabla 10).

Tabla 10. Alimentos inductores de migraña y porcentaje de enfermos migrañosos obesos y no obesos sensibles a ellos (PALMERO-BECARES, 1986).

Alimento	Paciente obeso	Paciente no obeso
Queso	34.37	36.84
Embutidos	18.75	21.05
Ahumados	8.33	15.78
Vino tinto	27.08	21.08
Vino blanco	9.37	10.51
Sidra	3.12	0.0
Cerveza	1.04	0.0
Café	8.33	5.26
Frutos secos	26.04	47.36
Chocolate	26.04	10.52
Grasas animales	10.41	10.51
Salazones	8.33	5.26
Conservas de:		
pescado	12.50	17.78
verduras	13.54	5.26

PALMERO-BECARES (1986) concluye que la "crisis de migraña" podría producirse en personas sensibles a distintas sustancias presentes en los alimentos. Aunque señala que no es el objetivo de su estudio, sugiere que los posibles agentes responsables de la migraña sean las aminas biógenas, especialmente la tiramina, en base a que la mayoría de los alimentos que más se citan como inductores de migrañas son productos obtenidos por fermentación/maduración y por tanto susceptibles de presentar contenidos relativamente elevados de aminas.

1.3.1.3. Otros efectos tóxicos.

TIRAMINA

JOOSTEN (1988) señala dos ejemplos en los que alimentos ricos en tiramina están relacionados con la aparición de trastornos en el hombre. Un primer caso es el señalado por Schultz en 1984, en el que se relacionó un consumo elevado de queso maduro con la aparición de polineuropatía. Otro caso fue señalado más recientemente por Jacon y Carron en 1987 donde se asoció la aparición de ataques de disnea con fuertes palpitations tras la ingestión de comida rica en tiramina. No obstante, JOOSTEN (1988) indica que ambos artículos no se aportan pruebas sustanciales del papel etiológico de la tiramina, ni tampoco del contenido real de aminas biógenas en los alimentos implicados.

TRIPTAMINA

En base a nuestra información, no se han señalado efectos tóxicos atribuibles a la triptamina de los alimentos, ni tampoco "crisis hipertensivas" por interacción entre esta amina y medicamentos inhibidores del enzima monoamino-oxidasa (véase apartado 1.3.2.1.). No obstante, debemos indicar que realmente son muy escasos, prácticamente inexistentes, los estudios destinados a conocer la incidencia y significación de la presencia de triptamina en alimentos.

β -FENILETILAMINA

PAULOS y TESSEL (1982) han observado que existe un aumento de la excreción urinaria de β -feniletilamina en personas sometidas a un fuerte "stress". Igualmente, se han encontrado elevadas concentraciones de esta amina en orina de pacientes esquizofrénicos paranoicos crónicos. Estas observaciones parecen indicar que la β -feniletilamina juega un papel importante en el metabolismo endógeno, pero se desconoce que de la dieta pueden influir sobre su concentración efectiva en el cerebro (JOOSTEN, 1988).

SEROTONINA

Algunos autores señalan la alta incidencia de fibrosis de endomiocardio en algunas regiones de Africa, en comparación con la baja frecuencia de estas afecciones en países septentrionales. El hecho de que esta patología sea común en países donde hay un consumo importante (en cantidad y en frecuencia) de alimentos que contienen elevados niveles de serotonina (plátanos principalmente) justifica que se haya planteado la existencia de una posible relación entre serotonina o sus productos de degradación y las lesiones cardíacas antes citadas (SMITH, 1980; GARCIA-MORENO, 1981).

También la serotonina parece ser la responsable de los trastornos intestinales que se producen en habitantes de regiones como Uganda, donde la ingestión de plátanos es considerable. El mecanismo de acción parece ser una inhibición de la secreción gástrica y una estimulación de la musculatura lisa provocada por la serotonina (SMITH, 1980; GARCIA-MORENO, 1981).

No obstante, en los trabajos consultados no se han encontrado datos sobre las cantidades de serotonina capaces de producir estos efectos. Además, los estudios realizados sobre serotonina en alimentos son relativamente escasos (GARCIA-MORENO, 1981).

PUTRESCINA y CADAVERINA

La consecuencia más importante de la presencia de estos dos compuestos en los alimentos es posiblemente, la potenciación de la toxicidad de otras aminas, como ya hemos indicado en el apartado 1.3.1.1.

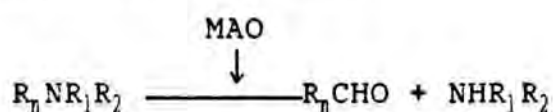
No existen datos en la bibliografía sobre intoxicaciones alimentarias provocadas por la sola presencia de putrescina o cadaverina en los alimentos ingeridos. Sólo Framen y Eysell en 1969 (JOOSTEN, 1988) han señalado que tras la ingestión de grandes cantidades de putrescina o de cadaverina se habían observado efectos tóxicos, cuyos síntomas fueron: hipotensión, bradicardia, dispnea y parálisis de las extremidades.

1.3.2. EFECTOS TOXICOS INDIRECTOS

1.3.2.1. Interacciones alimentos-medicamentos IMAO

Los medicamentos inhibidores del enzima monoaminooxidasa (IMAO) forman un grupo de fármacos químicamente heterogéneo, que tienen en común la capacidad de bloquear la acción del enzima monoamino-oxidasa.

El enzima monoamino-oxidasa (MAO) cataliza la desaminación oxidativa de las aminas en aldehídos, de acuerdo con la siguiente reacción:



donde R_1 y R_2 pueden ser hidrógenos o grupos metilos, pudiendo ser R_n una cadena carbonada de 1 a 5 átomos de carbono.

Las aminas aromáticas del grupo de las catecolaminas, tales como adrenalina y noradrenalina, la dopamina y las indolalquilaminas, como serotonina, son sustratos endógenos de este enzima. También son sustratos de la MAO algunas aminas halladas en el cerebro en concentraciones mínimas, tales como la β -feniletilamina, la triptamina y la tiramina e, igualmente, las aminas exógenas ingeridas con la alimentación. En cuanto a las diaminas y poliaminas, únicamente son sustratos de la MAO cuando sus grupos amino se hallan separados por 7 o más grupos metilo (UNZUETA y col., 1989).

Existen dos isoenzimas de la MAO, denominados MAO A y MAO B, que se diferencian en función de su especificidad por el sustrato, siendo preferente la serotonina, la noradrenalina y la adrenalina para la MAO A y la β -feniletilamina para la MAO B. Ambos isoenzimas pueden metabolizar a la tiramina, la dopamina y la triptamina (CROOK, 1981; UNZUETA y col., 1989).

Las indicaciones terapéuticas de estos fármacos han sido diversas: antidepresivos, antihipertensivos, antiifecciosos, antineoplásicos y antiparkinsonianos (tabla 11) (SANTOS-BUELGA, 1984).

Tabla 11. Medicamentos inhibidores del enzima monoaminoxidasa (IMAO).

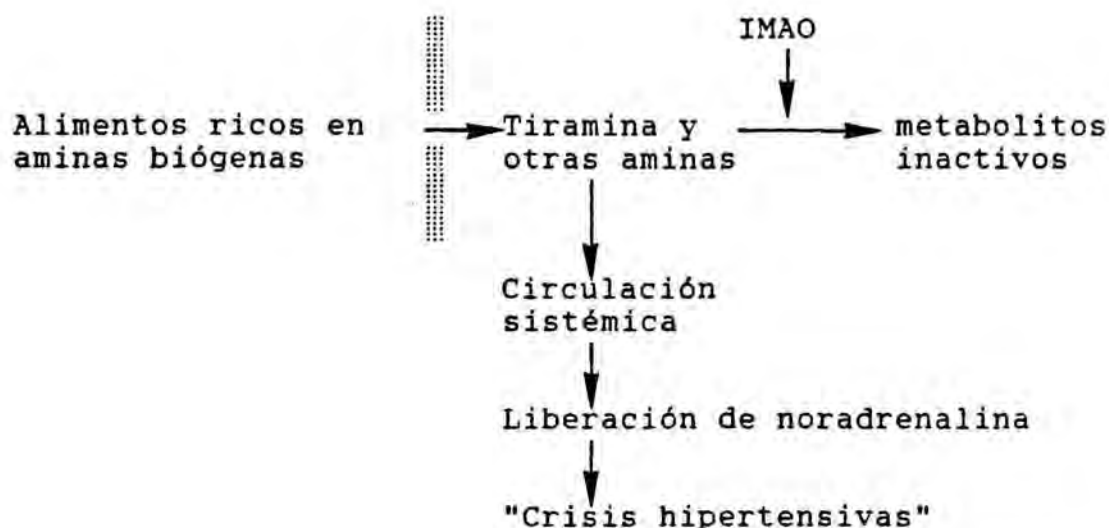
GRUPO FARMACOLOGICO	FARMACO
Antidepresivos	Fenelzina Mebanizina Nialamida Isocarboxazida Tranilcipromina Clorgilina Etriptamina
.....
Antidepresivos y antiparkinsonianos	Deprenil
.....
Antidepresivos y antiinfecciosos	Iproniazida Isoniazida Furazolidona
.....
Antihipertensivos	Fenipramina Pargilina
.....
Antineoplásicos	Procarbazina

El mecanismo de acción de los fármacos IMAO implica un bloqueo enzimático irreversible e inespecífico (afecta a los dos isoenzimas) que conlleva a una acumulación de aminas en el organismo, debido a que no se pueden metabolizar normalmente, dando lugar a efectos de intensidad variable (SANTOS-BUELGA, 1984).

Actualmente se están desarrollando los IMAO de tercera generación, que ejercen un bloqueo reversible y selectivo para cada una de las formas de la MAO. Estos fármacos presentan ciertas ventajas respecto a los anteriores, como es el poder ajustar más fácilmente la dosis y el grado de inhibición, ya que ésta revierte al suspender el tratamiento (UNZUETA y col., 1989).

En condiciones normales, las aminas biógenas ingeridas con la alimentación se metabolizan en el tracto intestinal y en el hígado por la MAO. Si el enzima está bloqueado, se pierde esta protección y las aminas exógenas pueden acceder a la circulación sistémica, en cantidad suficiente para liberar noradrenalina de la neuronas adrenérgicas y dar lugar a efectos tóxicos, fundamentalmente hipertensivos (Figura 6) (MARINE y col., 1986; VIDAL-CAROU, 1987; BAKU, 1988).

Figura 6. Esquema del mecanismo de interacción entre alimentos ricos en aminas biógenas y medicamentos IMAO.



BLACKWELL en 1963 fue el primero en señalar una reacción tóxica entre un antidepresivo de tipo IMAO (tranilcipromina) y un alimento (queso). Posteriormente, se comprobó que esta interacción se daba también con otros alimentos distintos del queso, como conservas de pescado, vinos, cervezas, extractos de levadura, etc. (BLACKWELL y col., 1965 y 1967).

Un caso más reciente señalado en la bibliografía, en el que está implicado un producto alimenticio diferente del queso, es el descrito por MURRAY y col. en 1988. Estos autores observaron una sintomatología propia de interacción alimento-medamento IMAO en un paciente sometido a un tratamiento con tranilcipromina. Los síntomas, una fuerte jaqueca seguida por una hemiplejía lateral con disfagia facial, se iniciaron a los 15 minutos de que el paciente hubiera ingerido 250 mL de una cerveza irlandesa sin alcohol. La tomografía computerizada del cerebro confirmó que se había producido una hemorragia cerebral aguda.

La tiramina es la amina biógena que más frecuentemente se ha relacionado con estas interacciones, si bien el mecanismo de las mismas no impide que puedan tener importancia otras aminas aromáticas, como histamina, serotonina, β -feniletilamina y triptamina (MARINE FONT, 1978; STOCKLEY, 1981; McCABE, 1986). Como ejemplos citaremos los siguientes casos:

- Uragoda en 1980 describió la aparición de síntomas característicos de esta interacción en pacientes tratados con isoniazida, tras la ingestión de atún que presentaba contenidos relativamente elevados de histamina (ROE, 1989).
- Krikler y Lewis en 1965 describieron el desarrollo de una crisis hipertensiva en un paciente sometido a tratamiento con pargilina, tras el consumo de 60 g de un chocolate que contenía concentraciones relativamente elevadas de β -feniletilamina (SMITH, 1980).

Al igual que ocurre con otras reacciones tóxicas, en algunos casos no se han producido o no se han manifestado los síntomas típicos de interacción entre fármacos IMAO y alimentos ricos en aminas biógenas. Estas diferencias pudieran atribuirse a características interindividuales (edad, sexo, capacidad de metabolización de xenobióticos, estado del paciente,...) y/o a variables en el tratamiento y en el contenido de aminas biógenas de los alimentos ingeridos (RIVAS-GONZALO, 1981; ROE, 1989).

A diferencia de los dos casos anteriores (intoxicaciones histamínicas y migrañas de origen alimentario), las interacciones de las aminas biógenas con los medicamentos IMAO pueden ser graves y de hecho se han descrito ya algunos casos mortales. Blackwell y col. recogieron 26 casos de interacciones durante los años 1963 y 1966, entre los cuales se produjeron 9 muertes por hemorragia intracraneal (STOCKLEY, 1981).

Los síntomas de la interacción, que se agruparon en el pasado bajo la denominación de "síndrome del queso", aparecen en forma de ataques, entre media y dos horas después de que el paciente haya ingerido el alimento que contenía las aminas biógenas. Inicialmente, aparece dolor de cabeza, palpitaciones (con bradicardia o taquicardia), náuseas, vómitos, fiebre, sudoración, dolor en el pecho, pupilas dilatadas, fotofobia y en casos muy graves hemorragia subaracnoidea (RIVAS-GONZALO, 1981; SANCHEZ y PLANAS, 1985). Sin embargo, es raro que queden secuelas permanentes (LIPPMANN y NASH, 1990).

La importancia de estas interacciones ha provocado la limitación del empleo de estos medicamentos en terapéutica (JELLEFF-CARR, 1985) e incluso la retirada de un gran número de ellos, sustituyéndolos por otros de actividad terapéutica similar pero con mecanismos de acción diferentes. Así, se han retirado la fenipramina y la etriptamina, entre otros (SANTOS-BUELGA, 1984). No obstante, todavía se siguen utilizando con relativa frecuencia,

fundamentalmente en tratamientos de depresiones neuróticas graves y fóbicas en pacientes que no toleran o no responden al tratamiento con antidepresivos tricíclicos (ANONIMO, 1984; SELVA, 1986).

Horwitz y col. en 1964 (STOCKLEY, 1981) señalaron que 6 mg de tiramina podían provocar una ligera elevación de la presión sanguínea en pacientes sometidos a tratamiento con IMAO y que entre 10 y 25 mg de esta amina podían desencadenar crisis hipertensivas graves. PONTO y col. en 1977, indicaron que 10 mg producen un efecto presor notable y que 25 mg pueden dar lugar a crisis hipertensivas agudas.

La tranilcipromina y la fenelzina son los IMAO más efectivos como inhibidores, tanto de la MAO intestinal como de la hepática. Estos fármacos son asimismo los responsables del 90% de las crisis hipertensivas de este tipo en seres humanos (RIVAS-GONZALO, 1981).

Por todo ello, es frecuente que en tratamientos con fármacos IMAO se aconseje reducir el consumo de alimentos susceptibles de contener niveles elevados de aminas biógenas, tanto durante el tratamiento como de 3 a 4 semanas después de la finalización del mismo, para que se vuelvan a sintetizar los enzimas bloqueados irreversiblemente (ANONIMO, 1984; MacCABE, 1986; ROE, 1989). Se recomienda a los pacientes que sigan dietas en las que se han excluido productos que pudieran contener niveles elevados de aminas. Se trata de dietas que se denominan como "dietas bajas en tiramina" o "dietas para tratamientos con IMAO" (PEMBERTON y GASTINEAU, 1984; ROJAS-HIDALGO, 1985; MacCABE, 1986; PRUISSEN-BOSKALJON y MELISSEN-LAUREN, 1987).

PEMBERTON y CASTINEAU (1984) señalan que lo que se pretende con la dieta es prohibir o limitar los alimentos que pueden ser ricos en tiramina y otras aminas presoras, así como los alimentos que hayan sido implicados en el desarrollo de crisis hipertensivas en pacientes bajo tratamiento con fármacos IMAO.

Respecto a las dietas para tratamientos con fármacos IMAO, es importante destacar que:

1. Los datos disponibles sobre contenidos de tiramina y otras aminas biógenas muestran una gran variabilidad. Se observan variaciones entre distintas marcas comerciales de un mismo tipo de alimentos, pues factores como la preparación, elaboración y conservación pueden influir mucho sobre el contenido de aminas biógenas (PEMBERTON y CASTINEAU, 1984; MacCABE, 1986).

2. Las cifras de contenidos de aminas en los alimentos proceden de los resultados de investigaciones de diversos autores, que utilizan frecuentemente diferentes métodos de análisis y generalmente no se menciona el número de muestras analizadas ni el estado exacto en el que se encontraba el producto: fresco, maduro, crudo o cocido. (PRUISSEN-BOSKALJON y MELISSEN-LAUREN, 1987).

Como ejemplo, D'ARCY (1988) señala que la recomendación de evitar el consumo de vino Chianti siempre se ha realizado en base a un valor de 25.4 mg/L de tiramina, citado por Horwitz y col. en 1964. Posteriormente se han realizado otros estudios en los que se ha demostrado que los niveles de tiramina en el vino Chianti no son siempre tan elevados (RIVAS-GONZALO, 1979; VIDAL-CAROU, 1987; HANNA y col., 1988; CERUTTI y col., 1989b).

D'ARCY (1988) aconseja que, como es poco probable que los fabricantes de vino y de cerveza determinen el contenido de tiramina en sus productos y que incluyan esta información en la etiqueta, el paciente bajo tratamiento con IMAO evite el consumo de esta clase de bebidas alcohólicas para evitar todo posible riesgo. Este consejo se podría hacer extensible a todos aquellos alimentos que por sus características o por su proceso de elaboración puedan ser susceptibles de contener niveles relativamente elevados de aminas biógenas.

En el tabla 12 se muestra un ejemplo de "dieta baja en tiramina" elaborada en función de lo que señalan PEMBERTON y CASTINEAU (1984), MacCABE (1986), PRUISSEN-BOSKALJON y MELISSEN-LAUREN (1987) y LIPPMANN y NASH (1990), así como en datos propios.

Tabla 12. Recomendaciones de alimentos en una dieta baja en tiramina, para pacientes bajo tratamiento con medicamentos IMAO.

ALIMENTOS A EVITAR SU CONSUMO

- . Quesos, excepto los quesos frescos
- . Embutidos curados
- . Carnes sazonadas y extractos de carne (tipo "Bovril")
- . Conservas y semiconservas de pescado:
arenques, caballas y salmón ahumados y en escabeche, sardinas y atún.
- . Hígado de ternera, buey, pollo y productos a base de estos alimentos, como los "patés".
- . Chucrut
- . Vino, cerveza y otras bebidas alcohólicas fermentadas como vermouths y sidras.
- . Chocolate y productos derivados
- . Extracto de levadura
- . Habas (por su elevado contenido en dopamina)
- . Agüacates y plátanos maduros.

ALIMENTOS PERMITIDOS PERO CON MODERACION

- . Yogurt y nata
- . Embutidos cocidos
- . Salsa de soja
- . Cacahuetes
- . Uvas y fresas
- . Café y té

ALIMENTOS PERMITIDOS

- . Carne y pescado frescos
 - . Huevos
 - . Sopas
 - . Verduras
 - . Frutas
 - . Leche fresca
 - . Legumbres y féculas
 - . Bebidas refrescantes
 - . Galletas y postres
-

1.3.2.2. Formación de nitrosaminas

Algunas de las aminas biógenas presentes en los alimentos han sido señaladas como precursores de ciertas nitrosaminas cancerígenas, como la nitrosopiperidina, la dimetilnitrosamina y la nitrosopirrolidina (BELITZ y GROSCH, 1988). YAMAMOTO y col. (1982) señalan que tanto las poliaminas, espermidina y espermina, como las diaminas, putrescina y cadaverina, pueden ser nitrosadas o ser potenciales precursores de otras aminas capaces de formar nitrosaminas.

Aminas biógenas nitrosables

1. Aminas aromáticas con grupos amino primario, como histamina, tiramina, triptamina, serotonina, β -feniletilamina.

HILDRUM y col. (1975) señalaron que las nitrosaminas de aminas primarias producen compuestos inestables, que se degradan inmediatamente una vez formados. Sin embargo, BELITZ y GROSCH (1988) indican que la formación de estos compuestos es posible mediante una serie de reacciones que comprenden: nitrosación, diazotación, desaminación, dimerización y nitrosación.

Fujita y col. en 1987 (JOOSTEN, 1988) estudiaron la formación de 3-diazotiramina (que inducía a la aparición de cáncer bucal en ratas) a partir de tiramina y en presencia de nitrito. Señalaron que este compuesto mutágeno puede formarse en el estómago, ya que la incubación de 5mM de tiramina y 50mM de nitrito a 37°C y pH de 1-2 durante 60 minutos producía cantidades significativas de 3-diazotiramina. Sin embargo, la concentración de nitrito empleada fue extremadamente elevada y la reacción no ha podido ser demostrada "in vivo".

2. Diaminas con grupos amino primarios como cadaverina y putrescina.

Lijinsky y Epstein en 1970 (YAMAMOTO, 1982) y Bills y col. en 1973 (NAKAMURA y col., 1979) demostraron que la putrescina y la cadaverina pueden ser convertidas por la acción del calor (durante la cocción) en pirrolidina y piperidina, respectivamente. Estas nuevas aminas son precursores directos de la nitrosopirrolidina y la nitrosopiperidina, sustancias reconocidas por su elevado poder carcinogénico.

3. Poliaminas con grupos amino secundarios como espermina y espermidina.

La espermidina y la espermina contienen grupos amino secundarios, que pueden ser nitrosadas por los nitritos. HILDRUM y col. (1975, 1977) aislaron a la 3-butenil-2-propenil-N-nitrosamina como principal compuesto volátil, que se forma en la nitrosación de la espermidina y espermina, e identificaron también tres nitrosaminas más derivadas de la espermidina.

HOTCHKISS y col. (1977) identificaron cuatro nitrosaminas no volátiles formadas por nitrosación de la espermidina. Estos mismos autores en 1979 comprobaron, mediante un test de Ames, la capacidad mutagénica de estos compuesto y de los aislados por HILDRUM y col. (1977).

KAWABATA y col. (1978) señalaron que la agmatina da lugar a una nitrosamina con un poder mutagénico moderado.

La formación de las nitrosaminas podría tener lugar durante el procesado de alimentos que contengan monoaminas, diaminas o poliaminas y nitritos, como sería el caso de la elaboración de los embutidos que incluye una adición de nitratos y nitritos y, en algunos casos, se aplican además tratamientos térmicos (VANDEKERCKHOVE y DEMEYER, 1976; WORTBERG y WOLLER, 1982). También se ha señalado que las nitrosaminas se pueden formar a nivel gastrointestinal, tras la ingestión de alimentos que contengan estas aminas (YAMAMOTO y col., 1982).

ALLISON y MacFARLANE (1989) señalaron incluso que la significación toxicológica de la putrescina y de la cadaverina puede estar relacionada con el desarrollo de cáncer de colon, por la formación de N-nitrosaminas en el intestino. Igualmente, señalan que algunas de las bacterias aisladas de las heces poseen capacidad metabólica para llevar a cabo N-nitrosaciones de aminas secundarias, en condiciones de pH neutro y en presencia de nitritos.

1.4. DETERMINACION DE AMINAS BIOGENAS EN ALIMENTOS POR CLAE

Existen diversos métodos por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE o HPLC) propuestos para separar y cuantificar aminas biógenas en alimentos. Algunos de ellos fueron diseñados, en un principio, para analizar estas sustancias en medios biológicos (plasma, orina, tejidos...) y posteriormente se adaptaron para ser empleados en el análisis de productos alimenticios (HURST, 1990).

Los métodos cromatográficos utilizados, en el análisis de aminas biógenas en alimentos, son mayoritariamente por fase reversa, siendo muy baja la proporción de los que utilizan el intercambio iónico. La fase estacionaria de la cromatografía en fase reversa es de naturaleza apolar, normalmente grupos alquilo como octil, octadecil,... ligados a los grupos sílice que forman parte del relleno de la columna. Como fase móvil se suelen utilizar mezclas de metanol/agua y acetonitrilo/agua. Para el análisis de sustancias ácidas o básicas (como sería el caso de las aminas) se pueden emplear, en vez de agua, soluciones tamponadas de fosfatos o acetatos a un pH determinado, el cual permite controlar el grado de ionización de los solutos. Esta técnica se denomina supresión iónica.

No obstante, en los últimos años se está introduciendo, en el análisis de aminas biógenas por CLAE, la técnica de adicionar a la fase móvil iones de carga contraria a los solutos que se desea separar, para formar un "par iónico" no cargado. Así, se logra que el efecto solvóforo de la fase móvil sea mayor que sobre el soluto en forma ionizada (produciéndose la retención). Las aminas a un pH ácido forman un complejo lipofílico ("par iónico") con el contra-ión adicionado (ácido heptanosulfónico, octanosulfónico, decanosulfónico,...), que eluirá de la columna como tal complejo, mejorándose la resolución cromatográfica (CHANG y col., 1985).

Se ha realizado un resumen de los métodos publicados para la determinación de amina biógenas en alimentos por CLAE, que se presenta en las tablas 13 y 14. Se puede observar que existen dos grandes grupos de métodos: unos que utilizan la absorbancia o la fluorescencia natural de las aminas para su detección y cuantificación, mientras que en otros se lleva a cabo una reacción de derivatización entre las aminas y un reactivo, para obtener un compuesto cromóforo o fluorescente, que pueda ser detectado y cuantificado convenientemente.

Tabla 13. Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos sin derivatización

Condiciones cromatográficas	Eluyentes	Detección	Aminas detectadas	Alimentos	Ref. bibliográfica
Fase reversa con par iónico Flujo: 1.2 mL/min Isocrático	Metanol: Agua con ácido 1-heptano-sulfónico.	Absorción (254 nm)	TIRN FENL TRIPN	Chocolate Embutidos Queso	KOEHLER y EITENMILLER (1978)
IMP ("ion moderate partition") Flujo: 0.5 mL/min Isocrático	Solución de NaOH a pH 11.0	Absorción (207nm)	HISN CADN PUTN ESPM	Pescado	GILL-THOMPSON (1984)
Fase reversa con par iónico Isocrático	Acetonitrilo: Agua con octano-sulfonato sódico	Absorción (220nm)	HISN TIRN TRIPN	Queso	CHANG y col. (1985)
Intercambio iónico Flujo: 1.5 mL/min Isocrático	Agua: solución tamponada de fosfato sódico a pH 7.0	Absorción (278nm)	TIRN	Alimentos fermentados tradicionales asiáticos	MOWER y col. (1989)

Tabla 14. Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos por derivatización: Pre-columna (I).

Condiciones y detección	Eluyentes	Derivatiz.	Aminas detectadas	Alimentos	Ref. bibliográfica
Fase reversa Flujo: 1mL/min Gradiente ABS. (254 nm)	A: Acetonitrilo: solución de ác. acético B: Acetonitrilo: Metanol: sol. ác. acético	Cl-DANS en acetona	HISN CADN PUTN ESPM ESPD	Pescado	MIEZ Y KARVAS (1977)
Fase reversa Flujo: 1.5 ml/min Isocrático Fluorescencia	Ciclohexano: Acetato de etilo	Cl-DANS en acetona	HISN	Vino Cerveza Extractos de levadura	BATTAGLIA Y FRÖHLICH (1978)
Fase reversa Flujo: 2 mL/min Isocrático ABS. (220-200nm)	Acetonitrilo: Solución tamponada con fostato potásico pH 7.0 nol	OPT en medio alcalino y mercaptoeta-	HISN	Vino	SUEDEN y col. (1978)
Fase reversa Flujo: 2 mL/min Isocrático FLUR. (350nm/425nm)	Acetonitrilo: Solución de fosfato potásico a pH 6.4	OPT en medio alcalino y mercaptoeta- nol	HISN	Vino	POLO (1982)

Tabla 14. Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos por derivatización: Pre-columna (II).

Condiciones y detección	Eluyentes	Derivatiz.	Aminas detectadas	Alimentos	Ref. bibliográfica
Fase reversa Flujo: 1 mL/min Isocrático ABS. (254nm)	Metanol: Agua	Clorhidrato de benzoilo en medio básico	CADN PUTN AGMN ESPM ESPD	Vegetales	FLORES (1983)
Fase reversa Flujo: 1.5 mL/min Temp: 33°C Gradiente ABS. (254nm)	A: Metanol: Ace- tonitrilo B: Acido fosfó- rico 0.33mM	Cl-DANS en acetona	HISN TIRN TRIPN FENL CADN PUTN	Queso Pescado	HUI Y TAYLOR (1983)
Fase reversa Flujo: 0.5 mL/min Gradiente FLUR. (340nm/440nm)	A: Metanol: Acético: Ace- tonitrilo B: Metanol	OPT en medio básico con mercaptoeta- nol	HISN TIRN TRIPN FENL PUTN CADN AGMN ESPM ESPD	Vino	BUTEAU y col. (1984)

Tabla 14. Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos por derivatización: Pre-columna (III).

Condiciones y detección	Eluyentes	Derivatiz.	Aminas detectadas	Alimentos	Ref.bibliográfica
Fase reversa Flujo: 1.5 mL/min Temp.: 35°C Gradiente	A: Solución de acetato sódico: THF B: Metanol	OPT en medio básico y mercaptoetanol	HISN TIRN SERN TRIPN FENL CADN PUTN	Vinos	MAYER y PAUSE (1984)
FLUR. (340nm/450nm)					
Fase reversa Flujo: 1 mL/min Temp.: 40°C Isocrático	Acetonitrilo: Solución de acetato sódico pH 6.6 con tetra-n-butilamonio	Fluorescamina	HISN	Pescado	TAMASE y col. (1984)
FLUR. (390nm/480nm)					
Fase reversa Flujo: 0.7 mL/min Isocrático	Acetonitrilo: Solución de fosfato monosódico	OPT en meta-nol	HISN	Pescado	GOUYGOU y col. (1987)
FLUR. (340nm/430nm)					
Fase reversa Temp.: 30°C Isocrático	Metanol: solución tamponada de acetato a pH 6.5: THF	OPT en meta-nol	HISN	Vino	OUGH y col. (1987)
FLUR. (370nm/418nm)					

Tabla 14. Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos por derivatización: Pre-columna (IV).

Condiciones y detección	Eluyentes	Derivatiz.	Aminas detectadas	Alimentos	Ref. bibliográfica
Fase reversa con par ión Flujo: 1.2 mL/min Temp.: 50°C Gradiente	A: Solución fosfato sódico a pH 4.28 y octano sulfonato sódico B: Metanol: Solución A (1:1)	OPT en medio básico con mercaptoetan.	TIRN TRIPN CADN PUTN AGMN	Pescado	YAMANAKA Y col. (1987)
FLUR. (348nm/450nm)					
Fase reversa Flujo: 1.5 mL/min Gradiente	A: Solución fosfato con tetrabutilamonio B: Metanol: Acetonitrilo	Cl-DANS en acetonitrilo	HISN CADN PUTN	Alimentos	CARLUCCI Y KARMAS (1988)
ABS. (254nm)					
Fase reversa Flujo: 0.5 mL/min Isocrático	Acetonitrilo: Solución de fosfato potásico	OPT en metanol	HISN	Pescado	POZO Y SAITUA (1988)
FLUR. (350nm/447nm)					
Fase reversa Flujo: 0.5 mL/min Isocrático	Acetonitrilo: Metanol: Agua: Acido acético	Cl-DANS en acetonitrilo	HISN TIRN FENL CADN PUTN	Vino	VECCHIO Y col. (1989)
FLUR. (350nm/447nm)					

Tabla 14. Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos por derivatización: Post-columna (V)

Condiciones y detección	Eluyentes	Derivatiz.	Aminas detectadas	Alimentos	Ref. bibliográfica
Fase reversa Flujo: 1 mL/min Flujo post: 1mL/min Temp. reacción: 40°C Isocrático	Solución de ácido acético a pH 2.8	OPT en medio básico	TIRN SERN TRIPN FENL	Chocolate	HURST Y TOOMEY (1981)
FLUR. (340nm/418nm)					
Intercambio iónico Flujo: 1 mL/min Flujo post: 0.5mL/min Isocrático	Solución tampón de ácido cítrico a pH 6.4	OPT en medio básico	HISN	Pescado	YOSHIDA Y NAKAMURA (1982)
FLUR. (360nm/455nm)					
Intercambio iónico Flujo: 1.5mL/min Temp.: 45°C Flujo post: 1.2mL/min Isocrático	Solución de fosfato potásico: Metanol	OPT en medio básico y mercaptoetanol	HISN	Pescado	WALTERS (1984)
FLUR. (350nm/445nm)					

Tabla 14. Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos por derivatización: Post-columna (VI).

Condiciones y detección	Eluyentes	Derivatiz.	Aminas detectadas	Alimentos	Ref. bibliográfica
Fase reversa con par iónico Flujo: 1mL/min Temp. reacción: 145°C Isocrático	Solución tampón nada de acetato sódico pH 5.0: Dimetilsulfóxido: Agua: Dodecilsulfonato sódico	Ninhidrina, disuelta en la fase móvil	HISN TIRN TRIPN FENL CADN PUTN	Chocolate Chucrut Queso Pescado Vino	JOOSTEN Y OLIEMAN (1986)
ABS. (546nm)					
Fase reversa con par iónico Flujo: 1.5mL/min Flujo post: 1mL/min Temp. reacción: 40°C Isocrático	Metanol: Solución de fosfato sódico con ácido heptanosulfónico	OPT en medio básico y mercaptoeta-nol	TIRN	Productos lácteos	REVEURS (1986)
FLUR. (350nm/445nm)					
Fase reversa con par iónico Flujo: 1.5 mL/min Gradiente	A: Solución de acetato sódico a pH 4.5 B: Solución de acetato sódico a pH 4.5; Metanol. Ambas fases con octanosulfonato sódico.	OPT en medio básico y mercaptoetanol	HISN TIRN CADN PUTN AGMN ESPD	Pescado	WATERS (1988)
FLUR. (350nm/445nm)					

1.4.1. METODOS POR CLAE SIN DERIVATIZACION

Los métodos cromatográficos para el análisis de aminas biógenas que utilizan la medida de la absorbancia natural suelen ser poco sensibles y selectivos, debido a que la detección se realiza a longitudes de onda (p.e. a 254 nm y a 210 nm) en las que absorben otros muchos compuestos.

En estos métodos suelen ser necesarias pautas de extracción de la muestra largas y complejas, para intentar evitar que un gran número de compuestos puedan ser extraídos junto con las aminas biógenas e interferir en su determinación final (HURST, 1990).

Otro tipo de sistema de detección, en el que no es necesaria la derivatización de los analitos, es la detección electroquímica. Ultimamente han aparecido algunos métodos de este tipo para la cuantificación de catecolaminas en muestras de plasma, orina y tejidos, pero existen todavía pocos trabajos en que se apliquen métodos similares a alimentos. Esta técnica se basa en la oxidación del grupo catecol por la acción de un electrodo de grafito, produciendo una ortoquinona, dos protones y dos electrones. El detector electroquímico mide esta oxidación como una corriente anódica (HURST, 1990). Es un detector muy sensible y específico, pero su uso está limitado a las aminas biógenas que presenten el grupo catecol. Como ejemplo de autores que han aplicado esta técnica en alimentos señalaremos a WHEATLEY y TIPTON (1987), que utilizan este sistema de detección electroquímica para la determinación de tiramina en bebidas alcohólicas.

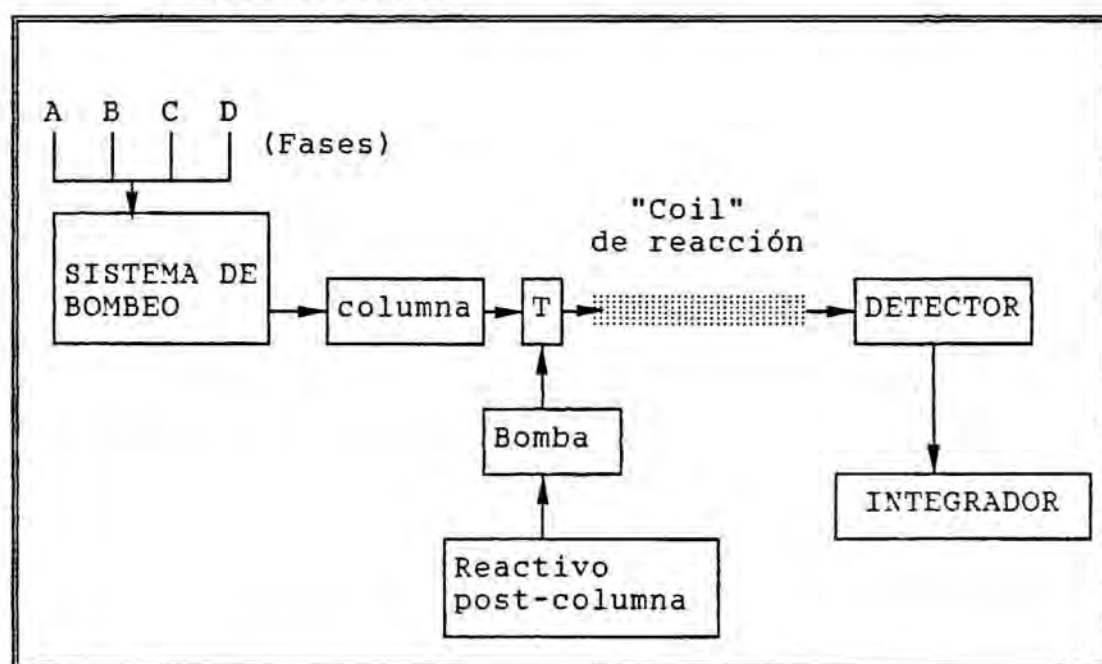
1.4.2. METODOS POR CLAE CON DERIVATIZACION

Los derivados que más habitualmente se forman presentan absorbancia al ultravioleta/visible o bien son fluorescentes. En este último caso se consigue un aumento considerable de la sensibilidad y la selectividad de la técnica analítica.

La derivatización se puede realizar antes de que la muestra sea introducida en la columna para proceder a su separación, sería por tanto una derivatización pre-columna, o bien realizarse una vez los diferentes compuestos han eluido separadamente de la columna, recibiendo entonces este sistema el nombre de derivatización post-columna.

La derivatización post-columna requiere un segundo sistema de bombeo, para impulsar el reactivo derivatizante a la salida de la columna y de esta forma provocar la mezcla con los analitos. En general, esta mezcla se realiza en un cámara que consta de un tubo capilar en forma de "T". Posteriormente, la reacción transcurre a lo largo de un tubo capilar, denominado "coil" de reacción. La longitud y el diámetro de este "coil" será menor o mayor, en función del tiempo que sea necesario para que tenga lugar la reacción, entre analito y reactivo. Las dimensiones deben estar perfectamente estandarizadas para asegurar la máxima reproducibilidad de los resultados. En la figura 7 se representa un esquema de un sistema CLAE con derivatización post-columna.

Figura 7. Esquema de un sistema CLAE con derivatización post-columna.



Aunque este tipo de derivatización representa un incremento en la instrumentación necesaria y, por tanto, en el coste total, una de las ventajas más importantes que presenta, tanto para la determinación de aminas biógenas en alimentos como en general, es que se requieren menores preparaciones de la muestra, las interferencias que se producen son mínimas y se ahorra tiempo en el análisis, ya que el transcurso de las etapas de reacción se realiza de forma automática (WALTERS, 1984).

En la tabla 15 se recogen los reactivos derivatizantes más utilizados para la determinación de aminas biógenas en alimentos.

Tabla 15. Reactivos utilizados para la determinación de aminas biógenas (HURST, 1990).

REACTIVO	DETECCION
Cl-DANS (Cloruro de dansilo o 5-N,N'-dimetilamino naftaleno-1-sulfonilcloruro)	Fluorescencia UV/Visible
Cl-DABS (Cloruro de dabsilo o 4-N,N'-dimetilamino benzeno-4-sulfonilcloruro)	UV/Visible
Fluorescamina	Fluorescencia
Ninhidrina	Fluorescencia
OPT (o-ftalaldehído)	Fluorescencia
PITC (fenilisotiocianato)	UV/Visible

A. Cloruro de dansilo (Cl-DANS)

Es uno de los reactivos que, junto al OPT, se ha utilizado más ampliamente en la determinación de aminas biógenas en medios biológicos y alimentos.

La derivatización con este reactivo se realiza normalmente antes de la inyección de la muestra en el sistema cromatográfico.

El procedimiento de dansilación de las aminas suele ser largo, incluso puede llegar a ocupar dos días, en algunas metódicas. A temperatura ambiente se necesita un tiempo de reacción de unas 12 horas a temperatura ambiente (MIETZ y KARMAS, 1977), aunque se puede acelerar si se aplican temperaturas mayores. Una vez finalizada la reacción debe realizarse la extracción del complejo dansilado formado, lo cual suele provocar que se obtengan recuperaciones bajas de las aminas (GILL y THOMPSON, 1984). Sin embargo, los derivados formados son estables durante un intervalo de tiempo bastante amplio tras su preparación.

BUTEAU y col. (1984) señalan que el empleo del Cl-DANS, que también reacciona con compuestos fenólicos, en el análisis de aminas en vinos provoca la aparición de un gran número de interferencias, ya que reacciona

con los compuestos fenólicos presentes en el vino . El Cl-DANS también reacciona con el amoníaco del ambiente y de los disolventes, provocando la aparición de picos "fantasmas" debidos a los complejos dansil-sulfonamida formados. Además, algunos aminoácidos básicos tienden a formar un pequeño porcentaje de productos secundarios durante la reacción de derivatización con este reactivo.

B. Fluorescamina

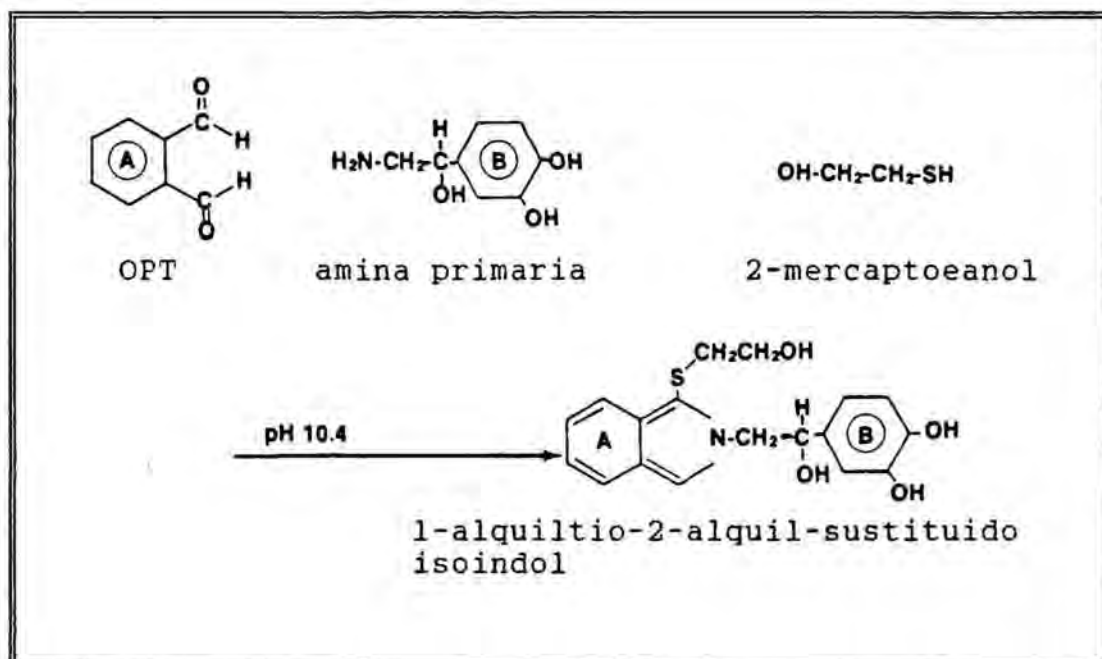
Es un reactivo que reacciona casi instantáneamente y a temperatura ambiente con las aminas primarias, dando lugar a un compuesto fluorescente.

Las diaminas y poliaminas suelen producir más de un pico, debido a la formación de mono- y difluorescamina derivados (BUTEAU y col., 1984).

C. O-Ftalaldehido (OPT o OPA)

El OPT forma con las aminas primarias un complejo fluorescente en medio básico, al reaccionar los dos grupos aldehidos del OPT con el grupo amino de la amina biógena. Se ha observado que en presencia de un agente reductor, como el 2-mercaptoetanol, aumenta la fluorescencia del compuesto formado, así como su estabilidad (figura 8).

Figura 8. Esquema de la formación del compuesto fluorescente entre una amina primaria y el OPT en presencia de 2-mercaptoetanol.



REUVERS y col. (1986) señalaron que la ventaja de utilizar el OPT, para el análisis de las aminos biógenas en alimentos, es que presenta mayor selectividad para las aminos primarias que el Cl-DANS. Sin embargo el OPT tendría como inconveniente que no reacciona con las aminos secundarias.

Los derivados con el OPT se pueden realizar tanto pre- como post-columna.

La reacción pre-columna es sencilla y bastante rápida, ya que se produce, en medio básico, en un tiempo inferior a los 5 minutos. Posteriormente, el medio se acidifica para incrementar la fluorescencia y la estabilidad del compuesto formado.

BUTEAU y col., 1984; MAYER y PAUSE, 1984; WALTERS, 1984; POZO y SAI TUA, 1988 señalan que, debido a la relativa inestabilidad del complejo OPT-amina formado, se ha de aplicar una metódica de trabajo muy precisa, en la que sobre todo se ha de procurar que el intervalo de tiempo entre el inicio de la derivatización y la inyección de la muestra sea corto, ya que la fluorescencia del complejo va descendiendo conforme va pasando el tiempo, y constante, para evitar errores que afectarían a la exactitud de la medida.

Fundamentalmente por esta falta de estabilidad del complejo OPT-amina, muchos autores (WALTERS, 1984; REUVERS y col., 1986; WATERS, 1988) recomiendan la derivatización post-columna en el análisis de aminos biógenas en alimentos, ya que el tiempo entre la formación del derivado y la detección es muy corto y siempre es el mismo. La reacción se produce en el "coil" de reacción y el derivado formado llega a la célula del fluorímetro rápidamente.

1.4.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS: PREPARACION Y EXTRACCION

El paso previo de cualquier determinación cromatográfica es la extracción de las sustancias a determinar, en este caso las aminos biógenas, de la matriz en la que están presentes, es decir del alimento.

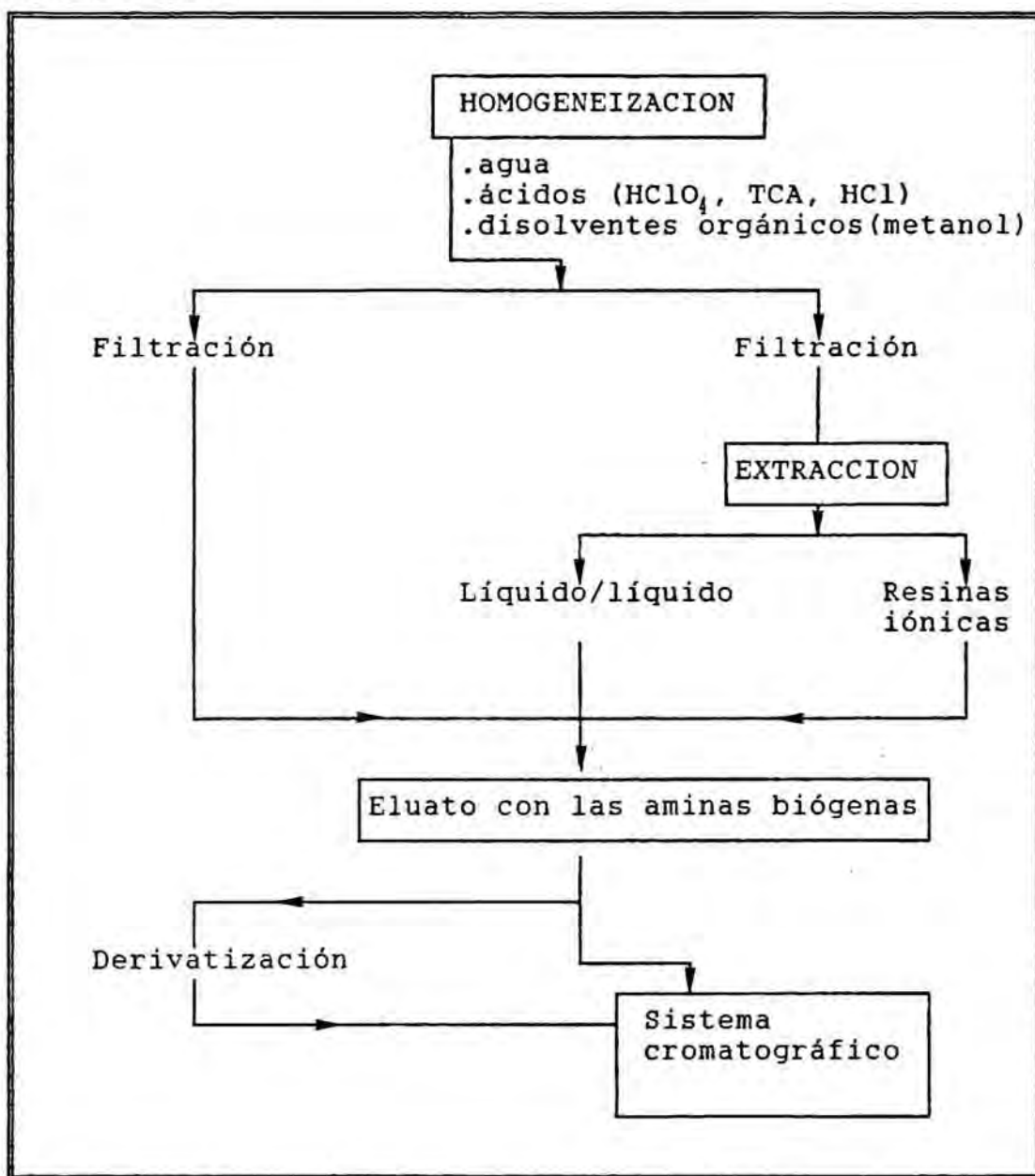
En el caso de productos líquidos, esta extracción suele ser innecesaria. En el caso de los alimentos sólidos, la preparación y extracción de la muestra es necesaria y, a veces, dependiendo de la complejidad del alimento, puede presentar mayores problemas que la técnica cromatográfica en sí (HURST, 1990). Resumidamente podemos señalar que para:

Productos líquidos, como vino, cervezas,... Los tratamientos que se realizan a las muestras suelen ser mínimos, como por ejemplo una filtración, o una extracción con resinas o Sep-Pack[®] (SUBDEN y col., 1978; OUGH y col., 1987;). Estos tratamientos van destinados generalmente a eliminar compuestos coloreados que pudieran interferir, como sería el caso de los vinos tintos o de las cervezas negras.

Productos sólidos, como pescados, quesos, embutidos,... Los tratamientos para este tipo de muestras son muy numerosos y de diversa complejidad. Algunos autores proponen una homogeneización de la muestra con ácido tricloroacético o ácido perclórico y su posterior filtración (GOUYGOU y col., 1987; POZO y SAITUA, 1988). Otros incluyen una separación líquido/líquido o una extracción de las aminas mediante resinas de intercambio iónico (KOEHLER y EINTENMILLER, 1978; CHANG y col., 1985; CARLUCCI y KARMAS, 1988).

En general, las etapas para la extracción de las aminas biógenas en un muestra sólida podrían ser las que se esquematizan en la figura 9.

Figura 9. Esquema de preparación y extracción de aminos biógenos de una matriz sólida para su posterior determinación por CLAE.



2. LA CERVEZA

2.1. DEFINICION Y TIPOS

(DUBÖE-LAURENCE y BERGER, 1988; HOUGH, 1990)

La Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza (MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA DEL GOBIERNO, 1981, 1984 y 1988) define a la cerveza como la bebida resultante de fermentar, mediante levadura seleccionada, el mosto de malta de cebada, sólo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, sometido previamente a un proceso de cocción y aromatizado con extractos, concentrados y/o flores de lúpulo.

El grado alcohólico de la cerveza no debe ser inferior al 3% en masa y el extracto seco primitivo no debe ser inferior al 11% en masa (11° Bailling). En función de este parámetro, la legislación española clasifica a las cervezas en:

CERVEZA, su extracto seco primitivo (extracto seco del mosto antes de fermentar) no debe ser inferior al 11% en masa.

CERVEZA ESPECIAL, su extracto seco primitivo no debe ser inferior al 13% en masa.

CERVEZA ESPECIAL EXTRA, su extracto seco primitivo no debe ser inferior al 15% en masa.

Además de los tres tipos de cerveza definidos existen otros productos de cervecería como son: malta líquida, obtenida exclusivamente a partir del mosto de la malta, aromatizada o no con lúpulo y con un contenido en alcohol no superior al 1%, y malta espumoso, que se obtiene por saturación de la malta líquida con dióxido de carbono.

Establecer una división neta entre los diferentes tipos de cervezas no es fácil, debido a la gran variedad de cervezas existentes. Los diferentes tipos de cebada, de lúpulo y de levadura, las diferentes clases de agua y de climatología, e incluso factores de tipo socioeconómico han ido determinando, en muchos casos, que cada región o zona geográfica elabore un tipo de cerveza, con sus características especiales y propias.

Una primera división que se puede realizar para clasificar a las cervezas es en función del tipo de levadura que se emplea para su elaboración. Así, se pueden establecer dos grandes grupos:

I. Cervezas de fermentación alta, en las que la levadura al finalizar el proceso de fermentación asciende hacia la superficie de la cerveza. Como ejemplos de cervezas de fermentación alta se pueden citar los siguientes tipos:

"Ale" (británicas). En su origen se aromatizaban con hojas de romero y posteriormente se incorporó la adición de lúpulo. Dentro de esta categoría existen a su vez diferentes clases de cervezas, como son las "pale ales", pálidas, muy lupulizadas y secas; las "mild ales", cobrizas, suaves y dulces y las "strong ale", de elevada graduación alcohólica.

"Stout" y "Porter" (irlandesas). Cervezas que se obtienen a partir de maltas muy torrefactas que otorgan un fuerte color negro y un sabor mitad caramelo mitad regaliz. Son de tipo "stout" marcas comerciales tan conocidas como la "Guinness" o la "Tennent's".

"Cervezas de abadía" o "trapenses". Productos elaborados por monjes cistercienses. Son cervezas oscuras, muy lupuladas y que han sufrido una segunda fermentación en botella, para lo que se les inocula una cierta cantidad de levadura una vez embotelladas.

"Weissebier" (Berlín) y "Weizenbier" (Baviera). Se elaboran a partir de mezclas de malta de cebada y de trigo. Son ligeras, débilmente lupuladas y refermentadas en botella, lo que les permite madurar y saturarse de CO₂.

"Kriek" o cerveza de cerezas. Se elaboradas a base de cebada y durante su envejecimiento maduran en ellas cervezas.

"Altbier" (alemanas). Son cervezas oscuras y amargas.

II. Cervezas de fermentación baja, en las que la levadura se deposita en el fondo del tanque de fermentación, al finalizar el proceso fermentativo. También se denominan "lager", que en alemán significa "guarda". Las siguientes cervezas son de tipo lager:

"Pils" o "Pilsener". Su elaboración procede de Checoslovaquia, pero actualmente su procedimiento de elaboración es el que se utiliza en la mayor parte de Europa, América del Norte y Australia. Son cervezas suaves, claras y muy aromatizadas con lúpulo.

"Dortmünder". Son cervezas parecidas a las "pils", pero mucho más secas y menos lupuladas.

"Münchener". Cervezas más oscuras que las dos anteriores y con más cuerpo.

"Bock". Cervezas alemanas oscuras y fuertes.

Finalmente existen también cervezas de "fermentación espontánea" elaboradas en la zona circundante a Bruselas. Se caracterizan por el hecho de que no se adiciona al mosto una levadura concreta, sino que se le deja expuesto al aire para que se instaure en él una flora característica de la zona, que será la responsable de la fermentación. Suelen ser procesos de elaboración largos, con fermentaciones que pueden alcanzar los cuatro años de duración. Las cervezas así elaboradas se caracterizan por una fuerte acidez y un bouquet muy característico y especial, que las hace muy apreciadas. Cervezas de fermentación espontánea son, por ejemplo, "Lambic", "Gueuze" y "Kriek-Lambic".

2.1. ELABORACION DE LA CERVEZA

(SUNIER, 1958; ROSE, 1975; DALGLIESH, 1981; MOLINA-CANO, 1987; BELITZ y GROSCH, 1988; HOUGH, 1990)

La clave del proceso de elaboración de la cerveza es la adición de levadura al mosto, para provocar la fermentación de algunos de los azúcares de los cereales, produciendo alcohol y dióxido de carbono. De este modo se obtiene la cerveza "joven" o "verde", que pasa a continuación a grandes tanques de maduración (o envejecimiento) donde adquirirá su sabor y aroma característicos. Sin embargo, la fase de fermentación sólo es una etapa, aunque importante, de una serie de operaciones, todas ellas decisivas papeles decisivos para la obtención del producto final.

2.2.1. MATERIAS PRIMAS

La cebada

El grano de cebada posee una estructura en forma de huso y está recubierto por envolturas resistentes que lo protegen exteriormente. Si se retiran estas envolturas se observa un pequeño embrión y una masa relativamente grande de tejido endospermico, que consiste principalmente en reservas de alimento que posibilitarán la germinación del embrión. Estas reservas están formadas en un 60-70% por polisacáridos, de los cuales el 55% es almidón y el resto son azúcares, como glucosa y maltosa fundamentalmente. El endosperma contiene también un 12% de agua, un 10% de materia nitrogenada, un 4.4% de celulosa, un 2.1% de minerales y un 2.5% de lípidos.

Las variedades de cebadas que se utilizan en cerveceria son fundamentalmente dos: cebada de dos "filas" o "carreras" y cebada de seis "filas" o "carreras". La primera de ellas se caracteriza por ser una cebada de granos grandes y uniformes, con un contenido en almidón elevado. La de seis "filas" presenta un grano más irregular y un contenido de almidón menor, pero contiene una alta proporción de proteínas y produce maltas con una elevada dotación enzimática.

Para la elaboración de cerveza, los granos de cebada no se utilizan como tales, sino que han de ser transformados en malta previamente.

La malta

Es la cebada germinada. El grano de cebada se deja germinar parcialmente, deteniendo el proceso por secado y torrefacción. La germinación tiene por finalidad permitir que los granos de almidón del endosperma sean accesibles a los enzimas hidrolíticos que, a su vez, se generan durante este proceso. De este modo, se liberan moléculas de maltosa que las levaduras podrán utilizar como sustrato de la fermentación.

Los cereales secundarios o auxiliares

Suelen ser derivados de cereales sin maltear, generalmente, maíz, trigo o arroz que se emplean para conferir ciertas características al mosto. En algunos casos sirven para reforzar la cantidad de azúcares fermentables del mosto, diluyendo el contenido de nitrógeno total, o bien para bajar el extracto seco, el color o la densidad. En otros casos se utilizan simplemente para disminuir precios de coste. La legislación española indica que podrán ser adicionados siempre que no excedan del 30 por ciento de la materia prima empleada.

Los cereales secundarios se pueden añadir en forma de granos molidos o en copos o bien en forma de jarabes o extractos en polvo, siendo éstas dos últimas formas las más utilizadas actualmente. Estos jarabes o extractos en polvo se obtienen mediante hidrólisis ácida o digestión enzimática del almidón de estos cereales.

El lúpulo

El lúpulo (Humulus lupulus) es una planta trepadora dioica que pertenece a la familia de las Cannabiáceas. Para la elaboración de cerveza sólo se utilizan las inflorescencias de la planta femenina.

Estas inflorescencias son ricas en: a) aceites esenciales de tipo terpeno, que le confieren casi todas sus características aromáticas, y b) sustancias de carácter amargo (resinas) como humulona, lupulona y cohumulona, que son las responsables del gusto amargo de la cerveza.

El lúpulo contiene también taninos que intensifican el color y clarifican la cerveza, al precipitar con las proteínas durante la obtención del mosto. Finalmente el lúpulo aporta sustancias antisépticas que ayudan a evitar un deterioro microbiológico de la cerveza acabada.

El agua

El agua tiene un papel muy importante en la fabricación de la cerveza. Debe reunir todas las condiciones que se exigen para las aguas potables. Además de ser inodora, incolora e insípida, el agua debe estar exenta de materia orgánica, hierro, sulfuros y nitratos. Su dureza, ya sea total, permanente o temporal, influye de manera importante en la calidad del producto final. Actualmente los métodos de corrección de las aguas permiten adaptar el agua de fabricación a cada tipo de cerveza.

La levadura

Excepto casos muy particulares en que la cerveza se obtiene por fermentación espontánea, se adicionan al mosto exclusivamente levaduras del género Saccharomyces. Se distinguen fundamentalmente las levaduras de fermentación "alta" y las de fermentación "baja".

Las levaduras de fermentación alta se caracterizan porque actúan a temperaturas superiores a los 15°C y porque se acumulan después de la fermentación en la superficie de la cerveza. Estas levaduras tienen una capacidad limitada para fermentar la rafinosa (sólo fermentan 1/3 de la cantidad de este azúcar presente en el mosto), debido a que carecen del enzima melibiasa. Un ejemplo de levadura de fermentación alta es el Saccharomyces cerevisiae var. cerevisiae.

Las levaduras de fermentación baja generalmente se utilizan a temperaturas inferiores a los 10°C y mantienen su actividad hasta los 0°C. A lo largo de la fermentación estas levaduras floculan hacia el fondo del tanque. Tienen capacidad para fermentar de forma completa a la mayoría de los azúcares del mosto y también a la rafinosa. La Saccharomyces cerevisiae var. uvarum, que también se ha denominado S. uvarum o S. carlsbergensis, es un ejemplo de levadura de fermentación baja.

Según el poder de fermentación se pueden diferenciar dos tipos de levadura de fermentación baja:

- a) Levadura de elevado poder fermentativo. Se mantiene mucho tiempo suspendida en la cerveza en forma de "levadura en polvo" y proporciona cervezas de un grado de fermentación alto.
- b) Levadura de bajo poder fermentativo. Se sedimenta rápidamente en forma de copo o de tela ("levadura en tela"), limitándose de esta forma su acción fermentativa.

La mayoría de las industrias cerveceras obtienen las levaduras que necesitan a partir de cepas propias o de colecciones de cultivos, mediante un proceso denominado de "propagación" y preparación del "pie de cuba". Este proceso consiste en incrementar la biomasa de la levadura, suministrando constantemente, o a pequeños intervalos de tiempo, mosto industrial con la finalidad de obtener una cantidad suficiente de levadura que permita su adición al mosto que se pretende fermentar.

En algunas cervecerías se utiliza la levadura solamente una vez, mientras que en otras se reutiliza la levadura que sedimenta al final de un proceso de fermentación. En este último caso, la levadura pastosa que se recoge, se lava para eliminar impurezas y se guarda en unos tanques especiales a una temperatura de 4⁰C, hasta que se usa para una nueva fermentación. En algunas ocasiones se prensa para disminuir el volumen o bien se mantiene en suspensión sobre el propio mosto.

El lavado de la levadura tiene por objeto eliminar impurezas, flora contaminante y células de levaduras muertas. Este lavado se puede realizar simplemente con agua destilada, pero así sólo se consigue la eliminación de cuerpos extraños e impurezas. Son mucho más efectivos los lavados en los que se utiliza ciertos ácidos, como fosfórico, sulfúrico o tartárico a pH 2.2-2.4 durante un par de horas. Las levaduras son generalmente más resistentes a los valores bajos de pH que las bacterias en general, y la flora láctica en particular. Por ello, las bacterias pueden ser eliminadas selectivamente por la rápida pérdida de viabilidad que experimentan.

Cada ciclo de la levadura, desde que se adiciona al mosto hasta que se recoge de nuevo al final de la fermentación para volverse a adicionar, se denomina "generación". El número de veces que se recicla una levadura depende de la industria cervecera. Cuando ya no se recicla más, la masa de levadura obtenida constituye un subproducto que suele utilizarse para alimentación animal.

2.2.2. ETAPAS DE LA ELABORACION

2.2.2.1. Malteado: Obtención de la malta

Tiene por objeto favorecer el desarrollo de todos los sistemas enzimáticos que intervienen en la hidrólisis de los diversos constituyentes del endosperma del grano de cebada, fundamentalmente:

- * enzimas hidrolíticos, que actuarán sobre los polisacáridos, escindiéndolos en los azúcares que los componen, ya que la levadura sólo puede fermentar azúcares sencillos. Estos mismos enzimas serán los responsables de la hidrólisis de los polisacáridos aportados por los cereales secundarios.
- * enzimas proteolíticos, que actuarán hidrolizando las proteínas que contiene la cebada, dando lugar a péptidos y aminoácidos.

El proceso del malteado se puede dividir en las siguientes fases:

1.- Maceración o "remojo". Su objetivo principal es proporcionar al grano de cebada el agua y el oxígeno necesarios para la germinación.

Los granos de cebada limpios se maceran con agua a 12-15⁰C durante 2-3 días, hasta la obtención del grado de blandura requerido. Durante este periodo de tiempo el agua se va cambiando para eliminar la posible flora microbiana existente y, al mismo tiempo, reponer el O₂ disuelto.

2.- Germinación. Una vez que el grano ha absorbido la cantidad necesaria de agua, dispone de O₂ y está a la temperatura conveniente, el embrión se activa induciendo la secreción de enzimas que difunden por todo el endosperma e inician la hidrólisis de almidón, proteínas, lípidos, etc,.. Los principales enzimas que se activan son amilasas α y β , hemicelulosas, proteinasas, peptidasas, oxidasas, peroxidasas, catalasas y fitasas.

Esta etapa dura unos 7-9 días y se realiza en cámaras o tambores giratorios provistos de sistemas de aireación. Es necesario un cuidadoso control de la temperatura, humedad y niveles de O₂ para que se produzca una germinación uniforme. De esta forma se obtiene una masa endospermica totalmente desagregada y muy friable, que permitirá una molturación de la malta sin que se fragmente la cascarilla.

La cebada germinada se denomina "malta verde" y presenta un contenido en agua del 40 al 45%.

3.- Torrefacción. Con objeto de detener la germinación, la "malta verde" se somete en primer lugar a una desecación (unas 12 horas a 35-40⁰C), con lo que se reduce a un 10% el contenido en agua. A continuación se eleva la temperatura de tostado a unos 80-85⁰C y se mantiene durante unas 4-5 horas. La humedad se reduce a un 1-5% y la malta

adquiere estabilidad suficiente para su almacenamiento. Si la temperatura de torrefacción es superior a la indicada se obtienen maltas más tostadas, que se destinan a la fabricación de cervezas negras.

Durante la torrefacción se inhibe parcialmente la acción de los enzimas y se refuerza la coloración, debido a los productos resultantes de las reacciones entre los hidratos de carbono y los aminoácidos (reacciones de Maillard). Igualmente se forman trazas de productos que pueden influir posteriormente en el sabor de la futura cerveza.

Bioquímica del malteado

Durante la germinación del grano de cebada se producen cambios bioquímicos importantes, que afectan a la mayoría de sustancias que forman parte de la composición del cereal. Estos cambios son consecuencia, en la mayoría de los casos, de la actividad de una batería de enzimas destinados a proporcionar toda una serie de principios activos necesarios para que el embrión pueda germinar y crecer.

Proteínas

Las proteínas de la cebada en germinación constituyen una mezcla compleja y de difícil clasificación, debido a que el proceso genera toda una serie de nuevos compuestos.

Los enzimas encargados de la hidrólisis proteica durante la germinación son fundamentalmente proteinasas y peptidasas. Entre éstas las más importantes durante el malteado son las endopeptidasas y las peptidasas. Las primeras pueden hidrolizar cualquier enlace peptídico de la cadena de proteína, mientras que las segundas escinden aminoácidos o péptidos simples. Las más importantes son las carboxipeptidasas que liberan aminoácidos libres, que serán requeridos posteriormente por las levaduras para su crecimiento.

Así, y de modo ilustrativo, se puede extrapolar que si el proceso de malteado se inicia con una cebada con 100 partes de sustancia nitrogenada, la malta que se obtenga contendrá aproximadamente unas 94 partes. Durante el braceado (obtención del mosto) 40 de estas 94 partes se solubilizan en el agua caliente y 54 permanecen en el grano agotado. De las 40 partes solubilizadas, aproximadamente 0.8 partes se encuentran en forma de aminoácidos libres, siendo el mayoritario la prolina. La mayoría de las sustancias nitro-

genadas y sobre todo los aminoácidos son utilizados durante el crecimiento de la levadura. Los compuestos nitrogenados más complejos precipitarán durante las diferentes etapas de la elaboración de la cerveza. El resto, que permanece en disolución, jugará un papel importante en la formación de espuma en el producto acabado.

Almidón

El almidón es el más importante de los carbohidratos presentes en la malta. Los enzimas que degradan este polisacárido son las amilasas, iniciándose esta hidrólisis durante el malteado y finalizándose en el braceado u obtención del mosto.

Durante el malteado, el almidón se degrada fundamentalmente a una mezcla de moléculas de poliglucosa, algo menos complejas que las originales. Para los procesos respiratorios y biosintéticos embrionarios sólo se libera una cantidad limitada de azúcares simples.

Los enzimas glucolíticos que actúan durante el malteado son las amilasas α y β . El mecanismo de acción de estos dos enzimas es diferente. La α -amilasa hidroliza cualquier enlace a 1 \rightarrow 4 (excepto en determinados puntos, como enlaces cercanos a ramificaciones y a extremos de la molécula). Por el contrario, la β -amilasa hidroliza a las moléculas de almidón por sus extremos no reductores. Como consecuencia de esta diferente acción, los productos de la α -amilasa son fundamentalmente carbohidratos complejos, denominados dextrinas, ramificadas y lineales, mientras que la β -amilasa libera principalmente unidades de maltosa. En general y por esta razón a la α -amilasa se le suele denominar enzima dextrinante y a la β -amilasa enzima sacarificante.

La β -amilasa se encuentra ya en la cebada antes de la germinación, aunque gran parte está ligada y es inactiva. Por el contrario, la α -amilasa se sintetiza cuando comienza la germinación. Durante el malteado aumenta constantemente la relación α -amilasa/ β -amilasa, siendo más termoestable la α -amilasa que la β -amilasa. Por esta razón las maltas muy tostadas pueden ser deficitarias en β -amilasa.

Lípidos

Los lípidos presentes en la cebada y en la malta están formados por triglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos. Son importantes para la síntesis de la membrana de la levadura y porque pueden intervenir en el desarrollo de sabores desagradables. Durante el malteado, una parte de los lípidos pueden ser degradados y oxidados por enzimas, tales como, esterasas, fosfatasas, glicosilasas y peroxidases.

2.2.2.2. Braceado: Obtención del mosto

La finalidad de este proceso es la transformación de los azúcares no fermentables, presentes en la malta y en los cereales secundarios, en azúcares fermentables por las levaduras de cultivo. El líquido que se obtenga (mosto) debe tener una concentración de azúcares característica para cada tipo de cerveza que se quiera elaborar.

Existen numerosos métodos de preparación del mosto o braceado, pero fundamentalmente se reducen a tres:

- Métodos por infusión. La mezcla de malta molida y agua se calienta progresivamente sin alcanzar en ningún momento la temperatura de ebullición.
- Métodos por decocción. El aumento de la temperatura se consigue llevando a ebullición una parte de la masa, que posteriormente se mezcla con la totalidad haciendo subir la temperatura. Esta operación se puede repetir tantas veces como sea necesario.
- Métodos mixtos, en los que se combinan ambos métodos de calentamiento.

En líneas generales el proceso de obtención del mosto se inicia molturando la malta con objeto de aumentar la superficie de contacto con el agua. A continuación la malta triturada se mezcla con agua tibia (40°C) y se mantiene a esta temperatura unos 30 min (periodo de reposo). Paralelamente se prepara una papilla gelatinosa con los cereales secundarios o auxiliares. Cuando está preparada, se añade a la papilla de malta y se calienta la mezcla resultante a la temperatura de sacarificación escogida, que normalmente es alrededor de los 70-75°C. La elevación de la temperatura se realiza gradualmente, a razón de un grado por minuto.

La mezcla se mantiene a esta temperatura hasta que todo el almidón se ha hidrolizado. El control de la sacarificación se suele realizar mediante una prueba de coloración con iodo. Se deposita en un pocillo una alícuota de la mezcla a la que se le añade una gota de iodo. La sacarificación es completa cuando no aparece ninguna coloración.

Después de la sacarificación, la mezcla se lleva a ebullición y se mantiene a esta temperatura entre unos 15 a 30 minutos. Con esta elevación de la temperatura se consigue destruir la mayor parte de los enzimas.

Cabe destacar la importancia del control de la temperatura durante la elaboración del mosto, ya que los enzimas que intervienen presentan temperaturas óptimas de actuación distinta, siendo relativamente fácil prolongar más o menos su acción, o incluso inhibir alguna de ellas, utilizando diferentes diagramas para la subida de la temperatura.

Así, durante el período de "reposo", cuando la temperatura se mantiene a unos 40-50°C, los enzimas proteolíticos encuentran las condiciones más convenientes para su actividad. Los péptidos y aminoácidos que se liberan, no contribuyen directamente a la producción de alcohol, pero proporcionan sustratos alimenticios esenciales para la levadura, dando además cuerpo y otras propiedades a la cerveza. Por tanto, es importante que sólo se hidrolice durante este proceso la cantidad adecuada de proteínas.

Al aumentar la temperatura se activan las amilasas (enzimas que hidrolizan el almidón) y provocan la transformación del almidón en maltosa y dextrinas. La maltosa es un azúcar fermentable formado por dos glucosas y las dextrinas son unidades cortas, ramificadas y lineales que no fermentan por acción de las levaduras.

El enzima responsable de la formación de la maltosa (β -amilasa) tiene una temperatura óptima de actuación de unos 60-65°C, mientras que la α -amilasa, responsable de la formación de dextrinas, actúa con más eficacia a temperaturas algo superiores, entre 65°C y 75°C. Así las actividades amilásicas pueden ser controladas mediante la temperatura.

En consecuencia, temperaturas más altas tienden a favorecer la acción α y a dificultar la β , con lo que el contenido de azúcares fermentables baja. Los mostos que se obtienen presentarían una proporción mayor de dextrinas y darían lugar a cervezas con más cuerpo y de menor contenido en alcohol.

De esta forma, en función del programa de temperaturas que se aplique, es posible obtener mostos con más o menos dextrinas, con más o menos azúcares fermentables o con distintas proporciones de ambos y también mostos con un grado de proteólisis más o menos elevado.

Filtración del mosto.

Una vez terminada la etapa de braceado se procede a la filtración, que tiene por objeto separar el mosto de los residuos insolubles aportados por la malta y los cereales. Este residuo, denominado bagazo, se lava a continuación con agua caliente para extraer el mosto que aún lo impregna, aumentándose de esta forma el volumen de mosto obtenido. Los sistemas de filtración más corrientes son por cubas filtrantes o por filtros-prensas.

2.2.2.3. Cocción y lupulado del mosto

El mosto clarificado se transvasa a calderas de cobre o de acero inoxidable, donde es sometido a un proceso de ebullición de una duración aproximada de 60-90 minutos.

Los efectos principales de la cocción del mosto son:

- a) La detención de la actividad enzimática (estabilización bioquímica).
- b) La esterilización de mosto (estabilización biológica).
- c) Un principio de coagulación de material proteico.
- d) La destilación de ciertas sustancias volátiles.
- e) La evaporación de agua y por tanto la concentración del mosto.
- f) La producción de color por caramelización de azúcares, formación de melanoidinas y oxidación de taninos (reacciones que generan también sustancias aromáticas).

Durante esta etapa se adiciona el lúpulo y se dejan hervir conjuntamente el lúpulo y el mosto. El lúpulo no se suele añadir todo de una vez. En general los más amargos y menos finos se añaden al principio de la ebullición del mosto, mientras que los más finos y aromáticos se suelen agregar unos 20-25 minutos antes del final del proceso de cocción.

La ebullición del mosto durante esta etapa permite la extracción del lúpulo, de una serie de aceites esenciales y de sustancias amargas, que contribuyen al gusto y aroma de la cerveza. También se extraen sustancias antisépticas, de naturaleza resinosa, que ayudan a evitar un deterioro microbiológico de la cerveza acabada.

El lúpulo aporta además taninos, los cuales tienen una especial importancia en el proceso de la elaboración de la cerveza, ya que se combinan con las proteínas del mosto formando un residuo insoluble que posteriormente se eliminará. Si se dejaran las proteínas en el mosto tenderían a precipitar con el tiempo dando lugar a turbidez en el producto acabado. Esta misma función la desempeñan también los taninos aportados por la malta.

Enfriamiento del mosto.

Después de la cocción, el residuo del lúpulo se elimina por filtración y el mosto se enfría hasta unos 6^oC-10^oC, mediante refrigeradores de placas. Esta refrigeración provoca la precipitación y el depósito de sustancias que se encontraban disueltas en el mosto caliente. Así, hay mezclas de proteínas, taninos y material nitrogenado coagulado en forma de flóculos, que se eliminan por filtración o por centrifugación ("whirlpool tank").

Una vez se obtiene el mosto completamente limpio y antes de ser transvasado al tanque de fermentación, se airea con aire estéril antes de adicionarle la levadura, ya que la presencia de oxígeno en el mosto favorece el inicio de la fermentación.

Especial atención requieren los lugares donde se realicen el enfriamiento y la eliminación de los precipitados, por el potencial riesgo de contaminación que puede existir. Los riesgos de contaminación son teóricamente nulos, en instalaciones cerradas, si se cumple que todos los recipientes y lugares por donde vaya a pasar el mosto estén perfectamente limpios.

En instalaciones abierta, propias de fabricaciones más artesanales, el riesgo aumenta. Por ello, se recomienda que las instalaciones se encuentren en lugares con ventilación estéril y que el grado de limpieza sea elevado.

2.2.2.4. La fermentación principal

El objetivo de la fermentación es provocar la transformación de los azúcares fermentables del mosto en alcohol y gas carbónico. Esta transformación tiene lugar con producción simultánea de un gran número de compuestos: alcoholes superiores, ácidos orgánicos volátiles, aldehídos, ésteres, etc., que confieren a la cerveza su gusto tan especial.

El mosto, obtenido mediante el braceado, contiene carbohidratos asimilables, una amplia gama de aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas simples, sales minerales, de las que forman parte calcio, magnesio, sodio, potasio, hierro, zinc, cobre, manganeso, cloruros, sulfatos, carbonatos y fosfatos. También contiene vitaminas, como la biotina, el ácido pantoténico, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico.

La levadura necesita azúcares simples, aminoácidos, sales minerales y vitaminas. El mosto es un medio rico que satisface todas estas necesidades para permitir un crecimiento óptimo de la levadura. De esta forma, los azúcares disueltos en el mosto son utilizados en rutas metabólicas para proporcionar energía, los aminoácidos se incorporan en procesos de biosíntesis y las sales y vitaminas desempeñan importantes papeles de regulación metabólica.

El mosto clarificado, enfriado y saturado de O_2 se mezcla con la levadura en cantidad suficiente para que en el tanque de fermentación se obtenga la concentración inicial de levadura requerida. La adición de la levadura puede hacerse directamente en los conductos por donde circula el mosto procedente de los sistemas de refrigeración, o en un tanque intermedio o bien en el propio tanque de fermentación.

El mosto aporta los nutrientes necesarios para las levaduras durante el periodo de fermentación, que dura de seis a nueve días. Las levaduras, en una primera etapa crecen y se reproducen en presencia del oxígeno del medio en el que se encuentran. El número y la masa de las células aumentan considerablemente durante esta etapa, pero no se produce etanol en cantidades considerables. Una vez consumido todo el oxígeno, las células se adaptan a las nuevas condiciones de anaerobiosis y empiezan a producir etanol y otros compuestos químicos.

La fermentación es una de las etapas más importantes del proceso de elaboración de la cerveza y para su buen desarrollo debe prestarse una especial atención al estado fisiológico de la levadura, a la composición del mosto y a condiciones del proceso, tales como:

a) La temperatura. Influye en el comportamiento de la levadura y afecta de forma importante a la formación de compuestos relacionados con las características sensoriales de la cerveza (alcoholes superiores, aldehídos, ésteres,...).

Los fermentadores tienen sistemas de refrigeración que permiten mantener la temperatura a los valores requeridos. Así, las temperaturas que se acostumbran a utilizar en fermentación alta son de 15 a 20°C, mientras que para la fermentación baja suelen ser del orden de 8-10°C y hacia el final de la fermentación se disminuye hasta valores próximos a 4°C.

b) La forma y volumen del depósito. Se ha observado que la relación diámetro/altura, la capacidad e incluso el ángulo del cono de los tanques cilíndrico-cónicos influyen en el bouquet final de la cerveza.

c) La presión. Una presión demasiado elevada ejerce una influencia negativa, ya que provoca una disminución del pH interno de la célula, al aumentar la concentración de CO₂ intracelular.

Al final de la fermentación las levaduras se depositan en el fondo (en el caso de fermentación baja) o suben a la superficie del líquido (si se trata de fermentación alta) y la cerveza obtenida se denomina cerveza "joven" o "verde".

2.2.2.5. Fermentación secundaria.

La cerveza verde que ha sido transvasada a grandes tanques de maduración (bodega), se mantiene a baja temperatura (0°C-4°C) durante varias semanas. En este periodo de maduración la cerveza se clarifica, madura y se satura de dióxido de carbono.

La fermentación secundaria, producida por las trazas de levadura que permanecen en la cerveza, es generalmente lenta pero es, probablemente, la causante de la producción de pequeñas cantidades de alcoholes y ésteres entre otros, que ayudan a que la cerveza adquiera su aroma y su sabor tan característico.

2.2.2.6. Clarificación, pasteurización y envasado

Después de la etapa de maduración de la cerveza debe aplicarse un tratamiento de clarificación y uno de estabilización, para asegurar que posteriormente no aparezcan turbideces debidas a precipitaciones químicas o al crecimiento de microorganismos.

La clarificación de la cerveza permite eliminar restos de levadura que pudieran quedar todavía en la cerveza, resinas coaguladas y una fina suspensión de proteínas que hubieran precipitado debido a la baja temperatura alcanzada durante la fase de guarda.

La clarificación se puede hacer por filtros de masa, filtros de tierras de infusorios (Kieselguhr), filtros de cartón, por centrifugación o por combinación de varios de los procedimientos citados.

Después de la filtración es necesario ajustar la concentración de CO_2 ya que normalmente es insuficiente. La carbonatación se realiza a temperatura próxima a los 0°C para facilitar la disolución del gas en la cerveza.

Finalmente, la cerveza se envasa en barriles, botellas o latas. En estos envases, la cerveza no está esterilizada y, aunque el lúpulo y la leve acidez ayudan a conservarla, los posibles microorganismos presentes podrían iniciar su crecimiento, lo cual obviamente sería indeseable.

Para evitar estos problemas son necesarios tratamiento estabilizadores, como es la pasteurización, cuya finalidad es la eliminación de las formas viables de microorganismos que se pudieran encontrar en la cerveza. Este tratamiento puede ser aplicado antes o después del envasado.

La pasteurización aplicada a productos envasados (en botellas o en latas) se realiza en los denominados "túneles de pasteurización", aplicándose temperaturas del orden de 60°C durante unos 30 minutos. Respecto a la pasteurización de la cerveza sin envasar, se realiza en un "pasteurizador de tubos" mediante pasteurización "flash". En este procedimiento se aplican temperaturas del orden de $70-75^\circ\text{C}$ durante 15-60 segundos, para después efectuar un rápido enfriamiento y envasar en recipientes estériles.

Algunos fabricantes no pasteurizan la cerveza que se envasa en barriles de aluminio o de acero inoxidable ("cerveza de barril") y por ello se debe guardar refrigerada y su consumo ha de ser rápido. Debido a que no se somete a ningún tratamiento térmico, algunos consumidores consideran que el sabor de la cerveza de barril es superior al de la embotellada o enlatada.

2.3. MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DURANTE LA ELABORACION DE LA CERVEZA

(INGLEDEW, 1979; HAIKARA, 1986; PRIEST y CAMPBELL, 1987; SCHMIDT, 1988; HOUGH, 1990).

La composición química del mosto y de la cerveza selecciona de alguna forma el tipo de microorganismos que se van a desarrollar en estos productos.

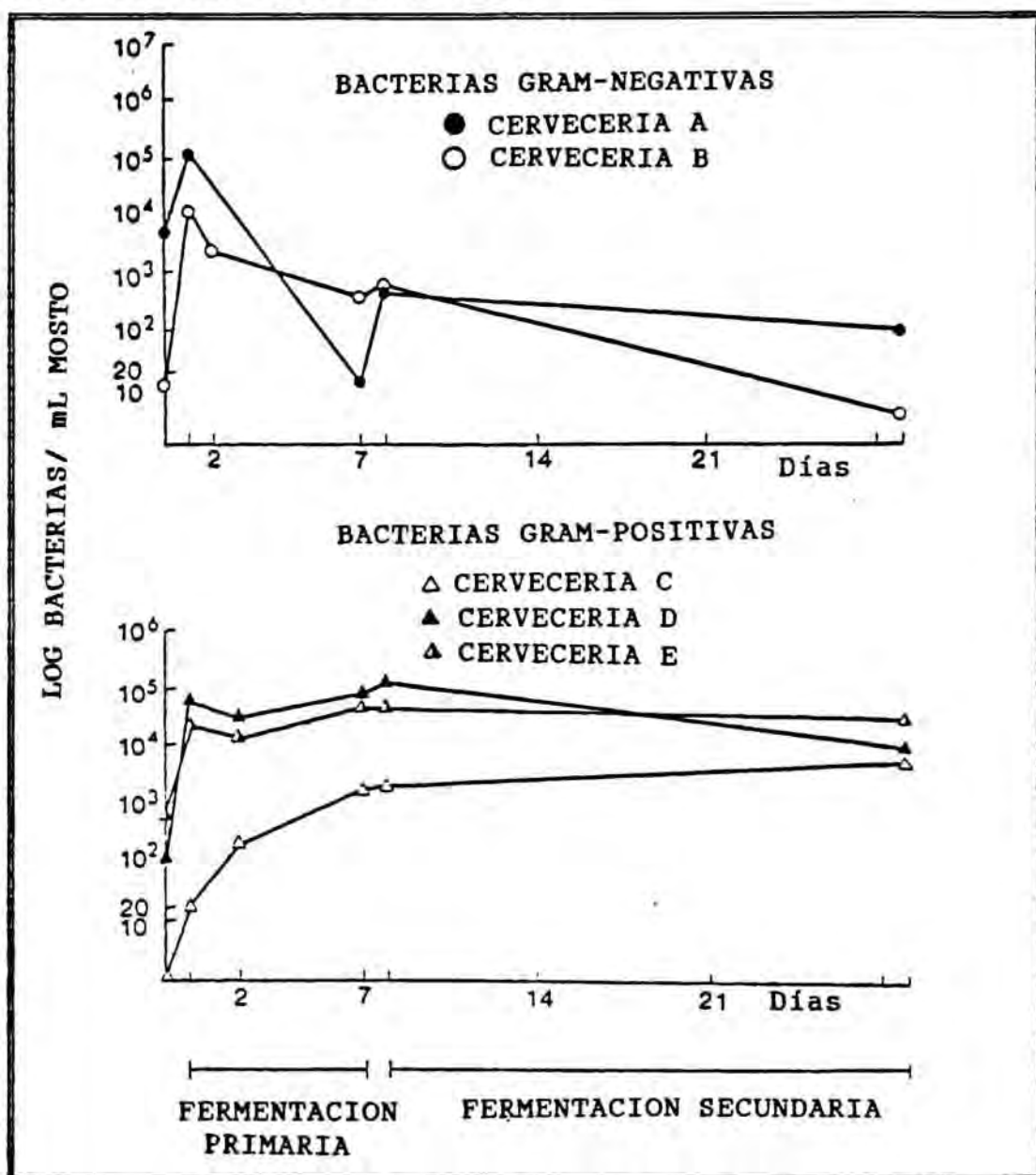
El mosto es un medio rico para la proliferación de todos aquellos microorganismos que puedan crecer a un pH aproximado de 5. Presenta una amplia variedad de sustancias nutritivas (carbohidratos, proteínas, lípidos) y factores de crecimiento para que puedan desarrollarse numerosos microorganismos aeróbicos, anaeróbicos facultativos y microaerofílicos. Por el contrario, la composición de la cerveza es mucho más selectiva, tiene un bajo contenido de nutrientes, de oxígeno y un pH ligeramente ácido (4-4.2). Además debe sumarse la acción antiséptica de las resinas del lúpulo y la presencia de etanol. Esta composición y características físico-químicas limita de forma considerable el crecimiento de un gran número de grupos microbianos, pero esto no determina que no se pueda contaminar por microorganismos que se adapten a las características de este producto.

Los microorganismos que con mayor frecuencia pueden estar presentes en alguna etapa de la elaboración de la cerveza se pueden dividir en cinco grupos: bacterias del ácido láctico, bacterias del ácido acético, enterobacterias, ciertas especies anaeróbicas estrictas y levaduras salvajes. No todos estos grupos pueden estar presentes en todas las etapas de elaboración, ya que las diferencias de pH, la presencia de ciertas sustancias, como el etanol, y las diferentes condiciones físico-químicas hacen que en cada fase de elaboración exista una flora predominante.

Una de las etapas más peligrosas por el potencial riesgo de contaminación es el enfriamiento del mosto. El mosto, que ha sido sometido a un tratamiento térmico, es enfriado a 8-10⁰C para proceder a la adición de la levadura. Si este proceso no se realiza en unas buenas condiciones higiénicas y de forma rápida, es relativamente fácil que pueda contaminarse por enterobacterias, bacterias lácticas y/o acéticas. Actualmente el riesgo ha disminuido al realizarse el enfriamiento en sistemas completamente cerrados. No obstante, se ha de tener en cuenta que todo el material e instalaciones que se utilicen durante este proceso han de estar perfectamente limpios para evitar posibles contaminaciones.

Durante la fermentación el crecimiento de microorganismos suele estar limitado por el pH y por la concentración de alcohol. Las posibles bacterias Gram-negativas que pudieran estar presentes en el mosto no resisten el descenso de pH y suelen desaparecer a partir del 2º día de la fermentación principal. Sin embargo, las bacterias Gram-positivas, como las del ácido láctico, toleran bien las condiciones de pH y alcohol, manteniéndose los niveles de contaminación durante todo el proceso (Figura 10). También se pueden instaurar durante esta etapa levaduras salvajes que compiten con la de cultivo.

Figura 10. Evolución de los niveles de bacterias Gram-negativas (A) y Gram-positivas (B) durante la elaboración de la cerveza (HAIKARA, 1986).

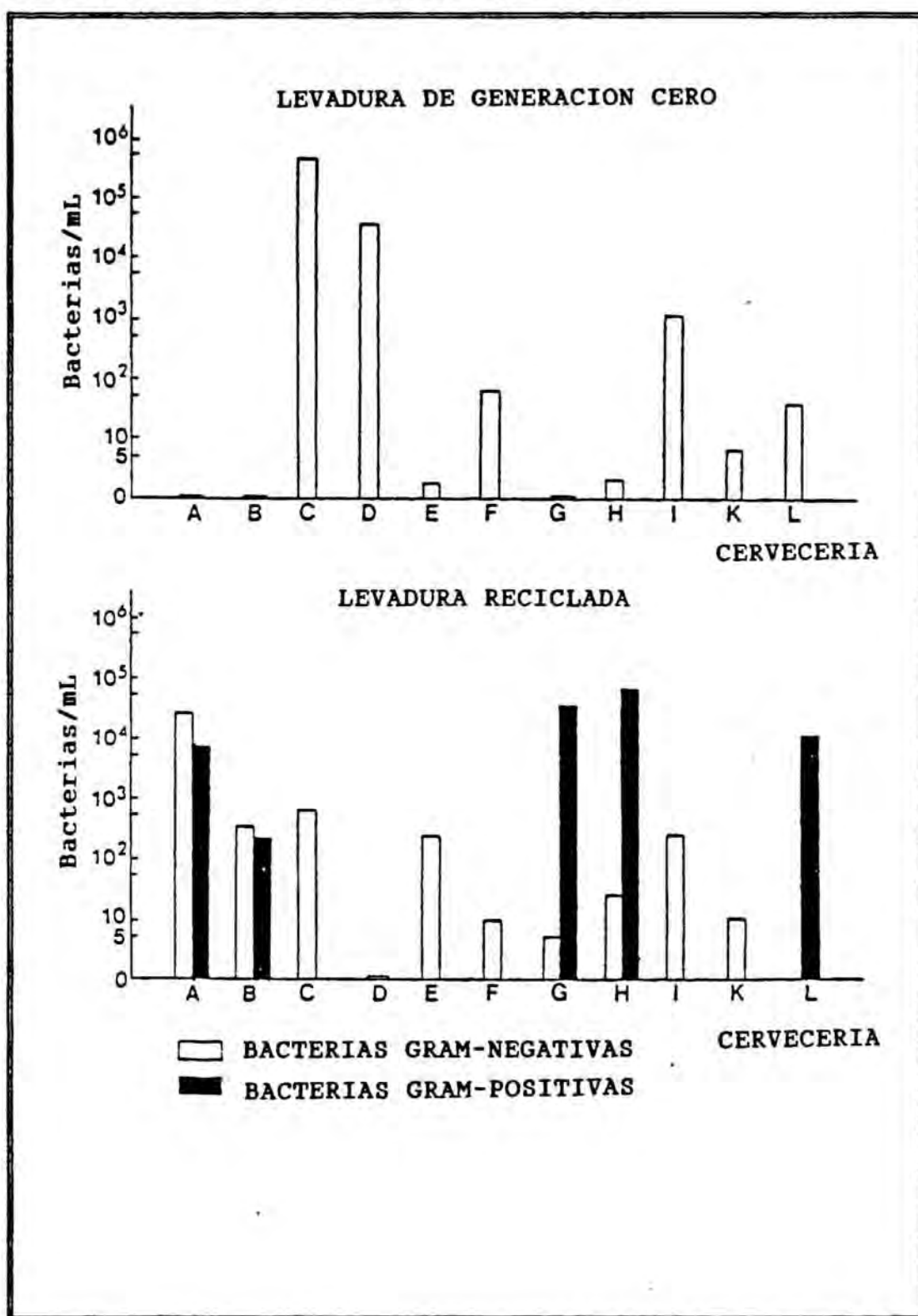


Uno de los puntos más conflictivos de la fase de fermentación es el grado de pureza de la levadura de cultivo, ya que puede ser un reservorio importante de microorganismos contaminantes. Si una levadura ha resultado contaminada durante una fermentación, puede propagar la contaminación al siguiente proceso (si no se ha realizado un reciclaje correcto).

En la figura 11 se puede observar como la flora bacteriana que puede contaminar una levadura es diferente según se trate de una levadura "nueva" (o de generación cero) o de una levadura "vieja" (o reciclada). Las bacterias Gram-negativas se presentan tanto en las levaduras nuevas como en las recicladas, mientras que las especies Gram-positivas son más abundantes en las levaduras recicladas. Teniendo en cuenta que durante la fermentación la flora Gram-negativa desciende, cabría esperar que en las levaduras recicladas no exista contaminación por parte de Gram-negativas. Sin embargo, como se muestra en la figura 11, esto no ocurre así. Las bacterias Gram-negativas se pueden multiplicar en la masa de levadura durante su almacenamiento en los depósitos entre fermentaciones y, probablemente, también en las tuberías que se utilizan para hacerlas circular. Por ello, se recomienda que el lavado con ácido mineral a que se somete la levadura cuando se reutiliza, sea lo más exhaustivo y cuidadoso posible para asegurar la total eliminación de flora contaminante.

Finalmente, señalaremos que la malta y la cebada también pueden presentar contaminaciones por un número de grupos de microorganismos. La importancia de esta contaminación radica principalmente en dos hechos: a) se pueden provocar alteraciones en los granos que a su vez induzcan el desarrollo de alteraciones durante el proceso de elaboración y/o en el producto final obtenido y b) pueden constituirse en fuentes de contaminación, facilitando el acceso de numerosos microorganismos a la planta cervecera.

Figura 11. Recuentos de bacterias Gram-negativa y Gram-positiva en levaduras de generación cero y recicladas en diferentes cervecerías (HAIKARA, 1986).



En la tabla 16 se presenta un resumen de los diferentes microorganismos que se pueden encontrar en las diferentes etapas del proceso de elaboración de la cerveza. 16 continuación se describirán las principales características de los posibles microorganismos contaminantes en la cerveza y las alteraciones más usuales que pueden provocar.

Tabla 16. Microorganismos presentes usualmente durante la elaboración de la cerveza (INGLEDEW, 1979).

ETAPA	MICROORGANISMOS
Braceado	Bacterias del ácido láctico termófilas
Enfriamiento previo a la adición de levadura	Enterobacterias Bacterias del ácido láctico Bacterias del ácido acético
Fermentación	Bacterias del ácido láctico Bacterias del ácido acético Enterobacterias: <u>Obesumbacterium</u> Levaduras salvajes
Maduración Producto envasado	Bacterias del ácido láctico Bacterias del ácido acético <u>Zymomonas</u> Bacterias anaeróbicas estrictas

2.3.1 MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EN LAS MATERIAS PRIMAS: CEBADA Y MALTA.

La naturaleza y la cantidad de microflora en la cebada dependen tanto de las condiciones en las que se haya desarrollado el grano como de las condiciones a que sea sometido después de la recolección.

La microflora normal de los granos de cebada incluye sobre todo hongos, algunas bacterias y muy pocas levaduras. Cuando los granos llegan a los silos de almacenamiento los géneros de hongos más frecuentes son Alternaria, Helminthosporum, Cladosporum, Epicoccum y Fusarium. Si la etapa de almacenamiento transcurre de forma correcta, la mayoría de estos hongos desaparecen, pero pueden instalarse géneros como Aspergillus y Penicillium. Si los silos no tienen buenas condiciones de aireación, pueden producirse las denominadas "manchas calientes" que desembocan en verdaderas combustiones de los granos. Este proceso se desarrolla como consecuencia de la aparición de

hongos como Aspergillus glaucus, A. candidus y A. flavus que con su crecimiento pueden provocar temperaturas de hasta 55°C, facilitando de esta forma el crecimiento de bacterias termófilas que llevan al grano hasta los 75°C y de ahí, a través de una serie de reacciones bioquímicas hasta su combustión. El crecimiento de ciertos mohos puede aportar micotoxinas, que pueden permanecer durante todo el proceso de elaboración y aparecer después en la cerveza. En cuanto a bacterias, pueden aparecer Pseudomonas, Micrococcus y Bacillus sp. en el grano almacenado.

Por lo que respecta a la malta, las especies que más comúnmente se encuentran son bacterias del ácido láctico mesófilas, como Lactobacillus leishmanii y Pediococcus acidilactici. Como bacterias Gram-negativas se pueden encontrar especies de Pseudomonas, Micrococcus y Bacillus. Respecto a levaduras salvajes se señalan a los géneros Sporobolomyces y Rhodotorula como más abundantes. También se pueden aislar diferentes especies de mohos, siendo los más frecuentes Aspergillum fumigatus, Penicillum sp., Alternaria alternata. No obstante, se ha de tener en cuenta que las especies varían dependiendo del origen de las maltas.

La mayoría de los microorganismos citados no sobreviven a la torrefacción. El problema radica en el hecho de que el molturado (posterior a la torrefacción) se suele realizar en la cervecería y no en la maltería. Por ello, la malta se convierte en un excelente vehículo de transporte de numerosos microorganismos, que pueden tener una gran importancia como contaminantes durante la elaboración de la cerveza.

Los efectos de la contaminación microbiana sobre la cerveza son numerosos. El más conocido es la reducción de la estabilidad del gas ("gushing") en el producto acabado, que se traduce en la existencia de una gran cantidad de espuma inestable. También puede verse afectado el bouquet de la cerveza. La presencia de especies de Aspergillus, Cladosporium y Fusarium, entre otras, pueden ser responsables de la aparición de intensos "off-flavors", ("quemado", a "sucio" y a "vínico"). El color puede verse igualmente afectado por la presencia de mohos y también pueden provocarse problemas en la estabilidad debido a elevaciones de los niveles de nitrógeno total y de nitrógeno amínico.

2.3.2 MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DURANTE LA ELABORACION DE LA CERVEZA.

2.3.2.1. Bacterias Gram-positivas

A. Bacterias del ácido láctico.

Las bacterias del ácido láctico y en concreto los géneros Lactobacillus y Pediococcus, son los que causan mayores problemas a la cerveza.

Las bacterias del ácido láctico son bacilos y cocos Gram-positivos sin capacidad para formar esporas. Son microorganismos fermentativos estrictos, dividiéndose en heterofermentativos, con formación de ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol, y en homofermentativos, con producción solamente de ácido láctico.

La presencia de bacterias del ácido láctico se puede producir durante todo el proceso de elaboración de la cerveza. Así, pueden encontrarse en el mosto, en la etapa de fermentación y en la cerveza acabada, debido a que toleran bien concentraciones de alcohol superiores al 6% y no se ven afectadas por las sustancias antisépticas del lúpulo.

Las medidas de control que se recomiendan a las industrias cerveceras, para evitar la contaminación por bacterias del ácido láctico, se dirigen a una buena limpieza de todo el equipo con detergentes apropiados. Otro punto clave debe ser el control de las levaduras recicladas, efectuando lavados a pH 2.0-2.5 durante unas 2 horas y un regular reemplazamiento de las mismas.

Las bacterias del ácido láctico incluyen los cuatro géneros siguientes:

- .. Lactobacillus, microorganismos bacilares heterofermentativos.
- .. Pediococcus, cocos homofermentativos.
- .. Leuconostoc, cocos heterofermentativos.
- .. Streptococcus, cocos anaeróbicos facultativos homofermentativos.

Lactobacillus

Son microorganismos anaeróbicos facultativos o microaerofílicos. Son bacilos mesófilos, con un crecimiento óptimo entre los 30 y 40°C, desarrollándose bien en medios ácidos (pH óptimo 5.2-6.2).

Los lactobacilos poseen un metabolismo heterofermentativo y presentan muchos requerimientos nutricionales. A partir de la maltosa producen mayoritariamente ácido láctico, etanol y CO₂, y, como productos secundarios acetato, glicerol y en menores cantidades diacetilo y 2,3-butano-diol.

El lactobacilo más frecuente como contaminante en la cerveza es el L. brevis (o L. diastaticus) siendo menos frecuentes: L. delbrueckii, L. casei, L. fructivorans, L. fermentum, L. coryneformis y L. plantarum.

Se ha podido observar que algunos tipos de cerveza son más resistentes que otras al crecimiento de lactobacilos. Sin embargo, no se ha podido establecer ninguna relación entre parámetros como pH, densidad, nitrógeno total, nitrógeno amínico, concentración de carbohidratos fermentables o dióxido de azufre y crecimiento de lactobacilos, que pueda explicar la resistencia de ciertos tipos de cerveza al crecimiento de estos microorganismos.

Las alteraciones más características que produce el Lactobacillus en la cerveza son la aparición de una turbidez de aspecto "sedoso", una elevada acidez debido al ácido láctico producido y la aparición de un aroma a "mantequilla" debido a la producción de diacetilo. Aunque este compuesto no se sintetiza en cantidades considerables, modifica rápidamente el aroma de la cerveza, ya que existe un bajo umbral de detección sensorial para el diacetilo (menor a las 0.15 ppm).

Pediococcus

Son microorganismos anaeróbicos facultativos o microaerofílicos, con una temperatura óptima de crecimiento entre 21 y 25°C y un pH de 3.5 a 5.5. Este intervalo de pH coincide con el que se produce durante la fermentación de la cerveza.

Presentan un metabolismo homofermentativo, formando ácido láctico como producto mayoritario de fermentación. También, al igual que Lactobacillus, producen diacetilo.

La contaminación con Pediococcus genera en la cerveza es la aparición de unos filamentos flotantes ("ropiness") que enturbian el producto final. Estos filamentos son el resultado de la excreción por parte de los microorganismos de polímeros de manosa, glucosa, proteínas y ácido nucleico.

La presencia de Pediococcus en las industrias cerveceras es un problema habitual. Como fuentes de contaminación se señalan el polvo de malta circundante por el ambiente, el propio aire y la levadura contaminada de anteriores procesos. Se recomienda para evitar su aparición una rigurosa limpieza del equipo con detergentes caústicos y un buen lavado de la levadura reciclada con un ácido.

Leuconostoc y Streptococcus

Existen escasos trabajos sobre la presencia de estos microorganismos en cerveceras y no se les ha relacionado como causantes de alteraciones en la cerveza.

Las únicas especies que se han detectado han sido L.mesenteroides y S.lacti.

B. Micrococcaceae

Estas bacterias Gram-positivas no habían sido consideradas como causantes de problemas en cervecera, pero recientes estudios han demostrado que están bastante difundidas en las plantas de elaboración y que pueden llegar a causar alteraciones en el producto acabado. De todas formas son todavía escasos los estudios realizados al respecto. Las especies que se han podido aislar son: Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus epidermis y el Micrococcus varians, éste último sobre todo en la levadura empleada para la fermentación.

Las fuentes de contaminación podrían ser las materias primas y el propio personal de la planta.

2.3.2.2 BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Las bacterias Gram-negativas que se encuentran con más frecuencia en la industria cervecera se pueden clasificar en los siguientes grupos:

A. Bacterias del ácido acético

Es un grupo de microorganismos pleomórficos que incluye especies aeróbicas y anaeróbicas, las cuales tienen capacidad de oxidar el etanol a ácido acético y el acetato a CO_2 y H_2O .

Los principales géneros que contaminan la cerveza son Acetobacter y Gluconobacter.

Estas bacterias toleran la acción antiséptica del lúpulo e igualmente toleran bastante bien el alcohol presente, por lo que pueden sobrevivir al final de la fermentación e incluso en la cerveza embotellada.

Su presencia produce en la cerveza la aparición de un característico olor a "vinagre". El Acetobacter forma finas películas de aspecto "graso" sobre la superficie de la cerveza. El género Gluconobacter da origen a unas cápsulas de dextrano gelatinoso que producen unos filamentos flotantes en la cerveza.

La mayoría de contaminaciones se producen a través del aire. Por esta razón, un buen envasado y la eliminación de todo el oxígeno durante el almacenamiento es el mejor control para este tipo de contaminación.

Los productos que más afectados por las bacterias del ácido acético son las cervezas de barril, ya que pueden instaurarse contaminaciones fácilmente, si se han producido entradas de aire en el barril o si la cerveza ha permanecido durante mucho tiempo en la tubería de expedición en un barril medio vacío.

B. Enterobacteriaceae

Son bacilos aeróbicos o anaeróbicos facultativos, siendo su habitat natural el suelo, el agua y la vegetación en general. Las fuentes de contaminación pueden ser el agua, la cebada y la malta.

Los microorganismos de este tipo que se pueden encontrar en la industria cervecera son: Obesumbacterium proteus, Enterobacter agglomerans, Citrobacter freundii y especies pertenecientes a los géneros Klebsiella, Escherichia, Citrobacter, Serratia, Proteus y también géneros próximos a la familia Enterobacteriaceae tales como: Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenes, Acinetobacter y Xantomonas

No está bien establecida la influencia que ejercen las especies de enterobacterias sobre el proceso de fermentación, ni su efecto sobre las características organolépticas del producto final. Por otra parte, y a excepción de O. proteus y E. agglomerans, la mayoría de enterobacterias no sobreviven a las condiciones presentes durante la fermentación, ya que son microorganismos muy sensibles al alcohol y a valores de pH inferiores a 4.3 (pH óptimo: 5.0-7.5). Sin embargo, en recientes estudios se ha señalado la posibilidad de que la presencia de enterobacterias sea mayor a la que se cree, ya que se podrían encontrar en forma latente y no ser detectadas por los métodos habituales.

Obesumbacterium proteus

Es la enterobacteria contaminante de la cerveza más y mejor conocida. Es una bacteria Gram-negativa anaeróbica facultativa. Su temperatura óptima de crecimiento es 32°C y su pH óptimo de 6. No es sensible al lúpulo, así como tampoco a concentraciones de alcohol superiores al 6%. Sin embargo es muy sensible a variaciones del pH hacia zonas inferiores a 4.

Se encuentra frecuentemente contaminando a la levadura de fermentación, produciendo un retraso en el proceso fermentativo, con lo que resulta una cerveza de elevada densidad y pH. Asimismo provoca la formación de muchos alcoholes, acetoina, dimetilsulfuro y ácidos grasos volátiles, así como de diacetilo. Las cervezas que han sufrido una contaminación por O. proteus durante su elaboración se caracterizan por un "flavor" afrutado muy característico, que recuerda a la chirivía. Es muy raro, debido al pH ácido, que se encuentren en la cerveza acabada, siendo un microorganismo característico de contaminación durante la etapa de fermentación.

Enterobacter agglomerans

Es una enterobacteria que recientemente se ha reconocido como un contaminante importante de la cerveza. Se ha señalado que puede crecer bien en el mosto con o sin lúpulo, pero no se conoce el efecto que el pH y el alcohol ejercen sobre su crecimiento.

Sobrevive durante el proceso de fermentación y, al igual que O. proteus, contamina frecuentemente a la levadura reciclada, provocando una ralentización de la fermentación, que da lugar a un producto con un pH elevado. El "bouquet" final de la cerveza también se ve afectado ya que aparecen gustos afrutados y aromas sulfurosos.

C. Zymomonas

Es una bacteria anaeróbica pero aerotolerante Gram-negativa. Tiene capacidad para fermentar la glucosa y la fructosa, produciendo etanol y CO₂, pero no a la maltosa.

Es un contaminante que puede presentarse en el producto final envasado y es característico de cervezas elaboradas con levaduras de fermentación alta.

Una cerveza contaminada por Zymomonas presenta un aroma característico a "manzanas podridas", debido principalmente a la formación de compuestos de tipo aldehído.

D. Bacterias anaeróbicas estrictas

Su aparición en la industria cervecera se debe a la introducción de nuevos procedimientos de elaboración y, en particular, al envasado de cerveza con un bajo contenido en O₂.

Dentro de estos contaminantes, se encuentran las especies Pectinatus cerevisiphilus y Megasphaera cerevisiae, las cuales se diferencian entre sí por su morfología bacilar y cocoide, respectivamente. El género Pectinatus se caracteriza por producir CO₂ a partir de lactato y además una gran variedad de ácidos, entre los cuales destaca el ácido acético, propiónico, succínico y láctico. El género Megasphaera da lugar a ácido butírico, acético, isobutírico, valérico, caproico y acetona.

La proliferación de estos microorganismos se produce principalmente en la cerveza envasada y da lugar a "flavors" muy desagradables.

2.3.2.3. Levaduras salvajes

Se considera levadura salvaje toda aquella levadura que no sea la de cultivo. Las levaduras salvajes que más frecuentemente se encuentran en cervecería pertenecen a los géneros: Saccharomyces, Brettanomyces, Candida, Hasenula, Filoridium y Pichia.

Las levaduras salvajes pueden dar lugar a alteraciones, si se encuentran en cantidades importantes respecto a la levadura de cultivo, como pueden ser la formación de gustos y aromas anómalos, el exceso de espuma ("gushing"), la sobrefermentación, la refermentación, etc.

Algunas levaduras también puede desarrollarse en la cerveza filtrada o pasteurizada, provocando la formación de turbidez y precipitados.

Otras levaduras denominadas "killer yeasts", segregan una sustancia, la zimocida, que destruye la membrana plasmática y por tanto mata a las levaduras sensibles. Las levaduras de cultivo que se emplean en la industria cervecera suelen ser sensibles a la zimocida. Por ello, contaminaciones por levaduras salvajes productoras de estas sustancias se consideran muy peligrosas. Sin embargo, la zimocida sólo es eficaz en un estrecho intervalo de pH, por lo que sólo en los procesos de fermentación en continuo (que mantienen ese estrecho intervalo de pH) puede provocar la eliminación total de la levadura de cultivo y su rápida sustitución por la salvaje, con la consiguiente producción de cerveza con características totalmente anómalas.

Levaduras del genero Saccharomyces y Brettanomyces son levaduras que provocan fenómenos de sobrefermentación. Estos microorganismos tienen la capacidad de fermentar dextrinas y, por tanto, pueden crecer en la cerveza una vez ya ha finalizado el proceso fermentativo. Se obtienen cervezas turbias y con aromas extraños.

2.3.3. CONTROL DE LA CONTAMINACION BACTERIANA

(HAMMOND, 1986; HOUGH, 1990)

En el proceso de elaboración de cerveza los principales puntos que requieren una especial vigilancia en cuanto a condiciones higiénicas son los siguientes:

- la levadura de fermentación
- el enfriamiento del mosto
- la etapa de fermentación
- el proceso de filtración
- la limpieza de los envases
- el proceso de envasado
- el agua utilizada
- el aire del ambiente
- el aire utilizado para airear el mosto antes de la adición de la levadura.

Actualmente los equipos de la mayoría de fábricas de cerveza suelen ser de acero inoxidable, lo que permite una limpieza fácil. También se tiende a ir utilizando recipientes totalmente herméticos, por lo que se van eliminando las contaminaciones a partir del aire.

La limpieza e higienización de los depósitos y equipos de acero inoxidable está estandarizada y se suelen emplear diferentes mezclas de detergentes y agentes caústicos. La sosa es uno de los productos que más se utiliza debido a que destruye eficazmente los microorganismos. También se emplea hipoclorito, que es un buen bactericida, para mejorar el poder limpiador de los detergentes. Su uso ha de ser restringido si se alcanzan valores de pH ácidos o neutro, ya que es un peligroso agente de corrosión para el acero inoxidable.

El costo de mano de obra para las operaciones de limpieza es muy alto, por lo que muchas factorías, especialmente las de gran tamaño, controlan automáticamente las secuencias de lavado y de reciclaje. Estas operaciones, que día a día se utilizan más, reciben el nombre de CIP ("Cleaning In Place") y se controlan mediante microprocesadores.

También es necesario un estricto control microbiológico, con una toma de muestras frecuente en los diversos puntos de riesgo que existen durante la fabricación de cerveza. Hough (1990) señala que las fábricas de cerveza deben ser, y con frecuencia son, instalaciones con un elevado nivel de higiene que han de equipararse en este sentido a las mejores industrias lácteas.

3. AMINAS BIOGENAS EN CERVEZAS

3.1. ANTECEDENTES Y CONTENIDOS

La información sobre el origen y los contenidos de aminas biógenas en cervezas es bastante limitada. El estudio de las aminas en bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación se ha centrado sobre todo en el vino. Si bien son escasos los trabajos realizados para conocer las causas de la presencia de aminas biógenas en cervezas y su significación, cabe destacar algunos estudios realizados en Canadá, Alemania e Italia, países en los que parece denotarse un especial interés por el tema.

En España, país de amplio consumo de esta bebida, con una media en 1989 de 68 litros por habitante y año (ZAFRA, 1990) y con un incremento en el consumo de un 5% en 1990, prácticamente no hay trabajos previos orientados a conocer la incidencia de las aminas biógenas en las cervezas y su eventual significación.

ZEE y col. (1981a) realizaron un amplio estudio sobre el contenido de aminas biógenas en cervezas de consumo habitual en Canadá, tanto de este país como de importación. Analizaron un total de 86 cervezas y observaron que:

- Solamente se encontraban niveles cuantificables de histamina y de cadaverina, en 5 y en 3 muestras, respectivamente (el límite de detección para ambas aminas de la técnica analítica empleada era de 4.5 mg/L). Por el contrario, en todas las muestras se detectó la presencia de tiramina, putrescina y agmatina, siendo los niveles medios de esta última amina los más elevados y los menores los de putrescina.
- Si se clasificaban las cervezas en función de su origen se comprobaba que:
 - .. Las cervezas canadienses presentaban, en general, contenidos de aminas más elevados que las europeas y las americanas.
 - .. Existía una amplia variabilidad en los contenidos de aminas en cervezas agrupadas según la región geográfica canadiense de producción. Señalaron que esto era debido principalmente a las condiciones de elaboración de la cerveza y a las materias primas empleadas.

- Si se clasificaban las muestras en función de las plantas industriales de producción, existía para cada cervecera una cierta tendencia a elaborar cervezas con un determinado nivel de aminas, por ejemplo, una planta producía generalmente un determinado tipo de cerveza con niveles elevados de agmatina y otra elaboraba productos que presentaban siempre niveles bajos de putrescina.

CHEN y VAN GHELUWE (1979) tras analizar 200 muestras de cervezas canadienses, estadounidenses y europeas, llegaron a la misma conclusión que ZEE y col. (1981a), en el sentido de que las cervezas canadienses presentaban contenidos más elevados de histamina que las de Estados Unidos y de Europa. La razón señalada por los autores, como posible causa de esta diferencia entre las citadas zonas de origen, que el empleo de diferentes métodos de elaboración. Esta explicación es probablemente demasiado simplificada, ya que dentro de las cervezas europeas pueden existir también diferencias en función de los países productores e incluso entre empresas elaboradoras dentro de un mismo país.

Las cervezas "light" se ha señalado que presentan contenidos menores de aminas, atribuyéndose este hecho al propio proceso de elaboración, que conlleva fermentaciones a temperaturas más bajas que pueden hacer menos favorable el crecimiento bacteriano (CHEN y VAN GHELUWE, 1979; ZEE y col., 1984a).

En cuanto a estudios europeos destacan los realizados por HRDLICKA y col. (1968) en Checoslovaquia, aplicando un método cromatográfico (cromatografía en capa fina), que proporcionaba resultados cualitativos y semi-cuantitativos. Estos autores estudiaron muestras de tres tipos de cerveza: "Smíchov", "Pilsen" y "Branik" y concluyeron que los tres tipos de cervezas contenían, más o menos, los mismos componentes no volátiles, en total 17, de los cuales identificaron 12: espermina, espermidina, putrescina, cadaverina, histamina, serotonina, tiramina, triptamina, etanolamina, colina, glutamina y hordenina. Señalaron que los mayores contenidos de tiramina y etanolamina se encontraban en cervezas tipo "Pilsen" y "Smíchov", mientras que las de tipo "Branik" presentaban los contenidos más bajos. En cuanto a los contenidos en histamina, fueron mayores en cervezas tipo "Branik" que en "Pilsen" y "Smíchov".

Por último, HRDLICKA y col. (1968) también señalaron que, en las cervezas tipo "Smíchov", un mayor grado alcohólico parece hacer disminuir el contenido en colina, mientras que no afecta a la serotonina ni a la tiramina, que incluso pueden presentar valores más elevados.

La presencia de histamina, tiramina, cadaverina, putrescina, triptamina y β -feniletilamina ha sido también estudiada en cervezas europeas (CERUTTI y col. 1985 y 1987). Estos autores tras analizar 40 cervezas italianas y 30 procedentes de otros países europeos, comprobaron que el comportamiento de las aminas era bastante similar en todas las muestras estudiadas, dentro de un margen. En base a su estudio concluyeron que:

- La putrescina debe ser considerada, al menos en parte, como un componente "natural" de la cerveza, ya que proviene de las células de la levadura, en las que cumple algunas importantes funciones fisiológicas.
- La cadaverina y la β -feniletilamina, en general, siempre se encuentran en niveles bajos y la histamina y la triptamina casi nunca se detectan.
 - .. La presencia de niveles elevados de cadaverina podría indicar el empleo de materias primas en condiciones no óptimas, o ser el resultado de contaminaciones microbianas durante el almacenamiento de la malta.
 - .. Los severos tratamientos térmicos, a los que se somete la malta torrefacta para la elaboración de la cerveza negra, podrían ser la causa de unos eventuales niveles elevados de β -feniletilamina. Esta amina se formaría por descarboxilación química de su aminoácido precursor, tal y como ha sido ya observado durante la torrefacción de los granos de cacao.
- La tiramina, fue la amina cuyo contenido variaba más entre las cervezas. Señalaron que niveles altos de esta amina son el resultado del uso de materias primas en mal estado y/o de la presencia de contaminación bacteriana durante el proceso de elaboración. La presencia de tiramina debe ser considerada por tanto como "indeseable".

Las aminas biógenas más estudiadas en cervezas son la histamina y la tiramina y, aunque se dispone de relativamente pocos datos, se señala que los contenidos de tiramina en cervezas son más elevados que los de histamina (RAMANTANIS, 1984a). Esta tendencia también ha sido puesta de manifiesto por otros autores: 4.5 a 7.2 mg/L para histamina y 10.0 a 15.0 mg/L para tiramina (ZEE y col., 1981), 0.15 a 0.4 mg/L de histamina y 1.1 a 2.5 mg/L de tiramina (WACKERBAUER y TOUSSAINT, 1984), 4 a 8 mg/L para histamina y 1.3 a 15 mg/L para tiramina (AMERICAN SOCIETY BREWING CHEMISTS, 1983). Lo mismo ocurre para otros alimentos obtenidos por fermentación como quesos y embutidos (apartado 1.1.1.). Sin embargo, en el vino se observa la tendencia contraria, es decir, mayores contenidos de histamina que de tiramina (VIDAL-CAROU, 1987).

En España son muy escasos los datos que se tienen sobre contenidos de aminas biógenas en cervezas de nuestro país, tal como se puede observar en las tablas 17 y 18, en las que además se incluyen los niveles de aminas hallados por diversos autores en cervezas de otros países.

Por último señalaremos, en cierto modo como "curiosidad" que indicaría que la presencia de aminas biógenas en alimentos tiene cada vez una mayor importancia, que en unas tablas de composición de alimentos elaboradas por SOUCI y col. (1986/87), se incluyen dentro de la composición de la cerveza, la histamina y la tiramina con la siguiente concentración:

Cerveza clara:	0.67 mg/L de histamina
Cerveza de trigo:	0.46 mg/L de histamina
Cerveza negra:	0.18 a 1.20 mg/L de tiramina.

Desde un punto de vista legal, en España no se han fijado todavía límites máximos permitidos de aminas biógenas en alimentos en general. En los vinos cabe la posibilidad de que, siguiendo directrices de otros países, se establezcan máximos tolerables. Si bien en la bibliografía que trata de estas aminas en cervezas, no hemos encontrado referencias sobre medidas de este tipo, cabe pensar que en un futuro se puedan también dictar normativas al respecto. Recordemos que las cervezas se consumen tanto o más que el vino y por ello serían aplicables todas las consideraciones toxicológicas o tecnológicas que se señalan para vinos. Quizás la única diferencia resida en que las cervezas no han sido lo suficientemente estudiadas en cuanto a su contenido en aminas.

Tabla 17. Contenidos de aminas biógenas aromáticas (mg/L) en cervezas de distintos países (I).

Pais de Origen	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Referencia Bibliografica
Alemania	4	n d	tr	--	--	--	ZAPPAVIGNA, 1974
Alemania	24	0.2-11.2	--	--	--	--	LEMBKE, 1978
Alemania	?	0.1-0.2	24.7	--	5.6	--	NARZISS Y col. 1984
Alemania	10	0.1-0.5	1.1-2.2	--	--	--	WACKERBAUER Y TOUSSAINT, 1984
Australia	?	1.5	0.7	0.1	--	--	INGLES Y col., 1985
Canadá	176	0.1-0.5	--	--	--	--	CHEN Y VAN GHELUWE, 1979
Canadá	45	<4.5-5.4	11.2-20.1	--	--	--	ZEE Y col., 1981
Canadá	?	1.0-3.0	--	--	--	--	YAMORLINSKI Y BEVERIDGE, 1982
Cuba	?	--	3.5-8.3	--	--	--	VIDAUD Y col., 1984
Checoslov.	?	det	det	--	det	det	HRDLICKA Y col. 1968
China	1	<4.5	--	--	--	--	ZEE Y col., 1981
Dinamarca	2	n d	tr	--	--	--	ZAPPAVIGNA, 1974
EEUU	?	--	1.0-1.3	--	--	--	Yamamoto y col. 1980 en A.S.B.C., 1983

Tabla 17. Contenidos de aminas biógenas aromáticas (mg/L) en cervezas de distintos países (II).

Pais de Origen	nº	HISN	TIRN	FENL	TRIPN	SERN	Referencia Bibliografica
EEUU	12	<4.50	12.4-21.2	--	--	--	ZEE Y col., 1981
EEUU	3	n d -4.3	0.8-1.8	--	--	--	A.S.B.C., 1984
Europa	14	0.1-0.3	--	--	--	--	CHEN Y VAN GHELUWE, 1979
Europa	29	<4.5-7.3	10.6-13.9	--	--	--	ZEE Y col., 1981a
Europa	30	<0.1-25.0	0.1-52.6	<0.1-0.8	<0.5-7.5	--	CERUTTI Y col., 1987
España	8	--	1.1-2.0	--	--	--	RIVAS Y col., 1982
Francia	3	n d	tr	--	--	--	ZAPPAVIGNA Y col., 1974
Holanda	5	n d	tr	--	--	--	ZAPPAVIGNA Y col., 1974
Holanda	13	n d -0.7	n d	n d	--	--	BOS Y col., 1986
Irlanda e Inglaterra	9	--	0.6-4.0	--	--	--	WHEATLEY Y col., 1987 Y 1988
Italia	18	n d	n d -9.0	--	--	--	ZAPPAVIGNA Y col., 1974
Italia	40	n d	0.3-70.8	n d -0.7	n d -7.5	--	CERUTTI Y col., 1985
Italia	7	n d	0.7-35.5	<0.1-0.8	n d	--	CERUTTI Y col., 1989

Tabla 18. Contenidos de diaminas y poliaminas biógenas (mg/L) en cervezas de distintos países.

Pais de Origen	nº	CADN	PUTN	AGMN	ESPM	ESPD	Referencia Bibliografica
Australia	?	n d	0.5	--	--	--	INGLES Y COL., 1985
Canadá	45	n d	2.7-6.5	21.3-105.2	--	--	ZEE Y COL., 1981a
Checoslov.	?	det	det	det	det	det	HRDLICKA Y COL., 1968
EEUU	12	n d	3.1-7.8	22.3-68.1	--	--	ZEE Y COL., 1981a
EEUU	3	0.9-5.5	1.4-5.1	12.9-26.8	--	--	A.S.B.C., 1984
Europa	29	n d -34.1	2.3-7.1	12.8-105.1	--	--	ZEE Y COL., 1981a
Europa	30	<0.1-37.5	2.5-7.5	--	--	--	CERUTTI Y COL., 1987
Holanda	13	n d -60.0	0.5-8.0	1.0-17.0	--	--	BOS Y COL., 1986
Italia	40	n d -0.5	1.8-7.5	--	--	--	CERUTTI Y COL., 1985
Italia	7	0.5-0.6	3.1-5.6	--	--	--	CERUTTI Y COL., 1989
Japón	8	n d -0.8	n d -2.3	tr.-0.4	--	--	UMEZU Y SHIBATA, 1983

Las causas de la presencia de aminos biógenas en cervezas no están todavía bien definidas, al igual que ocurre en los vinos y en otros productos alimenticios. Numerosas experiencias en laboratorios y en las propias plantas de elaboración dan resultados y conclusiones que no siempre son concordantes y contribuyen a aumentar el número de teorías e hipótesis sobre el tema.

3.1. AMINAS BIOGENAS EN LAS MATERIAS PRIMAS.

3.2.1. CEBADA

WACKERBAUER y TOUSSAINT (1984) y NARZISS y col. (1984a y b) señalan que el contenido de aminos depende del tipo y del origen de la cebada. Igualmente, señalan que la clase de abono, de suelo y las condiciones atmosféricas durante el crecimiento del cereal pueden influir en el contenido de aminos que presente la cebada.

A este respecto NARZISS y col. (1984a y b) (tabla 19) encontraron diferencias, aunque poco significativas, en cuanto a niveles de tiramina y de triptamina entre cebadas de invierno y verano. Sin embargo, esta diferencia no se pudo constatar para la histamina. Los niveles de tiramina y de triptamina fueron más bajos en las cebadas de invierno que en las de verano, lo cual podría estar relacionado con el contenido proteico de estas cebadas, ya que las de verano presentaban un porcentaje de proteínas mayor que las de invierno.

WACKERBAUER y TOUSSAINT (1984) detectaron histamina, tiramina, putrescina, espermina y espermidina en varias muestras de cebada, aunque a concentraciones muy bajas (menores a 0.05 mg/Kg en la mayoría de las muestras), a excepción de la tiramina que presentó niveles más elevados, entre 0.12 y 2.71 mg/Kg.

Tabla 19. Contenido de histamina, tiramina y triptamina (en mg/Kg) en cebadas de invierno y de verano (NARZISS y col. 1981a y b).

Tipo	Histamina	Tiramina	Triptamina
verano	0.02	14.90	2.20
verano	0.03	14.20	2.10
invierno	0.03	11.70	1.70
invierno	0.02	12.30	1.80

3.2.2. MALTA

Se admite que durante el proceso del malteado existe formación de aminas biógenas (WACKERBAUER y TOUSSAINT, 1984; NARZISS y col., 1984a y b) (Tabla 20). Por tanto, las aminas presentes en la malta no proceden por completo y directamente de la cebada, sino que se forman en parte durante la germinación de los granos de este cereal.

Tabla 20. Formación de aminas biógenas durante el malteado (WACKERBAUER y TOUSSAINT, 1984).

Aminas (mg/Kg)	Cebadas			Maltas		
	1	2	3	1	2	3
Histamina	nd	0.97	0.99	1.08	1.01	0.67
Tiramina	0.37	0.62	0.79	6.32	8.75	5.30
Putrescina	<0.05	<0.05	0.09	1.13	0.71	2.59
Espermina	nd	<0.05	<0.05	--	0.35	1.06
Espermidina	nd	<0.05	<0.05	--	0.24	0.27

Mediante estudios realizados en malterías a pequeña escala, los mismos autores han demostrado que la formación de aminas en la malta está influenciada por determinados factores, que juegan un papel fundamental en la elaboración de esta materia prima. Así, NARZISS y col. (1984a y b) establecen que los factores que pueden ejercer una mayor influencia son: la temperatura y el tiempo de germinación, la temperatura de secado, el tiempo de almacenamiento y el enriquecimiento con CO₂ de la atmósfera donde se desarrolla el proceso.

NARZISS y col. (1984a y b) observaron que un enriquecimiento de la atmósfera con CO₂ podía producir en la malta un descenso del contenido de tiramina de hasta un 60% y, por el contrario, un aumento del contenido de histamina de hasta un 30%.

El secado de la malta a temperaturas elevadas produce, según WACKERBAUER y TOUSSAINT (1984), un aumento de la concentración de histamina y un descenso sobre la de tiramina respecto a una malta secada a 80°C. NARZISS y col. (1984a) señalan que si la temperatura de secado es muy elevada se puede producir descarboxilación de la histidina por acción térmica, lo cual conduciría a un aumento de los niveles de histamina.

Por otra parte, CHEN y VAN GHELUWE (1979) señalaron que el contenido de histamina en la malta depende de la variedad de que se trate. Sin embargo, también indicaron que no se puede establecer una relación general y definida entre variedad de malta y contenido de histamina hasta que se puedan estandarizar totalmente las condiciones de crecimiento de la cebada y las del malteado.

ZEE y col. (1981d) señalaron que las materias primas utilizadas, y especialmente la malta, son las responsables principales de las variaciones de aminas biógenas en mosto y en cerveza. Estos autores realizaron un estudio elaborando mostos con diferentes tipos de malta, de 2 y de 6 "filas" y observaron que, en general, las maltas de 2 "filas" daban lugar a mostos con un contenido más elevado de histamina, putrescina, tiramina y agmatina que las de 6 "filas".

3.2.3. CEREALES SECUNDARIOS

Se ha observado que cuanto mayor es la proporción de cereales secundarios adicionados, el contenido de aminas biógenas en el mosto y en la cerveza suele ser menor.

ZEE y col. (1981d) realizaron fermentaciones con mostos elaborados a partir de malta y de diferentes tipos de cereales secundarios (maíz, trigo, cebada, arroz y jarabe de maíz), en una proporción de 80 de malta + 20 de cereal secundario y observaron que los contenidos de histamina, tiramina, putrescina y agmatina variaban en función del tipo de cereal secundario utilizado. Las cantidades más bajas de agmatina se encontraban en los mostos fermentados que contenían un 20% de jarabe de maíz, mientras que las más elevadas se encontraban cuando el cereal secundario era maíz. Se observó que en los mostos elaborados a partir de jarabe de maíz, de maíz o de arroz se encontraban cantidades más bajas de tiramina, respecto a los de trigo y los de cebada. La concentración de putrescina fue más baja en los mostos de jarabe de maíz y más alta en los de cebada. Por último, para la histamina no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes mostos.

Los mismos autores observaron que cuando se aumentaba la cantidad de arroz (desde 0% hasta 40%) en detrimento de la de malta, existía un descenso en el contenido total de aminas. Comprobaron que todos los mostos que contenían arroz presentaban en general un contenido menor de aminas.

En base a estas observaciones, ZEE y col. (1981b) señalaron que un aumento del contenido de arroz puede reducir los niveles de aminas biógenas en cervezas. Asimismo, manifiestan que una buena medida tecnológica, para obtener productos con contenidos bajos en aminas biógenas, sería incrementar la proporción de cereales secundarios. No obstante, añaden que son necesarios más estudios para determinar exactamente como influye un aumento en la proporción de estos cereales auxiliares en la calidad del producto final.

CHEN y VAN GHELUWE (1979) también realizaron trabajos combinando la malta con diferentes proporciones de cereales secundarios (por ejemplo, 85% de malta + 15% de jarabe de maíz, 65% de malta + 35% de jarabe de maíz, 12% de malta + 88% de jarabe de maíz). También observaron que aparecían menores contenidos de histamina a partir de los mostos que presentaban la proporción más elevada de cereales secundarios.

3.2.4. LUPULO

Vogel y col. en 1962 (ZAPPAVIGNA, 1974) encontraron de 30 a 40 mg/L de histamina en lúpulo fresco, 120-160 mg/L en un extracto de lúpulo y 0.5 a 1 mg/L de histamina en la cerveza elaborada con este lúpulo. Dados estos contenidos concluyeron que la histamina de la cerveza proviene del lúpulo.

Sin embargo, estudios posteriores indican que la contribución del lúpulo al contenido de aminas, y concretamente al de histamina, en las cervezas es muy baja, inferior al 10% de la cantidad total de aminas (WACKERBAUER y TOUSSAINT, 1984; NARZISS y col., 1984a). Por otra parte, CERUTTI y col. (1985) tras analizar 10 extractos de lúpulo no detectaron aminas.

Por último, cabe indicar que NARZISS y col. (1984a) encontraron contenidos más elevados de histamina en lúpulos agotados y por ello concluyeron que el reciclaje del lúpulo puede dar lugar a cervezas con contenidos más elevados de esta amina.

3.3. FORMACION DE AMINAS BIOGENAS DURANTE LA ELABORACION

Uno de los primeros trabajos en el que se sigue la evolución de varias aminas biógenas durante la fabricación de la cerveza es el de HRDLICKA y col. en 1968. Estos autores estudiaron la evolución de las aminas durante el proceso de fabricación de la cerveza, tomando muestras de mosto caliente, mosto frío, cerveza "verde" y cerveza acabada, dispuesta para su comercialización. Observaron que al final del proceso disminuía el contenido de las aminas biógenas consideradas globalmente (de 12.67 mg/L a 6.81 mg/L). En concreto, disminuían los contenidos de tiramina, triptamina, serotonina, colina y etanolamina. Respecto a la histamina observaron una evolución que incluía un aumento en las últimas etapas del proceso, que podía ser atribuido a la autólisis de las levaduras.

Posteriormente se han desarrollado otros trabajos en los cuales se ha prestado especial atención a ciertos puntos del proceso de elaboración de la cerveza, que pudieran tener una mayor influencia sobre la presencia de aminas biógenas, como son la etapa de braceado, la de fermentación y la de filtración, antes de proceder al envasado.

Algunos de estos estudios se han realizado a escala de laboratorio, en pequeñas instalaciones, que permiten reproducir las condiciones que se dan en el proceso real. Otros se han llevado a cabo siguiendo procesos reales de elaboración en industrias cerveceras, con toma de muestras en los diferentes puntos claves de la fabricación de la cerveza.

3.3.1. BRACEADO

NARZISS y col. (1984a) señalaron que el método utilizado para la obtención del mosto y los tiempos de ebullición aplicados ejercen una cierta influencia en el contenido final de histamina. Así, el método por decocción provocaba la obtención de mostos con valores mayores de histamina. Por el contrario, la aplicación de tiempos de ebullición superiores a los 60 min daban lugar a un ligero descenso de los niveles de histamina. Estos trabajos fueron realizados a pequeña escala.

Igualmente indicaron que durante la obtención del mosto (desde malta a mosto frío preparado para la adición de la levadura) los niveles de histamina aumentan, posiblemente por que se produce una descarboxilación enzimática de la histidina. Esta actividad enzimática podría provenir de la propia malta o bien tener un origen microbiano.

A escala industrial, los mismos autores realizaron también el seguimiento de los niveles de histamina, tiramina y triptamina durante el braceado. Observaron que, al igual que a escala de laboratorio, se producía un aumento de estas aminas durante esta fase del proceso de elaboración, debido probablemente a una actividad enzimática. Para el caso concreto de la histamina, se observó que la reutilización por tres veces del mismo lúpulo producía una elevación del nivel de histamina mayor que en el caso de una o dos reutilizaciones.

WACKERBAUER y TOUSSAINT (1984) estudiaron la influencia del proceso de maceración sobre el contenido de aminas biógenas en mosto y cerveza. Observaron que los niveles de histamina disminuían mientras que, por el contrario, los de tiramina y putrescina aumentaban siempre, independientemente de la técnica empleada en la maceración. Sin embargo, estos autores no aportaron ninguna conclusión respecto al hecho de que exista formación de tiramina y de triptamina. Señalaremos que tiempos de maceración más prolongados pueden producir una mayor desagregación del material proteico y por tanto niveles más elevados de aminoácidos libres.

Por el contrario, CERUTTI y col. (1989) no observaron durante la obtención del mosto a escala industrial ninguna variación entre el contenido inicial y final de las aminas.

3.3.2. FERMENTACION

ZEE y col. (1981d) estudiaron la evolución de histamina, tiramina, putrescina y agmatina durante la fermentación principal con levadura de cultivo puro a escala de laboratorio. Observaron que no existían diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales de las cuatro aminas y concluyeron, por tanto, que no existía formación ni tampoco disminución de los niveles de estas sustancias durante la fermentación. Así, señalaron que los niveles finales de aminas biógenas en cervezas dependían principalmente de los contenidos de aminas en las materias primas y que las variaciones que presentaban cervezas en cuanto a su composición en aminas dependían también de las variaciones que existían en las materias primas. Igualmente CHEN y VAN GHELUWE (1979) resaltaron la importancia de las materias primas y no la del proceso de fermentación en la presencia de aminas biógenas en el producto final.

Otros autores (NARZISS y col. 1984a y b; CERUTTI y col., 1989) señalan que durante la etapa de fermentación se pueden producir cambios en las concentraciones de aminas biógenas inicialmente presentes en el mosto de partida. Estos cambios podrían estar provocados por actividades descarboxilásicas y/u oxidativas provenientes de las propias materias primas o de la presenica de posibles microorganismos contaminantes.

NARZISS y col. (1984a) observaron, en fermentaciones realizadas a escala de laboratorio, un ligero descenso en el contenido de histamina, mientras que no detectaron ninguna variación durante la fase de guarda o maduración. Estos mismos autores tras realizar un estudio en diversas industrias cerveceras alemanas comprobaron que tanto los niveles de histamina como los de triptamina descendían durante la fermentación, siendo cuantitativamente más importante el descenso de la triptamina. Por el contrario, detectaron una constante formación de tiramina (del orden del 50%) durante todo el proceso fermentativo. Estos autores señalaron que las cerveceras estudiadas trabajaban ininterrumpidamente las 24 horas del día, sin que existiera una limpieza exhaustiva de las instalaciones. Este hecho podría producir que existieran niveles elevados de microorganismos que pudieran ser los responsables de la formación de histamina o de otra amina.

También CERUTTI y col. (1989) estudiaron el comportamiento de las aminas biógenas durante la fermentación principal a escala real en cerveceras italianas. Realizaron seguimientos de la evolución de histamina, tiramina, cadaverina, putrescina, β -feniletilamina y triptamina y comprobaron que, si bien la putrescina y la cadaverina se encontraban en todas las muestras, sus contenidos no variaban durante todo el proceso de elaboración. La histamina y la triptamina no fueron detectadas en ninguna de las muestras (límite de detección: 0.1 mg/L y 0.5 mg/L, respectivamente) y sólo se encontró β -feniletilamina en dos de los siete tipos de cervezas estudiados. Por ello, los autores señalaron que la presencia de β -feniletilamina en cervezas es debida mayoritariamente a las materias primas utilizadas.

La evolución de la tiramina no fue igual en las dos industrias estudiadas. En una de ellas no hubo formación en ninguno de los cinco procesos estudiados, mientras que en la otra, se observó una marcada formación de tiramina en los dos procesos estudiados, desde 0.3 hasta 31.6 mg/L y desde 0.4 hasta 34.5 mg/L. Además, la mayor formación de tiramina se producía durante la fermentación principal. Ante el diferente comportamiento de la tiramina en las dos cerveceras, los autores señalaron que es posible obtener productos con un bajo contenido de aminas si se utilizan materias primas en buen estado y si se aplica una tecnología adecuada.

Finalmente, se ha señalado que los procesos de filtración aplicados sobre la cerveza durante su elaboración no parecen influir sobre los niveles de aminas biógenas (ZEE y col., 1981b; CERUTTI y col., 1989).

3.4. FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA FORMACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN CERVEZAS

3.4.1. LEVADURA DE CULTIVO

El papel que juega la levadura de cultivo sobre la formación de las aminas biógenas en bebidas alcohólicas fermentadas es bastante discutido. Algunos autores (BUTEAU y col., 1984) manifiestan que la actividad fermentativa de la propia levadura es la responsable directa de la formación de las aminas biógenas durante la fermentación alcohólica. Por otra parte, LEMBKE (1978), NARZISS y col. (1984a) y BRAVO-ABAD (1990), entre otros, indican que las levaduras por sí mismas no tienen actividad aminoácido-descarboxilásica. No obstante, estas levaduras podrían crear el microambiente adecuado para que los posibles microorganismos responsables puedan desarrollarse y sintetizar los enzimas descarboxiladores.

Concretamente en cervezas, y con el objetivo de estudiar el papel de la levadura de cerveza en la formación de aminas biógenas, se han realizado los siguientes trabajos:

1. NARZISS y col. (1984a) hicieron fermentar un mismo mosto con diferentes cepas de levadura en las mismas condiciones de fermentación (8.5⁰C). Observaron que el contenido de histamina disminuía a lo largo del proceso y que no existía relación entre el descenso de esta amina y una posible acción por parte de la levadura.
2. WACKERBAUER y TOUSSAINT (1984) tras realizar varios seguimientos de fermentaciones a escala industrial, en las que cabía suponer que no existía contaminación, atribuyeron las variaciones del contenido de aminas durante la fermentación a la actividad de la levadura o a su metabolismo.

3. ZEE y col. (1981d) utilizaron una cepa de Saccharomyces uvarum para llevar a cabo una fermentación a escala de laboratorio, que permitiese estudiar la influencia de la levadura sobre los niveles de histamina, tiramina, putrescina y agmatina. Los resultados demostraron que S. uvarum no tenía capacidad para producir aminas, ya que los niveles de estas sustancias permanecían constantes durante todo el proceso (Tabla 21).

Tabla 21. Contenidos medios (mg/L) de histamina, tiramina, putrescina y agmatina en el mosto inicial y en el mosto fermentado con S. uvarum (ZEE y col. 1981d).

Aminas	Mosto inicial	Mosto fermentado
Histamina	2.26±0.28	2.15±0.24
Tiramina	4.76±0.26	4.63±0.22
Putrescina	10.82±0.55	10.82±0.47
Agmatina	55.24±7.83	55.45±8.08

4. CHEN y VAN GHELUWE (1979) realizaron un seguimiento de la histamina en una fermentación a escala de laboratorio para estudiar su evolución durante la fermentación alcohólica. Utilizaron una levadura de cultivo puro, no contaminada, tipo "ale" y observaron (Tabla 22) que no existía formación de histamina a pesar de detectarse un consumo de histidina de casi un 50% respecto al contenido inicial del aminoácido en el mosto. Concluyeron que la levadura de cerveza no posee actividad L-histidina-descarboxilásica y que el contenido de histamina (dentro de unos niveles considerados como normales) proviene directamente de las materias primas.

Tabla 22. Estudio de la evolución de histamina y de histidina durante la fermentación alcohólica (CHEN y VAN GHELUWE, 1979).

Tiempo de fermentación (horas)	Histidina (mg/L)	Histamina (mg/L)
0	54.5	0.240
20	43.7	0.245
31	37.2	0.239
40	24.0	0.241
48	21.7	0.252
71	21.8	0.256
95	23.7	0.259
139	23.6	0.249

3.4.2. MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

Muchos autores atribuyen el aumento del contenido de aminos durante la fermentación a la actividad de otros microorganismos y no a las levaduras de cultivo. LEMBKE (1978) y ZEE y col. (1981d) indicaron que la presencia en la cerveza de microorganismos indeseables, tales como bacterias del ácido láctico (Lactobacillus y Pediococcus), procedentes de una levadura contaminada o de unas condiciones sanitarias deficientes durante la incorporación de la levadura (ZEE y col., 1981d), pueden ser los responsables de la producción de aminos por descarboxilación de sus aminoácidos precursores. CERUTTI y col. (1989) también señalan que la síntesis de aminos puede ser debida a la presencia de especies microbianas con actividad descarboxilásica que se encuentren contaminando a la levadura. ZEE y col. (1981d) puntualizan al respecto que también se ha de tener en consideración la contaminación bacteriana, procedente de las materias primas, particularmente importante durante el proceso de malteado.

CHEN y VAN GHELUWE (1979) determinaron cantidades importantes de histamina (1.8 a 5.6 mg/L en cervezas) contaminadas por Lactobacillus, Pediococcus y bacterias bacilares cortas ("short-rod") no identificadas. También observaron que una cerveza no pasteurizada, tras el almacenamiento de 4 semanas a temperatura ambiente, presentaba un contenido en histamina 10 veces superior al de una cerveza idéntica pero pasteurizada. Al analizar la cerveza no pasteurizada comprobaron que había contaminación microbiana. Estos mismos autores hallaron contenidos relativamente elevados de histamina (1.9 mg/L) en cervezas belgas elaboradas por "fermentación espontánea", en las que intervienen en parte de su elaboración toda una serie de microorganismos además de las levaduras propias de la fermentación.

ZEE y col. (1981d) comprobaron que Lactobacillus brevis era el responsable de la producción de tiramina y de putrescina en mostos contaminados con este microorganismo (Tabla 23).

Tabla 23. Niveles medios de aminos (mg/L) en mosto y en mosto contaminado por Lactobacillus brevis (ZEE y col., 1981d).

Aminos	Mosto con <u>L.brevis</u>	Mosto
Histamina	2.52±0.42	2.26±0.28
Putrescina	10.34±2.06	4.76±0.26
Tiramina	27.98±3.73	10.82±0.55
Agmatina	27.59±6.72	55.24±9.83

Respecto a la agmatina, se pudo constatar un descenso de casi la mitad en el mosto contaminado con el microorganismo respecto al control. Una posible explicación sería la propuesta por White y col. en 1973 (ZEE y col., 1981d) que señalaban que Lactobacillus brevis puede producir putrescina a partir de agmatina por la acción de una arginina ureohidrolasa.

En un estudio realizado por STEINER y LAENZLINGER (1978) se detectaron 0.5 mg/L de histamina en una cerveza que presentaba 0.2 mg de diacetilo por litro, lo cual podría indicar que se había producido una contaminación por bacterias del ácido láctico. Estos mismos autores observaron, en cervezas de barril contaminadas, que en las muestras que presentaban contaminación por cocos no se detectaba producción de histamina, mientras que en las muestras contaminadas con lactobacilos, los contenidos de histamina en algunos casos eran relativamente altos (0.7 a 13.2 mg/L). La variación de niveles observada podría ser explicada por el hecho de que los niveles de flora láctica presente no hubieran sido siempre los mismos. La ausencia de niveles elevados de histamina en las cervezas contaminadas por cocos no fue atribuida a una falta de producción por parte de estos microorganismos, ya que son bacterias que poseen capacidad histidina-d Descarboxilásica, sino a la posible presencia de histaminasas que degraden la histamina formada. Otros autores han señalado que es necesaria una posible inducción del enzima histidina-d Descarboxilásica para que sea activo (RICE y col. 1976; SMITH, 1980-81; JOOSTEN y STADHOUDERS, 1987; BRAVO-ABAD, 1990).

STEINER y LAENZLINGER (1978) comprobaron que al contaminar una cerveza con una cepa de lactobacilos se producía un aumento considerable de histamina (aproximadamente 18 mg/L) a los pocos días de adición de los microorganismos, mientras que la turbidez aparecía más tardíamente. Con esta experiencia se pretendía demostrar que la histamina podía ser utilizada como un indicador de contaminación, ya que niveles de contaminación pequeños daban lugar a valores relativamente elevados de histamina. Por supuesto, habría de tenerse en cuenta que no se hubieran utilizado materias primas con contenidos de histamina altos.

3.4.4. AMINOACIDOS PRECURSORES

Uno de los factores que se consideran necesarios para la formación de aminas biógenas en alimentos es la disponibilidad de aminoácidos precursores libres (RICE y KOEHLER, 1976). Existen muy pocos trabajos destinados a conocer la interrelación entre niveles de aminoácidos precursores y formación de aminas biógenas, tanto en cervezas como en otros alimentos.

CHEN y VAN GHELUWE (1979) no encontraron relación directa entre el descenso de histidina y los niveles de histamina durante la fermentación de la cerveza.

BUTEAU y col. (1984) no pudieron establecer, durante la fermentación alcohólica del vino, una relación entre la formación de aminas biógenas y la disminución de sus aminoácidos precursores. Como posible explicación señalaron que las rutas de síntesis de las aminas son complejas y que más de un compuesto pueden dar lugar a un mismo metabolito final. Del mismo modo una sustancia puede ser el origen de varios productos finales. ULLA y col. (1989), tras estudiar la evolución de tirosina y de tiramina a lo largo de la vinificación de tres tipos de vino, tampoco pudieron observar la existencia de una transformación directa del aminoácido en la amina.

Por su parte, STEINER y LAENZLINGER (1978) señalan que la escasa formación de histamina a partir del octavo día de contaminación de una cerveza con Lactobacillus, puede ser atribuida a que la histidina que hubiera presente estuviera ya agotada y que por tanto no existiera aminoácido precursor.

En una malta cervecera siempre existe suficiente proteína y enzimas proteolíticos para dar lugar a un mosto con una cantidad adecuada de aminoácidos y péptidos. De hecho, la malta aporta al mosto todos los constituyentes nitrogenados, desde aminoácidos libres hasta sustancias proteicas de elevado peso molecular (CHARAMBOULUS, 1981).

Los aminoácidos del mosto son necesarios como nutrientes de las levaduras, para asegurar una rápida y normal fermentación (CHARAMBOULUS, 1981; GARZA-ULLOA y col., 1986). La mayor parte de estos aminoácidos son asimilados por la levadura durante la fermentación, por lo que la cerveza acabada contiene, en general, niveles muy bajos de aminoácidos. Hudson (CHARAMBOULUS, 1981) calculó que entre 1/3 y 1/2 del nitrógeno del mosto se pierde durante la fermentación.

BATALLA y TORRENT (1990) señalan que la composición cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos en el mosto y en la cerveza depende:

- de la variedad de la cebada y de su contenido en nitrógeno,
- de las condiciones de malteado,
- de como se realice el proceso de maceración y de braceado,
- de las condiciones de fermentación
- de la cepa de la levadura.

En lo que concierne a la cebada, poco puede hacerse para modificar su perfil de aminoácidos, pero sí es posible modularlos en el mosto resultante, hasta ciertos límites, durante los procesos de malteado y maceración.

La levadura no asimila todos los aminoácidos a la misma velocidad, sino que lo hace de una forma secuencial, pues metaboliza cada uno de ellos de una manera diferente (JONES y PIERCE, 1969; BATALLA y TORRENT, 1990). El ácido glutámico y el ácido aspártico, entre otros, son absorbidos inmediatamente, mientras que la prolina solo es asimilada en una pequeña proporción y a una velocidad muy lenta (Tabla 24).

Tabla 24. Orden de asimilación de los aminoácidos por parte de la levadura (JONES y PIERCE, 1969; BATALLA y TORRENT, 1990).

Grupo A: inmediata

Acido aspártico, ácido glutámico, serina, asparagina glutamina, arginina, treonina y lisina.

Grupo B: gradual

Histidina, valina, metionina, isoleucina y leucina.

Grupo C: después de la fase Lag

Glicina, alanina, tirosina, fenilalanina y triptófano.

Grupo D: lentamente, después de 60 horas

Prolina, hidroxiprolina y ácido τ -aminobutírico

Si recordamos los aminoácidos precursores de las aminas biógenas, se puede observar que:

- .. Glutamina y lisina se absorben rápidamente por la levadura.
- .. Histidina es asimilada gradualmente.
- .. Tirosina, fenilalanina y triptófano son aminoácidos que se absorben después de la fase de crecimiento de la levadura y que, por tanto, permanecen durante más tiempo en el mosto.

Además, la levadura no requiere a todos los aminoácidos por igual y en base a ello éstos se pueden clasificar en tres grupos (Tabla 25), en función de su naturaleza "esencial" para el metabolismo de la levadura (JONES y PIERCE, 1969; CHARAMBOLUS, 1981).

La concentración en el mosto de los aminoácidos de las clases III y II es fundamental, ya que la levadura utiliza estos aminoácidos para la síntesis de los suyos propios. Deficiencias en estos aminoácidos pueden dar lugar a cambios importantes en el metabolismo del nitrógeno de la levadura y pueden afectar a la calidad final de la cerveza (JONES y PIERCE, 1969).

Tabla 25. Orden de importancia de los aminoácidos para la levadura (CHARAMBOULUS, 1981; BATALLA y TORRENT, 1990).

Clase I	Clase II	Clase III
Acido aspártico	Glicina	Histidina
Acido glutámico	Alanina	Arginina
Serina	Valina	Leucina
Asparagina	Isoleucina	Lisina
Glutamina	Fenilalanina	
Treonina	Tirosina	
Prolina		
Metionina		

Por el contrario, la concentración de los aminoácidos de la clase I en el mosto no es tan importante, ya que sólo se utilizan en cantidades significativas en las últimas etapa del periodo de fermentación. Además la levadura puede sintetizar estos aminoácidos por otras vías (JONES y PIERCE, 1969).

GARZA-ULLOA y col. (1987) y BATALLA y TORRENT (1990) realizaron un estudio sobre los contenidos de aminoácidos en mostos y en cervezas mejicanas y españolas, respectivamente. En la tabla 26 se incluyen los datos que obtuvieron. Se observa claramente como los contenidos de aminoácidos en cervezas son mucho más bajos que los presentes en el mosto, a excepción de aquellos aminoácidos que la levadura asimila en una proporción muy baja, como la prolina y el ácido γ -aminobutírico.

Tabla 26. Contenidos de aminoácidos (mg/L) en mostos y cervezas (GARZA-ULLOA y col., 1986; BATALLA y TORRENT, 1990).

Aminoácido	Mosto	Cerveza	Mosto	Cerveza
GABA	111.5	107.4	84.0	70.8
ASP	49.9	12.9	67.5	7.5
GLU	38.7	3.3	83.1	4.8
ALA	65.0	8.4	128.3	20.6
ARG	61.2	1.8	146.1	5.3
ASN	63.2	2.1	135.6	tr.
PHE	92.1	3.0	125.7	16.1
GLY	28.2	10.3	31.7	8.2
GLN	12.3	tr.	5.9	tr.
HPRO	--	--	6.4	6.3
HIS	20.6	tr.	37.6	6.3
LEU	122.5	4.1	171.9	19.0
LYS	107.8	tr.	88.5	2.6
MET	59.6	tr.	37.5	4.5
PRO	--	--	1746.0	1318.0
SER	43.3	3.3	67.1	tr.
TYR	62.1	5.5	78.5	29.9
THR	52.1	5.8	69.1	3.1
TRP	28.3	6.5	47.3	20.8
VAL	95.1	2.6	130.0	14.3

3.5. AMINAS BIOGENAS Y CALIDAD HIGIENICO-SANITARIA DE LOS PROCESOS DE ELABORACION

En el caso concreto de la cerveza, debe señalarse que, tras estudios realizados por diversos autores, cabe la posibilidad de que exista una correlación entre las condiciones higiénico-sanitarias de elaboración y la aparición de aminas en el producto acabado, de forma análoga a lo indicado para otros alimentos.

Se ha afirmado que un factor condicionante de la formación de aminas biógenas en las cervezas es la higiene durante todo el proceso de elaboración, es decir, desde materias primas hasta producto final y su almacenamiento. (CERUTTI, 1985).

En base a lo señalado por varios autores (ZEE y col., 1981a; NARZISS y col., 1984 a y b; CERUTTI y col., 1985; CERUTTI y col., 1989) un contenido relativamente elevado de aminas biógenas en las cervezas, podría ser consecuencia de:

1. El uso de materias primas (malta, cereales secundarios, lúpulo) en un mal estado.
2. La aplicación, durante el malteado y la cocción, de temperaturas excesivamente elevadas que pudieran provocar una descarboxilación térmica de los aminoácidos precursores de las aminas.
3. El empleo de levaduras contaminadas con microorganismos aminoácido-descarboxiladores.
4. Condiciones higiénico-sanitarias deficientes durante todo el proceso de elaboración, que impliquen niveles elevados de contaminación microbiana (Gram negativos, Gram positivos y levaduras salvajes).
5. El almacenamiento en condiciones no idóneas que pudieran favorecer la contaminación del producto final por parte de microorganismos.
6. La aplicación de tratamientos estabilizantes (pasteurización) defectuosos, en los que no se alcance el grado de esterilización comercial requerido.

La presencia de niveles bajos o muy bajos de aminas biógenas en una cerveza, sería según CERUTTI y col., 1987 un "indicador" de que ha sido un producto elaborado siguiendo unas "buenas prácticas de fabricación".

La calidad de las materias primas utilizadas y la "pureza" de las levaduras adicionadas al mosto (no contaminadas) son los factores que para ZEE y col. (1981) influyen en un mayor grado sobre la presencia de las aminas en cerveza.

CERUTTI y col. (1985) realizaron un seguimiento de las aminas biógenas en 11 plantas de elaboración italianas y observaron que:

- .. La histamina no se detectaba en ninguna de las muestras.
- .. La cadaverina, la β -feniletilamina y la triptamina no encontraban en la mayoría de las muestras
- .. Los niveles de putrescina oscilaron entre 1.8 y 6.9 mg/L.
- .. Los niveles de tiramina en 2 cervecerías eran siempre altos respecto a las 9 restantes. Además en una de las muestras se encontró un valor anormalmente alto dentro de una misma planta productora.

CERUTTI y col. (1985) señalaron que las causas de que en una misma cervecería se presentaran siempre niveles altos de tiramina podría ser: el uso de materias primas en un estado defectuoso y/o la presencia de actividad enzimática descarboxilásica de microorganismos contaminantes, que actuarían sobre los aminoácidos precursores. La presencia esporádica de niveles excepcionalmente altos de tiramina en una cerveza podría ser la consecuencia de un "accidente", que provocase la contaminación del mosto o quizás de la levadura.

Estos mismos autores, años más tarde (CERUTTI y col., 1989), tras realizar otro estudio de similares características en dos plantas cerveceras, observaron que en una siempre se formaban niveles elevados de tiramina (más de 30 mg/L) mientras que en la otra no había formación. La concentración de otras aminas como cadaverina, putrescina, β -feniletilamina, histamina y triptamina permanecía constante durante todo el proceso. Concluyeron que la presencia de niveles relativamente elevados de tiramina, como son más de 30 mg/L, podrían ser indicadores del uso de levaduras contaminadas por bacterias con actividad descarboxilásica. Según estos autores, el diferente comportamiento de la tiramina en las dos plantas demuestra que si se utilizan materias primas en un buen estado y si se aplican tecnologías convenientes es posible obtener productos con niveles de aminas bajos.

Otros autores al realizar estudios del mismo tipo, llegaron a conclusiones similares, señalando que la mayor parte de las diferencias entre las distintas plantas de elaboración estudiadas eran debidas a las condiciones de fabricación de la cerveza y a las materias primas empleadas (ZAPPAVIGNA y col., 1974; ZEE y col., 1981d).

Por todo ello, se ha llegado a afirmar que sería indispensable que en los programas de control de calidad de las industrias cerveceras se incluya la determinación analítica de las aminos biógenos, con la finalidad de conocer mejor la calidad de las materias primas y de los diferentes procesos que tienen lugar durante la fabricación de cervezas (CERUTTI y col., 1985).

CERUTTI y col. (1987) señalan que es necesario establecer unos "nuevos índices de calidad" para evitar en lo posible riesgos al consumidor y también evitar cualquier perjuicio en la "imagen de esta bebida". Establecen como niveles recomendables de aminos biógenos en las cervezas los siguientes:

.....

Cadaverina y β -fenietilamina: inferior a 1mg/L

Triptamina y tiramina: inferior a algunos mg/L

Histamina: inferior a 0.1 mg/L

Putrescina: sin niveles máximos ya que se la considera una amina "natural" de la cerveza

.....

De estos estudios se desprende que en la cerveza pueden también aplicarse las consideraciones efectuadas para otros alimentos en relación con el eventual interés tecnológico de las aminos biógenos que, en definitiva, se traducen en su posible papel como indicadoras de procesos tecnológicos inapropiados, relacionados con defectos higiénico-sanitarios durante la elaboración o el almacenaje y/o como indicadoras del empleo de materias primas en condiciones no óptimas.

3.6. RELACION ENTRE AMINAS BIOGENAS Y ALGUNAS CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO ACABADO

(MINISTERIO DE PRESIDENCIA DE GOBIERNO, 1981, 1984 y 1989; BELITZ y GROSCH, 1985; HOUGH, 1990).

Existen muy pocos trabajos destinados a estudiar eventuales relaciones entre las aminos biógenas y algunas características del producto acabado, como por ejemplo el extracto seco primitivo o el grado de fermentación. El estudio de estos parámetros nos permitirá conocer si la presencia de aminos biógenas en las cervezas coincide con valores anormalmente altos o bajos de estos parámetros, que a su vez pueden ser indicadores de una elaboración no correcta y/o de un estado de conservación defectuoso. Por otra parte, se podrá comprobar si sus valores se encuentran dentro de los márgenes que marca la legislación española.

3.6.1. GRADO ALCOHOLICO

Representa el porcentaje de alcohol etílico que contiene la cerveza. Se expresa en gramos de alcohol por 100 g de cerveza (% P/P) o en gramos de alcohol por 100 mL de cerveza (% V/V). La Legislación Española señala que no puede ser inferior al 3% en peso.

Su determinación tiene como objeto comprobar si a una mayor graduación alcohólica le corresponden contenidos mayores o menores de aminos biógenas.

3.6.2. EXTRACTO SECO PRIMITIVO

Representa el porcentaje de extracto seco del mosto antes de la fermentación (incluye los azúcares fermentables). Para su cálculo se aplica la fórmula de Balling:

$$E.S.P. = \frac{2.0665 A + E.R.}{100 + 1.0665 A} \times 100$$

siendo: E.S.P.: extracto seco primitivo
expresado en g/ 100 g o grados
Balling o grados Plato.
A: graduación alcohólica (g/100 g).
E.R.: extracto real (g/100 g).

El extracto real, necesario para calcular el extracto seco primitivo y el grado de fermentación, se calcula a partir de la densidad del residuo de destilación una vez restablecido su peso inicial por adición de agua destilada. Se expresa en gramos por 100 g de cerveza (% P/P) y su valor debe ser superior al 3% en peso.

La legislación española señala que la cerveza debe tener un extracto seco primitivo no inferior al 11% (P/P), en la cerveza especial no debe ser inferior al 13% (P/P) y en la especial extra como mínimo debe ser del 15% (P/P).

El extracto seco primitivo nos interesa porque indica la cantidad de extracto del mosto a partir del cual se realizó la fermentación. Se pretende estudiar si existe una relación entre el contenido de aminos y el contenido de extracto inicial y se tratará de comprobar si, tal y como señalan CHEN y VAN GHELUWE (1979), las cervezas con un mayor extracto primitivo presentan un mayor contenido en aminos.

3.6.3. GRADO DE FERMENTACION

Representa el porcentaje de extracto seco primitivo que ha sido fermentado. Se calcula a partir del extracto seco primitivo y del extracto real mediante la siguiente fórmula:

$$G.F. = 100 \left(1 - \frac{E.R.}{E.S.P.} \times \frac{1}{1 - (0.005161 \times E.R.)} \right)$$

siendo: G.F.: grado de fermentación, expresado en % y con una cifra decimal.

E.R.: extracto real

E.S.P.: extracto seco primitivo.

El factor 0.005161 se utiliza para corregir la pérdida de masa por desprendimiento de CO₂.

El grado de fermentación debe ser superior al 46.0%, salvo en la cerveza negra que puede ser menor pero sin ser inferior al 35.0%, según la Legislación Española.

Las cervezas con un grado de fermentación inferior al 50% se consideran como poco fermentadas. Las que poseen un grado de fermentación entre 50% y 60% son medianamente fermentadas y las que lo presentan superior al 60% se consideran muy fermentadas.

Este parámetro podría relacionarse con la presencia de aminas biógenas en cervezas en base a dos hipótesis

- a. Cabe la posibilidad de que cervezas más fermentadas (grado de fermentación más altos) presenten contenidos de aminas más elevados.
- b. Las cervezas muy poco fermentadas (grado de fermentación bajo) podrían ser más susceptibles al desarrollo de contaminaciones microbianas durante el almacenamiento. Los microorganismos contaminantes podrían presentar actividad aminoácido-descarboxilásica y, por tanto, dar lugar a formación de aminas biógenas.

3.6.4. ACIDEZ TOTAL

Su valor aporta información sobre la cantidad de ácidos que presenta la cerveza, fundamentalmente los ácidos láctico, succínico, fórmico y acético. Se expresa en porcentaje en peso (P/P) de ácido láctico y no puede superar el 0.3% según la legislación española. También puede expresarse como mL de álcali (1N) por 100 g de cerveza o % de ácido acético.

Un exceso de acidez puede indicarnos que el producto ha sufrido un proceso de acidificación por parte de microorganismos. Recordemos que las bacterias del ácido láctico y del ácido acético dan lugar, a partir de los azúcares, a compuestos de naturaleza ácida, como ácido láctico, acético, succínico y fórmico, entre otros. Si la formación de aminas es atribuible a una actividad microbiana, cabe la posibilidad de que estos microorganismos productores de ácidos estuvieran también relacionados con la formación de aminas.

3.6.5. pH

La acidez total viene definida solamente por la suma de ácidos libres sin tener en cuenta su fuerza. Por el contrario, la determinación del pH permite conocer la acidez real, o concentración de hidrógeniones, que nos informa a la vez de la cantidad y de la fuerza de los ácidos.

Koessler y col. en 1928 (VOIGT y EITENMILLER, 1977) postularon que la descarboxilación de aminoácidos podría ser un mecanismo de protección de los microorganismos contra un medio ambiente demasiado ácido. Así, cuando la concentración de hidrogeniones fuera suficientemente elevada para amenazar la supervivencia de los microorganismos, se aumentaría la síntesis de enzimas descarboxilasas. Por tanto, se tratará de establecer si las cervezas con valores de pH bajos presentan contenidos de aminos más elevados.

El pH de una cerveza debe estar comprendido entre 3.5 y 5, según la Legislación Española. Actualmente, la determinación del pH es una práctica corriente, ya que la resistencia de una cerveza a sufrir cambios organolépticos depende de la acidez real que presente.

*III. OBJETIVOS E HIPOTESIS
A ESTUDIAR*

II. OBJETIVOS E HIPOTESIS A ESTUDIAR

La revisión bibliográfica efectuada, sobre diversos aspectos vinculados a la presencia de aminas biógenas en alimentos, pone de manifiesto el interés de disponer de más información sobre algunas cuestiones relacionadas con estas sustancias en los alimentos.

La elección de la cerveza como objeto de estudio se debe, por una parte, a sus propias características, ya que al requerir para su obtención una etapa de fermentación con participación de microorganismos, quedaría incluida dentro de los productos susceptibles de contener niveles importantes de aminas biógenas. Se trata, además, de una bebida en la que prácticamente no se han realizado estudios destinados a conocer no sólo la incidencia y significación de los niveles de aminas, sino tampoco las causas y factores que influyen en la presencia de estas sustancias en el producto acabado. Por otra parte, nuestro grupo de investigación dispone de algunos datos que sugieren que el tema de las aminas biógenas tiene tanto o más interés en estas bebidas que en los vinos, que han sido mucho más estudiados al respecto. Recordemos que las cervezas son productos de amplio consumo y que además el mismo se encuentra en expansión. Por todo ello, los objetivos planteados en este trabajo han sido:

1. Desarrollar un método cromatográfico que permita la determinación de aminas biógenas en cervezas y en sus materias primas.
 - El método debe ser útil para cuantificar no sólo a la histamina y a la tiramina, que son las aminas biógenas más estudiadas en alimentos en general, sino también otras aminas aromáticas como β -feniletilamina, triptamina y serotonina, diaminas, como cadaverina y putrescina y poliaminas como agmatina, espermina y espermidina.
 - Una vez establecidas las condiciones operatorias óptimas, se pretende verificar estadísticamente la validez del método mediante el cálculo de parámetros como linealidad, precisión, recuperación o exactitud y límites de detección y cuantificación.



2. Conocer la incidencia, distribución y significación de las distintas aminas en cervezas de consumo en España, ya sean de producción propia o de importación.

- Se trata de comprobar si el perfil de contenidos de aminas es similar en las diferentes cervezas o si, por el contrario, se pueden establecer diferencias entre ellas en función del tipo de aminas que se presentan o de las cantidades en que se encuentran.
- Se pretende estudiar igualmente si existe algún tipo de relación, entre la presencia o un cierto contenido de alguna/s amina con alguna característica del producto acabado. En concreto, se estudiarán posibles relaciones entre las aminas y el grado de fermentación, la acidez, el extracto seco primitivo y/o el grado alcohólico.
- Dado que algunas de las aminas se han relacionado con problemas de tipo toxicológico, directo o indirecto, se pretende evaluar en base a los contenidos de aminas, los posibles riesgos toxicológicos asociados al consumo de cervezas.

3. Estudiar el origen de las aminas biógenas en la cerveza.

En base a la bibliografía cabe plantear como hipótesis de estudio las siguientes:

a) La presencia de aminas en el producto acabado se debe total o parcialmente al aporte de las mismas por las materias primas.

b) Existe formación de aminas durante la elaboración, ya sea por las levaduras responsables de la fermentación o bien por la presencia de microorganismos contaminantes durante cualquier etapa de la fabricación.

- Se estudiará si en las materias primas (malta, lúpulo, cereales secundarios) se encuentran aminas en cantidad suficientemente elevada para influir en el contenido de estas sustancias en el producto acabado (teniendo en cuenta la dilución que comporta la obtención del mosto de cerveza).

- Si se demuestra que la malta contiene aminas en cantidades significativas, se realizarán seguimientos del proceso de malteado, para comprobar si el mismo provoca formación de aminas o si éstas proceden ya directamente de la cebada.

- Se estudiará la evolución de las aminos biógenas durante la fermentación principal y secundaria de la cerveza. Se pretende conocer si:

- . La eventual formación de aminos es consecuencia de la actividad de la levadura de fermentación y si tiene alguna influencia la reutilización de una misma levadura para varias fermentaciones.
- . La eventual formación de aminos se debe a la presencia de microorganismos contaminantes, es decir no estrictamente necesarios para la obtención de la cerveza.
- . La mayor o menor presencia de los aminoácidos precursores libres tiene alguna influencia en el grado de formación de aminos.

4. Estudiar si existe alguna relación entre niveles más o menos elevados de aminos y las condiciones higiénicas durante la elaboración de la cerveza.

Esta parte del trabajo se realizaría si previamente se demuestra que la formación de aminos está relacionada con la presencia de microorganismos contaminantes. Para confirmar cualquier tipo de relación se pretende, en primer lugar, aislar los microorganismos a partir de muestras de fermentación industrial y a continuación contaminar voluntariamente y de forma controlada fermentaciones realizadas a escala de laboratorio.

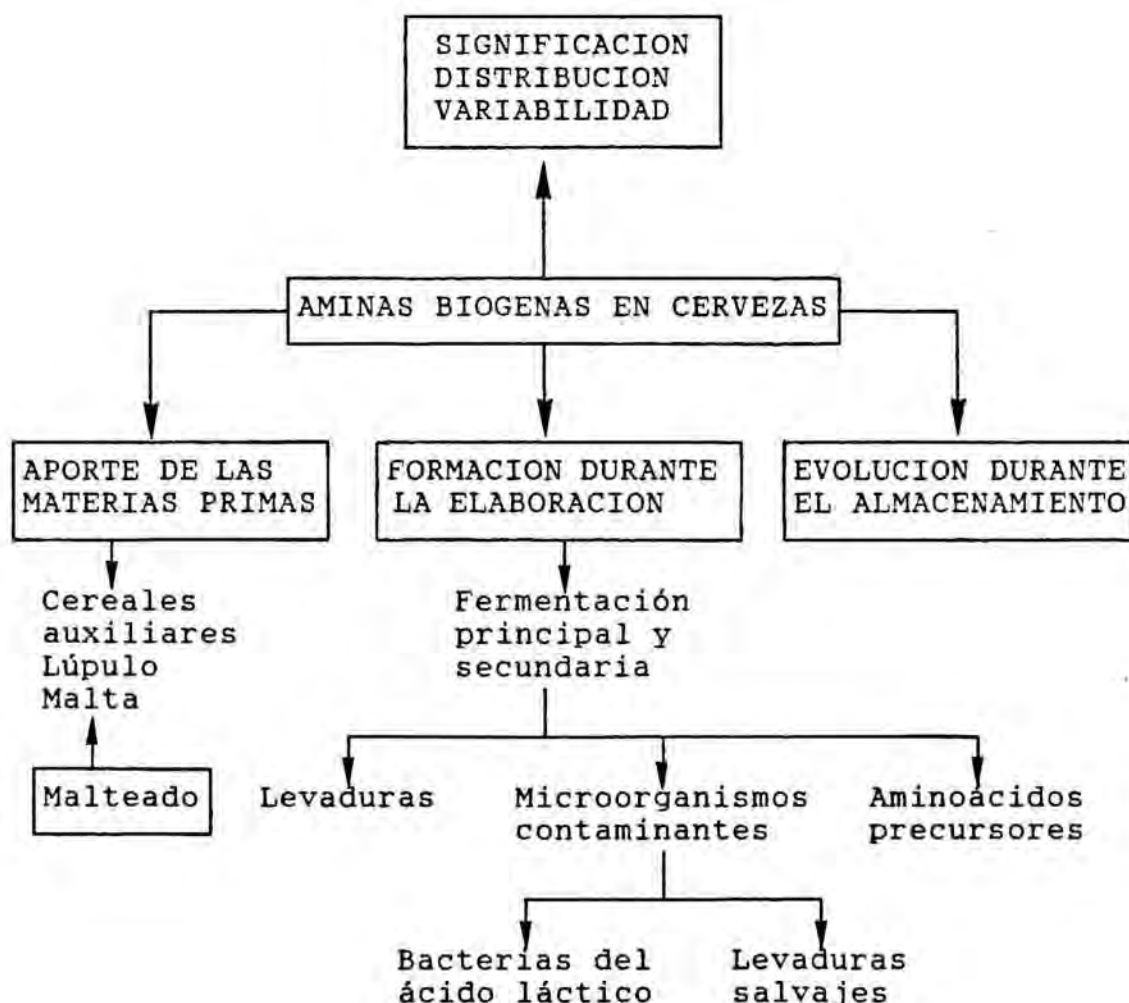
- Se pretende conocer que nivel mínimo de microorganismos contaminantes pueden provocar formación apreciable de aminos.
- Se pretende estudiar si, ante un determinado nivel de aminos en el producto acabado, se puede presumir el grado de contaminación que eventualmente se produjo durante su elaboración.
- Se pretende comprobar si los tratamientos que aplica la industria, para controlar la contaminación microbiana, son eficientes para evitar una eventual formación de aminos durante la elaboración de la cerveza.

5. Estudiar si durante el almacenamiento de la cerveza se produce alguna variación en el contenido de aminas biógenas.

- Se estudiará, a partir de cervezas pertenecientes a un mismo lote de fabricación, la evolución de las aminas durante su almacenamiento a temperatura ambiente por un periodo de tiempo superior, al menos, al de su vida comercial.

6. Estudiar la variabilidad de los contenidos de aminas biógenas en cervezas de diferentes lotes de producción y en productos del mismo tipo pero elaborados en distintas industrias cerveceras.

Diagrama que refleja los puntos de interés en el estudio de aminas biógenas en cervezas.



IV. PARTE EXPERIMENTAL

4. DETERMINACION DE AMINAS BIOGENAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA

4.1. MATERIAL Y REACTIVOS

Aparatos

- HPLC System KONTRON 600 (binario) con controlador y programador KONTRON 205 e inyector Rheodyne 7125.
- Espectrofluorímetro KONTRON SFM 25.
- Sistema de derivatización post-columna WATERS RDM (Reagent Delivery Module).
- Tubo capilar de reacción ("coil") de reacción de 2 m de longitud.
- Integrador HEWLETT PACKARD HP 3396 A.
- Baño de Ultrasonidos ULTRASONICS - P-SELECTA
- pHmetro CRISON Digit 501.
- Centrifuga CENTRONIC S-577 - P-SELECTA
- Balanza de precisión ELECTRONIC BALANCE ER180A-AND
- Granatario SALTER ELECTROSCALE EB300
- Magnetoagitadores A-06 SBS
- Agitador de tubos HEIDOLPH-REAX 2000

Material fungible

- Columna de fase reversa NOVA-PACK C18/ 3.9 mm x 300 mm Diámetro de partícula 4µm, WATERS.
- Filtros para disolventes de 0.45 µm de poro y membrana de HVLP, MILLIPORE.
- Filtros para muestras Millex-HV₄ de tamaño de poro 0.45 µm y membrana HVLP, MILLIPORE.

Reactivos

- Agua de calidad MILLI-Q
- Disolventes orgánicos para CLAE: Metanol y Acetonitrilo (Romil)
- Acetato de sodio (Merck)
- Acido acético glacial (Merck)
- Octanosulfonato sódico (Sigma-Aldrich)
- Acido bórico (Merck)
- Hidróxido potásico (Merck)
- Mercaptoetanol (Merck)
- Eter de polioxietilenlaurílico (BRIJ[®]-35) (Merck)
- o-Ftalaldehído (OPT) (Merck)
- Dihidroclorhidrato de histamina (Merck)
- Tiramina (base libre) (Merck)

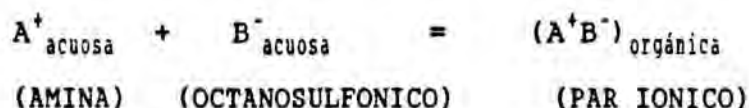
- Hidroclorhidrato de β-feniletiltamina (Sigma-Aldrich)
 - Complejo de sulfato de creatinina-serotonina (Sigma-Aldrich)
 - Hidroclorhidrato de triptamina (Sigma-Aldrich)
 - Dihidroclorhidrato de cadaverina (Sigma-Aldrich)
 - Dihidroclorhidrato de putrescina (Sigma-Aldrich)
 - Sulfato de agmatina (Sigma-Aldrich)
 - Tetrahidroclorhidrato de espermina (Sigma-Aldrich)
 - Trihidroclorhidrato de espermidina (Sigma-Aldrich)
- Soluciones patrón de aminas biógenas. Se han preparado "soluciones madres" de 1000 mg/L en ácido clorhídrico 0.1N de cada una de las aminas biógenas. A partir de estas soluciones se han obtenido por dilución las diferentes soluciones patrón compuestas de trabajo por la mezcla de todas las aminas biógenas, en las siguientes concentraciones expresadas en amina base: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 50 mg/L. Las soluciones patrón se guardaban en frascos de vidrio topacio, en refrigeración y se filtraban por filtro de 0.45 µm.

4.2. FUNDAMENTO Y DESCRIPCION DEL METODO

El método de cromatografía líquida que se propone para la determinación de aminas biógenas en cervezas, se basa en el método de SEILER y KNÖDGEN (1985) para la determinación de estas sustancias en muestras biológicas (tejidos y orina).

Este método incluye la separación de los pares iónicos de las aminas biógenas, formados con ácido octanosulfónico, en una columna de fase reversa y una posterior derivatización post-columna con orto-ftalaldehído-mercaptoetanol. La detección se realiza por lectura de la intensidad de fluorescencia de los derivados amina-OPT formados.

La formación de pares iónicos consiste en añadir un segundo ión al eluyente (p.e. ácido octanosulfónico) que se combina con las aminas protonadas (a un pH ácido) enlazándose fuertemente a ellas para formar un par iónico neutro:



El par iónico se comporta como si fuera una molécula no iónica polar, soluble en disolventes orgánicos. De esta forma el analito se puede separar mediante columnas de fase reversa. Esta técnica es preferible a la cromatografía por intercambio iónico, utilizada clásicamente para la separación de aminas, ya que las columnas C-18 tienen una mayor eficacia, se equilibran más rápidamente y, en general, tienen un comportamiento bastante homogéneo (LINDSAY, 1987).

Todavía no está bien establecido el mecanismo de la separación de los compuestos por cromatografía de par iónico. La teoría más simple asume que los pares iónicos se forman en la fase móvil y se desplazan a través del sistema como especies neutras. La separación ocurre por partición de estos pares iónicos neutros entre la fase móvil y la fase estacionaria (C-18). Sin embargo, este mecanismo no explica totalmente el comportamiento observado experimentalmente; por ello, se cree que en este tipo de cromatografía se dan fenómenos de partición y de intercambio iónico simultáneamente (HANNAH, 1981; LINDSAY, 1987).

El gradiente aplicado en el método propuesto, consiste en un primer periodo isocrático con un eluyente constituido por una solución amortiguadora de acetato sódico a pH 4.5 con un 10% de metanol. Posteriormente, se aumenta la proporción de disolvente apolar (mezcla de metanol y acetonitrilo) hasta alcanzar una proporción del 45%. De esta forma se consigue la separación de diez aminas biógenas (histamina, tiramina, 8-feniletilamina, serotonina, triptamina, cadaverina, putrescina, agmatina, espermina y espermidina) que eluyen en orden de polaridad decreciente.

La reacción de derivatización con el ortoftalaldehído (OPT) se realiza a la salida de la columna, mediante un sistema de bombeo que permite la mezcla de la fase móvil, que proviene de la columna, con el reactivo derivatizante. El sistema de bombeo empleado, un RDM de WATERS, utiliza como sistema propulsor gas helio; de esta forma se eliminan las posibles interferencias de las pulsaciones provocadas por una bomba de pistones convencional, situada a la salida de columna. Estas interferencias, que se traducen en un importante ruido de fondo, suelen ser, además, muy importantes en sistemas de detección por fluorimetría, como es nuestro caso.

La reacción de formación del complejo entre las aminas y el OPT-mercatoeptanol se completa durante su paso por el "coil" de reacción, formado por un tubo de una longitud de dos metros y de diámetro capilar. Este "coil" está conectado a la entrada de la célula de lectura del espectrofluorímetro, en el que se realiza la lectura de la intensidad de fluorescencia del complejo formado, a unas longitudes de onda de excitación y de emisión determinadas, que se ha comprobado corresponden a los máximos de las aminas biógenas analizadas.

La preparación de las muestras de cerveza es sencilla y rápida, ya que sólo consta de una filtración previa por un filtro de 0.45 μm para eliminar en suspensión. Para las maltas y los lúpulos es necesario realizar una extracción previa de las aminas biógenas con ácido perclórico y una posterior filtración. El gradiente de disolventes utilizado permite que los compuestos que pudieran interferir, durante la elución de las aminas, aparezcan en los primeros minutos del cromatograma, totalmente separados de las aminas biógenas.

4.2.1. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

■ Eluyentes

Fase A: Solución tampón A + Metanol (9:1)

Fase B: Solución tampón B + Acetonitrilo + Metanol
(7:2.4:0.6)

Solución tampón A: solución de acetato de sodio 0.1M y de octano sulfonato sódico 10mM ajustada a pH 4.5 con ácido acético.

Solución tampón B: solución de acetato de sodio 0.2M y de octano sulfonato sódico 10mM ajustada a pH 4.5 con ácido acético.

■ Reactivo de derivatización post-columna.

Se disuelven 25 g de ácido bórico y 22 g de hidróxido potásico en 500 mL de agua (pH 10.5-11). Posteriormente se añaden 1.5 mL de solución de Brij-35 al 30% y 1.5 mL de mercaptoetanol. A continuación, se adicionan 0.2 g de OPT disueltos en 3 mL de metanol. Este reactivo se guarda en botellas color topacio en refrigeración y debe ser utilizado en los 2 días siguientes de su preparación.

* Tanto los eluyentes como el reactivo derivatizante han de ser filtrados (0.45 µm) y desgasificados antes de su utilización.

■ Programa de elución

	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
Periodo de elución	0	88	12
	22	88	12
	52	5	95
	57	0	100
	62	0	100
Periodo de retorno y equilibrio	67	88	12
	77	88	12

- El flujo de la fase móvil es de 1 mL por minuto durante todo el programa de elución, mientras que el flujo del reactivo de derivatización es de 0.5 mL por minuto.
- La columna y el "coil" de reacción están a temperatura ambiente.
- El volumen de inyección es de 20 µL.
- La lectura espectrofluorométrica se realiza a las longitudes de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 445 nm.

4.2.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

A. Mosto y cerveza

- . Las cervezas se desgasifican mediante agitación y los mostos se filtran o se centrifugan (a 3000 rpm durante 5 min), con la finalidad de separar restos de levadura y materia precipitada que puedan existir.
- . Las muestras se filtran a través de un filtro de 0.45 μm de tamaño de poro y se guardan en refrigeración hasta el momento del análisis.

B. Malta y lúpulo

- . Se toma un peso de muestra, previamente molida, y se homogeneiza con ácido perclórico 0.4 N durante 15 min en placa agitadora.
- . Se centrifuga durante 10 min a 3000 rpm para separar las dos fases (extracto y residuo).
- . Se filtra y, a continuación, el residuo sólido obtenido se interpone con otro volumen de ácido perclórico y se vuelve a homogeneizar durante 15 min con el objeto de lavar y agotar la muestra.
- . Se centrifuga de nuevo y mediante filtración se separan las dos fases.
- . Los dos extractos perclóricos obtenidos se reúnen y se enrasa a un volumen final, que para el caso de la malta es de 50 mL y para el lúpulo de 25 mL.

* Para la malta se toman 5 g de muestra, y se homogeneiza con dos fracciones de 25 mL de ácido perclórico 0.4N cada vez. Para el lúpulo se toman 2 g de muestra y se homogeneiza con 15, 10 y 10 mL de ácido perclórico sucesivamente.

- . Por último, se filtra aproximadamente 1 mL del extracto perclórico de la malta o del lúpulo a través de un filtro de 0.45 μm y se guarda en refrigeración hasta el momento del análisis.

4.2.3. IDENTIFICACION DE LOS PICOS CROMATOGRAFICOS

La identificación de los picos cromatográficos, correspondientes a cada una de las aminas biógenas analizadas, se ha realizado mediante sus tiempos de retención. Para ello, se han inyectado separadamente soluciones patrón de las diferentes aminas, identificándose los tiempos de retención que corresponden a cada una de ellas. En las figuras 12 y 13 se muestran respectivamente los cromatogramas de dos soluciones patrón que contienen las diez aminas biógenas determinadas a unas concentraciones de 3 mg/L y 5 mg/L (histamina, tiramina, β -feniletilamina, serotonina, triptamina, cadaverina, putrescina, agmatina, espermina y espermidina).

Los tiempos de retención observados para las aminas han sido los que se indican en la tabla 27.

Tabla 27. Valores medios, desviación estándar y coeficiente de variación de los tiempos de retención observados para las diez aminas biógenas determinadas.

Aminas	n	Valor* medio	Desviación estándar	CV(%)
HISTAMINA	15	31.50	0.50	1.60
TIRAMINA	15	17.55	0.25	1.40
β -FENILETIL.	15	45.10	0.20	0.50
SEROTONINA	15	23.55	0.60	2.70
TRIPTAMINA	15	47.95	0.25	0.55
CADAVERINA	15	26.00	0.35	1.35
PUTRESCINA	15	21.80	0.55	2.65
AGMATINA	15	39.90	0.35	0.85
ESPERMINA	15	51.60	0.40	0.80
ESPERMIDINA	15	46.90	0.15	0.35

* en min

Figura 12. Cromatograma de una solución patrón de aminas biógenas de 3 mg/L en HCl 0.1N.
(Velocidad de papel 0.3 cm/min).

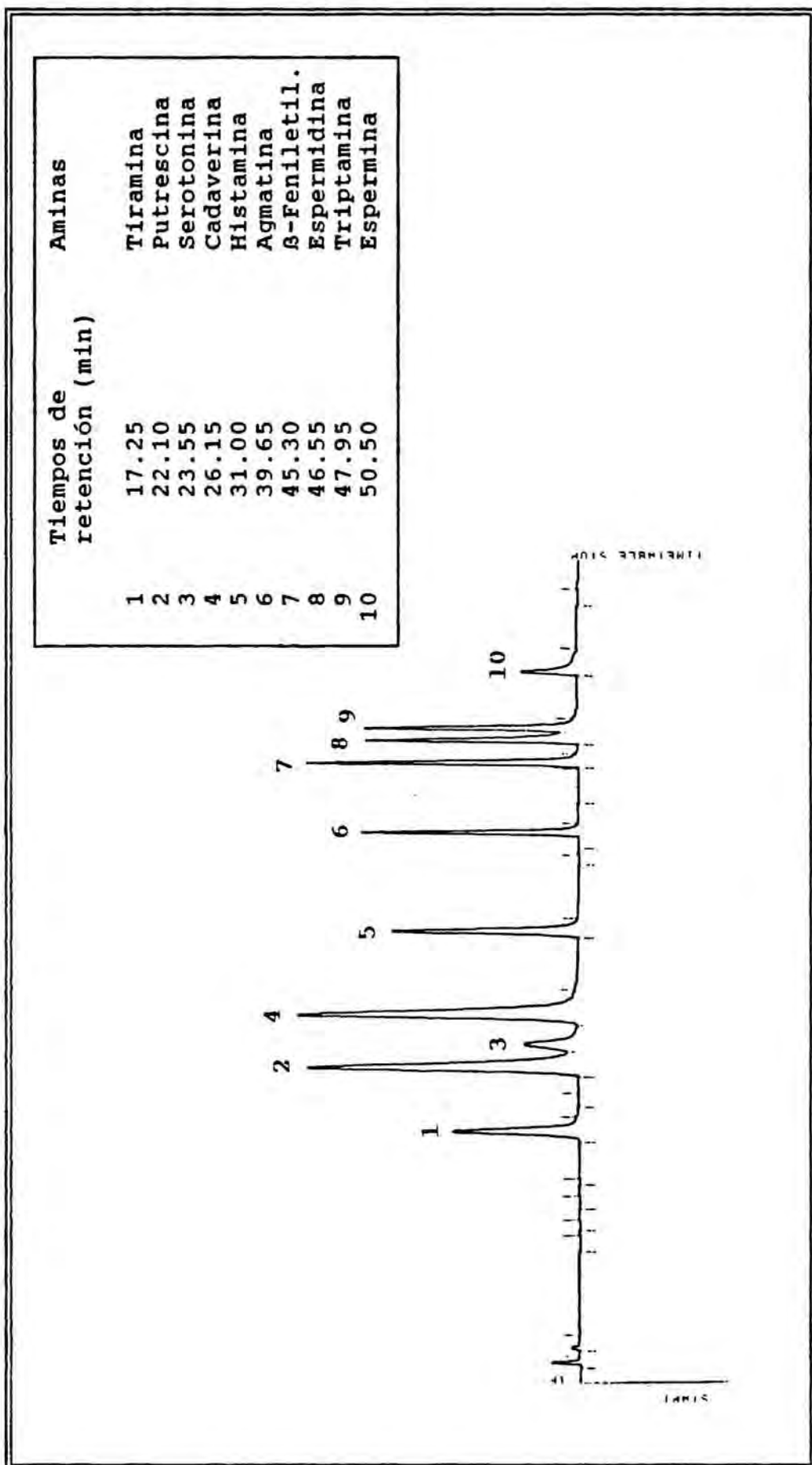
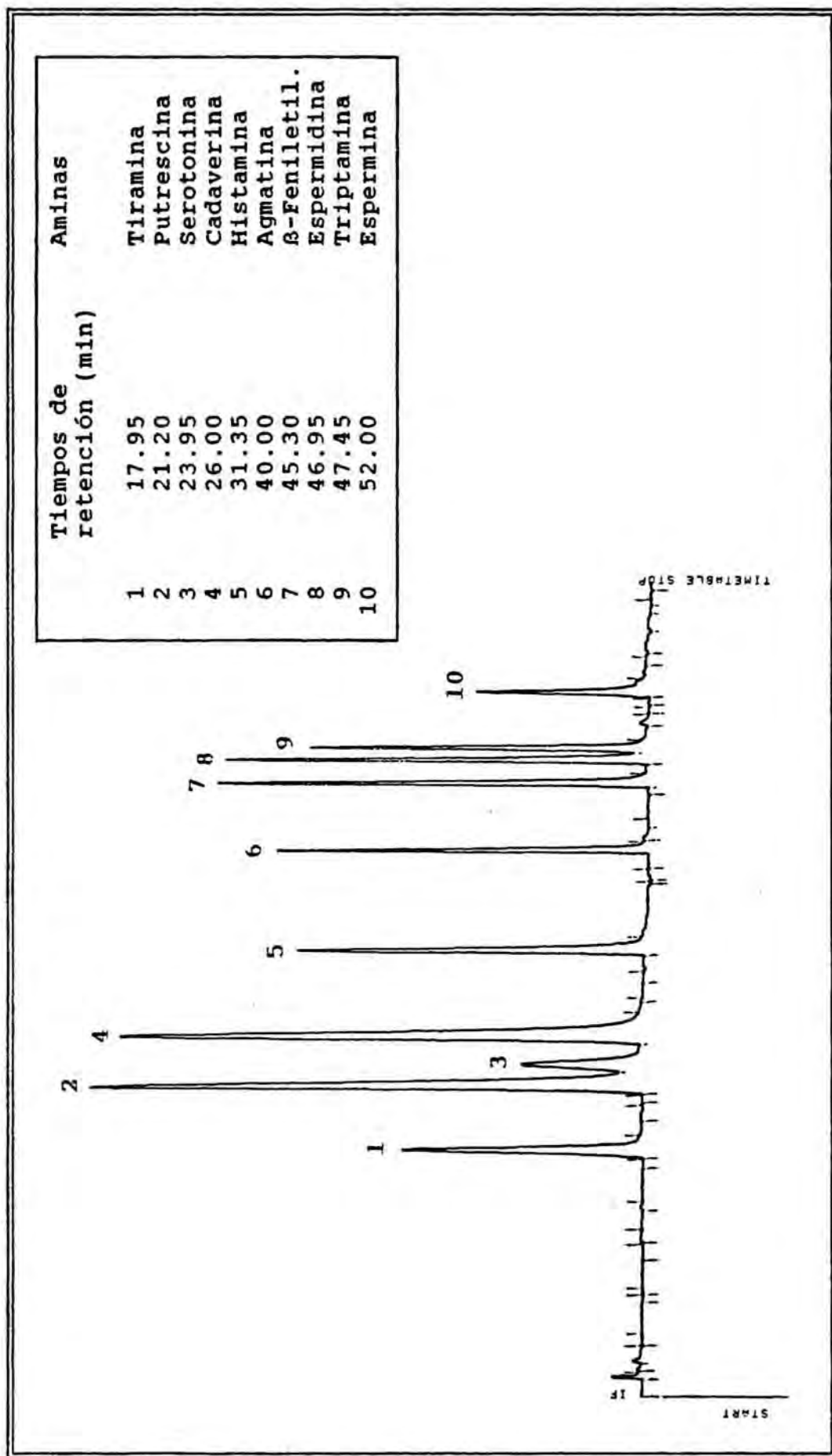


Figura 13. Cromatograma de una solución patrón de aminas biógenas de 5 mg/L en HCl 0.1N.
(Velocidad de papel 0.3 cm/min).



En las figuras 12 y 13 se observa que en los 30 primeros minutos eluyen, por este orden, tiramina, putrescina, serotonina y cadaverina, en un periodo de tiempo en el cual es baja la proporción de disolvente orgánico. La histamina eluye cuando la apolaridad de la fase móvil empieza a aumentar. Posteriormente, hacia los cuarenta minutos, eluyen la agmatina, la β -feniletilamina, la espermidina y la triptamina, en una zona en la que la fase móvil presenta ya unas características más apolares. Por último, la presencia de un 100% del eluyente B en la fase móvil provoca que salga la última amina, la espermina, que por sus características de molécula muy apolar no eluye hasta el minuto 51.60 ± 0.40 .

Se observa que durante los 16 primeros minutos de elución cromatográfica no aparece ninguna amina. El mantenimiento de un cierto grado de polaridad, mediante un régimen isocrático, permite que durante los 10 primeros minutos eluyan sustancias muy polares, como algunos aminoácidos y sustancias de naturaleza fenólica, que de otra manera podrían interferir, obligando a realizar un tratamiento de la muestra mucho más complejo que la simple filtración.

En las figuras 14 a 18 se presentan respectivamente los cromatogramas obtenidos al inyectar una muestra de cerveza clara, una de cerveza negra, un mosto de cerveza, un extracto de malta y uno de lúpulo. Se observa que en todos los casos en la zona que comprende los 10 primeros minutos eluyen un gran número de sustancias, que como ya se ha señalado, podrían interferir en la identificación y cuantificación de las aminas biógenas.

Figura 14. Cromatograma de una muestra de cerveza clara.
(Velocidad de papel 0.3 cm/min).

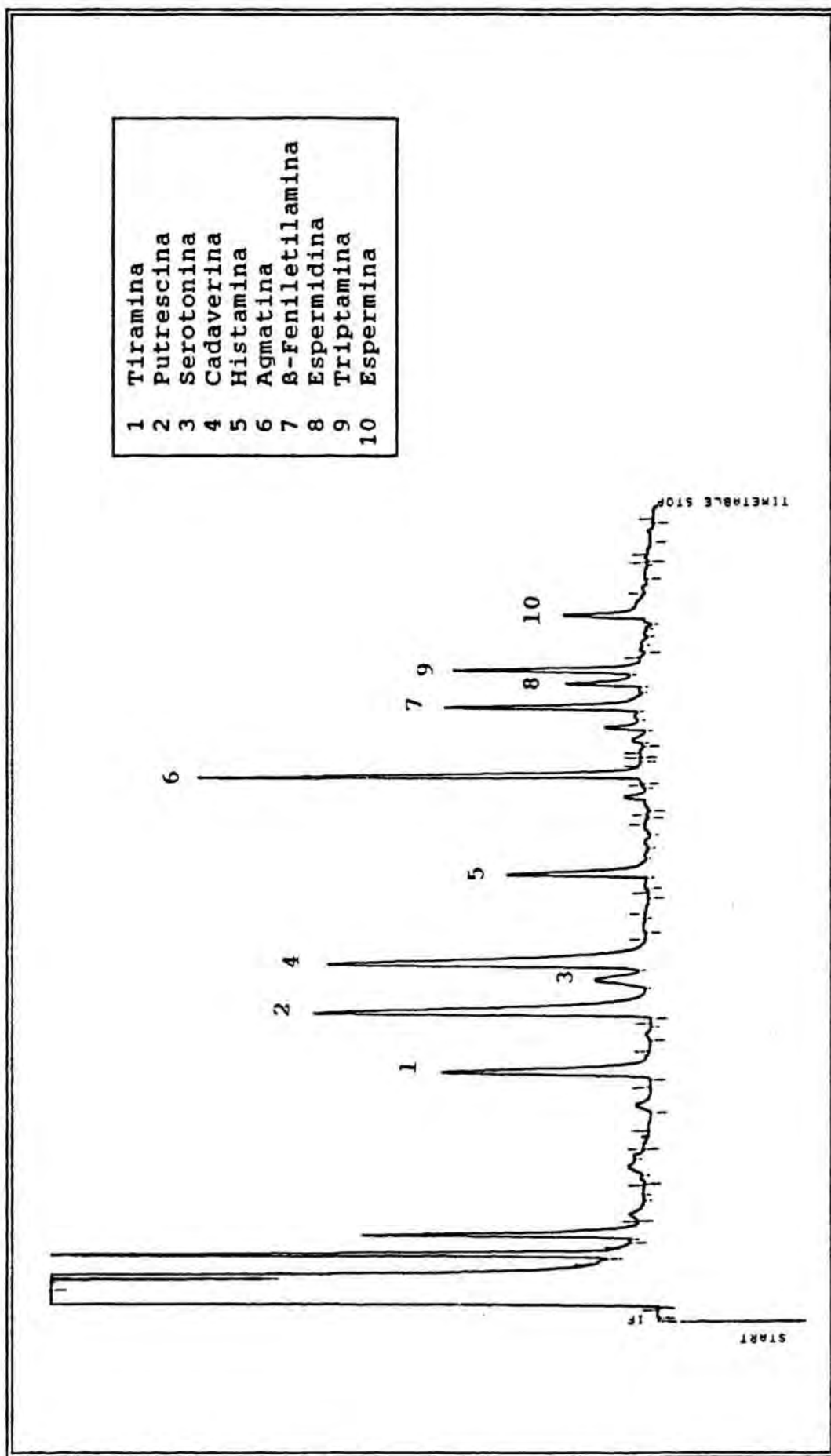


Figura 15. Cromatograma de una muestra de cerveza negra.
(velocidad de papel 0.3 cm/min).

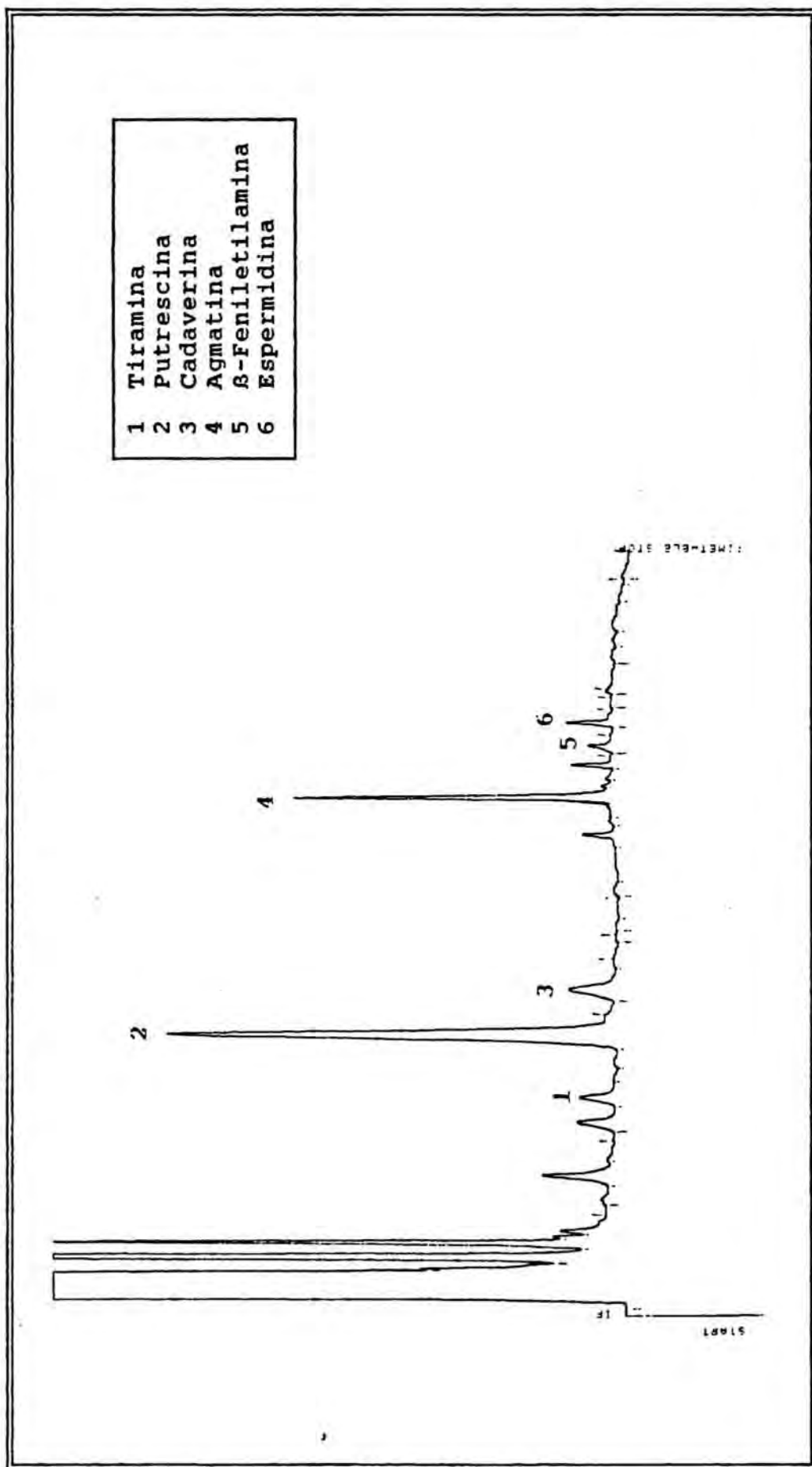


Figura 16. Cromatograma de una muestra de mosto de cerveza.
(Velocidad de papel 0.3 cm/min).

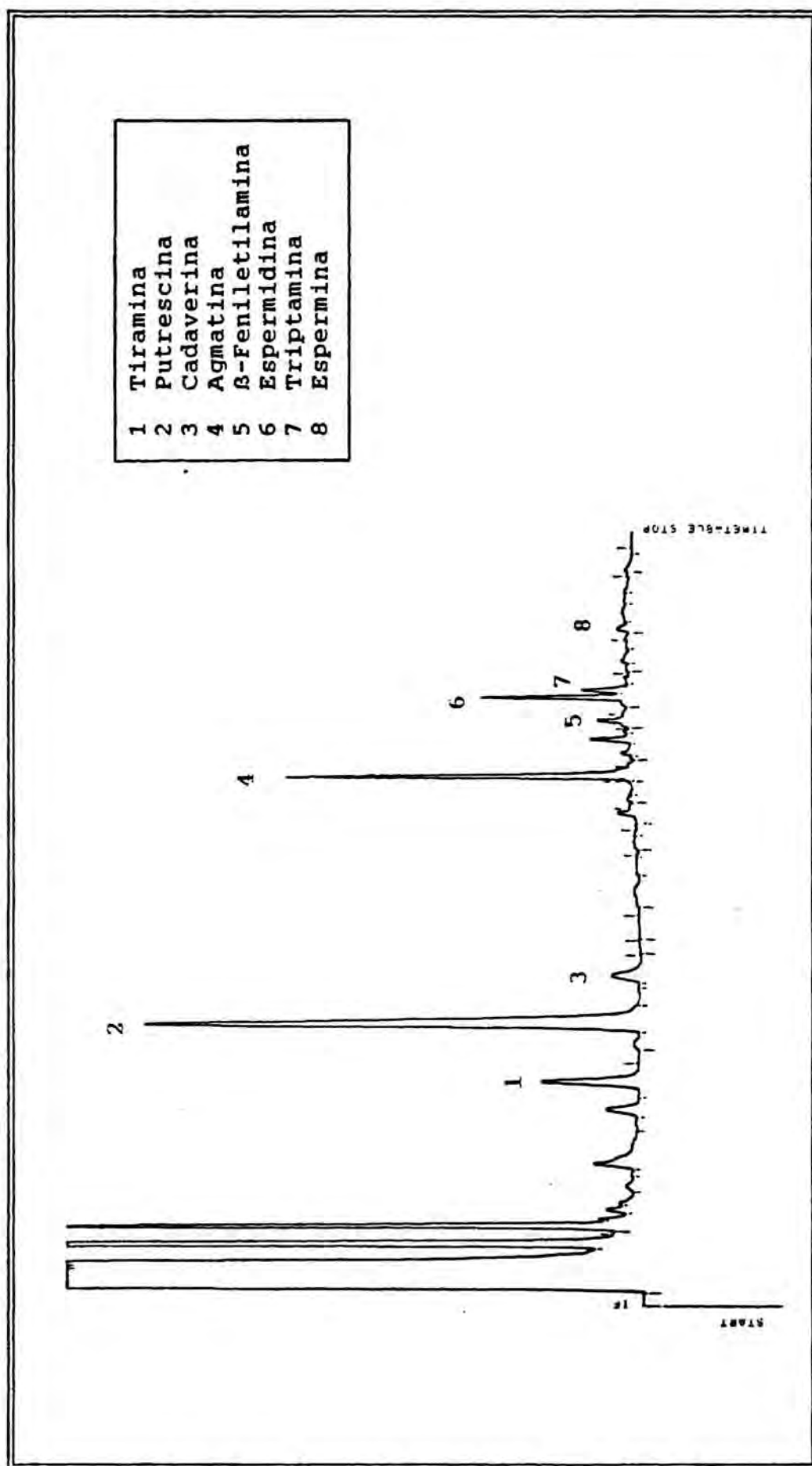


Figura 17. Cromatograma de una muestra de malta.
(Velocidad de papel 0.3 cm/min).

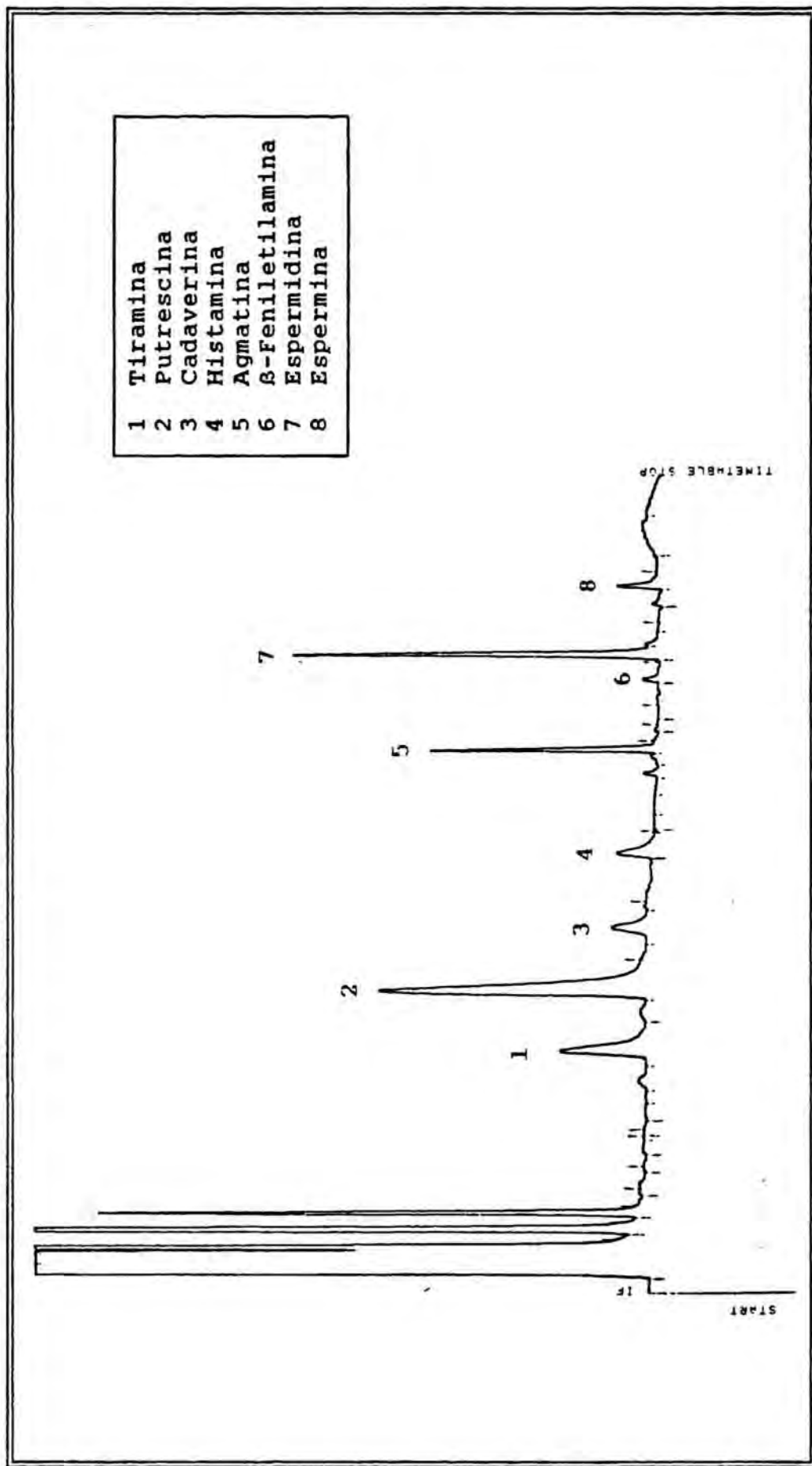
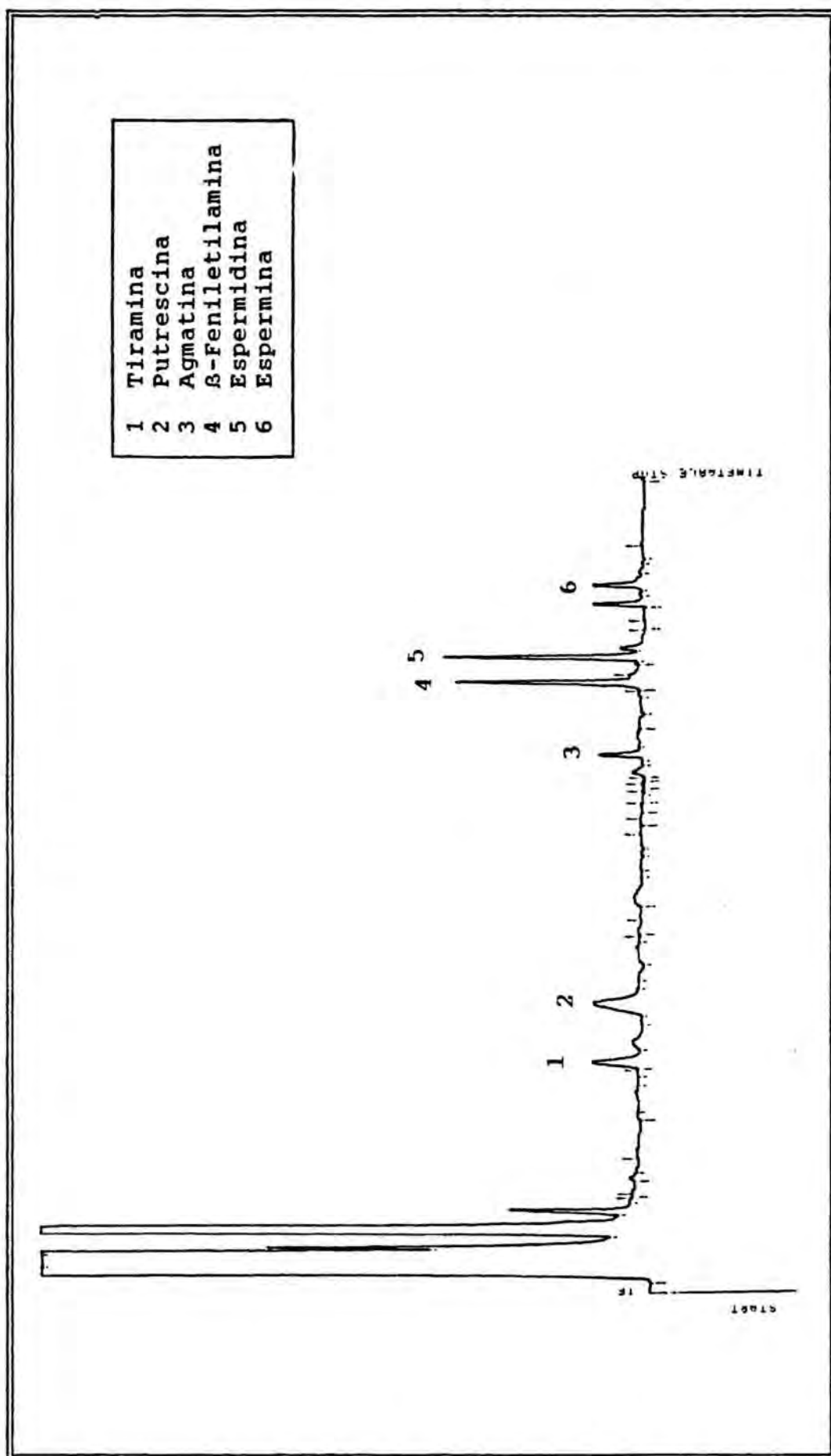


Figura 18. Cromatograma de una muestra de lúpulo.
(Velocidad de papel 0.3 cm/min).



4.2.2. CUANTIFICACION.

El cálculo del contenido de las aminas biógenas de la muestra se ha realizado por extrapolación a partir de una recta de calibrado, preparada con patrones de cada una de las aminas biógenas.

El intervalo de concentraciones de las rectas de calibrado de histamina, β -feniletilamina, serotonina, triptamina, espermina y espermidina fue entre 0 y 5 mg/L, mientras que el de tiramina, cadaverina, putrescina y agmatina fue entre 0 y 10 mg/L, ya que estas últimas aminas se presentan generalmente en las cervezas en concentraciones superiores a las anteriores. Cuando una muestra presentaba contenidos de cualquiera de las aminas mayores al límite del correspondiente intervalo, se procedía a la dilución de la muestra hasta un nivel de concentración dentro de los márgenes de la recta de calibrado. Posteriormente, para el cálculo final se tenía en cuenta la dilución efectuada.

4.3. ESTUDIO DE LA VALIDEZ DEL METODO.

4.3.1. LINEALIDAD

El término de linealidad expresa la proporcionalidad entre cantidad de analito y respuesta y también el intervalo de concentración de analito para el cual el método es satisfactorio. Por tanto, la linealidad se podría definir como la capacidad que tiene un método de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito de la muestra, dentro de un intervalo determinado.

La linealidad del método se ha comprobado mediante el cálculo de rectas de calibrado a partir de soluciones patrón de cada una de las aminas. Para ello, se tomaron soluciones patrón, en ácido clorhídrico 0.1N, de:

Histamina: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L
Tiramina: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 8.0 y 10.0 mg/L
β-Feniletilamina: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L
Serotonina: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L
Triptamina: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L
Cadaverina: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 8.0 y 10.0 mg/L
Putrescina: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 8.0 y 10.0 mg/L
Agmatina: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 8.0 y 10.0 mg/L
Espermina: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L
Espermidina: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L

Se escogieron estos intervalos de concentración en función de las cantidades en que se presentan, en general, cada unas de estas aminas en las cervezas.

El análisis de cada una de estas soluciones patrón se ha realizado, por quintuplicado, según el método analítico descrito en el apartado 4.2. A continuación se construyeron las rectas de calibrado entre las respuestas observadas (áreas) y las concentraciones de cada unas de las aminas biógenas.

Las rectas de calibrado obtenidas con sus coeficientes de correlación (r) se muestran en las figuras 19 a la 28, situando en el eje de abscisas la concentración de cada amina, en mg/L, y en el eje de ordenadas la respuesta expresada en área.

Figura 19. Recta de calibrado para la histamina.

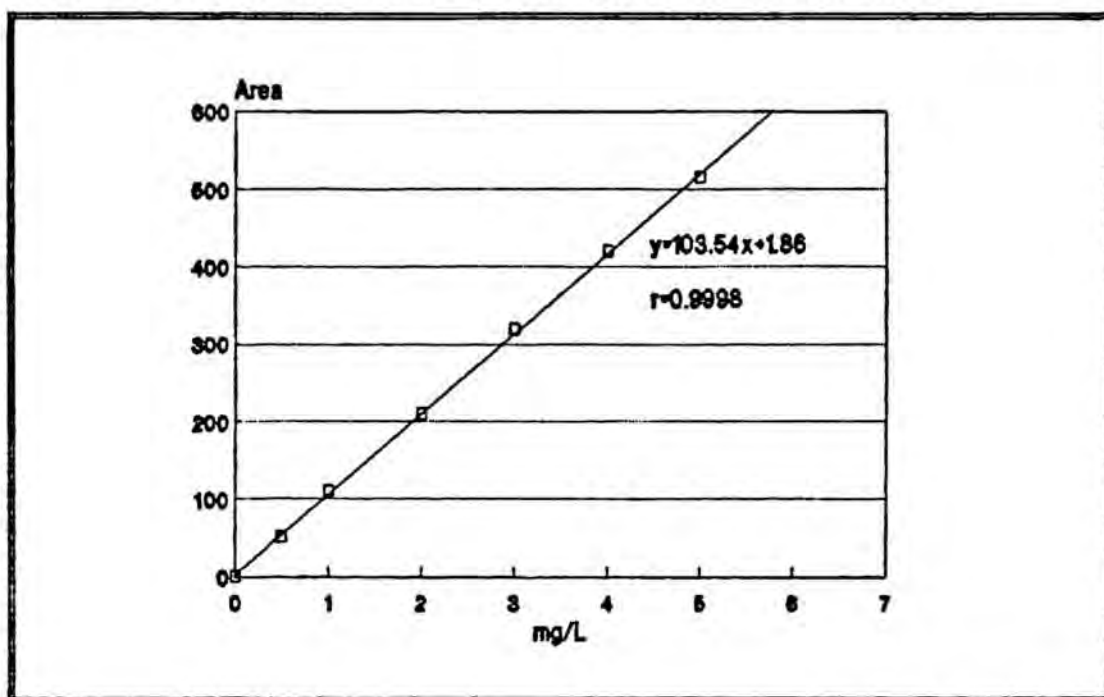


Figura 20. Recta de calibrado para la tiramina.

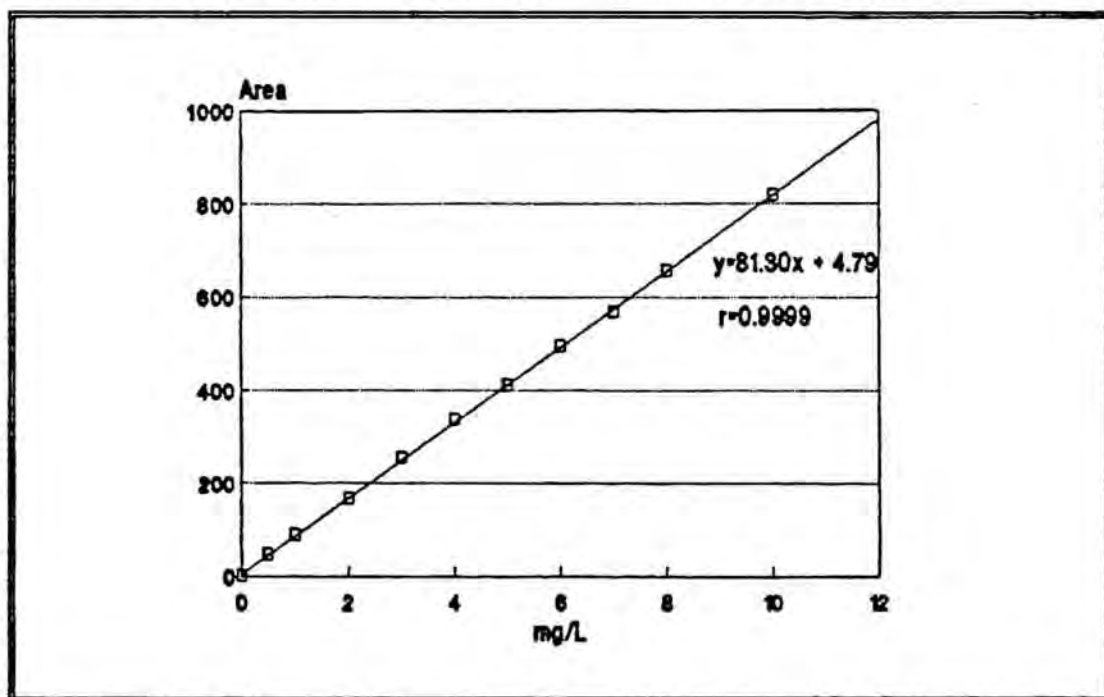


Figura 21. Recta de calibrado para la 8-feniletilamina.

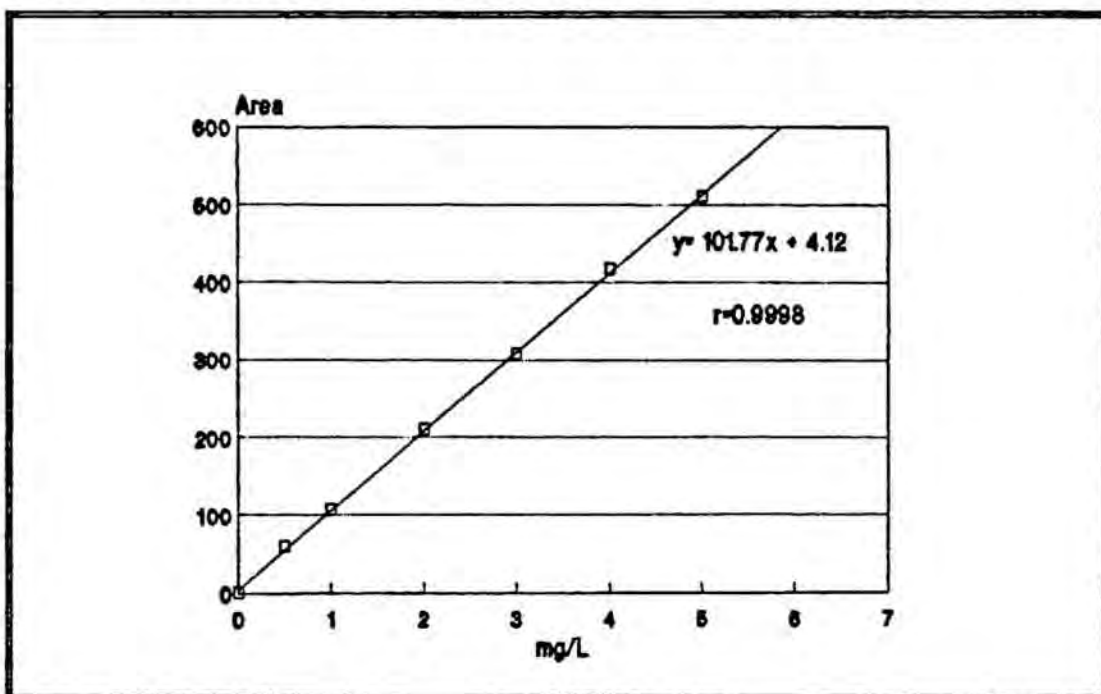


Figura 22. Recta de calibrado para la serotonina.

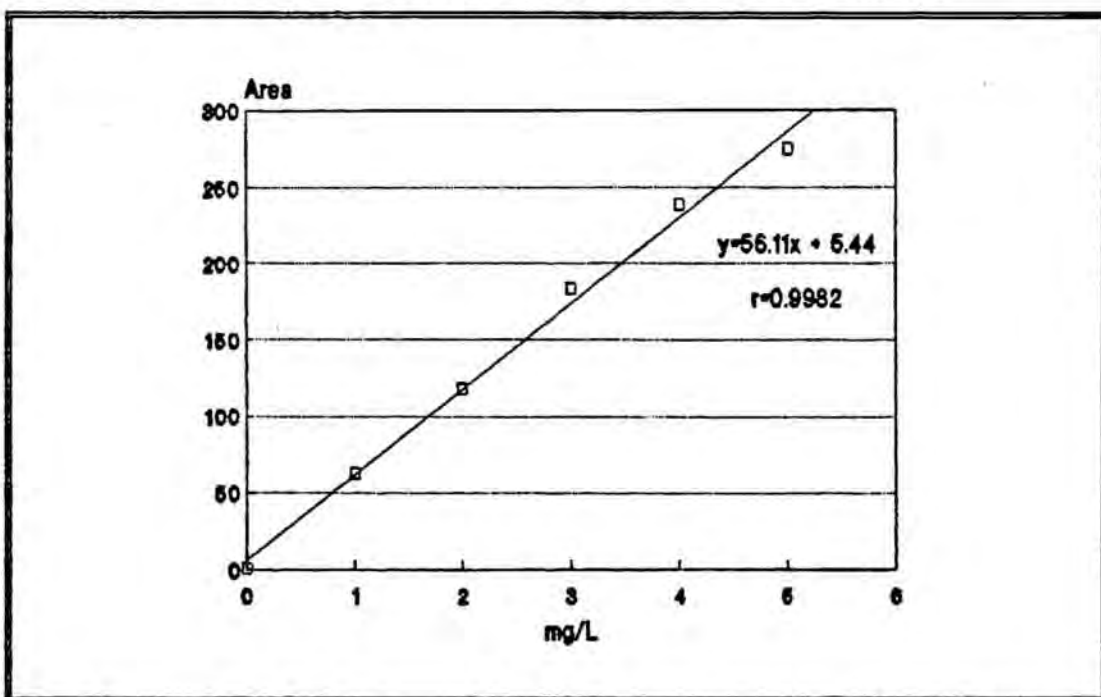


Figura 23. Recta de calibrado para la triptamina.

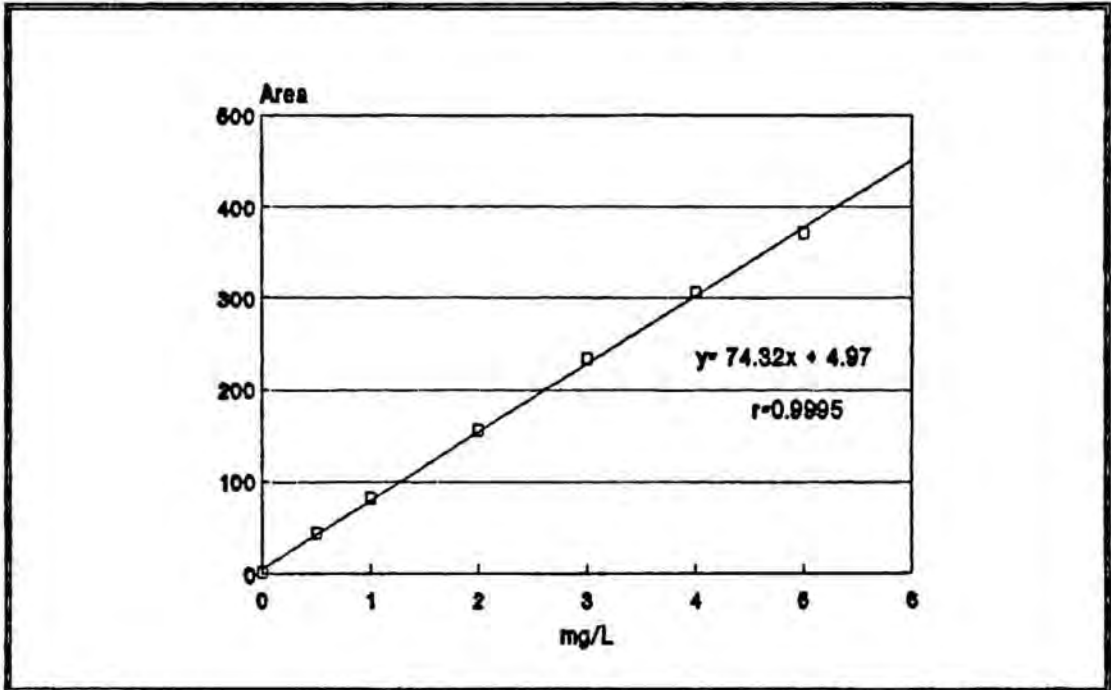


Figura 24. Recta de calibrado para la cadaverina.

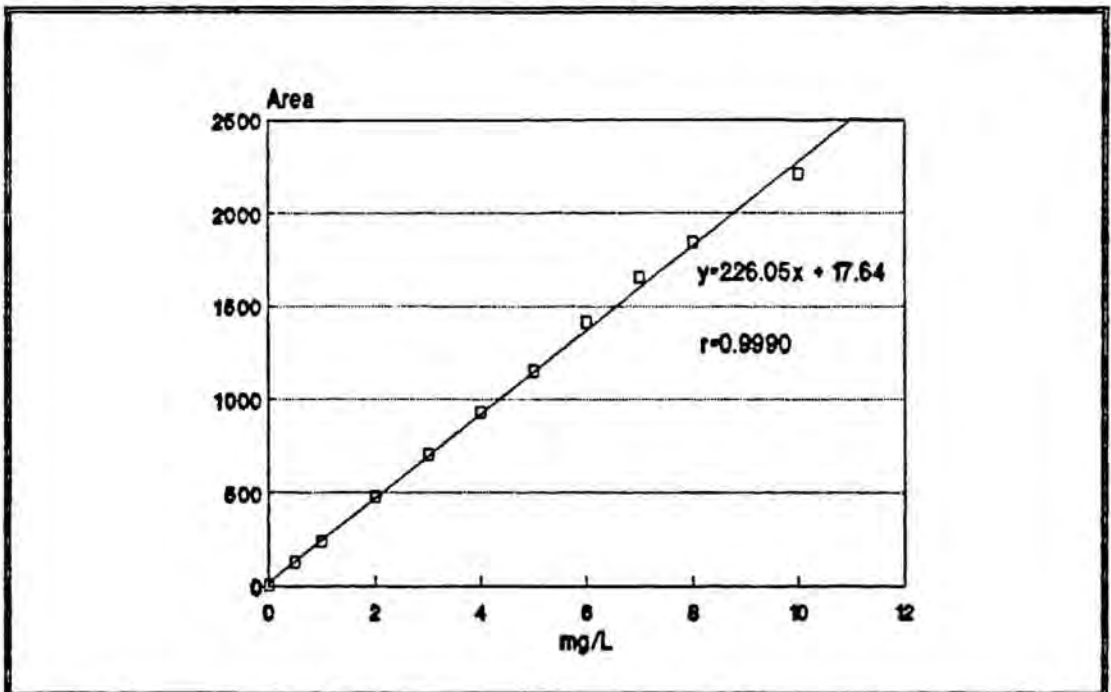


Figura 25. Recta de calibrado para la putrescina.

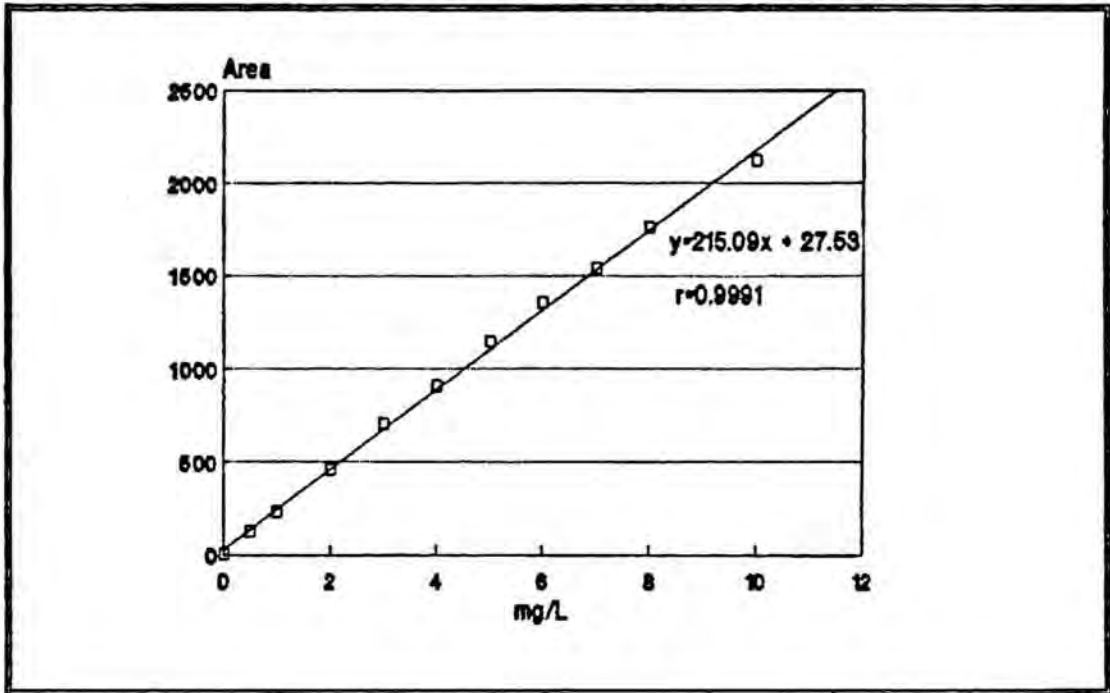


Figura 26. Recta de calibrado para la agmatina.

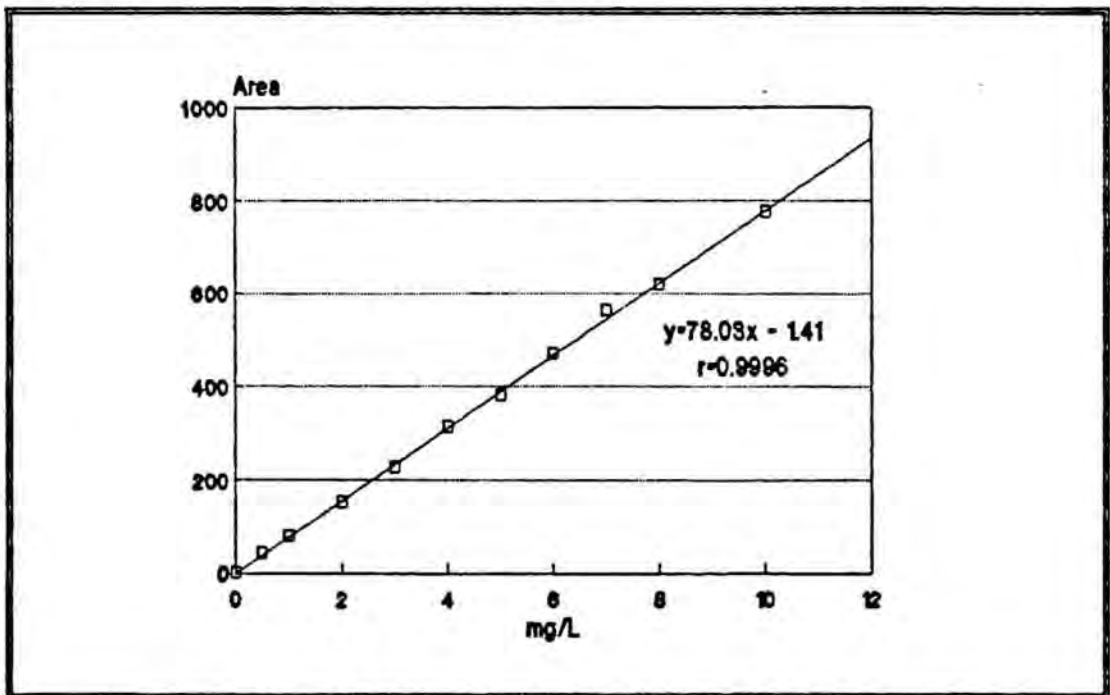


Figura 27. Recta de calibrado para la espermina.

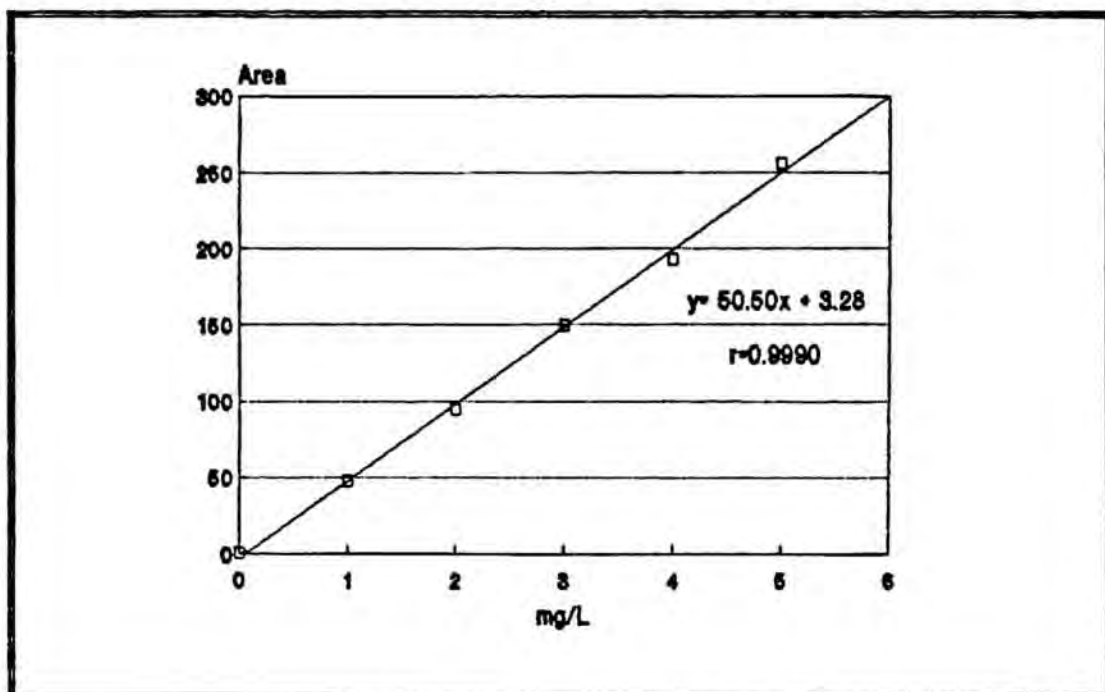
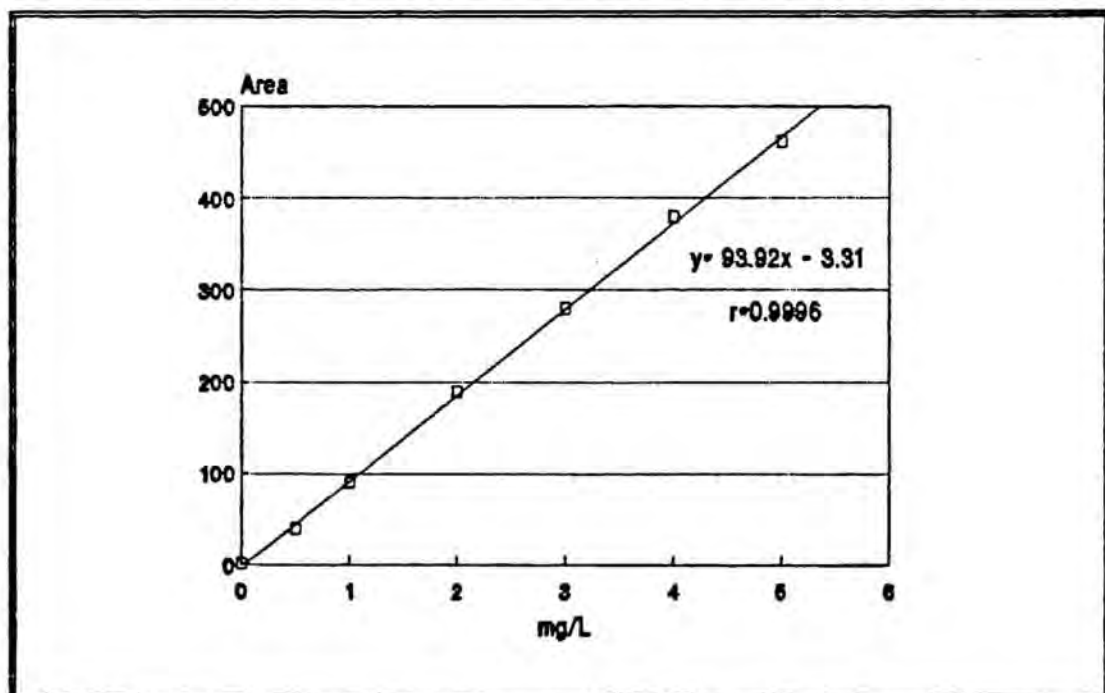


Figura 28. Recta de calibrado para la espermidina.



4.3.1.1. Significación de los coeficientes de correlación y de determinación.

Se ha estudiado la significación estadística de los coeficientes de correlación hallados al calcular las rectas de calibrado para cada una de las aminas biógenas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 28. En esta tabla se incluyen, además de los coeficientes de correlación y de sus grados de significación, los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos. El R^2 indica la proporción de la variancia total de y (respuesta) que es explicada por el modelo lineal de regresión.

Tabla 28. Coeficientes de correlación, grado de significación y coeficientes de determinación de las resctas de calibrado de las aminas biógenas.

Aminas	r	Grados de libertad (n-2)	Grado de significación	R2 %
HISTAMINA	0.9998	5	<0.001	99.96
TIRAMINA	0.9999	9	<0.001	99.98
β -FENILET.	0.9998	5	<0.001	99.96
SEROTONINA	0.9982	4	<0.001	99.64
TRIPTAMINA	0.9995	5	<0.001	99.90
CADAVERINA	0.9990	9	<0.001	99.80
PUTRESCINA	0.9991	9	<0.001	99.82
AGMATINA	0.9996	9	<0.001	99.92
ESPERMINA	0.9990	4	<0.001	99.80
ESPERMIDINA	0.9996	5	<0.001	99.92

Se observa que en todos los casos los valores de r obtenidos suponen una correlación positiva, con una probabilidad superior al 99.9%. Respecto a los R^2 hallados podemos señalar que en todos los casos la variable independiente (concentración) explica, en promedio, el 99.85% de la variancia total de y (respuesta).

4.3.1.2. Test de linealidad

La existencia de una relación lineal entre concentración y respuesta se manifiesta con una recta de regresión verdadera inclinada de pendiente diferente de 0 (DOMENECH-MASSONS, 1989) :

$$y = \alpha + \beta x \quad \beta \neq 0$$

Si el intervalo de confianza de β no incluye el valor de 0 se puede concluir que existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta (CASTRO y col. 1989).

Al calcular la recta de regresión, mediante el método de ajuste de los "mínimos cuadrados", se obtiene una pendiente b de la recta ($y = bx + a$) que es una estimación de la β verdadera.

Para comprobar la linealidad de una recta de calibrado se puede realizar una prueba de significación de la estimación de β , que como se ha señalado es la pendiente (b) de la recta de regresión calculada. Esta prueba se denomina prueba de significación de b (DOMENECH-MASSONS, 1989) y se lleva a cabo mediante un test de Student-Fisher. Así, se compara la t experimental hallada mediante la expresión $t_{exp} = |b|/S_b$, siendo S_b el error estándar de la pendiente b , con el valor de t dado por la ley de Student-Fisher para $n-2$ grados de libertad.

También para comprobar la linealidad se puede comparar la variancia explicada por la regresión lineal con la variancia residual (DOMENECH-MASSONS, 1989). Esta prueba se denomina análisis de la variancia de la regresión, y es la que se utiliza habitualmente.

La F_{exp} se calcula a partir de la expresión:

$$F_{exp} = \frac{\text{Variancia regresión } (S^2 \text{ reg})}{\text{Variancia residual } (S^2 \text{ res})}$$

y se compara con el valor de F dado por la ley de Snedecor para 1 y $n-2$ grados de libertad.

En la tabla 29 se muestran los resultados de estas dos pruebas.

Tabla 29. Tests de linealidad de las rectas de calibrado de las aminas biógenas y respuesta expresada en área.

Amina	GL*	t _{exp}	p**	GL	F _{exp}	p
HISTAMINA	5	107.5	<0.001	1,4	11565.5	<0.001
TIRAMINA	9	219.7	<0.001	1,8	48275.2	<0.001
β -FENILET.	5	127.1	<0.001	1,4	16154.9	<0.001
SEROTONINA	4	26.6	<0.001	1,3	706.7	<0.001
TRIPTAMINA	5	72.9	<0.001	1,4	5326.7	<0.001
CADAVERINA	9	66.7	<0.001	1,8	4715.0	<0.001
PUTRESCINA	9	72.3	<0.001	1,8	5225.7	<0.001
AGMATINA	9	107.5	<0.001	1,8	11547.4	<0.001
ESPERMINA	4	43.5	<0.001	1,3	1893.9	<0.001
ESPERMIDINA	5	80.0	<0.001	1,4	6398.8	<0.001

*GL: grados de libertad; **p: grado de significación.

Los valores de los grados de significación obtenidos, para cada una de las aminos y para ambas pruebas, indican que la probabilidad de que la pendiente (b) sea diferente de 0, y por tanto que exista una relación lineal, es superior en todos los casos al 99.9%. Con ello, se demuestra la linealidad del método propuesto para la determinación de aminos biógenas en cervezas, dentro de los intervalos de concentración consideradas.

4.3.2. INFLUENCIA DE LA FILTRACION DE LAS MUESTRAS.

Las muestras antes de ser inyectadas, deben filtrarse a través de un filtro de 0.45 μm (membrana HVLP Millipore) con el objeto de eliminar partículas en suspensión que podrían acumularse en los filtros de entrada y/o en los rellenos de las columnas.

Con el objeto de determinar si esta filtración influye en el análisis cromatográfico de las aminos biógenas, ya sea por fenómenos de retención o de adsorción, se han realizado 6 determinaciones de una misma cerveza filtrada y 4 determinaciones de la misma muestra sin filtrar. Mediante un test de t de Student se han comparado las medias de los contenidos de aminos biógenas obtenidos en la cerveza filtrada y en la no filtrada, comprobándose que para ninguna amina existen diferencias estadísticamente significativas en función de la filtración. Los resultados se muestran en la tabla 30.

Tabla 30. Contenidos medios (mg/L) y desviación estándar de aminos biógenas en la misma muestra de cerveza filtrada y sin filtrar.

Aminos	Cerveza filtrada (n=6)	Cerveza sin filtrar (n=4)	t_{exp}	Grado de significación
HISTAMINA	1.95 \pm 0.08	2.00 \pm 0.09	0.82	0.05
TIRAMINA	4.33 \pm 0.15	4.50 \pm 0.15	1.62	0.05
β -FENILETIL.	2.08 \pm 0.05	2.21 \pm 0.14	1.77	0.05
SEROTONINA	1.47 \pm 0.19	1.26 \pm 0.10	1.71	0.05
TRIPTAMINA	2.81 \pm 0.07	2.93 \pm 0.16	1.60	0.05
CADAVERINA	3.04 \pm 0.09	3.00 \pm 0.13	0.52	0.05
PUTRESCINA	2.74 \pm 0.19	2.56 \pm 0.13	1.44	0.05
AGMATINA	6.15 \pm 0.14	5.97 \pm 0.15	1.75	0.05
ESPERMINA	1.60 \pm 0.07	1.48 \pm 0.19	1.44	0.05
ESPERMIDINA	0.77 \pm 0.07	0.85 \pm 0.10	1.35	0.05

$$t_{\text{tab}}(8, 0.05) = 2.31$$

Por tanto, la filtración, a la que se someten las cervezas y los extractos perclóricos de malta y de lúpulo, previa al análisis no ejerce influencia alguna sobre los contenidos de las aminos biógenas.

4.3.2. PRECISION (REPETIBILIDAD)

La precisión de un método analítico indica el grado de concordancia (en una zona definida de valores a medir) entre medidas repetidas (ensayos analíticos) sobre una misma muestra y en condiciones constantes y determinadas. Es decir indica la distribución de los valores analíticos alrededor de su media (LINDEN, 1978; CASTRO y col., 1989).

La repetibilidad es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de una serie de análisis realizados generalmente en un corto intervalo de tiempo.

Para estudiar la precisión del método se realizaron 6 determinaciones en 2 muestras diferentes de cervezas y 5 en una tercera muestra. Todas estas cervezas presentaban niveles de aminos biógenas diferentes y en una de ellas no fueron detectadas serotonina, triptamina y espermina.

El análisis de cada una de las muestras se efectuó el mismo día, con los mismos reactivos y aparatos. Los resultados obtenidos para cada amina biógena, así como la media, la desviación estándar, el coeficiente de variación, el intervalo de confianza (95%) individual y el de la media se muestran en las tablas 31 a 40.

Tabla 31. Precisión del método para la determinación de histamina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L		
	Muestra A	Muestra B	Muestra C
1	2.65	3.70	2.05
2	2.75	4.00	1.90
3	2.75	4.00	2.05
4	2.90	3.80	1.85
5	2.70	3.85	1.95
6	2.85	--	1.90
\bar{x}	2.80	3.90	1.95
DE	0.09	0.11	0.08
CV(%)	3.35%	2.95%	4.30%
IC _i (95%)	2.80+0.25	3.90+0.30	1.95+0.20
IC _s (95%)	2.80+0.10	3.90+0.15	1.95+0.09

Tabla 32. Precisión del método para la determinación de tiramina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L		
	Muestra A	Muestra B	Muestra C
1	8.90	0.80	4.60
2	9.40	1.00	4.25
3	9.20	0.85	4.40
4	9.15	0.95	4.25
5	9.00	1.00	4.30
6	9.15	--	4.20
\bar{x}	9.15	0.90	4.35
DE	0.15	0.09	0.15
CV(%)	1.90%	9.85%	3.40%
IC _i (95%)	9.15+0.45	0.90+0.25	4.35+0.40
IC _s (95%)	9.15+0.20	0.90+0.10	4.35+0.15

Tabla 33. Precisión del método para la determinación de 8-feniletilamina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L		
	Muestra A	Muestra B	Muestra C
1	0.55	1.20	2.10
2	0.60	1.10	2.05
3	0.60	1.00	2.00
4	0.65	1.25	2.10
5	0.55	1.15	2.15
6	0.70	--	2.10
\bar{x}	0.60	1.15	2.10
DE	0.05	0.10	0.05
CV(%)	9.60%	8.45%	2.50%
IC _i (95%)	0.60±0.15	1.15±0.30	2.10±0.10
IC _l (95%)	0.60±0.05	1.15±0.10	2.10±0.05

Tabla 34. Precisión del método para la determinación de serotonina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L	
	Muestra B	Muestra C
1	1.10	1.30
2	1.00	1.70
3	1.20	1.40
4	0.95	1.70
5	1.10	1.30
6	--	1.45
\bar{x}	1.10	1.50
DE	0.10	0.10
CV(%)	9.10%	7.35%
IC _i (95%)	1.10±0.30	1.50±0.30
IC _l (95%)	1.10±0.10	1.50±0.10

Tabla 35. Precisión del método para la determinación de triptamina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L	
	Muestra B	Muestra C
1	4.70	2.85
2	4.75	2.70
3	4.20	2.75
4	4.60	2.80
5	4.55	2.85
6	--	2.90
\bar{x}	4.55	2.80
DE	0.20	0.10
CV (%)	4.75%	2.65%
IC _i (95%)	4.55±0.60	2.80±0.20
IC _l (95%)	4.55±0.30	2.80±0.10

Tabla 36. Precisión del método para la determinación de cadaverina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L		
	Muestra A	Muestra B	Muestra C
1	2.50	1.20	3.05
2	2.55	1.25	3.20
3	2.60	1.30	3.00
4	2.60	1.25	2.95
5	2.70	1.40	2.95
6	2.55	--	3.10
\bar{x}	2.60	1.30	3.05
DE	0.07	0.10	0.10
CV (%)	2.65%	5.90%	3.20%
IC _i (95%)	2.60±0.20	1.30±0.20	3.05±0.25
IC _l (95%)	2.60±0.10	1.30±0.10	3.05±0.10

Tabla 37. Precisión del método para la determinación de putrescina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L		
	Muestra A	Muestra B	Muestra C
1	6.40	1.25	3.10
2	6.65	1.50	2.80
3	6.60	1.50	2.70
4	6.50	1.35	2.60
5	6.35	1.45	2.60
6	6.50	--	2.65
\bar{x}	6.50	1.40	2.75
DE	0.10	0.10	0.20
CV (%)	1.75%	7.70%	6.95%
IC _i (95%)	6.50+0.30	1.40+0.30	2.75+0.50
IC _l (95%)	6.50-0.10	1.40-0.15	2.75-0.20

Tabla 38. Precisión del método para la determinación de agmatina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L		
	Muestra A	Muestra B	Muestra C
1	3.00	13.85	6.40
2	2.40	14.00	6.10
3	2.80	14.55	6.15
4	2.80	14.25	6.20
5	2.70	14.50	6.00
6	2.60	--	6.05
\bar{x}	2.70	14.25	6.15
DE	0.20	0.30	0.15
CV (%)	7.50%	2.15%	2.30%
IC _i (95%)	2.70+0.50	14.25+0.85	6.15+0.35
IC _l (95%)	2.70-0.20	14.25-0.40	6.15-0.15

Tabla 39. Precisión del método para la determinación de espermina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L	
	Muestra B	Muestra C
1	2.25	1.50
2	2.10	1.55
3	2.10	1.65
4	2.15	1.60
5	2.30	1.60
6	--	1.70
\bar{x}	2.20	1.60
DE	0.10	0.10
CV(%)	4.15%	4.45%
IC _i (95%)	2.20+0.25	1.60+0.20
IC _l (95%)	2.20+0.10	1.60+0.10

Tabla 40. Precisión del método para la determinación de espermidina.

Determinación (número)	Contenido en mg/L		
	Muestra A	Muestra B	Muestra C
1	0.75	2.95	0.80
2	0.80	3.10	0.75
3	0.65	3.15	0.65
4	0.60	3.00	0.85
5	0.70	3.10	0.80
6	0.65	--	0.75
\bar{x}	0.70	3.10	0.80
DE	0.07	0.10	0.07
CV(%)	10.65%	2.70%	8.90%
IC _i (95%)	0.70+0.20	3.10+0.25	0.80+0.20
IC _l (95%)	0.70+0.10	3.10+0.10	0.80+0.10

Según HORWITZ (1982) la precisión de un método en un ensayo efectuado interlaboratorio puede considerarse aceptable si el coeficiente de variación (CV) obtenido es inferior al hallado por la siguiente fórmula:

$$CV = 2 (1 - 0.5 \log C)$$

siendo C la concentración del analito en g/mL.

Asimismo HORWITZ (1982) señala que la precisión, expresada como CV, en un ensayo intralaboratorio, como es nuestro caso, puede considerarse aceptable si el CV hallado es inferior o se encuentra en el intervalo de 1/2 y 2/3 del CV obtenido al aplicar la anterior fórmula.

Se ha calculado el CV, tanto inter como intralaboratorio, para cada una de las concentraciones de las aminas biógenas halladas en las tres cervezas analizadas en base a la fórmula de Horwitz, obteniéndose las cifras que se muestran en la tabla 41.

Tabla 41. Coeficientes de variación (%) obtenidos según la fórmula de HORWITZ (1982).

Aminas	Nivel (mg/L)	CV (%)	CV (%) INTER*	CV (%) INTRA**
HISTAMINA	2.80	3.35	13.75	6.90 - 9.20
	3.90	2.95	13.05	6.55 - 8.70
	1.95	4.30	14.50	7.25 - 9.65
TIRAMINA	9.15	1.90	11.50	5.75 - 7.65
	0.90	9.85	16.20	8.10 - 10.80
	4.35	3.40	12.85	6.45 - 8.60
β-FENILETIL.	0.60	9.60	18.70	9.35 - 12.50
	1.15	8.45	15.60	7.80 - 10.40
	2.10	2.50	14.35	7.20 - 9.60
SEROTONINA	1.10	9.10	15.85	7.95 - 10.60
	1.50	7.35	15.10	7.55 - 10.05
TRIPTAMINA	4.55	4.75	12.75	6.40 - 8.50
	2.80	2.65	13.70	6.85 - 9.15
CADAVERINA	2.60	2.65	13.90	6.95 - 9.30
	1.30	5.90	15.45	7.75 - 10.30
	3.05	3.20	13.55	6.80 - 9.05
PUTRESCINA	6.50	1.75	12.10	6.05 - 8.05
	1.40	7.70	15.20	7.60 - 10.15
	2.80	6.95	13.75	6.90 - 9.20
AGMATINA	2.70	7.50	13.80	6.90 - 9.20
	14.25	2.15	10.75	5.40 - 7.20
	6.15	2.30	12.20	6.10 - 8.15
ESPERMINA	2.20	4.15	14.20	7.10 - 9.50
	1.60	4.45	14.90	7.45 - 9.95
ESPERMIDINA	0.70	10.65	16.90	8.45 - 11.30
	3.05	2.70	13.55	6.80 - 8.15
	0.80	8.90	16.65	8.35 - 11.10

*Interlaboratorio; ** Intralaboratorio

Se puede comprobar que, para todas las aminas biógenas y para todas las concentraciones estudiadas, los valores de CV hallados experimentalmente se encuentran dentro de los límites que establece la fórmula de Horwitz para estudios intralaboratorios y, por tanto, podemos considerar el método aceptable en función de su precisión.

4.3.4. EXACTITUD (RECUPERACION)

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero.

La exactitud del método cromatográfico propuesto se ha calculado tras adicionar, a alícuotas de una muestra de cerveza, 1 mL de solución patrón de una mezcla de las diez aminas biógenas en unas concentraciones de 2 y 6 mg/L. Se han realizado 3 determinaciones analíticas para cada uno de los niveles de adición. Los resultados se muestran en la tabla 42.

Tabla 42. Contenidos de aminas (mg/L) en cerveza y en la misma muestra adicionada de patrones de las aminas.

Aminas	Cerveza	Cervezas adicionadas					
		Niveles de adición 2µg			6µg		
HISTAMINA	1.95	4.00,	3.85,	3.95	8.30,	8.15,	7.75
TIRAMINA	4.35	6.30,	6.15,	6.20	9.90,	10.20,	10.65
β-FENILET.	2.10	3.90,	4.20,	4.00	8.15,	7.70,	8.00
SEROTONINA	1.50	3.70,	3.40,	3.65	7.30,	7.80,	7.50
TRIPTAMINA	2.80	4.30,	4.90,	4.30	8.85,	8.35,	8.65
CADAVERINA	3.05	5.20,	5.10,	4.95	8.60,	9.30,	9.10
PUTRESCINA	2.75	4.70,	4.80,	4.70	8.40,	8.90,	8.85
AGMATINA	6.15	7.80,	8.05,	8.20	12.40,	11.70,	12.10
ESPERMINA	1.60	3.30,	3.75,	3.35	7.50,	7.30,	7.90
ESPERMIDINA	0.80	2.50,	2.90,	2.75	6.50,	6.85,	6.90

Para conocer si la exactitud era independiente de los niveles de concentración de las aminas adicionadas, se ha realizado una prueba de homogeneidad de variancias de Cochran, planteando como hipótesis nula (H₀) que las variancias observadas en los dos niveles de adición para cada amina son homogéneas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 43.

Tabla 43. Contenidos medios (mg/L) y desviación estándar hallados en función del nivel de amina adicionado y resultados de la prueba de homogeneidad de variancias de Cochran.

Aminas	GL*	Niveles de adición		G _{exp}	p**
		2 ug	6 ug		
HISTAMINA	2,2	3.93±0.08	8.07±0.28	0.9330	NS***
TIRAMINA	2,2	6.38±0.36	10.30±0.38	0.5213	NS
B-FENILET.	2,2	4.03±0.15	7.95±0.23	0.6923	NS
SEROTONINA	2,2	3.58±0.16	7.53±0.25	0.7102	NS
TRIPTAMINA	2,2	4.50±0.35	8.61±0.25	0.6545	NS
CADAVERINA	2,2	5.08±0.13	9.00±0.36	0.8914	NS
PUTRESCINA	2,2	4.73±0.05	8.71±0.27	0.9578	NS
AGMATINA	2,2	8.02±0.20	12.07±0.35	0.7213	NS
ESPERMINA	2,2	3.47±0.25	7.57±0.30	0.6054	NS
ESPERMIDINA	2,2	2.72±0.20	6.75±0.47	0.8422	NS

*GL: grados de libertad; **p : grado de significación;
 ***NS: no significativo.

Para todas las aminas biógenas la G experimental hallada fue inferior a la G de las tablas de Cochran para 2 grupos y 2 grados de libertad y un nivel de significación de 0.05 ($G_{tablas(2,2,0.05)} = 0.9750$). Ello significa que las variancias de las medias de los dos niveles de adición utilizados son equivalentes, es decir, que la exactitud no depende de la concentración de aminas presentes en la muestra.

Finalmente y para calcular si la exactitud del método, expresada como porcentaje de recuperación, es aceptable, se han comparado las medias de las recuperaciones obtenidas en los dos niveles de adición de cada amina con el valor 100 teórico de recuperación mediante un test de t de Student (Tablas 44). Se han considerado, para cada amina biógena, conjuntamente las recuperaciones obtenidas para cada nivel de adición, ya que se ha comprobado que la concentración del analito no influye en la exactitud de este método.

Tabla 44. Exactitud (% recuperación) del método para la determinación de aminas biógenas en cervezas.

Determinación (número)	HISN	TIRN	FENIL	SERN	TRIPN
1	100.0	108.8	95.1	106.0	90.0
2	101.3	98.4	102.4	98.0	102.1
3	97.5	99.2	97.6	105.2	90.0
4	104.4	97.0	100.6	98.0	100.6
5	97.5	99.5	95.0	104.5	95.0
6	97.5	104.0	98.8	100.4	98.3
\bar{x}	99.6	101.1	98.3	101.9	97.65
DE	2.63	4.42	2.94	3.56	3.13
CV (%)	2.64	4.37	2.96	3.50	3.20
texp	0.39	0.64	1.38	1.30	1.83
ttab (5,0.001) = 6.87					
p*	NS**	NS	NS	NS	NS
.....					
.....					
Determinación (número)	CADN	PUTN	AGMN	ESPM	ESPD
1	103.1	99.0	95.7	92.0	90.0
2	101.2	101.0	98.8	104.2	103.5
3	98.2	99.0	100.6	93.1	98.2
4	95.1	96.0	102.0	99.0	95.6
5	103.0	101.7	96.3	96.0	100.7
6	100.7	100.1	99.6	103.9	101.5
\bar{x}	100.2	99.7	99.0	98.0	98.3
DE	3.06	2.16	2.43	5.25	4.99
CV (%)	3.05	2.17	2.46	5.36	5.08
texp	0.16	0.37	1.02	0.93	0.83
ttab (5,0.001) = 6.87					
p*	NS**	NS	NS	NS	NS

*p : grado de significación; **NS: no significativo

No existe, para ninguna de las aminas biógenas, diferencia significativa entre la recuperación media hallada y el valor teórico de 100%, confirmando la buena exactitud del método para la determinación de aminas biógenas en cervezas.

Así, en definitiva, podemos concluir que la recuperación media del método de determinación de aminas biógenas por CLAE, aplicado a cervezas, es para cada una de las aminas:

HISTAMINA	99.60%
TIRAMINA	101.10%
B-FENILETILAMINA	98.30%
SEROTONINA	101.90%
TRIPTAMINA	96.00%
CADAVERINA	100.20%
PUTRESCINA	99.70%
AGMATINA	99.00%
ESPERMINA	98.00%
ESPERMIDINA	98.30%

*Con una recuperación media total de 99.20 ± 1.68 y un coeficiente de variación de 1.70%.

Por último y para completar este estudio de exactitud del método analítico propuesto, se han estudiado las recuperaciones obtenidas al adicionar cantidades conocidas de patrón de aminas biógenas a muestras de malta y de lúpulo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 45 para las maltas y en la 46 para el lúpulo.

Tabla 45. Recuperaciones (media, desviación estándar y coeficiente de variación) obtenidas en la determinación de aminas biógenas en maltas.

Aminas	Recuperaciones (%)	$\bar{X} \pm DE$ CV (%)
HISTAMINA	85.20, 86.40, 86.60, 88.20 91.60, 87.45, 90.10, 86.90	87.80 \pm 2.10 2.40%
TIRAMINA	90.30, 82.65, 82.50, 85.00 89.65, 87.75, 88.90, 86.70	86.70 \pm 3.04 3.50%
β -FENILET.	82.10, 85.40, 87.90, 87.40 91.05, 94.45, 86.15, 88.25	87.85 \pm 3.70 4.22%
SEROTONINA	83.55, 82.60, 82.20, 81.90 80.90, 83.10, 79.90, 84.10	82.30 \pm 1.38 1.68%
TRIPTAMINA	89.50, 85.60, 89.40, 84.40 89.80, 90.20, 91.30, 92.45	89.10 \pm 2.73 3.07%
CADAVERINA	90.40, 86.20, 87.60, 88.40 82.00, 88.25, 86.60, 87.95	87.20 \pm 2.45 2.81%
PUTRESCINA	87.75, 92.90, 92.80, 86.35 90.85, 88.80, 87.15, 86.65	87.20 \pm 2.45 3.01%
AGMATINA	85.15, 89.10, 90.25, 89.00 85.90, 91.20, 90.10, 87.65	88.55 \pm 2.14 2.42%
ESPERMINA	83.10, 87.60, 87.20, 84.85 83.40, 85.80, 84.90, 88.10	85.60 \pm 1.89 2.21%
ESPERMIDINA	91.10, 83.25, 88.95, 92.10 87.90, 90.75, 91.20, 85.00	88.80 \pm 3.20 3.61%

Tabla 46. Recuperaciones (media, desviación estándar y coeficiente de variación) obtenidas en la determinación de aminas biógenas en lúpulos.

Aminas	Recuperaciones (%)	$\bar{x} \pm DE$ CV (%)
HISTAMINA	90.25, 91.25, 91.10 88.35, 95.50	91.30 \pm 2.62 2.87%
TIRAMINA	85.80, 85.75, 86.30 91.05, 87.25	87.25 \pm 2.22 2.54%
β -FENILETIL.	83.60, 86.30, 88.40 95.85, 86.10	88.05 \pm 4.68 5.32%
SEROTONINA	84.90, 80.50, 81.20 79.40, 78.90	81.00 \pm 2.37 2.93%
TRIPTAMINA	90.90, 90.80, 85.65 88.55, 85.75	88.55 \pm 2.35 2.65%
CADAVERINA	89.75, 92.60, 91.75 87.50, 90.40	90.40 \pm 1.97 2.18%
PUTRESCINA	91.45, 93.25, 90.90 91.55, 91.80	91.80 \pm 0.88 1.00%
AGMATINA	89.50, 86.00, 87.60 88.30, 90.00	88.30 \pm 1.59 1.80%
ESPERMINA	87.60, 80.95, 83.00 81.85, 80.85	82.85 \pm 2.79 3.37%
ESPERMIDINA	89.10, 91.75, 86.50 92.10, 87.35	89.35 \pm 2.52 2.83%

4.3.5. SENSIBILIDAD. (LIMITES DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION).

El límite de detección (LD) de un método analítico, según la IUPAC (LONG y WINEFORDNER, 1983), es la menor concentración o cantidad de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado. Existen varios criterios para el cálculo del límite de detección (KAISER, 1970; KATEMAN y PIJPERS, 1981; LONG y WINEFORDNER, 1983; BONATE, 1990).

Según el criterio de KAISER (1970) y de LONG y WINEFORDNER (1983) para el cálculo del límite de detección se puede aplicar la fórmula siguiente:

$$LD = \frac{K \times S_{bl}}{b}$$

siendo S_{bl} la desviación estándar de la respuesta de n blancos, b la pendiente de la recta de calibrado y k una constante que recomiendan que como mínimo sea igual a 3.

Cuando no existe corrección de la lectura frente al blanco, como es el caso de los procedimientos cromatográficos, se aplica la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{\bar{y}_{bl} + K \times S_{bl}}{b}$$

en la que \bar{y}_{bl} es la media de la respuesta de n blancos.

El límite de cuantificación o de determinación (LC) es, según la USP XXIII (CASTRO y col., 1989), la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud en las condiciones experimentales establecidas.

Para su cálculo se aplica la fórmula del LD, siendo el valor de k recomendado en este caso de 10:

$$LC = \frac{\bar{y}_{bl} + 10 \times S_{bl}}{b}$$

Para la determinación de estos dos parámetros fue necesario un "blanco", es decir una muestra que tuviera todos los componentes de la cerveza pero sin aminos biógenas. Para ello se tomó una cerveza, se alcalinizó hasta un pH de 14 y se mantuvo en estas condiciones durante tres días. Las aminos biógenas son sustancias muy inestables a pH básico, degradándose a otros compuestos. Se comprobó que al tercer día de mantener esta muestra de cerveza a pH básico no se detectaba ninguna de las aminos biógenas que inicialmente se encontraban en la muestra. De esta forma se pudo disponer de un "blanco" que presentaba los componentes de la cerveza pero no las aminos biógenas. Antes de ser inyectada, la muestra se acidificaba a un pH de alrededor de 3.5-4.0, para igualar el de la cerveza original. En la figura 29 se muestra un cromatograma de esta la misma cerveza antes y después del tratamiento alcalino.

El "blanco" se analizó diez veces según el método descrito. Se realizó la lectura en unidades de IRF (intensidad relativa de fluorescencia) a los tiempos de retención que correspondían a cada una de las aminos. Así, se obtuvieron los siguientes valores medios de intensidad relativa de fluorescencia (IRF) a sus tiempos de retención correspondientes:

	Lectura (IRF)
Histamina	6.42 ± 0.20
Tiramina	6.44 ± 0.16
β-Feniletilamina	6.30 ± 0.30
Serotonina	6.45 ± 0.21
Triptamina	6.34 ± 0.18
Cadaverina	6.45 ± 0.23
Putrescina	6.45 ± 0.22
Agmatina	6.34 ± 0.19
Espermina	6.32 ± 0.34
Espermidina	6.34 ± 0.27

Paralelamente se calcularon, para cada una de las aminos biógenas, las rectas de calibrado entre concentración y respuesta en IRF obtenida al aplicar el método analítico a soluciones patrón de aminos biógenas. A partir de la pendiente obtenida en cada una de las rectas y de las respuestas de las 10 determinaciones del "blanco" se calculó el LD y el LC de cada una de las aminos biógenas aplicando las fórmulas antes expuestas. Los resultados se muestran en la tabla 47.

Figura 29. Cromatograma de una muestra de cerveza antes (A) y después (B) del tratamiento alcalino.

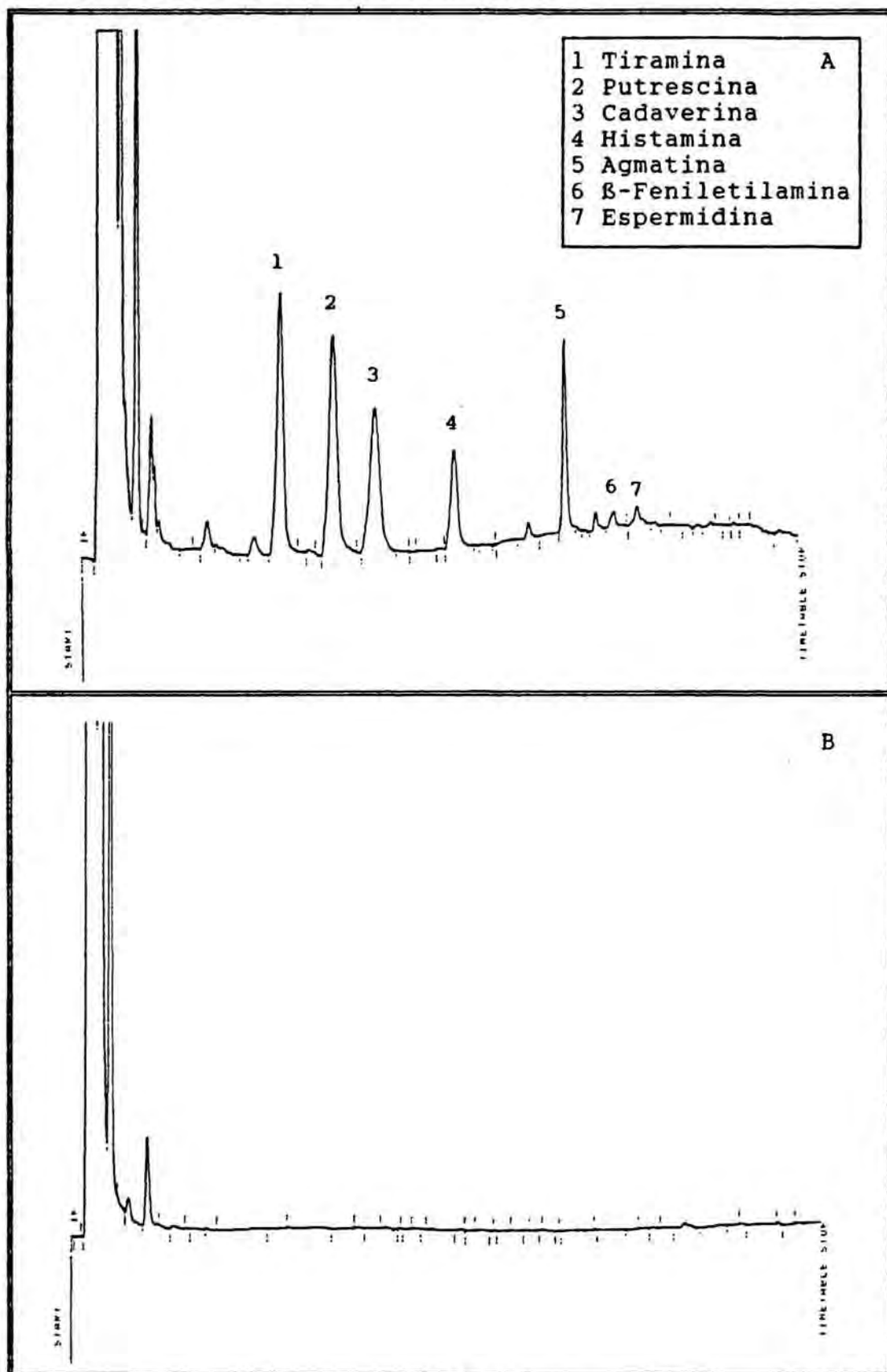


Tabla 47. Límites de detección y de cuantificación del método para determinar aminas biógenas en cervezas.

Amina	Rectas de calibrado	LD (mg/L)	LC (mg/L)
HISTAMINA	$y = 19.25x + 3.35$	0.35	0.45
TIRAMINA	$y = 18.15x + 2.40$	0.35	0.45
β -FENILETIL.	$y = 21.30x + 2.80$	0.30	0.40
SEROTONINA	$y = 10.60x - 1.20$	0.65	0.80
TRIPTAMINA	$y = 17.35x + 2.10$	0.40	0.50
CADAVERINA	$y = 22.70x + 1.85$	0.30	0.40
PUTRESCINA	$y = 23.65x + 2.05$	0.30	0.40
AGMATINA	$y = 21.32x + 2.65$	0.30	0.40
ESPERMINA	$y = 11.60x - 1.90$	0.60	0.75
ESPERMIDINA	$y = 20.30x + 1.45$	0.35	0.45

Se observa que las aminas que presentan unos límites de detección más elevados son serotonina y espermina, mientras que para el resto de estos compuestos el límite de detección oscila entre 0.30 y 0.40 mg/L.

5. DETERMINACION DE HISTAMINA Y DE TIRAMINA POR METODOS ESPECTROFLUORIMETRICOS.

5.1. DETERMINACION DE HISTAMINA

Para la determinación de histamina en cervezas y mostos de cerveza se ha seguido el método espectrofluorométrico propuesto por VIDAL-CAROU y col. (1989), que consta de las siguientes etapas:

1. Extracción de la histamina de la muestra con n-butanol en medio alcalino (pH = 12.5-13).
2. Lavado de la fase butanólica con hidróxido sódico saturado de cloruro sódico.
3. Transferencia de la histamina a una solución de ácido clorhídrico.
4. Reacción de formación del fluoróforo histamina-OPT.
5. Determinación cualitativa y cuantitativa por espectrofluorometría.

5.1.1. MATERIAL Y REACTIVOS

Aparatos: Espectrofluorímetro KONTRON SFM-25 con printer-plotter KONTRON 800.
Granatario SALTER-ELECTROSCALE EB300
pHmetro CRISON Digit 501.
Agitador de tubos HEIDOLPH-REAX-2000.
Magnetoagitador A-06 SBS.

Reactivos: Diclorhidrato de histamina (Merck).
o-Ftalaldehído (OPT) (Merck).
Cloruro sódico.
n-Butanol.
Eter de petróleo.

* Los disolventes y reactivos utilizados en los que no se indica específicamente su clase fueron de calidad PA.

Soluciones: Acido perclórico 0.4 N.
Hidróxido sódico 0.1 N y 1 N.
Hidróxido sódico 1 N saturado de ClNa.
Acido clorhídrico 0.1 N.
Acido cítrico 0.2 M.
Solución metanólica de OPT al 1% (P/V).
Soluciones patrón de histamina en HCl 0.1 N.

5.1.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO.

1. Extracción y separación.

Se toman 5 mL de cerveza, previamente desgasificada por agitación, que se introducen en un embudo de decantación, se añaden 10 mL de ácido perclórico 0.4 N y posteriormente se adiciona una cantidad suficiente de hidróxido sódico 1 N para alcanzar un pH entre 12.5 y 13 (aproximadamente de 7.5 a 8 mL).

A continuación se añaden de 3.5 a 4 g de cloruro sódico y se extrae cuatro veces con porciones de n-butanol de 45, 40, 30 y 25 mL, sucesivamente. Se agita 2 minutos en cada extracción.

Las fases butanólicas reunidas se lavan con 10 mL de hidróxido sódico 1 N saturado de cloruro sódico y se desecha la fase acuosa. A continuación se lava la fase butanólica con 25 mL de éter de petróleo, se agita, se deja separar y se desecha la fase acuosa liberada.

Se extrae la fase butanólica con 5 porciones de 10 mL de ácido clorhídrico 0.1 N, agitando 2 minutos en cada extracción. Se recogen los extractos acuoso-ácidos en matraces aforados de 50 mL. Por último, se añade más éter de petróleo, de 30 a 40 mL, a la fase butanólica, se agita y se deja separar, recogiendo la fase acuosa liberada también en los matraces aforados, que finalmente se enrasan hasta 50 mL con ácido clorhídrico 0.1 N.

2. Recta de calibrado por adición de patrones.

Para realizar la recta de calibrado por adición de patrones, se preparan soluciones del extracto acuoso-ácido final adicionados de histamina patrón.

En 5 matraces aforados de 5 mL se introducen, respectivamente, 1 mL de HCl 0.1 N, 1 mL de solución patrón de histamina de 0.5 mg/L, 1 mL de solución de 1 mg/L, 1 mL de 1.5 mg/L y 1 mL de 2 mg/L y, en todos los casos, se completa hasta 5 mL con 4 mL del extracto acuoso-ácido.

3. Reacción de condensación histamina-OPT.

De cada una de las soluciones anteriores, contenidas en los matraces de 5 mL, se toman 2 mL que se colocan en tubos de ensayo y se añaden, en primer lugar, 4 mL de hidróxido sódico 0.1 N, se agita bien e inmediatamente después se añaden 0.2 mL de solución metanólica al 1% de OPT, se agita de nuevo y se deja reposar durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionan 2 mL de ácido cítrico

0.2 M a cada tubo, se agita y se lee en el espectrofluorímetro en los máximos de excitación y de emisión de la histamina (340/425 nm). Debe realizarse también un blanco con 2 mL de HCl 0.1 N.

Además de la determinación cuantitativa, se realiza una cualitativa comparando los espectros de excitación y de emisión de la histamina obtenidos a partir de la cerveza con los de una solución patrón de esta amina.

4. Cálculos.

Para el cálculo del contenido de histamina en las cervezas, debe extrapolarse la recta de calibrado obtenida por adición de patrones sobre el eje de abcisas y el punto de intersección corresponderá a la concentración de histamina (Ca) en los 5 mL de solución final (4 mL del extracto acuoso-ácido + 1 mL de HCl 0.1 N).

La concentración de histamina en la cerveza, expresada en mg/L, será:

$$Ca \times \frac{5}{4} \times \frac{50}{5} = \text{mg/L de histamina en la muestra}$$

Para conocer la recuperación del método debe realizarse en paralelo una extracción de la cerveza adicionada de una cantidad conocida de histamina (Q). Igualmente, a partir del extracto que se obtenga debe prepararse una recta por adición de patrones de histamina a dicho extracto. Por extrapolación de esta segunda recta sobre el eje de abcisas se obtendrá un valor de concentración (Cb) que corresponde a los 5 mL de solución final del extracto de la cerveza adicionada.

Cálculo de la recuperación

$$Ca \times \frac{5}{4} \times 50 = A \text{ (}\mu\text{g de histamina en la muestra)}$$

$$Cb \times \frac{5}{4} \times 50 = B \text{ (}\mu\text{g de histamina en la muestra adicionada)}$$

Sí $A + Q$ es el valor esperado en el supuesto de que se recupere el 100% de histamina, el porcentaje de recuperación R de histamina será:

$$R (\%) = \frac{B}{A + Q} \times 100$$

5.1.3. VALIDEZ DEL METODO

La validez de este método para la determinación de histamina en cervezas ha sido comprobado previamente en términos de precisión, recuperación, y límites de detección y cuantificación (IZQUIERDO-PULIDO, 1987; VIDAL-CAROU y col., 1989).

La precisión, expresada como coeficiente de variación (CV%), para un contenido de histamina de 0.85 ± 0.065 mg/L, es del 7.65% ($n=8$). Este valor se encuentra dentro del límite de CV que proporciona la fórmula de HORWITZ (1982).

La recuperación media del método aplicado en cervezas ha sido de 93.40 ± 2.75 ($n=24$), tras la adición de 5, 10 y 15 μ g de histamina. Igualmente se ha comprobado que la exactitud del método no está influida por el nivel de histamina adicionado.

El límite de detección de este para la determinación de histamina fue de 0.03 mg/L y el de determinación de 0.08 mg/L.

5.2. DETERMINACION DE TIRAMINA

Para la determinación de tiramina en cervezas y mostos de cerveza se ha seguido el método espectrofluorimétrico propuesto por RIVAS y col. (1979), que consta de las siguientes fases:

1. Preparación de la muestra: alcalinización e interposición con arena de mar lavada y sulfato sódico anhidro.
2. Extracción de la tiramina con acetato de etilo en columna de vidrio.
3. Transferencia de la tiramina a ácido clorhídrico 0.2 N.
4. Reacción de formación del fluoróforo tiramina- α -nitroso- β -naftol.
5. Determinación cualitativa y cuantitativa por espectrofluorometría.

5.2.1. MATERIAL Y REACTIVOS

Aparatos: Espectrofluorímetro KONTRON SFM-25 con printer-plotter KONTRON 800.
Granatario SALTER ELECTROSCALE EB300.
pHmetro CRISON Digit 501.
Estufa 209 P-SELECTA.
Agitador de tubos HEIDOLPH-REAX-2000.
Baño termostatzado P-SELECTA.
Magnetoagitador A-06 SBS.

Reactivos: Acetato de etilo.
Arena de mar, grano fino, lavada y calcinada.
Carbonato sódico anhidro.
Sulfato sódico anhidro.
1,2-dicloroetano.
Etanol 95%.
 α -nitroso- β -naftol.
Nitrito sódico.
Monoclorhidrato de tiramina (Merck).

* Todos los reactivos en los que no se especifica la clase fueron de calidad PA.

Soluciones: Acido clorhídrico 0.2 N.
Acido nítrico 1 N.
Hidróxido sódico 1 N.
Nitrito sódico al 2.5% (P/V).
Solución de α -nitroso- β -naftol al 0.1% en etanol del 95%.
Solución amortiguadora de boratos a pH=10.2.
Soluciones patrón de tiramina en HCl 0.2 N.

5.2.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO.

1. Extracción y separación.

Se toman 5 mL de la muestra, se introducen en un vaso de precipitados de 250 mL y se concentran al baño maría hasta aproximadamente 2 mL. En función de la cantidad de tiramina que contenga, pueden tomarse volúmenes menores o mayores de cerveza.

Se alcaliniza con carbonato sódico anhidro (una punta de espátula), 1 mL de NaOH 1 N y con 1-2 mL de solución reguladora de boratos (pH = 10.2), para que el pH final de la mezcla esté entre 10.2 y 10.5.

La muestra alcalinizada se mezcla con arena de mar y sulfato sódico anhidro, en una proporción 2:1, de forma que el conjunto quede prácticamente seco (aproximadamente 50g de sulfato sódico y 100g de arena de mar).

Se adicionan 40-45 mL de acetato de etilo y se mezcla bien para que el disolvente entre en contacto con la muestra. Se dejan en contacto durante media hora, agitando de vez en cuando para evitar la formación de terrones.

Transcurrido este tiempo, la mezcla anterior se transfiere a una columna de vidrio de 3 cm de diámetro y provista de llave. El vaso de precipitados se lava con 45-50 mL de acetato de etilo, que se añaden también a la columna. Se deja eluir el acetato de etilo con un goteo tal que en el proceso se invierta un tiempo entre 1.5 a 2 horas.

El eluato orgánico se transfiere a un embudo de decantación y se extrae 5 veces con porciones de 10 mL de ácido clorhídrico 0.2 N. Se agita cada extracción durante 2 minutos. Las fases acuosas se recogen en un matraz aforado de 50 mL.

2. Reacción de formación del fluoróforo tiramina- α -nitroso- β -naftol.

Se toman 2 mL del extracto acuoso-ácido obtenido y se adicionan:

- 1 mL de solución α -nitroso- β -naftol al 0.1% en etanol del 95%.
- 1 mL de solución nítrica de nitrito sódico, recién preparada de la siguiente forma: 0.5 mL de una solución acuosa de nitrito sódico al 2.5% (P/V) diluida hasta 25 mL con ácido nítrico.

Se mezcla bien en agitador de tubos y se deja reaccionar en la estufa a 60°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar a temperatura ambiente (10-15 min).

Se añaden 10 mL de 1,2-dicloroetano, se mezcla enérgicamente en agitador de tubos y se dejan separar las dos fases. La fase acuosa se recoge por aspiración y con ella se efectúa la lectura en el espectrofluorímetro, en los máximos de excitación y de emisión correspondientes a la tiramina (450/540 nm).

Además de la determinación cuantitativa, se realiza una cualitativa por comparación de los espectros de excitación y de emisión de la muestra con los espectros de excitación y de emisión obtenidos con una solución patrón de tiramina.

3. Cálculos

El cálculo del contenido de tiramina de la muestra se realiza por intrapolación a partir de una recta de calibrado preparada con patrones de tiramina. Aplicando la corrección para tener en cuenta las diluciones efectuadas se obtendrá la concentración inicial de esta amina en la muestra.

Si Ca es el valor obtenido por intrapolación en la recta patrón, la concentración de tiramina en la muestra será:

$$Ca \times \frac{50}{5} = \text{mg de tiramina por mL de muestra}$$

Para el cálculo de la recuperación se realiza en paralelo una extracción de la cerveza adicionada de una cantidad conocida de tiramina (Q).

Se procederá de la misma forma y el contenido de tiramina en la muestra adicionada también se obtendrá por intrapolación en la misma recta de calibrado. Si C_b es el valor obtenido:

$$C_a \times 50 = A \text{ (}\mu\text{g de tiramina en la muestra)}$$

$$C_b \times 50 = B \text{ (}\mu\text{g de tiramina en la muestra adicionada).}$$

Para calcular la recuperación R expresada en porcentaje:

$$R (\%) = \frac{B}{A + Q} \times 100$$

Siendo $A + Q$ el valor esperado en el supuesto de que se recupere el 100 % de la tiramina adicionada.

5.2.3. VALIDEZ DEL METODO.

La validez del método de determinación de tiramina en cervezas ha sido comprobada en términos de precisión y exactitud (IZQUIERDO-PULIDO, 1987).

Se obtuvo un coeficiente de variación del 4.65%, para un contenido de tiramina de 16.50 ± 0.75 mg/L ($n=8$). Este valor es menor del que se obtiene por la fórmula de HORWITZ (1981) para esta concentración de tiramina y por ello cabe concluir que la precisión del método es satisfactorio.

La recuperación, en promedio, tras la adición de 10, 20 y 30 μg de tiramina, fue de 94.45 ± 2.60 ($n=24$) y se comprobó que no existían diferencias estadísticamente significativas en los valores de recuperación en función del nivel de tiramina adicionado.

6. DETERMINACION DE AMINOACIDOS.

6.1. DETERMINACION DE AMINOACIDOS POR AUTOANALIZADOR

La determinación de los aminoácidos ha sido realizada por el Servicio de Análisis de la Universidad de Barcelona.

Los análisis de aminoácidos se realizaron con un autoanalizador de aminoácidos LKB, modelo Alpha-Plus. Este autoanalizador consta de un cromatógrafo líquido que separa los aminoácidos mediante una columna de intercambio iónico. Tras la separación se realiza una reacción de derivatización post-columna con ninhidrina y posteriormente se desarrolla la detección colorimétrica a 570 nm. El método se basa en el propuesto por MOORE y STEIN en 1948 y es la forma más extendida para cuantificación de aminoácidos mediante cromatografía por intercambio iónico. El relleno de la columna utilizada es una resina polimérica de poliestireno-divinilobenceno, con un 8% de "cross-linking".

Las muestras, previamente a su análisis, se ultrafiltraban mediante filtros de 0.45 μm (Ultrafree^r-MC de membrana Durapore de bajo nivel de absorción). Mediante este tratamiento se eliminaban partículas en suspensión que podrían dar lugar a interferencias en el cromatograma final.

El análisis de cada muestra emplea unas 2 horas y se determinan, los siguientes aminoácidos, que eluyen en este orden:

1. Acido aspártico	9. Glicina	17. Tirosina
2. Hidróxiprolina	10. Alanina	18. Fenilalanina
3. Treonina	11. Valina	19. GABA
4. Serina	12. Cisteína	20. Sales de NH_4^+
5. Asparragina	13. Metionina	21. Ornitina
6. Acido glutámico	14. Isoleucina	22. Lisina
7. Glutamina	15. Leucina	23. Histidina
8. Prolina	*16. Norleucina	24. Triptófano
		25. Arginina

* Utilizado como patrón interno.

En la figura 30 se muestra un cromatograma de una solución patrón de aminoácidos de 400 μM y en las figuras 31 y 32 se incluyen, respectivamente, un cromatograma de una muestra de mosto de cerveza y un cromatograma de una muestra de cerveza del último día de fermentación. Los picos cromatográficos correspondientes a los diferentes aminoácidos se identifican mediante los números señalados anteriormente para cada aminoácido.

Figura 30. Cromatograma de una solución patrón de aminoácidos (400 µM).

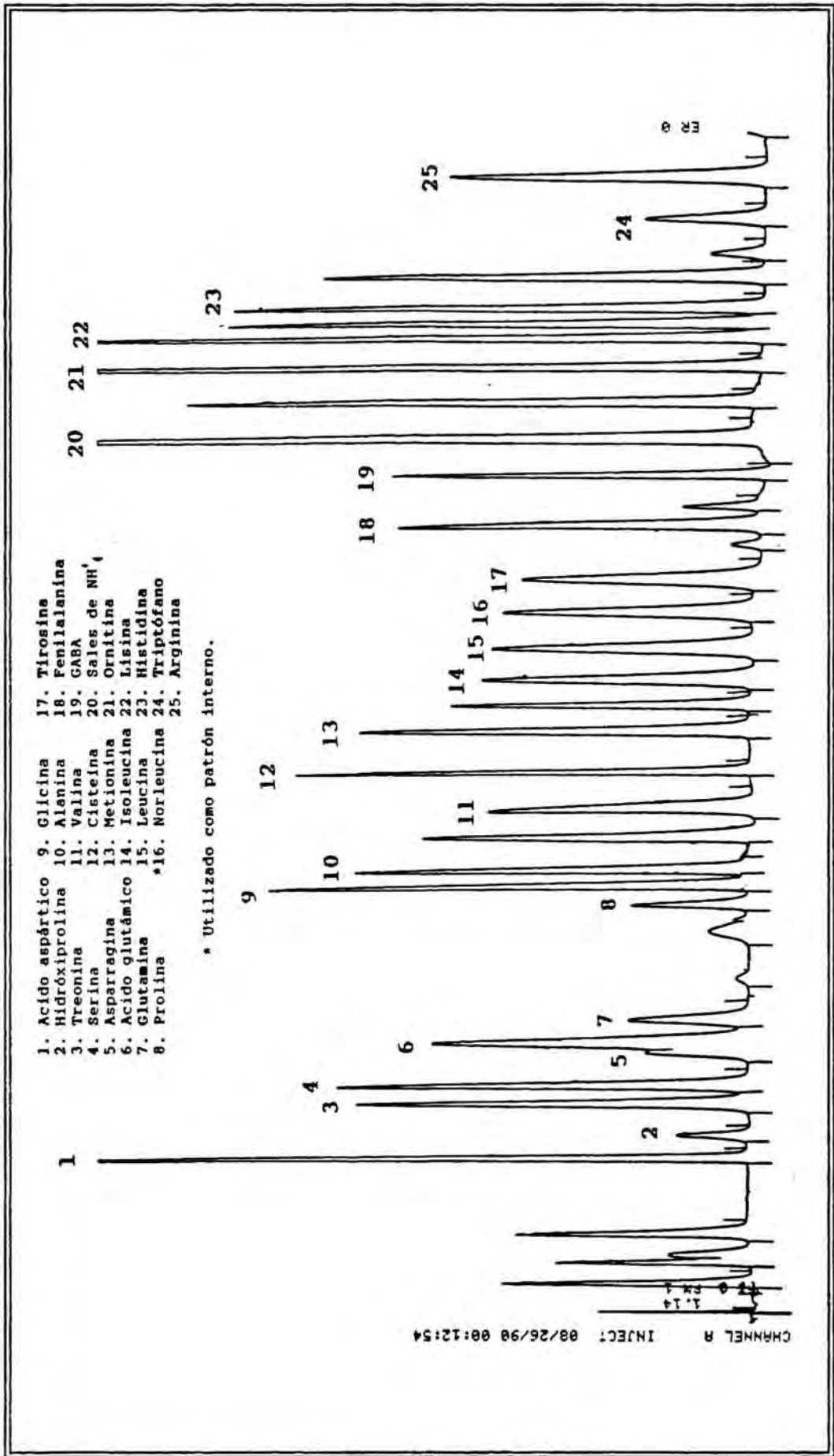


Figura 31. Cromatograma de aminoácidos de un mosto de cerveza (primer día de fermentación).

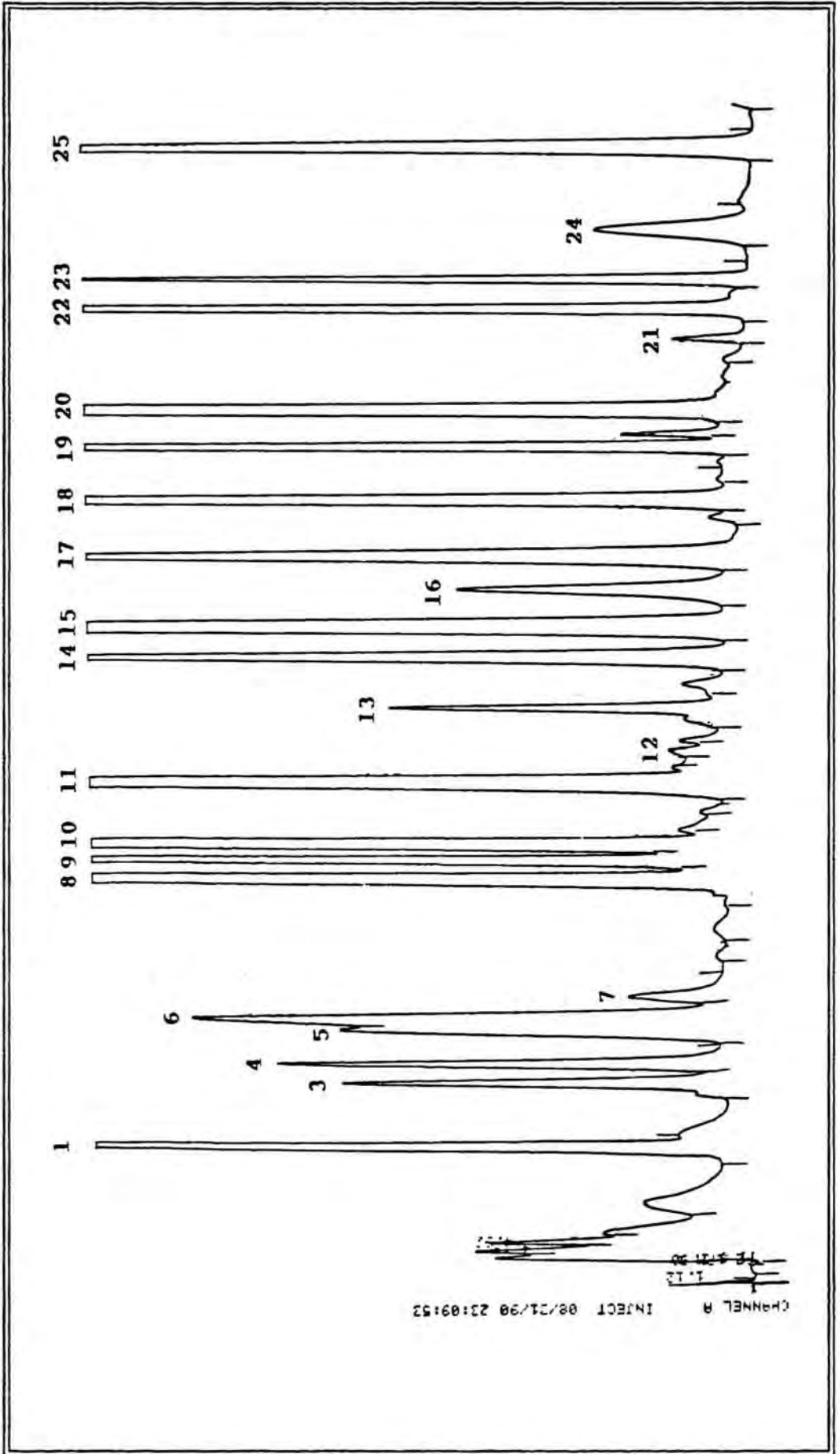
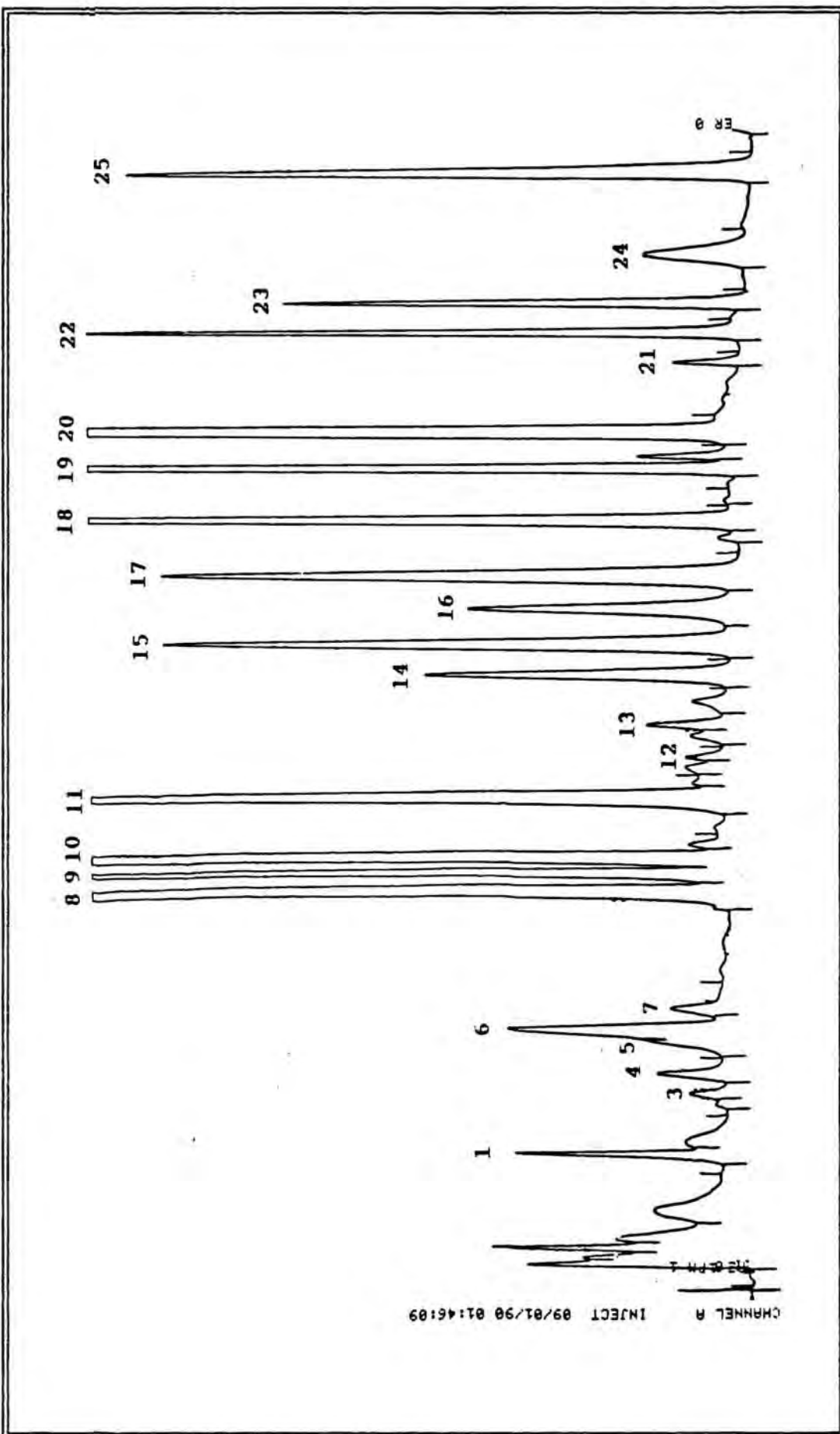


Figura 32. Cromatograma de aminoácidos de una muestra de cerveza del último día de fermentación.



6.2. DETERMINACION DE TIROSINA POR UN METODO ESPECTROFLUORIMETRICO

Para la determinación de tirosina en mostos y en cervezas se ha seguido el método espectrofluorométrico propuesto por RIVAS y col. (1981), que consta de las siguientes etapas:

1. Separación de la tirosina de la muestra mediante una resina de intercambio iónico.
2. Reacción de formación del fluoróforo tirosina- α -nitroso- β -naftol.
3. Lectura espectrofluorimétrica cualitativa y cuantitativa.

6.2.1. MATERIAL Y REACTIVOS

Aparatos: Espectrofluorímetro KONTRON SFM-25 con printer-plotter KONTRON 800.
Granatario SALTER-ELECTROSCALE EB300
pHmetro CRISON Digit 501.
Agitador de tubos HEIDOLPH-REAX-2000.
Magnetoagitador A-06 SBS.
Baño termostatzado P-SELECTA.

Reactivos: Resina de intercambio iónico Dowex 50wx4 (50-100 mallas) (Fluka).
L-Tirosina (Merck).
 α -nitroso- β -naftol (Merck).
1,2-dicloroetano.
Etanol 95%.

* Los disolventes y reactivos utilizados en los que no se indica específicamente su clase fueron de calidad PA.

Soluciones: Acido clorhídrico 0.2N, 1N y 2N.
Acido nítrico 1N.
Hidróxido sódico 1N y 2N.
Hidróxido amónico 2N.
Nitrito sódico al 2.5% (P/V).
Solución de α -Nitroso- β -naftol al 0.1% en Etanol del 95%.
Soluciones patrón de tirosina en HCl 0.2 N.

6.2.2. DESCRIPCION DEL METODO

1. Preparación de la resina

La resina comercial está en forma ácida (H^+) y, aunque ésta es la forma de utilización, es conveniente lavarla para eliminar posibles impurezas. Para ello, primero se hace pasar a través de la resina una solución de hidróxido sódico 2N, seguida de agua destilada hasta que los líquidos de lavado sean neutros. A continuación se pasa ácido clorhídrico 2N, tras lo cual nuevamente se lava con agua destilada. Se repite el proceso con hidróxido sódico 1N y ácido clorhídrico 1N, lavando con agua entre ambos reactivos y al final. Tras los tratamientos con hidróxido sódico, los líquidos deben ser alcalinos y tras el paso de ácido clorhídrico deben ser ácidos. Los lavados con agua destilada se prolongan en todos los casos hasta la elución de líquidos neutros.

Para cada columna se necesitan unos 2g de resina preparada de esta forma. El llenado debe ser uniforme, homogéneo y sin burbujas de aire, que pueden dar lugar a eluciones irregulares. Se ha de procurar que siempre haya líquido por encima de la resina.

2. Separación cromatográfica

Se toman 2 mL de muestra y se depositan en una columna que contiene 2 g de resina catiónica Dowex 50wx4 (50-100 mallas), preparada convenientemente. La columna tiene 2 mm de diámetro y el flujo a lo largo de toda la elución ha de ser de 1 mL por minuto aproximadamente.

Se pasan 5 mL de agua destilada para eliminar ácidos orgánicos y sustancias neutras, y se desecha este primer eluato. A continuación, se eluye la tirosina con 5 mL de solución de hidróxido amónico 2N. Finalmente, se hacen pasar 3 mL de agua destilada para recoger la totalidad de la fase amoniaca.

La fracción amoniaca se lleva a sequedad al baño maría y el residuo se redisuelve en 50 mL de ácido clorhídrico 0.2 N.

3. Reacción de formación del fluoróforo tirosina- α -nitroso- β -naftol.

Se toman 2 mL del extracto acuoso-ácido obtenido y se adicionan:

- 1 mL de solución de α -nitroso- β -naftol al 0.1% en etanol del 95%.
- 1 mL de solución nítrica de nitrito sódico, recién preparada de la siguiente forma: 0.5 mL de una solución acuosa de nitrito sódico al 2.5% (P/V) diluida hasta 25 mL con ácido nítrico.

Se mezcla bien en agitador de tubos y se deja reaccionar en la estufa a 60°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar a temperatura ambiente (10-15 min).

Se añaden 10 mL de 1,2-dicloroetano, se mezcla enérgicamente en agitador de tubos y se dejan separar las dos fases. La fase acuosa se recoge por aspiración y con ella se efectúa la lectura en el espectrofluorímetro, en los máximos de excitación y de emisión correspondientes a la tirosina (450/540 nm).

Además de la determinación cuantitativa, se realiza una cualitativa por comparación de los espectros de excitación y de emisión de la muestra con los espectros de excitación y de emisión obtenidos con una solución patrón de tirosina.

4. Cálculos

El cálculo del contenido de tirosina de la muestra se realiza por intrapolación a partir de una recta de calibrado preparada con patrones de tirosina. Aplicando la corrección para tener en cuenta las diluciones efectuadas, se obtendrá la concentración inicial de este aminoácido en la muestra.

Si C_a es el valor obtenido por extrapolación en la recta patrón, la concentración de tirosina en la muestra será:

$$C_a \times \frac{50}{5} = \text{mg de tirosina por mL de muestra}$$

Para el cálculo de la recuperación se realiza en paralelo una extracción de la cerveza adicionada de una cantidad conocida de tirosina (Q).

Se procederá de la misma forma y el contenido de tirosina en la muestra adicionada también se obtendrá por intrapolación en la misma recta de calibrado. Si C_b es el valor obtenido:

$$C_a \times 50 = A \text{ (}\mu\text{g de tirosina en la muestra)}$$

$$C_b \times 50 = B \text{ (}\mu\text{g de tirosina en la muestra adicionada).}$$

Para calcular la recuperación R expresada en porcentaje:

$$R (\%) = \frac{B}{A + Q} \times 100$$

Siendo $A + Q$ el valor esperado en el supuesto de que se recupere el 100 % de la tirosina adicionada.

7. DETERMINACION DE OTROS PARAMETROS ANALITICOS

7.1. ACIDEZ TOTAL

Para su determinación se ha seguido la pauta analítica incluida en los "Métodos Oficiales de Análisis de Cerveza" (MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA DEL GOBIERNO, 1985). Se determina por valoración potenciométrica

Material y reactivos

- pHmetro CRISON Digit 501
- Magnetoagitador A-06 SBS
- Bureta graduada de 25mL
- Solución de hidróxido sódico 0.1N exactamente valorada

Procedimiento

Se elimina el gas carbónico de unos 100 mL de muestra por agitación. Se pipetea 50 mL de cerveza desgasificada y se transfieren a un vaso de precipitados que se coloca sobre un agitador magnético. Se introduce en la muestra el electrodo del pHmetro. Se valora la cerveza con NaOH 0.1 N hasta pH 8.2, añadiendo el reactivo en porciones de 1.5 mL hasta llegar a pH 7.6 y después más lentamente hasta que se alcanza exactamente el pH 8.2.

Cálculos

La acidez total se expresa en porcentaje de ácido láctico (P/P) y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez total (\% \acute{a}c. l\acute{a}ctico)} = \frac{V_1 \times 10}{V_2 \times d} \times 0.09$$

La acidez se expresa con dos cifras decimales

Siendo: d = densidad en g/mL
V₁ = volumen de NaOH, en mL, empleados en la valoración.
V₂ = volumen tomado, en mL, de cerveza.
0.09 = factor de transformación de los miliequivalentes de NaOH en g de ácido láctico.

7.2. pH

Se ha determinado por el método oficial, que consiste en una lectura directa en el pHmetro, previamente ajustado a pH 4.0 y a pH 7.0 con soluciones reguladoras de pH (MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA DEL GOBIERNO, 1985).

Material y reactivos

- pHmetro CRISON Digit 501, provisto de un electrodo combinado.
- Termómetro.
- Soluciones reguladoras de pH 4.0 y de pH 7.0.

Procedimiento

Se toma una pequeña cantidad de muestra y se desgasifica mediante agitación en placa. A continuación, se introduce el electrodo en un pequeño volumen de muestra y se procede a la lectura del pH.

7.3. GRADUACION ALCOHOLICA, EXTRACTO REAL, EXTRACTO APARENTE, EXTRACTO SECO PRIMITIVO Y DENSIDAD.

La determinación de estos parámetros se ha realizado de forma automática mediante un autoanalizador: "Technicon beer analyzer" (TECHNICON INTERNATIONAL DIVISION, 1979). El contenido en alcohol se determina por termometría en un canal del aparato y la densidad de la cerveza se determina en otro canal de este sistema mediante un Paar densímetro. El extracto seco primitivo se calcula automáticamente a partir del contenido alcohólico y de la densidad por un sistema computerizado.

Estas determinaciones fueron efectuadas en la empresa cervecera que nos ha proporcionado parte de las muestras empleadas en este trabajo.

7.4. GRADO DE FERMENTACION

El grado de fermentación se determina, por cálculo, a partir del extracto real y del extracto seco primitivo, tal como se indica en los métodos oficiales de análisis de cerveza (MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA DEL GOBIERNO, 1985).

El grado de fermentación representa el porcentaje de extracto primitivo que ha sido fermentado y viene dado por la fórmula:

$$G.F. = 100 \times \left(1 - \frac{E.R.}{E.S.P.}\right) \times \frac{1}{1 - (0.005161 \times E.R.)}$$

Siendo: G.F. = grado de fermentación en %
E.R. = extracto real
E.S.P. = extracto seco primitivo.

8. DETERMINACIONES ANALITICAS MICROBIOLOGICAS

8.1. RECUENTO DE CELULAS CON LA CAMARA DE THOMA

Para realizar el recuento de células de levadura se ha utilizado la cámara de Thoma. Esta cámara consta de un portaobjetos que tiene grabada una retícula de 400 recuadros pequeños, agrupados en 16 cuadros medianos, cada uno de ellos subdivididos en 25 recuadros pequeños.

Para el montaje de la cámara de Thoma en primer lugar se humedece ligeramente las dos superficies laterales de la cámara. A continuación, se coloca un cubre-objetos realizando una ligera presión. Se deja secar hasta que se forman los denominados anillos de Newton. La cámara, una vez montada, presenta entre el cubre y el porta un espacio de 0.1 mm de altura.

La cámara de Thoma permite cuantificar el número de células de levadura en cualquier muestra que contenga un mínimo de $5 \cdot 10^5$ células/mL. Si la muestra tiene un recuento superior a 10^7 células/mL, es necesario diluirla tanto como sea necesario para conseguir una suspensión con un contenido comprendido entre 10^6 - 10^7 células/mL.

Las muestras en las que se ha realizado la cuantificación de células de levadura han sido:

- la propia levadura de cultivo, empleada para desarrollar las fermentaciones,
- las muestras de los diferentes días a lo largo de la fermentación principal (fábrica y laboratorio) y secundaria.

Debido a que la concentración habitual de una muestra de levadura y de una muestra de fermentación de fábrica es del orden de 10^9 cel/mL y de 10^7 cel/mL respectivamente, fue necesario en ambos casos diluir las muestras antes de iniciar el recuento.

En definitiva, la técnica de recuento con la cámara de Thoma consta de las siguientes fases:

1. Dilución de la muestra
2. Montaje de la cámara de Thoma
3. Recuento de células y cálculos.

8.1.1. MATERIAL Y REACTIVOS

Aparatos: Microscopio óptico
Agitador de tubos HEIDOLPH-REAX-2000

Material: Cámara de Thoma
Pipetas automáticas (JUSTOR 1100 NICHIRYO)
Tubos Eppendorf

Reactivos: Agua destilada.

8.1.2. DESCRIPCION DE LA TECNICA

1. Dilución de las muestras

Antes de realizar las diluciones, las muestras se homogeneizan, con el fin de disgregar bien las células.

- En las muestras de levadura se realizan dos o tres diluciones según, la consistencia de la muestra:

Primera dilución: se toma 1 mL de levadura y se lleva hasta 10 mL con mosto de cerveza. El empleo de mosto, en lugar de agua destilada, se debe a que el mismo disgrega mejor las células de levadura que el agua.

Segunda dilución: Se toman 100 μ L de la dilución anterior, se introducen en un tubo Eppendorf y se añaden 0.90 μ L de agua destilada y se homogeneiza.

Si es necesario realizar otra dilución se repite la operación anterior.

- En la muestras de fermentacion se realiza una dilución 1/10 en un tubo Eppendorf con agua destilada (0.90 mL de agua destilada + 100 μ L de muestra).

2. Recuento de células y cálculos

Se toma con una pipeta automática una alícuota de la suspensión de células homogeneizada, y se deposita una gota entre el cubre y el porta de la cámara de Thoma. Se deja que la gota penetre por capilaridad y, a continuación, se realiza el recuento de células al microscopio a 200-400 aumentos.

El recuento de células en muestras de levadura se realiza sobre las dos últimas diluciones, mientras que el recuento de células en muestras de fermentación se realiza sobre la primera y única dilución efectuada. El recuento en las muestras procedentes de bodegas se realiza directamente sobre éstas.

Durante el recuento deben anotarse el número de células (n) y el número de recuadros contados (p). Para transformar el número de células contadas (n) en el número de células por mL de muestra (N), se aplica la siguiente fórmula:

$$N = \frac{n}{p} \times 4 \times 10^6$$

Si se realiza el recuento de toda la cámara de Thoma, la fórmula se transforma en:

$$N = \frac{n}{400} \times 4 \times 10^6; \quad N = n \times 10^4$$

Una vez conocida la concentración de cél/mL (N), se ha de tener en cuenta si se ha realizado alguna dilución de la muestra, para transformar este número en el número de células de levadura por mL de muestra.

Al realizar el recuento es necesario seguir siempre el mismo criterio. El que se ha utilizado en este trabajo ha sido el siguiente:

- Se han contado todas las células que se encontraban en su totalidad dentro del recuadro y aquellas que se hallaban en más del 50%.
- Respecto a las células de levadura que se estaban dividiendo por gemación, se ha contado siempre la célula madre y las gemas sólo en el caso de que tuvieran un tamaño mayor a la mitad de la célula madre.
- Las células con una morfología opaca o rugosa no fueron contadas, ya que se consideraron células no viables y que, por tanto, no intervenían en el proceso de fermentación.
- Las células de una medida muy inferior a la media, no se contaron como una célula, sino que se contabilizaron como media célula.

8.2. RECUENTO DE BACTERIAS DEL ACIDO LACTICO

Los recuentos de bacterias del ácido láctico se realizaron en muestras de fermentación principal (fábrica y laboratorio) y de fermentación secundaria.

8.2.1. MATERIAL Y REACTIVOS

Aparatos: Estufa graduada a 28⁰C.
Recipiente de anaerobiosis.
Agitador de tubos HEIDOLPH-REAX-2000
Autoclave.

Material: Placas de Petri de 90 mm de diámetro.
Tubos Eppendorf.
Pipetas automáticas JUSTOR 1100 NICHIRYO
Asa de Digrafsky

Reactivos: Agar NNB (NNB-A) (Döhler Darmstadt).
Solución Ringer estéril (1/4).

8.2.2. DESCRIPCION DE LA TECNICA.

1. Preparación del medio de cultivo (NBB-A).

Se ha escogido el medio NBB-A por que es uno de los que tiene una recuperación más alta de los microorganismos capaces de crecer en la cerveza. En este medio pueden crecer todos los microorganismos descritos en el apartado 2.3.2., pero debido a que sólo se detectaron en las muestras de cerveza objeto de nuestro estudio microorganismos del ácido láctico, sólo nos referiremos a recuentos de este tipo de bacterias.

El medio NBB-A se adquiere ya preparado y esterilizado, por lo que sólo es necesario fundirlo. Para ello, se introduce el recipiente que contiene el medio de cultivo en un baño maría y se mantiene durante aproximadamente 30 min. Pasado este tiempo se deja enfriar hasta 50⁰C y, a continuación, se llenan placas de Petri estériles con aproximadamente 15 mL de medio. Las placas se dejan a 37⁰C durante 24 horas, o bien a 28⁰C durante 48 horas, después se guardan en refrigeración hasta el momento de su uso.

2. Dilución de las muestras.

Las muestras que se sospechaba que podrían contener un número elevado de bacterias se diluían con solución Ringer 1/4 estéril tantas veces como fuera conveniente, con la finalidad de que el número de colonias que aparecieran en cada placa fuera un número fácil de contar.

3. Siembra de las muestras e incubación.

La muestra se homogeneiza y de ella se toman 100 μ L que se depositan en medio de la placa. Con una asa de Digrafsky se reparte la muestra por toda la superficie del medio, hasta que se absorba por completo. Se deja secar la placa durante unos minutos. De las muestras en las que se han efectuado diluciones, se siembran siempre dos placas para cada dilución, además de una placa de la muestra sin diluir. El volumen de muestra sembrada, en todos los casos, fue de 100 μ L.

Las placas se incuban siete días a 28⁰C, dentro del recipiente de anaerobiosis en atmósfera de CO₂. Para crear esta atmósfera, en primer lugar se realiza el vacío y después se conecta el recipiente a una bombona de dióxido de carbono, repitiéndose esta operación dos veces.

4. Recuento y cálculos.

Se realiza el recuento de las colonias aparecidas por placa y se transforma este dato en UFC/ mL de muestra, considerando en los casos necesarios las diluciones realizadas.

Para las muestras que se han sembrado dos placas de una misma dilución el dato del recuento de las colonias aparecidas se obtiene realizándose la media de los dos recuentos realizados.

Sólo se realiza el recuento de aquellas placas que tienen de 30 a 300 colonias.

8.3. RECuento DE LEVADURAS SALVAJES

La propiedad que tienen la mayor parte de las levaduras salvajes de crecer a 37⁰C, y la incapacidad de la levadura de cultivo de crecer a esta temperatura, se ha utilizado para el aislamiento y recuento de las levaduras salvajes en las muestras estudiadas (ROCKEN y col., 1986).

Se han realizado recuentos de levaduras salvajes en muestras de fermentación principal (fábrica y laboratorio) y de fermentación secundaria.

El recuento de levaduras salvajes consta de las siguientes fases:

1. Preparación del medio de cultivo.
2. Siembra de muestras e incubación.
3. Lectura de las placas.

1. MATERIAL Y REACTIVOS

Aparatos: Estufa graduada a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
Agitador de tubos HEIDOLPH-REAX-2000.
Autoclave.

Material: Placas de Petri de 90 mm de diámetro.
Tubos Eppendorf.
Pipetas automáticas JUSTOR 1100-NICHIRYO
Asa de Digrafsky.
Mechero Bunsen.

Reactivos: Agar WL (ADSA Micro).
Solución de cloranfenicol (10 mg/mL).
Solución Ringer estéril (1/4).

8.3.2. DESCRIPCION DE LA TECNICA

1. Preparación del medio de cultivo (WL).

La composición del medio de cultivo WL (Wallerstein Laboratories) es:

Hidrolizado de triptosa caseína.....	5 g
Extracto de levadura.....	4 g
Fosfato potásico.....	0.55 g
Cloruro potásico.....	0.425 g
Cloruro cálcico.....	0.125 g
Sulfato magnésico.....	0.0025 g
Cloruro férrico.....	0.0025 g
Glucosa.....	50g
Verde de bromocresol.....	0.022 g
Agar.....	15g

El pH de este medio es aproximadamente de 5.5. La fórmula viene expresada por 1000 mL de agua destilada. Las levaduras salvajes aparecen en colonias grandes, opacas y pastosas.

La preparación del medio se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. El medio se introduce en un frasco de 1 L, el cual se esteriliza en autoclave durante 20 min, a 121⁰C. A continuación, se deja atemperar en un baño maría hasta 50⁰C y seguidamente se adiciona 1 mL de una solución de cloranfenicol al 1.1% por cada mL de medio de cultivo. De esta forma se consigue inhibir el crecimiento de bacterias. Se introduce la mezcla en placas de Petri, en una cámara de flujo laminar, procurando que cada placa contenga aproximadamente 15 mL de medio.

2. Siembra de muestras e incubación

Se realiza una siembra en superficie, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 8.2.2.

A continuación, se introducen las placas en una estufa a 37 ± 1⁰C en condiciones aeróbicas. Se mantienen a esta temperatura durante un mínimo de 3-5 días y pasado este tiempo se realiza el recuento de la colonias aparecidas.

3. Cálculos.

Se trata de un recuento en superficie. Se cuenta el número de colonias por placa y a partir de éste se determina el número de UFC/mL de muestra (UFC = Unidades Formadoras de Colonias).

8.4. AISLAMIENTO, MANTENIMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS.

A partir de cada aislamiento en placa, se realizó un segundo aislamiento para asegurar que se trataban de cultivos puros.

1. Mantenimiento de las cepas (GARVIE, 1986).

A partir de un primer aislamiento en placa con medio NBB, se realizaron siembras por picadura en medio NBB blando (NBB-A y NBB-B, 1:1), y se incubaban de 2 a 3 días a 28°C. Posteriormente se guardaban a 4°C hasta como máximo un mes.

Paralelamente, a partir también de un primer aislamiento se realizaron inculaciones de cepas aislada en caldo de NBB y se incubaron durante 2 a 3 días a 28°C, hasta obtener suficiente cantidad de masa celular. Posteriormente los cultivos se centrifugaban y se resuspendían en solución Ringer 1/4 estéril. A continuación se volvía a centrifugar y se resuspendían en medio "Skim milk" suplementado con 1% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura y 1% de carbonato cálcico. Las cepas de microorganismos en estas condiciones se podían mantener hasta 4 meses, a una temperatura de 4°C.

2. Identificación

La caracterización de las diferentes especies de Pediococcus se realizó estudiando su tolerancia a unos determinados valores de temperatura, de pH y de NaCl, de esta forma se llevo a cabo:

- Crecimientos a diferentes pH, en caldo MRS que contenía cerveza en una proporción del 50%.
- Crecimientos a diferentes concentraciones de NaCl en agar MRS que contenía un 50% de cerveza.
- Crecimientos a diferentes temperaturas, en caldo y en agar NBB y en agar MRS suplementado con un 50% de cerveza.

Los medios MRS que contenían un 50% de cerveza se prepararon disolviendo la cantidad correspondiente de medio en la mitad de volumen de agua esterilizada y completando hasta el volumen final con cerveza pasteurizada.

La prueba de la catalasa se realizó con una solución de peróxido de hidrógeno al 3%. Se consideró positiva cuando se producía formación de burbujas al sumergir una colonia en la citada solución.

La caracterización de las cepas de Pediococcus aisladas se complementó con el estudio de la capacidad que tienen los microorganismos para crecer en presencia de un determinado hidrato de carbono (NAKAGANA y KITAHARA, 1959), es decir, la capacidad de fermentación de ese azúcar. Este estudio puede realizarse utilizando Kits comerciales, como el indicado para la identificación de Lactobacillus y que también es aplicable para la caracterización de Pediococcus (DOLEZIL y KIRSOP, 1977).

El Kit utilizado fue el L.50 A.P.I. Lactobacillus System y el procedimiento comprende una incubación previa del mismo a unos 30°C. La positividad de la prueba viene indicada por el cambio de color del indicador del medio, como consecuencia de la producción de ácido resultante de la fermentación.

Tanto las pruebas de crecimiento como las del micrométodo A.P.I. se llevaron a cabo siempre por duplicado y sus lecturas se realizaron cada 2 o 3 días, hasta un máximo de quince.