



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

**Aminas biógenas y otros parámetros relacionados  
con la alteración bacteriana del pescado: estudio de su  
evolución y significación durante  
la elaboración de derivados**

María Teresa Veciana



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

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

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

57  
P.N.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS HUMANAS  
Y DE LA NUTRICIÓN

ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

AMINAS BIOGÉNICAS Y OTROS PARÁMETROS RELACIONADOS CON  
LA ALTERACIÓN BACTERIANA DEL PESCADO. ESTUDIO DE SU  
EVOLUCIÓN Y SIGNIFICACIÓN DURANTE LA ELABORACIÓN DE  
DERIVADOS.

MARIA TERESA VECIANA

*M<sup>te</sup> Veciana*

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084803

AMINAS BIOGENAS Y OTROS PARAMETROS RELACIONADOS CON  
LA ALTERACION BACTERIANA DEL PESCADO. ESTUDIO DE SU  
EVOLUCION Y SIGNIFICACION DURANTE LA ELABORACION DE  
DERIVADOS.

Memoria presentada por María Teresa Veciana  
Nogués, para aspirar al grado de Doctor en  
Farmácia.

Director: Dra. Carmen Vidal Carou

Barcelona, Junio de 1991

## INDICE

### I. INTRODUCCIÓN

### II. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. ESTRUCTURA DE MÚSCULO Y CAMBIOS POST-MORTEM EN EL PESCADO.....	1
2. EVALUACIÓN DE LA FRESCURA DEL PESCADO.....	5
2.1. VALORACIÓN ORGANOLÉPTICA.....	5
2.2. MÉTODOS FÍSICOS.....	10
2.2.1. Evaluación de la resistencia eléctrica de la carne de pescado.....	10
2.2.2. Medidas objetivas de las variaciones observadas en los ojos del pescado.....	11
2.2.3. Medida de la rigidez cadavérica.....	13
2.2.4. Determinación del pH.....	14
2.3. ÍNDICES QUÍMICOS.....	16
2.3.1. Métodos relacionados con el nitrógeno básico no proteico.....	18
2.3.1.1. Aminoácidos libres totales.....	18
2.3.1.2. Aminas biógenas.....	19
2.3.1.3. Nitrógeno Básico Volátil Total.....	19
2.3.1.4. Oxido de Trimetilamina.....	22
2.3.2. Índices relacionados con la degradación del ATP... ..	23
2.3.3. Índices basados en modificaciones de la fracción lipídica.....	24
2.3.3.1. Determinación del ácido 2-tiobarbitúrico....	24
2.3.3.2. Determinación del índice de peróxidos.....	25
3. PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL OXIDO DE TRIMETILAMINA... ..	26
3.1. TRIMETILAMINA.....	29
3.1.1. Origen y relación con las modificaciones de la flora bacteriana tras la muerte del pescado.....	29
3.1.2. Evolución de los contenidos de trimetilamina a lo largo del período de almacenamiento /descomposición del pescado.....	32
3.1.3. Trimetilamina como índice para evaluar el estado higiénico-sanitario del pescado.....	33
3.2. DIMETILAMINA.....	36
3.2.1. Origen de la dimetilamina en pescados.....	36
3.2.2. Formación de dimetilamina durante el almacenamiento del pescado.....	37

3.2.3. Desmetilación del óxido de trimetilamina y modificaciones en la textura del pescado congelado...	40
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DMA Y TMA..	42
3.3.1. Métodos clásicos.....	42
3.3.2. Métodos cromatográficos.....	45
4. ATP Y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACIÓN.....	51
4.1. EVOLUCIÓN POST-MORTEM DEL ATP Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.....	51
4.2. CONTENIDOS EN PESCADOS Y DERIVADOS.....	55
4.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DEGRADACIÓN DEL ATP Y SUS DERIVADOS.....	58
4.5. ÍNDICES BASADOS EN LA DEGRADACION DEL ATP PARA LA EVALUACION DE LA FRESCURA DEL PESCADO.....	65
4.6. INFLUENCIA DE LOS NUCLEÓTIDOS EN EL FLAVOR E ÍNDICES ENCAMINADOS A LA VALORACIÓN DE ESTAS PROPIEDADES.....	70
4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS PAR LA DETERMINACIÓN DE ATP Y DERIVADOS.....	73
4.7.1. Determinación del índice K mediante resinas de intercambio iónico.....	74
4.7.2. Técnicas enzimáticas.....	75
4.7.3. Cromatografía líquida de alta eficacia.....	76
5. AMINAS BIOGENAS.....	80
5.1. ORIGEN Y FORMACION.....	80
5.2. RIESGOS DE LA INGESTION DE AMINAS BIOGENAS DE ORIGEN ALIMENTARIO.....	86
5.2.1. Intoxicación histamínica.....	87
5.2.2. Migrañas de origen alimentario.....	99
5.2.3. Interacciones alimento-medicamento.....	104
5.2.4. Formación de nitrosaminas.....	109
5.2.5. Otros riesgos toxicológicos relacionados con la ingestión de aminas biógenas.....	113
5.3. AMINAS BIOGENAS EN PESCADOS: RELACION CON SU DETERIORO.	116
5.3.1. Disponibilidad de aminoácidos precursores libres...	117
5.3.2. Formación de aminas biógenas por actividad bacteriana.....	118
5.3.3. Factores que influyen en la formación de aminas biógenas por actividad bacteriana.....	126
5.3.4. Formación de aminas biógenas en pescado mantenido a distintas temperaturas.....	131
5.4. SIGNIFICACION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS EN PESCADOS.....	143
5.4.1. En pescado fresco refrigerado o mantenido en hielo.	143

5.4.2. En pescado congelado.....	143
5.4.2. Conservas de pescado.....	145
5.4.3. Semiconservas de pescado.....	151
5.5. AMINAS BIÓGENAS COMO ÍNDICES DE CALIDAD HIGIENICO-SANITARIA EN PESCADOS Y DERIVADOS.....	155
5.6. METODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGENAS EN PESCADOS.....	160
5.6.1. Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE.....	163
<b>III. OBJETIVOS E HIPOTESIS A ESTUDIAR.....</b>	<b>171</b>
<b>IV. MATERIAL Y METODOS</b>	
6. DETERMINACION DE AMINAS BIOGENAS EN PESCADO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (CLAE).....	173
6.1. FUNDAMENTO Y DESARROLLO DEL METODO.....	173
6.1.1. Ensayos previos al establecimiento de las condiciones cromatográficas.....	173
6.1.1.1. Influencia de la polaridad de la fase movil..	174
6.1.1.2. Influencia del pH.....	176
6.1.1.3. Modificaciones en el reactivo derivatizante..	178
6.2. DESCRIPCION DEL METODO.....	179
6.2.1. Material y reactivos.....	179
6.2.2. Preparación de la muestra.....	180
6.2.3. Condiciones cromatográficas.....	181
6.2.4. Identificación de picos cromatográficos.....	184
6.2.5. Cuantificación.....	187
6.3. ESTUDIO DE LA VALIDEZ DEL METODO.....	188
6.3.1. Linealidad.....	188
6.3.2. Precisión.....	190
6.3.3. Exactitud-Recuperación.....	193
6.3.4. Sensibilidad: Límite de detección y límite de cuantificación.....	197
6.4. DETERMINACION DE AMINAS BIOGENAS EN ANCHOAS.....	200
7. DETERMINACION DE ATP Y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (CLAE).....	203
7.1. METODO I PARA LA DETERMINACION DE ATP Y DERIVADOS POR CLAE.....	203
7.1.1. Ensayos previos al establecimiento de las condiciones cromatográficas.....	203
7.1.2. Descripción del método.....	204
7.1.2.1. Material y reactivos.....	204
7.1.2.2. Preparación de la muestra.....	205
7.1.2.3. Condiciones cromatográficas.....	206
7.1.2.4. Identificación de picos cromatográficos.....	207
7.1.2.5. Cuantificación	
7.1.3. Estudio de la validez del método.....	212
7.1.3.1. Linealidad.....	212

7.1.3.2. Precisión.....	213
7.1.3.3. Exactitud-Recuperación.....	214
7.1.3.4. Límite de detección.....	216
7.2. METODO II PARA LA DETERMINACION DE ATP Y DERIVADOS POR CLAE.....	219
7.2.1. Ensayos previos al establecimiento de las condiciones cromatográficas.....	219
7.2.2. Descripción del método.....	219
7.2.2.1. Material y reactivos.....	219
7.2.2.2. Preparación de la muestra.....	219
7.2.2.3. Condiciones cromatográficas.....	219
7.2.2.4. Identificación de picos cromatográficos.....	220
7.2.3. Estudio de la validez del método.....	223
7.2.3.1. Linealidad.....	223
7.2.3.2. Precisión.....	224
7.2.3.3. Exactitud-Recuperación.....	226
7.2.3.4. Límite de detección.....	229
7.3. ESTABILIDAD DE ATP Y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACION.....	231
7.3.1. Estabilidad de patrones mantenidos a 6-8°C.....	231
7.3.2. Estabilidad del ATP y derivados en el extracto neutro obtenido a partir de las muestras de pescado	237
7.3.3. Extracto neutro mantenido en congelación.....	240
7.3.4. Estabilidad en la muestra homogeneizada mantenida en congelación.....	242
8. DETERMINACION DE DIMETILAMINA Y TRIMETILAMINA POR CROMATOGRAFIA DE GASES.....	245
8.1. FUNDAMENTO Y DESARROLLO DEL METODO.....	245
8.1.1. Ensayos previos a la determinación de las condiciones finales.....	245
8.2. DESCRIPCION DEL METODO.....	247
8.2.1. Material y métodos.....	247
8.2.2. Preparación de la muestra.....	248
8.2.3. Determinación cromatográfica.....	249
8.2.4. Identificación de picos cromatográficos.....	249
8.2.5. Cuantificación.....	249
8.3. ESTUDIO DE LA VALIDEZ DEL METODO.....	252
8.3.2. Linealidad.....	252
8.3.2. Precisión.....	253
8.3.3. Exactitud-Precisión.....	255
8.3.4. Sensibilidad: límites de detección y de cuantificación.....	257

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

8. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS DURANTE EL ALMACENAMIENTO/DETERIORO DEL PESCADO.....	259
8.1. ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS Y OTROS PARAMETROS QUIMICOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO/DESCOMPOSICION DE BOQUERON.....	260
8.1.1. Planteamiento del estudio y toma de muestras.....	260
8.1.2. Evolución de los contenidos de aminas biógenas.....	261

8.1.2.1.	Contenidos iniciales y muestras de control...	261
8.1.2.2.	Evolución de los contenidos de aminas biógenas en boqueron mantenido a 8-10°C y 20±1°C.....	262
8.1.3.	Evolución de los contenidos de ATP y sus metabolitos.....	275
8.1.3.1.	Contenidos iniciales y en muestras control...	275
8.1.3.2.	Evolución de los contenidos de ATP y sus productos de degradación en boquerón mantenido a 8-10°C y a 20±1°C.....	276
8.1.4.	Evolución de los contenidos de trimetilamina, dimetilamina y del valor del pH.....	280
8.1.4.1.	Contenidos iniciales y en muestras control...	281
8.1.4.2.	Evolución de los contenidos de ATP y sus productos de degradación en boquerón mantenido a 8-10°C y a 20±1°C.....	282
8.2.	ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS, OTROS PARAMETROS QUIMICOS Y SU RELACION CON EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN EL ATUN.....	286
8.2.1	Planteamiento del estudio y toma de muestra.....	286
8.2.2.	Evolución de los contenidos de aminas biógenas.....	287
8.2.3.	Estudio comparativo de la formación de aminas biógenas y el crecimiento microbiológico a lo largo de la descomposición del atún.....	300
8.2.4.	Evolución de los contenidos de ATP y derivados.....	305
8.2.5.	Evolución de los contenidos de trimetilamina, dimetilamina y del valor del pH.....	311
9.	EVOLUCION DE LOS NIVELES DE AMINAS BIOGENAS, NUCLEOTIDOS Y DERIVADOS Y AMINAS VOLATILES EN MUESTRAS DE ATUN CONTAMINADAS CON DISTINTOS MICROORGANISMOS Y CONSERVADAS A 0°C, 8°C Y 20°C.....	316
9.1.	DISEÑO DEL ENSAYO Y MUESTRAS ESTUDIADAS.....	316
9.2.	EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS.....	317
9.2.1.	Evolución de los niveles de aminas biógenas en las muestras control.....	318
9.2.2.	Evolución de los niveles de aminas biógenas en muestras contaminadas con microorganismos de la especie <i>Plesiomonas shigllodes</i> .....	320
9.2.3.	Evolución de los niveles de aminas biógenas en muestras contaminadas con microorganismos de la especie <i>Serratia marcescens</i> .....	324
9.2.4.	Evolución de los niveles de aminas biógenas en muestras contaminadas con microorganismos de la especie <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	328
9.2.5.	Evolución de los niveles de aminas biógenas en muestras contaminadas con microorganismos de la especie <i>Proteus morgana</i> .....	332
9.2.6.	Resumen y consideraciones finales sobre la evolución de las aminas biógenas y de los microorganismos contaminantes.....	336
9.3.	EVOLUCION DE LOS NIVELES DE NUCLEOTIDOS Y DERIVADOS....	339
9.3.1.	Comportamiento de la serie control.....	340
9.3.2.	Comportamiento de las series contaminadas con microorganismos.....	343



9.3.3. Resumen y conclusiones finales en cuanto a los contenidos de nucleótidos y derivados.....	344
9.4. EVOLUCION DE LOS NIVELES DE DMA Y TMA.....	352
9.4.1. Comportamiento de la serie control.....	353
9.4.2. Comportamiento de las series contaminadas con microorganismos.....	354
10. ESTUDIO DE LA FORMACION DE AMINAS BIOGENAS EN EL PROCESO DE ELABORACION DE DERIVADOS DE PESCADO.....	359
10.1. AMINAS BIOGENAS EN EL PROCESO DE ELABORACION DE CONSERVAS DE ATUN.....	359
10.1.1. Evolución de los contenidos de aminas biógenas en las distintas etapas de elaboración de conservas de atún.....	362
10.1.2. Estudio comparativo de los niveles de aminas biógenas y el crecimiento microbiano y la evaluación organoléptica a lo largo del proceso de elaboración del atún.....	368
10.1.3. Evolución de ATP y sus compuestos de degradación durante el proceso de elaboración de conservas de atún.....	371
10.2 AMINAS BIOGENAS DURANTE LA ELABORACION DE SEMICONSERVAS DE ANCHOA.....	378
10.2.1. Diseño del ensayo y toma de muestras.....	378
10.2.2. Evolución de los contenidos de aminas biógenas a lo largo del proceso de elaboración de la "Anxova de l'Escala".....	381
10.2.3. Estudio comparativo de la evolución de los contenidos de aminas biógenas y los recuentos microbiológicos a lo largo de la elaboración de la "Anxova de l'Escala".....	400
10.2.4. Evolución del ATP y sus compuestos de degradación a lo largo del proceso de elaboración de la "Anxova de l'Escala".....	403
11. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS A LO LARGO DE LA VIDA COMERCIAL DE LA "ANXOVA DE L'ESCALA".....	408
11.1. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS A LO LARGO DEL PERIODO DE VIDA COMERCIAL DE ANCHOAS SALMUERADAS.....	410
11.2. ANCHOAS LIMPIAS EN ACEITE.....	419
11.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE AMINAS BIOGENAS Y LOS RECUEENTOS DE MICROORGANISMOS A LO LARGO DEL PERIODO DE VIDA COMERCIAL DE LA "ANXOVA DE L'ESCALA" ..	434
12. CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS EN PESCADOS.....	436
12.1. AMINAS BIOGENAS EN MUESTRAS DE PESCADO FRESCO.....	436
12.2. AMINAS BIOGENAS EN DERIVADOS DE PESCADO.....	444
12.3. CONTENIDOS DE ATP Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACION.....	450

<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	453
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	465
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	496

## **I. INTRODUCCION**

## **II. REVISION BIBLIOGRAFICA**

## 1. ESTRUCTURA DEL MUSCULO Y CAMBIOS POST-MORTEM EN EL PESCADO

(LUDORFF y MEYER, 1978; BURGESS y col, 1979; CHEFTEL, CHEFTEL, 1980, HUSS, 1980)

Las fibras musculares del pescado presentan una estructura interna semejante a la del músculo esquelético de los animales terrestres. Observadas al microscopio aparecen estriadas y en ellas se puede apreciar la disposición en sarcómeros.

Las fibras musculares están constituidas por miofibrillas y éstas a su vez, por filamentos contráctiles gruesos y delgados (miosina y actina), dispuestos solapadamente, siendo esta particular disposición la responsable de la estriación observada. Los espacios entre las miofibrillas encierran un medio acuoso denominado sarcoplasma, que incluye proteínas y algunas sustancias de peso molecular bajo. El conjunto está rodeado de una membrana denominada sarcolema.

Sin embargo, la disposición de las fibras musculares, a lo largo del cuerpo del pescado, es distinta a la de los animales terrestres, debido a su especial sistema de locomoción. Así, los peces carecen de extremidades unidas a la columna vertebral; las aletas torácicas y abdominales pares, que corresponden a las extremidades de los tetrápodos, se insertan directamente y sirven poco en la propulsión; son más bien órganos para mantener el equilibrio y la dirección en el agua. Las aletas dorsales y anales tienen también una función similar. El movimiento serpenteante de progresión del pez en el agua tiene lugar por contracción alternativa de sus músculos laterales derecho e izquierdo.

Las fibras musculares de los peces se agrupan en segmentos denominados miotomos, que tienen su origen en el desarrollo embrionario. El número de estos segmentos es independiente del tamaño del pez y el número de fibras es constante para cada especie (DYER, DINGLE, 1961).

Cada miotomo está constituido por un gran número de células musculares, situadas paralelamente y en sentido longitudinal. Estas células están insertadas por sus extremos en tejido conectivo e, igualmente, están envueltas por éste. Las fracciones de tejido que separan los miotomos longitudinalmente se denominan mioseptos y las que lo hacen transversalmente miocomatas.

Se pueden distinguir dos tipos de carne de pescado, denominadas clara y oscura o bien blanca y roja (aunque ambas sean en realidad rojas). El color se debe a la presencia de mioglobina, más abundante en el músculo oscuro. Por el contrario, en las fibras musculares claras se observa una mayor riqueza en sarcoplasma.

Las diferencias anatómicas entre los dos tipos de músculo se traducen también en diferencias fisiológicas. Las fibras rojas, bien irrigadas, son especialmente adecuadas para el metabolismo oxidativo (apropiado en casos de acción sostenida). Por el contrario, el músculo blanco es probablemente más adecuado para una actividad vigorosa durante

períodos de tiempo más cortos, puesto que su metabolismo es básicamente anaerobio (HULTING, 1982).

Los porcentajes de carne oscura y clara varían de una especie de pescado a otra. En arenques y caballa se alcanza hasta un 10% de carne oscura que se sitúa entre la piel y la carne blanca. En la familia de los gádidos (bacalao, abadejo...) y en otros pescados magros la proporción de músculo rojo es del 10% y se encuentra formando una capa muy delgada debajo de la piel.

Cuando se produce la muerte del pez, éste presenta unas características de estructura y composición distintas a las que presentará en el momento del consumo, debido a los cambios físicos y bioquímicos que tienen lugar durante este período de tiempo. Estos cambios pueden conducir también a la descomposición del pescado, si éste se almacena durante demasiado tiempo o si el almacenamiento se efectúa en condiciones deficientes.

Se puede considerar la siguiente secuencia de acontecimientos:

- a) instauración del "rigor mortis"
- b) inicio de la autoilisis
- c) desarrollo de microorganismos y cambios debidos a su actividad enzimática.

Tras la muerte la del pez, la interrupción de la circulación sanguínea priva al músculo del aporte de oxígeno, también cesa la eliminación del anhídrido carbónico y del resto de los metabolitos celulares. Con todo ello se instaura un desequilibrio que culmina con la aparición del "rigor mortis", o rigidez cadavérica, caracterizado por la ausencia del ATP necesario para permitir la separación de las proteínas contráctiles: actina y miosina. Se produce entonces una contracción similar a la fisiológica, pero en este caso irreversible.

Cuando se agotan las reservas de ATP (proceso acelerado por el forcejeo del pez durante su captura), para obtener más energía, las células, en ausencia de oxígeno, sólo pueden metabolizar la glucosa por la vía de la glucolisis anaerobia. El ácido láctico resultante no puede seguir la vía del ciclo de Krebs, por lo que se origina un descenso de pH debido al acumulo de éste ácido.

Si el pH desciende hasta el punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (cerca a 5.5), éstas se desnaturalizan y pierden su capacidad de retener agua, lo que origina cambios de textura. Esta disminución del pH es también responsable del cese de la glucolisis, por inhibición de los enzimas implicados en este proceso, incluso antes de que se agoten las reservas glucolíticas. Cuando cesa la glucolisis, no existen ya más posibilidades de obtención de ATP, con lo que se instaura el "rigor mortis".

En cuanto al tiempo de aparición del "rigor mortis", cabe recordar que dependerá fundamentalmente de las reservas de glucógeno que posea el pez al morir. Al respecto, se ha comprobado que hay variaciones estacionales, e incluso diarias, en el contenido de glucógeno independientemente de las provocadas por la lucha durante la captura.

Los cambios autolíticos que suceden tras la instauración del "rigor mortis" son, en principio, debidos únicamente a enzimas propios de la carne del pescado (que comparados con los existentes en el músculo de mamíferos muestran mayor actividad a bajas temperaturas, y menor estabilidad a las altas). La actividad autolítica es mayor en el músculo rojo que en el blanco, dentro de una misma especie de pescado.

Entre los cambios de los que es principalmente responsable la acción autolítica cabe citar:

- degradación de nucleótidos con la consiguiente aparición de nucleósidos: ribosa y bases púricas.
- aumento de aminoácidos libres debido a la proteólisis (posteriormente estos aminoácidos, podrán ser descarboxilados por la flora microbiana, siendo el origen de las aminas biógenas).
- en pescados marinos, aparición de dimetilamina y formaldehído, a partir del óxido de trimetilamina.

En cuanto a la proliferación bacteriana, cabe señalar que aunque el músculo de pescado vivo es estéril, existen microorganismos en la piel, agallas e intestinos. Cuando el pez está vivo, la piel constituye una barrera para la entrada de microorganismos y la flora bacteriana intestinal queda también aislada del resto del cuerpo por el peritoneo. Tras la captura, si el pescado es golpeado, debido a una mala manipulación, pueden producirse lesiones que aceleren la colonización bacteriana por parte de esa flora, que es la característica del pescado.

Por acción de los enzimas autolíticos de la carne del pescado se producen asimismo modificaciones, que permiten que la flora bacteriana, antes localizada en la superficie y en los intestinos, colonice también el tejido muscular, que por su parte ha empezado también a sufrir modificaciones debidas a la acción enzimática.

La invasión del pescado por parte de los microorganismos es relativamente fácil y rápida, ya que su carne contiene compuestos de bajo peso molecular, como dipéptidos y aminoácidos libres, que son rápidamente utilizados por las bacterias.

En una segunda fase, los microorganismos ejercerán también una acción proteolítica, liberando aminoácidos, que luego pueden ser descarboxilados por bacterias que poseen esta capacidad enzimática, originando las aminas biógenas, que serán objeto de estudio en esta memoria.

La fracción grasa del pescado también sufre procesos de deterioro que, evidentemente, serán menos importantes en pescados magros como el bacalao y el eglefino.

El elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados en el pescado implica una gran facilidad de enranciamiento. Los enlaces insaturados captan fácilmente oxígeno, viéndose favorecida esta captación en presencia de la luz, a temperaturas elevadas o en presencia de trazas de metales. Como consecuencia de la oxidación, los ácidos grasos se desdoblan formando compuestos de olor y sabor desagradables.



## 2. MÉTODOS DE EVALUACION DE LA FRESCURA DEL PESCADO

### 2.1. VALORACIÓN ORGANOLEPTICA

La valoración organoléptica es el método que el hombre clásicamente ha utilizado desde la antigüedad para aceptar o rechazar el pescado, o para asignarle un valor comercial. Este tipo de inspección presenta varias ventajas: no necesita equipos ni materiales especiales, es rápido y permite la valoración simultánea de varios parámetros en distintas muestras de pescado (BURGESS y col, 1979). Sin embargo, no está exenta tampoco de inconvenientes, el más importante de los cuales sea quizá, el que la valoración estará sujeta a las impresiones subjetivas del panel de calificadores. Para minimizar este efecto será necesaria la intervención de un número lo suficientemente elevado de calificadores, que dispongan de patrones de comparación establecidos previamente.

Además en el caso extremo en que se intente distinguir entre el llamado límite de frescura y el estado de alteración incipiente, se ha demostrado la necesidad de disponer de otras medidas objetivas de carácter físico y/o químico que permitan resolver este problema (GALLARDO y col, 1979).

Finalmente, debe matizarse que si bien éste tipo de valoración resulta ideal para calificar el pescado fresco, donde sólo en casos de duda sería necesario acudir a la determinación de otros parámetros, no sería aplicable en la evaluación de derivados de pescado, en los que la aplicación de tratamientos térmicos en su elaboración puede enmascarar olores, colores y sabores, fácilmente apreciables en el pescado alterado.

El precursor de los estudios para determinar la frescura del pescado mediante técnicas de valoración organoléptica fue Anderson, quién, en 1907, estableció las bases para este tipo de análisis (BURGESS y col., 1979). EHRENBURG y SHEWAN (1953) desarrollaron un esquema, con amplias bases estadísticas, para la valoración del pescado blanco, que constituyó la base de las actuales técnicas de valoración organoléptica del pescado.

Los distintos criterios utilizados para la valoración organoléptica del pescado siguen, en general, dos tipos de pautas, que vendrían representados por:

- a) el indicado en el Reglamento de la CEE nº103/76, basado en el método organoléptico cifrado francés y,
- b) la pauta esquema establecida por la Torry Station de amplio uso en el Reino Unido.

Ambos sistemas clasifican el pescado destinado al consumo humano en tres categorías:

- **E**, para pescado muy fresco,
- **A**, para pescado menos fresco, pero sin contaminación bacteriana y,
- **B**, para pescado que presenta contaminación bacteriana pero todavía apto para el consumo humano.

Se establece además un cuarto estado, **C**, que no es una verdadera categoría, para aquel pescado no apto para el consumo humano, el cual debe ser decomisado y destruido de modo que se asegure que no sea comercializado de nuevo (HOWGATE, 1986). La inclusión del pescado en una de estas categorías se realiza en función de un valor numérico, obtenido tras la inspección organoléptica siguiendo alguno de los esquemas citados anteriormente.

La directiva de la CEE, por ejemplo, establece que a cada parámetro estudiado se la asignará una puntuación de 0 a 3, siendo 3 el máximo grado de frescura. Las puntuaciones se suman y el total se divide por el número de características estudiadas, obteniéndose así un valor medio de puntuación. Así, se establece la clasificación siguiente:

<u>Categoría</u>	<u>Puntuación</u>
E	> 2.7
A	2 - 2.7
B	1 - 2
C	< 1

En la tabla 1 se especifican a modo de ejemplo las características y la puntuación asignada según la legislación española vigente al respecto (REAL DECRETO 1437/1992), que sigue el mismo criterio que la citada directiva de la CEE.

Según el esquema de la Torry Station deben estudiarse tanto características organolépticas sobre el pescado fresco crudo (aparición de los ojos y de la carne, olor y textura), como sobre el pescado cocido en las condiciones descritas por el protocolo analítico. Este esquema asigna dos tipos de puntuaciones dependiendo del parámetro estudiado. Una escala de 1 a 10 para el olor, el flavor o el gusto y otra de 1 a 5 para la valoración del aspecto visual o el tacto. De este modo, una puntuación de 5 indicaría que se trata de un pescado poco fresco en el caso del estudio del primer grupo de características, mientras que en base a las características del 2º grupo, se trataría de un pescado de categoría excelente. La lista de características a estudiar es muy amplia y, en ocasiones, sólo se aplica comercialmente para la evaluación del olor del pescado crudo y cocido, siendo especialmente discriminante el olor de las agallas (HOWATE, 1986)

Los esquemas generales de valoración organoléptica pueden ser modificados para que se adapten más exactamente a la evaluación de una determinada especie de pescado. Así, RODRÍGUEZ y col. (1991) modificaron el esquema de la directiva de la CEE de modo que se ajusta mejor a la sardina. Igualmente, HOLLINGWORTH y THORM (1983) utilizaron la clasificación organoléptica, con una escala numérica de 1 a 3, establecida por la FDA para evaluar el salmón.

Tabla 1. Criterios de valoración organoléptica del pescado según las normas de la CEE y la legislación española. (I)

CARACTERÍSTICAS A EXAMINAR	ASPECTO DEL PESCADO Y CRITERIOS DE PUNTUACIÓN			
	3	2	1	0
PIEL	Pigmentación viva y tornasolada, sin decoloración. Mucus acuoso y transparente.	Pigmentación viva pero sin lustre. Mucus ligeramente turbio.	Pigmentación en trance de decoloración y marchita. Mucus lechoso.	Pigmentación marchita. Mucus opaco.
OJOS	Convexos (abombados) Córnea transparente. Pupila negra y brillante.	Convexos y ligeramente aplastados, córnea ligeramente opalescente y pupila negra y marchita.	Aplastados o planos, córnea opalescente y pupila opaca.	Cóncavos (en el centro), córnea lechosa y pupila gris.
BRANQUIAS	Color brillante, sin mucus.	Menos coloreadas, tramas ligeras de mucus.	Decolorándose, mucus opaco	Amarillentas, mucus lechoso.
CARNE (corte en el abdomen)	Azulada, translúcida, lisa y brillante. Sin ningún cambio de coloración original.	Aterciopelada, cerúlea y apagada. Color ligeramente modificado.	Ligeramente opaca.	Opaca
COLOR de la columna vertebral	Sin coloración	Ligeramente rosa.	Rosa	Roja
ÓRGANOS	Riñones y residuos de otros órganos, rojo brillante, así como la sangre en el interior de la aorta.	Riñones y residuos de otros órganos rojo mate. Sangre decolorándose.	Riñones, residuos de otros órganos y sangre, rojo pálido.	Riñones, residuos de otros órganos y sangre, amarillado

Tabla 1. Criterios de valoración organoléptica del pescadosegún las normas de la CEE y la legislación española. (II)

CARACTERÍSTICA A EXAMINAR	ESTADO DEL PESCADO Y PUNTUACIÓN ASIGNADA			
	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
CARNE	Firme y elástica. Superficie lisa.	Elasticidad disminuida.	Ligeramente blanda (relajada), elasticidad disminuida. Superficie cerosa (aterciopelada) y marchita.	Blanda (floja). Escamas desprendiéndose fácilmente de la piel. Superficie granulosa.
COLUMNA VERTEBRAL	Se rompe en lugar de separarse.	Adherente	Poco adherente.	No adherente.
PERITONEO	Adherente totalmente a la carne.	Adherente.	Poco adherente.	No adherente.
	OLOR DEL PESCADO Y PUNTUACIÓN ASIGNADA			
	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
BRANQUIAS PIEL CAVIDAD ABDOMINAL	Alga marina	Ni de alga ni malo.	Ligeramente agrio.	Agrio.

## 2.2. MÉTODOS FÍSICOS

Presentan la ventaja de su sencillez y rápida aplicación, que les hace especialmente útiles en el caso de análisis rutinarios. En contrapartida, la información que proporcionan es a menudo limitada, por lo que se utilizan sobre todo como complemento de la inspección visual del pescado fresco.

### 2.2.1. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA ELÉCTRICA DE LA CARNE DEL PESCADO

Ha sido ampliamente estudiada la existencia de una correlación entre la disminución de la resistencia eléctrica, medida sobre el pescado, y la pérdida de frescura del mismo. Las modificaciones físico-químicas que se producen tras la muerte del pescado conducen a una desorganización de las proteínas del músculo, a un aumento de la proporción de compuestos de bajo peso molecular y al consiguiente aumento de conductividad eléctrica a través del mismo. Debe tenerse en cuenta, a la hora de evaluar un resultado obtenido mediante éste método, que las abrasiones de la piel, el lavado o el mero hecho de agarrar firmemente el pescado, pueden dar lugar a lecturas más bajas que nos llevarían a un juicio equivocado.

Las mediciones de la resistencia eléctrica sobre la carne del pescado son de gran rapidez y pueden efectuarse sin que se deteriore el producto a examinar. Se han desarrollado medidores de resistencia, especialmente adaptados para medidas sobre el músculo del pescado, que se distribuyen comercialmente bajo distintos nombres.

El medidor de Hennings, o FISH-TESTER, efectúa lecturas sobre una escala de 1 a 100, informando además, con valores marginales a la escala, sobre los días de reserva que pueden mantenerse en hielo los principales peces de consumo. En función del valor obtenido, WITTOFGEL y SCHELEGEL (1965) clasifican el pescado en categorías similares a las que se establecen según clasificación efectuada tras la valoración organoléptica:

LECTURA	CATEGORÍA
> 40	S o Extra
30 - 40	A
20 - 30	B
< 20	C

El TORRYMETER (JASON y LEE, 1971) utiliza una escala de 1 a 14 y se acompaña de unas tablas en las que figuran los valores límite aceptables para las distintas especies de pescado en que ha sido estudiado.

En ambos casos debe tenerse en cuenta la temperatura a la que se realiza la lectura conductimétrica y efectuar la corrección correspondiente si se aleja mucho de la de referencia (LUDORFF y MEYER, 1979)

### 2.2.2. MEDIDAS OBJETIVAS DE LAS VARIACIONES OBSERVADAS EN LOS OJOS DEL PESCADO

Tras la muerte del pescado, los medios transparentes del ojo aparecen claros y netamente limitados. A medida que avanza el deterioro, se origina una desecación que cursa con enturbiamiento de los líquidos oculares. La sustancia líquida, espesada por la desecación, presenta ante un rayo de luz que la atraviesa un índice de refracción distinto al que presenta el líquido del animal recién muerto. Se ha demostrado una correlación entre esta variación en el índice de refracción y el grado de deterioro del pescado (KIETZEMANN y col., 1964), obteniéndose así una medida numérica más objetiva que la simple observación ocular del análisis organoléptico. El uso de éste método queda sin embargo limitado a los pescados de carácter eminentemente magro, puesto en que los grasos existe una fluctuación muy amplia en los índices de refracción de referencia (LUDORFF y MEYER, 1978).

Como objeto de examen se puede utilizar tanto el líquido de la cámara anterior como el de la posterior del ojo. Se extrae con ayuda de una jeringa y la gota obtenida se deposita en un refractómetro de Abbe para efectuar la medición.

Del mismo modo que la valoración organoléptica, este tipo de examen sólo es aplicable en el pescado fresco. Los tratamientos necesarios para la obtención de derivados de pescado, incluso los más sencillos, provocan por acción mecánica, física o química profundas modificaciones que invalidarían los resultados obtenidos.

WITTOGEL en 1959 propuso la medida de la intensidad del enturbiamiento del cristalino. Se trata de un método semejante al que se acaba de comentar y que presentaría sus mismas ventajas y limitaciones.

### 2.2.3. MEDIDA DE LA RIGIDEZ CADAVÉRICA

En las primeras horas tras la muerte del pescado se desencadenan una serie de transformaciones que desembocan en el "rigor mortis" o rigidez cadavérica. En esta etapa, el músculo se halla contraído debido al establecimiento de una unión irreversible entre los filamentos de actina y los de miosina, tras haberse agotado las reservas de ATP. Con el tiempo el músculo sufre un reblandecimiento, debido a la acción de enzimas musculares capaces de desorganizar la línea Z, material proteico que mantiene unidas las moléculas de actina en el interior de la fibra muscular.

La duración de la etapa pre-rigor depende de las condiciones fisiológicas del pescado antes de la muerte. Cuanto mayor sea la fatiga que sufra éste en el proceso de captura, mas corta será esta etapa. El tiempo que tarda en establecerse el rigor mortis, así como su duración, dependen también de la especie de pescado considerada y de la temperatura a que se mantenga el pescado durante todo este tiempo.

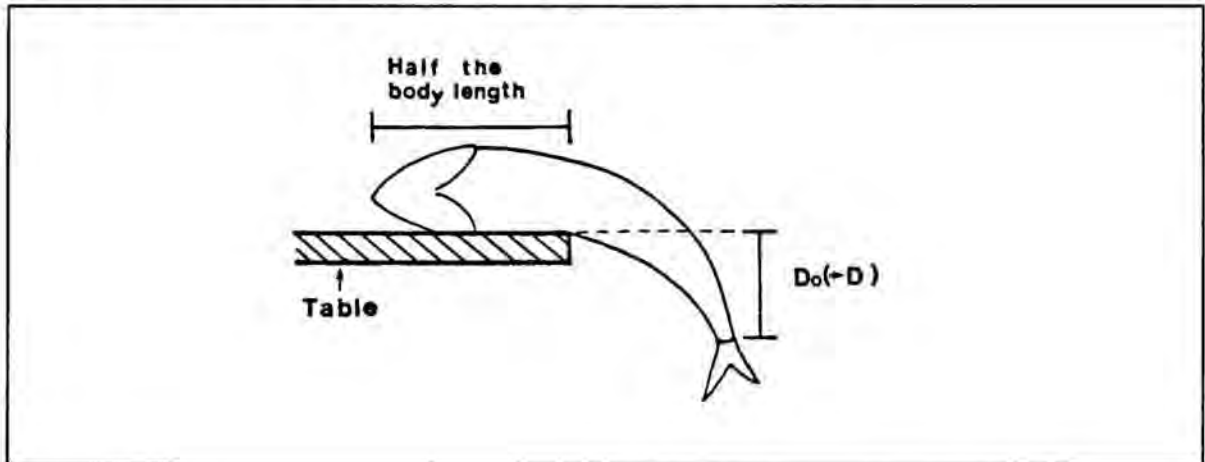
Existen diversas técnicas encaminadas a conocer en cuál de las etapas se encuentra el pescado: a) pre-rigor, b) rigor-mortis y c) post-rigor. Cutting en 1939 describía un método visual para determinar en qué etapa del establecimiento o resolución del rigor mortis se encontraba el pescado entero. Con posterioridad se han venido aplicando diversas modificaciones de esta técnica. Así, BITO y col (1983) proponen una valoración objetiva basada en el índice obtenido tras la aplicación de la fórmula siguiente:

$$INDICE \text{ de } RIGOR (\%) = \frac{D_0 - D}{D_0} \times 100$$



El pescado entero se coloca sobre una tabla horizontal, apoyando la mitad correspondiente a la cabeza, tal como se indica en la figura 1. Se miden las distancias  $D_0$  al inicio del experimento y  $D$  después de transcurrido un determinado período de tiempo.

Figura 1. Determinación del índice de rigor (BITO i col, 1983)



#### 2.2.4 DETERMINACIÓN DEL pH

Como parámetro para evaluar la frescura del pescado, presenta la ventaja de la mayoría de los métodos físicos, es decir, obtención rápida de resultados y la posibilidad de ser aplicado "en cualquier lugar" (no es necesario el laboratorio, puesto que el dispositivo de lectura puede ser trasladado con facilidad)(LUDORFF y MEYER, 1978).

El pH de la carne del pescado fresco es de alrededor de 6 unidades, aunque varía ligeramente según la especie de pescado (FRASER y col., 1968). Estos valores son más altos que en la carne de animales superiores, puesto que su contenido en glucógeno es escaso y el descenso de pH que se produce por el establecimiento de la glucólisis anaerobia, tras la muerte del pescado resulta menos importante. De todos modos, cabe citar que es posible disminuir el pH final inyectando al pescado, antes de la muerte, ciertas sustancias como la adrenalina (HULTING, 1980).

Los valores de pH aumentan lentamente durante el almacenamiento. Cerca del límite, por encima del cual el pescado deja de ser comestible, se alcanzan valores de aproximadamente 6.8 unidades. Valores superiores corresponderían a pescados en fase de descomposición y/o putrefacción.

Aunque se trata de una medida física, la variación del pH es un reflejo de los cambios químicos que se desarrollan tras la muerte del pescado. El descenso inicial, con respecto al pH fisiológico, se debe a la acumulación de ácido láctico, producto final de la glucólisis anaeróbica. Su posterior aumento puede ser reflejo de varias transformaciones, las más importantes de las cuales se citan a continuación:

- la descomposición del óxido de trimetilamina (OTMA) por parte de microorganismos o por los enzimas del propio pescado, y
- la formación de  $\text{NH}_3$  a partir de urea, en los peces cartilagosos, o por la desaminación de aminoácidos.

Sin embargo, resulta difícil relacionar un determinado valor puntual del pH con el grado de frescura, ya que el pH final que se alcanza tras la muerte del pescado depende

de las reservas glucolíticas en este momento, lo cual es muy variable, ya que dependerá del estado nutricional del pescado y del tipo de captura empleada. Si es útil, por el contrario, observar su evolución en estudios de descomposición e, igualmente, se ha estudiado la correlación existente entre el valor de pH y la puntuación asignada al pescado mediante valoración organoléptica. Es necesario, no obstante, realizar estudios para cada especie, puesto que los valores de pH no son extrapolables (PALANCA y PABLOS, 1987).

La determinación del pH se puede realizar directamente sobre el pescado triturado y homogeneizado, aunque es más aconsejable su dilución con H<sub>2</sub>O destilada, en el caso de que la muestra resulte muy heterogénea o esté excesivamente seca. En peces grandes, la determinación puede efectuarse también, después de levantar la piel con un bisturí, mediante la aplicación de un electrodo de punción (LUDORFF y MEYER, 1979). Además de la lectura directa mediante un electrodo, se han descrito otros métodos alternativos para medir el pH en el músculo (BAGER y PETERSON, 1983; SOLOMON, 1987), aunque su uso he quedado de momento bastante restringido frente a la sencillez del método tradicional.

## 2.3 INDICES QUIMICOS

El pescado por sus características de estructura y composición y por su elevada actividad de agua, es un alimento que se deteriora con facilidad. Aunque las modificaciones que ocurren durante la alteración son complejas, es posible relacionar de modo general los cambios químicos con la pérdida de frescura del pescado que se aprecia organolepticamente.

En una primera fase, los cambios químicos se deben fundamentalmente a la acción de los propios enzimas del pescado (establecimiento y resolución del rigor mortis...). Más tarde, cuando la flora bacteriana superficial e intestinal coloniza el músculo que inicialmente era estéril. Esta flora es la principal responsable de las modificaciones químicas. Por ello, no es sorprendente que se haya intentado relacionar la aparición determinados compuestos químicos con la actividad tanto de los enzimas del propio pescado como de la flora bacteriana contaminante.

Puesto que la pérdida de frescura y la alteración del pescado conllevan una serie de modificaciones químicas complejas y dado que la mayoría de los métodos de evaluación química implican la medida de una sola sustancia o de varias pertenecientes a la misma familia, ninguno de éstos métodos proporciona una idea global, como la obtenida mediante la valoración organoléptica. Por ello, se considera mejor la determinación de más de uno de estos parámetros. Aunque la idea obtenida tras la aplicación de este tipo de pruebas no sea tan global como la de la evaluación organoleptica, resultará siempre mucho más objetiva. Además, algunas de ellas son aplicables a derivados de pescado, en los que tras la aplicación de tratamientos tecnológicos, los sabores, colores y olores, base de la evaluación organoléptica, pueden ser modificados.

A continuación se describirá el fundamento de distintos criterios químicos aplicables, cuya correlación con la valoración organoléptica ha sido ampliamente probada. Así, posible establecer la siguiente clasificación:

- a) Métodos relacionados con cambios en el nitrógeno básico no proteico.
- b) Métodos basados en la degradación del ATP.
- c) Métodos relacionados con modificaciones de la fracción lipídica.

Además, en algunos casos se han descrito otros índices cuya aplicación estará restringida a determinados grupos o especies de pescado. Así por ejemplo, la determinación de  $\text{NH}_3$  encaminada fundamentalmente a evaluar el grado de deterioro de los peces teleósteos, en los que se forman importantes cantidades de este compuesto por la acción que ejercen los microorganismos al descomponer la urea (HUSS, 1988).

La determinación del **indol**, producto de degradación del triptofano, se usa como alternativa a la evaluación sensorial del cangrejo. Aunque no se conoce la cinética exacta de su formación, está generalmente aceptado que el indol se produce en el cangrejo a causa de una acción bacteriana previa a la congelación o a otros tipos de procesos aplicados en la obtención de derivados de este producto (CHANG y col, 1983 ; AOAC, 1990)

También se ha propuesto el contenido en **etanol** como índice químico para la evaluación del pescado, puesto que parece relacionarse con el flavor y la aceptabilidad del pescado por parte de los consumidores. Así, GROSGROVE (1978), HOLLINGWORTH y THROM (1983) y HOLLINGWORTH y col (1986) proponen su determinación para evaluar la calidad del salmón enlatado. KHAYAT (1979) lo proponía en evaluación de conservas de atún y IIDA y col. (1981a y b) lo proponen para diversas conservas de pescado.

HUMAN y KHAYAT (1981) proponen un nuevo índice en el que además del etanol se tienen en cuenta otros compuestos volátiles según la siguiente expresión:

$$IQ = \frac{\text{Etanol} + \text{Propanol} + \text{butanol}}{1\text{-penten-3-ol} + \text{hexanal}}$$

Según el valor de esta índice establecen una clasificación del pescado en distintas categorías:

- **Clase I:** valores inferiores a 0,1, que se corresponderían al pescado inmediatamente después de su captura
- **Clase II:** también denominada clase comercial, con valores de este índice que se sitúan entre 0,1 y 0,7
- **Clase III:** pescado que debe ser rechazado, con valores de este índice entre 1 y 6.

### 2.3.1 MÉTODOS RELACIONADOS CON EL NITRÓGENO BÁSICO NO PROTEICO.

La fracción nitrogenada no soluble es mucho más importante cuantitativamente en el pescado que en la carne de los animales de abasto y su composición cualitativa se ve modificada a lo largo de los complejos cambios que sufre al pescado tras la muerte.

#### 2.3.1.1 AMINOÁCIDOS LIBRES TOTALES

Parece evidente que a medida que avanza el proceso de descomposición del pescado, aumenta también la fracción aminoacídica libre, debido al efecto de enzimas con actividad proteolítica. Estas enzimas se encuentran en muchos de los tejidos del pescado y cuando abandonan sus compartimentos celulares pueden causar un proceso generalizado de solubilización de proteínas. Este proceso de autólisis se manifiesta primero como un aumento del contenido líquido en el abdomen, seguido del "belly-bursting" o estallido del abdomen. Almacenamientos muy prolongados pueden llevar a situaciones de total solubilización del pescado.

Como resultado de este proceso autolítico se incrementan los niveles de péptidos y de aminoácidos libres (SHEMAN y JONES, 1957). El pescado autolizado es un buen medio para el desarrollo de microorganismos, que a su vez también contienen enzimas proteolíticas (KARNOP, 1976; HUSS, 1988). Como consecuencia del crecimiento bacteriano puede observarse también, en fases posteriores, un descenso del contenido de aminoácidos libres, cuya transformación puede dar lugar a metabolitos con posibles efectos tóxicos (aminas biógenas) cuando este pescado se consume como alimento (KLAUSEN y LUND, 1986)

El origen de los enzimas autolíticos es diverso. Puede tratarse de proteasas intestinales, del estómago, del músculo del pescado, o bien pueden ser enzimas de origen bacteriano. AKSNES (1988) en un estudio realizado sobre capelina (*Mallotus villosus*), concluye que la mayor parte de la actividad proteolítica parece proceder de los enzimas intestinales, aunque no descarta la participación bacteriana que vendría a representar entre un 20 y un 38% del total. Este mismo autor (AKSNES, 1989) cita que el hecho de que en verano exista un mayor contenido de proteasas intestinales explica, junto con el hecho de que se den temperaturas ambientales mayores, el rápido desarrollo de la flora bacteriana en esta época, pues debido a la intensa proteólisis pronto, se desarrolla un medio adecuado para su desarrollo. En este mismo trabajo propone el uso de un inhibidor de proteasas, extraído de la patata, para alargar la durabilidad del pescado, comprobando que en pescados así tratados se mantiene una proporción más alta de aminoácidos esenciales y se forman menores cantidades de aminas biógenas, compuestos que aparecen como consecuencia de la actividad bacteriana.

### 2.3.1.2 AMINAS BIÓGENAS

Las aminas biógenas son bases orgánicas de bajo peso molecular, que pueden aparecer en animales, plantas o microorganismos como consecuencia de procesos metabólicos (RICE y col., 1976; LUTEN y BOUQUET, 1992).

Se acepta que el origen de las aminas biógenas en pescado, excepto aquellas cuya presencia podría considerarse fisiológica (espermina y espermidina), es fruto de la actividad aminoácido descarboxilasa que presentan algunos microorganismos. Por ello, su determinación ha sido propuesta como reflejo del deterioro del pescado. La determinación de estos compuestos presenta un doble interés

- su utilidad como indicadores del estado higiénico - sanitario del pescado que, debido a su carácter termoestable, podría extenderse a la evaluación de derivados de pescado cuya elaboración conlleve tratamientos térmicos
- la necesidad de vigilar los contenidos de algunos de estos compuestos, ya que han sido descritos problemas toxicológicos relacionados con el consumo de pescados que los contenían en cantidades elevadas.

El interés de la determinación de este tipo de sustancias, su origen, los factores que influyen en su formación, así como una revisión de los métodos analíticos propuestos para su determinación se desarrollan en el apartado 5 de esta memoria.

### 2.3.1.3. NITRÓGENO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL.

Como resultado del deterioro del pescado se forman una serie de compuestos nitrogenados básicos de carácter volátil, que se determinan globalmente en base a su contenido en nitrógeno (HUIDOBRO y TEJADA, 1990). La determinación del nitrógeno básico volátil fue una de las primeras pruebas químicas aplicadas a la evaluación del pescado.

En pescados elasmobranquios de hábitat marino, el principal componente de esta fracción, cuando el pescado se descompone, es la Trimetilamina (PEREZ-VILLAREAL y HOWATE, 1987), originada por una reducción bacteriana del óxido de trimetilamina, mientras que en los teleósteos es el  $\text{NH}_3$  formado por descomposición de la urea componente mayoritario de esta fracción (HUSS, 1988).

El hecho de que con éste índice se determine más de una sustancia, puede hacer creer que tiene una gran validez como índice indicativo de la descomposición del pescado. Sin embargo, ello no es correcto puesto que algunos de los compuestos formados sólo se originan en estados muy avanzados del proceso degradativo (BURGESS y col, 1979). A pesar de ello, el contenido de nitrógeno básico volátil total se correlaciona bien con el grado de aceptación organoléptica y es una prueba que aún hoy se aplica en ensayos de rutina, debido a su sencillez y a su bajo coste económico (CONNELL y SHEWAN, 1980).

Se han sugerido diversas cifras de Nitrógeno básico volátil relacionadas con la calidad de pescado. Así, BILLON y col. (1979) clasifican el pescado en función de ésta criterio, estableciendo tres categorías:

- **Clase I**, nitrógeno básico volátil total inferior a 30 mg/100g
- **Clase II**, nitrógeno básico volátil entre 30 y 40 mg/100g
- **Clase III**, no apta para el consumo humano, y con un contenido de nitrógeno básico volátil superior a 40 mg/100g

EL CENTRO DE INSPECCIÓN Y COMERCIO EXTERIOR (1986) sugiere unas cifras para el rechazo del pescado, en función de sus niveles de nitrógeno básico volátil, que varían según el tipo de pescado considerado:

- **pescado fresco**: 50-70 mg/100g para los escualos y sólo de 23-30 en el resto de las especies
- **ahumados y salazones**: hasta 80 mg/100g
- **conservas**: buena calidad 40-50 mg/100g, corrientes 50-60 mg/100g y mediocres 60-70 mg/100g
- **Crutáceos**: buena calidad hasta 30 mg/100g, corrientes 30-40 mg/100g y mediocres 40-60 mg/100g.

También otros autores citan valores superiores para productos derivados de pescado. GALLARDO y col (1984) proponen un límite de 48 mg/100g para conservas de atún, que se justificada por el aumento de la fracción básica volátil debida a la aplicación de tratamientos térmicos. MALLE y BILLON (1983) sugieren la cifra de 60 mg/100g como límite para la comercialización de los arenques salados, cifra superior a los 30 mg/100g propuesta por la orden francesa de 21 de diciembre de 1979 para pescado fresco.



Para la determinación del nitrógeno básico volátil se emplean dos tipos de métodos:

- a) Métodos basados en una destilación
- b) Métodos basados en una microdifusión

#### a) Métodos basados una la destilación

Son los de uso más extendido y se basan en la destilación de los compuestos básicos volátiles en medio alcalino, para que de este modo queden retenidos los aldehídos, las cetonas o los alcoholes de carácter también volátil. El destilado se recoge sobre agua o sobre un ácido y se determina el contenido en nitrógeno mediante una valoración volumétrica. El resultado se expresa como Nitrógeno básico volátil total.

El la tabla 2 se muestran, de modo resumido, las condiciones de destilación del método original propuesto por LÜCKE y GEIDEL (1935) y sus posteriores modificaciones (GALLARDO y col., 1978, BILLON y col, 1979).

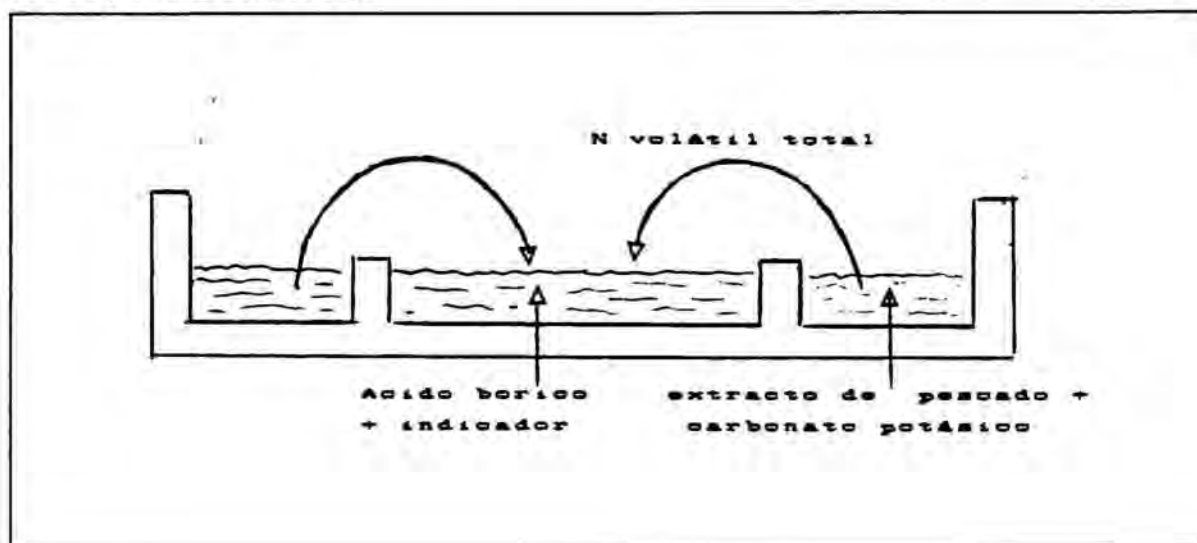
Tabla 2 Métodos empleados para la determinación del Nitrógeno básico volátil total.

<u>MÉTODO</u>	MATERIA A DESTILAR	MEDIO ALCALINIZANTE	OBSERVACIONES
LÜCKE y GEIDEL (1935)	músculo de pescado	MgO	-----
ANTONACOPOULOS (1960)	músculo de pescado	MgO	destilación en corriente de vapor
HILLING (1958)	Extracto acuoso	Ca(OH) <sub>2</sub>	-----
FAO/OMS (1968)	Extracto TCA	NaOH	-----
PEARSON y MUSLEMUDDIN (1968)	músculo de pescado	MgO	destilación a 50°C y a presión reducida
BILLON y col. (1979)	extracto TCA	NaOH	-----
GALLARDO Y MONTEMAYOR (1979)	extracto TCA	MgO	destilación 10 minutos y recogida sobre ácido bórico

### b) Métodos basados en la microdifusión

Se basa en la adición de carbonato potásico a un extracto de jugo de pescado desproteinizado, situado en una de los compartimentos de la célula de Conway (figura 2). Con ello se libera el nitrógeno volátil, que se recoge sobre la disolución de ácido bórico que se encuentra en el compartimento continuo de la célula.

Figura 2. Método de microdifusión de Conway para la estimación de L. Nitrógeno Básico volátil (PEARSON, 1986).



La microdifusión presenta la ventaja de poder trabajar a temperaturas relativamente bajas (37-45°C), con lo que se minimiza cualquier posible efecto de hidrólisis de proteínas y la subsiguiente liberación de  $\text{NH}_3$ . El inconveniente de éste método radica fundamentalmente en su larga duración, ya que son necesarias al menos 12 horas para que se produzca totalmente la difusión, por ello no es una técnica útil en análisis rutinarios (GALLARDO, 1979).

#### 2.3.1.4 OXIDO DE TRIMETILAMINA y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACIÓN

El óxido de trimetilamina (OTMA) es un compuesto que se encuentra como componente natural en los pescados marinos. A medida que avanza la descomposición del pescado, este compuesto es reducido a trimetilamina (TMA), principal responsable del "olor desagradable del pescado" por los enzimas bacterianos.

El contenido de TMA se correlaciona bien con la valoración organoléptica del pescado, por lo que ha sido propuesto como índice químico en la evaluación objetiva de pescado fresco.

En aquellos casos en los que el desarrollo bacteriano se encuentra dificultado, a partir del OTMA se puede formar dimetilamina y formaldehído en cantidades equimoleculares, por acción de enzimas del propio pescado, este fenómeno es importante en los pescados pertenecientes a la familia de los gádidos (bacalao, abadejo, rosada, merluza...) que poseen una elevada actividad del enzima responsable de esta transformación (HUSS, 1988).

La dimetilamina (DMA) ha sido propuesta como índice de calidad para pescado, congelado pero su uso se limitaría a aquellas especies en las que la actividad OTMA-desmetilasa que la origina fuese alta (GALLARDO Y MONTEMAYOR, 1982).

La dimetilamina no influye especialmente en los cambios observados en el pescado mantenido en congelación durante períodos de tiempo largos, pero si lo hace el formaldehído. Este compuesto parece estar relacionado con cambios, que a veces pueden resultar muy evidentes, y que llevan incluso al rechazo por parte de los consumidores. El formaldehído es un compuesto muy reactivo que interacciona con facilidad con las proteínas, esta circunstancia dificulta su determinación analítica y, salvo excepciones, se determina indirectamente cuantificando la DMA presente (CASTEL y col., 1973).

La principal limitación del uso de los metabolitos del OTMA para la evaluación química del pescado estriba en que este compuesto, cuya función fisiológica parece estar relacionada con los procesos de osmorregulación, no está presente o lo hace en cantidades despreciables, en los pescados de agua dulce. Además, se han descrito variaciones en función de la especie, estación del año y del propio individuo (BURGESS, 1979). El uso de TMA y DMA como índices para evaluar la calidad del pescado, así como sus ventajas y limitaciones, se estudiara más extensamente en el capítulo 3 de esta memoria.

### 2.3.2. INDICES RELACIONADOS CON LA DEGRADACIÓN DEL ATP.

Estos índices están relacionados con los cambios que sufre el pescado, inmediatamente después de su muerte, antes de que su músculo sea colonizado y transformado por la flora bacteriana intestinal y superficial. En el período que sigue a la muerte del pescado, tras la captura, se originan una serie de cambios que culminan en la etapa del "Rigor-mortis" y su posterior reblandecimiento. La causa inicial de estos cambios es el agotamiento del ATP y otros compuestos fosforilados.

En condiciones fisiológicas, el ATP se regenera a partir del ADP con la incorporación de fósforo inorgánico. Tras la muerte del pescado, el pH desciende debido al establecimiento de la glucólisis anaeróbica y a esta disminución del pH inhive al enzima responsable de regenerar el ATP (BELITZ y GROSCH, 1988). En estas circunstancias se inicia una secuencia degradativa, mediada por los propios enzimas musculares, que tiene como producto final la producción de hipoxantina (JONES y MURRAY, 1962).

El estudio de la determinación y del interés de estos compuestos, cuya principal ventaja estriba en que permiten una evaluación precoz de los cambios sucedidos en el pescado tras la muerte, se aborda de modo más extenso en el capítulo 4 de esta memoria.

### 2.3.3. INDICES BASADOS EN LAS MODIFICACIONES DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA.

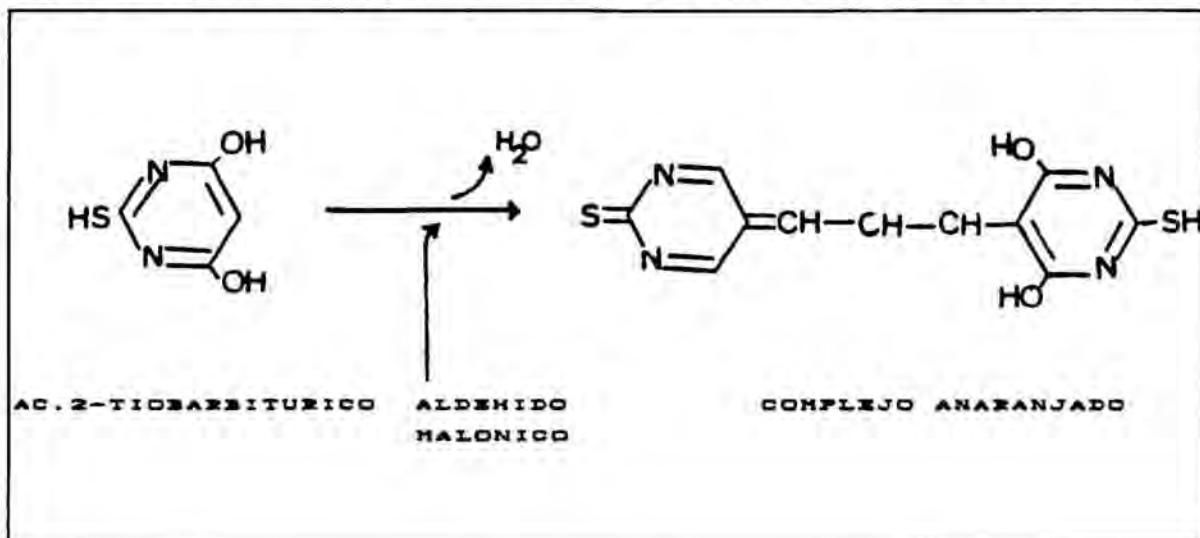
Estos índices presentan poca importancia para la evaluación del pescado fresco, ya que éste debe considerarse no apto para el consumo, debido a la proliferación bacteriana, mucho antes de que las modificaciones de la fracción lipídica empiecen a hacerse evidentes. Si son útiles en cambio, en la evaluación de la calidad del pescado mantenido en congelación, ya que en estas condiciones se consigue inhibir el desarrollo bacteriano pero no se evitan totalmente las modificaciones químicas debidas a los enzimas del propio pescado.

#### 2.3.3.1. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO 2-TIOBARBITURICO

La determinación del ácido 2-tiobarbitúrico se ha utilizado como índice de calidad en el caso de pescados grasos, puesto que se trata de una medida de rancidez; se basa en el hecho de que el ácido 2-tiobarbitúrico, en determinadas condiciones se combina con el aldehído malónico, producto de autoxidación de los lípidos altamente insaturados. Mediante esta reacción se origina un complejo de coloración anaranjada, cuya intensidad se lee espectrofotométricamente a 530 nm. El mecanismo de la reacción según SINNHUBER y YU (1977) se muestra en la figura 3.

Se debe tener en cuenta, sin embargo, que en el caso de peces marinos, que contiene OTMA, el formaldehído originado a partir de él, reacciona también con el ácido 2-tiobarbitúrico, aumentando el valor obtenido en la determinación de este índice (ALMANDROS y col, 1986).

Figura 3. Mecanismo de reacción del ácido 2-tiobarbitúrico con el aldehído malónico.



### 2.3.3.2. DETERMINACIÓN DEL INDICE DE PEROXIDOS

Es también una medida de la rancidez de las grasas. Será también junto con la determinación del ácido 2-tiobarbitúrico un índice para determinar la calidad de los pescados grasos (EGAN y col., 1987).

HAN y LISTON (1987) estudianron las condiciones de actuación de las fosfolipasas a temperaturas bajas y su posterior relación con la formación de hidroperóxidos y peróxidos en los lípidos del pescado. JOSEPHSON y col. (1987) ensayaron diversos compuestos para ser usados como inhibidores de la acción enzimática, que desemboca en la oxidación de los lípidos en el pescado congelado.

Existe una norma U.N.E. para esta determinación (UNE 55022) y en ella el índice de peróxidos se define como:

"...los miligramos de oxígeno activo, contenidos en un kilogramo de materia ensayada, calculados a partir del yodo liberado del yoduro potásico, operando en las condiciones que se indican en la metódica".

Para la determinación del índice de peróxidos es necesaria una extracción previa de la grasa del pescado con cloroformo. Al extracto clorofórmico obtenido se le adiciona ácido acético glacial y solución de yoduro potásico. El yodo liberado por la acción oxidativa de los peróxidos se valora posteriormente con solución de tiosulfato de normalidad conocida.

### 3. PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL ÓXIDO DE TRIMETILAMINA

El óxido de trimetilamina (OTMA) es un componente de la fracción nitrogenada no proteica, que fue identificado por primera vez en 1909 por SUWA en un pescado de la familia de los escualos (SIMIDU, 1961). Este compuesto, presente en cantidades variables según la especie de pescado de que se trate, sufre modificaciones post-mortem que originan la aparición de dos derivados:

- Trimetilamina (TMA), que se origina por la acción de enzimas bacterianos.
- Dimetilamina (DMA), originada por la actividad de enzimas propios del pescado.

Ambos mecanismos de transformación compiten por el mismo sustrato, y la aparición de cantidades importantes de DMA sólo es posible en aquellos casos en que el crecimiento bacteriano se encuentra inhibido por alguna razón, como sucede por ejemplo en la conservación del pescado en congelación (HUSS, 1988). Así, mientras la determinación de trimetilamina puede tener utilidad como índice de calidad higiénico-sanitaria del pescado mantenido en hielo o en refrigeración, la dimetilamina se utiliza fundamentalmente en productos congelados.

Ambos índices, como la mayoría de los parámetros químicos utilizados en la evaluación objetiva de la calidad del pescado, presentan las limitaciones derivadas de la variabilidad de contenidos entre especies. En este caso, esta variabilidad empieza ya a nivel de los contenidos del precursor, OTMA.

El OTMA, fisiológicamente parece tener importancia en los procesos de osmorregulación. Ello explica que sus contenidos sean siempre mucho mayores en los pescados de agua salada que en los de agua dulce. En los primeros la concentración varía entre 1 y 100 mg/100g, mientras que en pescados de agua dulce sólo se alcanzan los 5-20 mg/100g (STANSBY y OLCOTT, 1963). El hecho de que tanto en anfibios como en mamíferos marinos también exista OTMA y el que no se detecte en animales terrestres, apoya la hipótesis de que intervenga en los procesos de osmorregulación.

Aunque la función osmorreguladora del OTMA es la hipótesis más aceptada, en peces elasmobranquios (de esqueleto óseo) se han propuesto otras posibles funciones de este compuesto (HUSS, 1988):

- a) que se trate simplemente de un residuo, siendo la forma no tóxica de la TMA;
- b) que tenga función anticongelante
- c) que no presente ninguna función específica y sea sólo fruto de la acumulación de una sustancia presente en la alimentación.

En los peces cartilaginosos el contenido de OTMA es siempre muy elevado, no inferior al 2.5% de su peso seco. En ellos este compuesto además de intervenir en los procesos de osmorregulación tendría un importante papel metabólico, puesto que se combina con los excesos de amoníaco que se formen a partir de la urea en este tipo de peces, probablemente a través de un mecanismo de transmetilación y oxidación realizados en el hígado y, en algunas especies, en la musculatura oscura (SIMIDU, W., 1961).

En la tabla 3 se indican los contenidos de OTMA descritos por diversos autores en distintas **especies** de pescado.

Además de las diferencias entre especies, se han descrito variaciones en el contenido de OTMA entre individuos pertenecientes a la misma especie pero con distinto **habitat**. En este caso, las diferencias podrían atribuirse a la distinta composición del plancton marino que sirve de alimento a los peces (mientras el fitoplancton no contiene OTMA, si se detecta este compuesto en el zooplancton). Los microorganismos perteneciente a este segundo tipo de plancton poseen un enzima que oxida la TMA a OTMA. La TMA se encuentra en las plantas marinas junto con otras aminos metiladas (monometil- y dimetilamina).

Experiencias realizadas alimentando artificialmente a peces demuestran que el OTMA es de origen exógeno y depende de su presencia en la dieta. A pesar de este probado carácter exógeno del OTMA, AGUSTSSOM y STROM (1981) demostraron que algunas especies de pescado son capaces de sintetizarlo, aunque esta vía resultará siempre muy minoritaria frente al aporte a través de la dieta.

La presencia de este compuesto en los alimentos no es el único factor que influye en los niveles alcanzados en el pescado. Así, sometiendo a una misma dieta a peces de agua salada y de agua dulce, se observa que en los primeros se acumula gran cantidad de OTMA (alrededor de 120 mg/100g) que queda retenido en los tejidos durante largo tiempo, mientras que en los segundos se alcanzan niveles mucho menores y se eliminan mas rápidamente (SIMIDU, 1961).

Tabla 3. Contenidos de OTMA descritos en la bibliografía para diversas especies de pescado

REFERENCIA	CONTENIDO	ESPECIE
DYER, 1959	70 mg/100g 95 mg/100g 70 mg/100g 120 mg/100g	Abadejo Bacalao Eglefino Merluza
STANSBY y OLCOTT, (1963)	1-100 mg/100g 5-20 mg/100g	peces marinos peces de agua dulce
PARKIN y HULTIN, (1982)	10.5 mmol/100g	Locha
BABBIT y col. (1984)	57 mg/100g	Abadejo de Alaska
HIRANO y col. (1987)	104 mg/100g 284 mg/100g	Patudo Halibut
SIMPSON y HAARD (1986)	415 mg/100	Bacalao
BABBIT y col. (1987)	61 mg/100g	Abadejo de Alaska
SUZUKI y col. (1987)	48.1-110 mg/100g	Patudo
REBHEIN (1988)	61.1mmol/Kg 61.8mmol/Kg 44.9mmol/Kg 19.7mmol/Kg 14.4mmol/Kg 40.8mmol/Kg	Bacalao Merluza Merlan Eglefino Caballa Arenque
CHIOU y col. (1990)	2-11mg/100g 54 mg/100g	<i>Chanos chanos</i> <i>Orechomis aureus</i>
GALLARDO y col. (1991)	105.3 mg/100g 89.5 mg /100g 77.9 mg/100g	Merluza Pescadilla Rosada
WEKEL y BARNETT, (1991)	5.13-14.33 $\mu$ mol/g 61.7-70.1 $\mu$ mol/g	Atún Abadejo de Alaska



CHIOU y col. (1990) describen diferencias en el contenido en OTMA entre la parte dorsal y ventral de un mismo espécimen de pescado, perteneciente a la especie *Chanus chanus*, que presentaba un nivel de 2mg/100g en la musculatura dorsal mientras que en la ventral se alcanzaban los 11 mg/100g.

Se han descrito también **variaciones estacionales** y la existencia de una correlación positiva entre el contenido de OTMA y la **edad** del pescado (SIMIDU, 1961; HUSS, 1988). En pescados como el salmón, cuyo ciclo vital incluye una parte de la vida en agua dulce y otra en agua salada, la diferencia de contenidos en los diferentes períodos de su ciclo vital es considerable. Así, ya en 1931, COOK describía contenidos de 0-4.5 mg/100g en individuos jóvenes, cuyo hábitat son las aguas dulces, y de hasta 50-60 mg/100g en el músculo de la misma especie pero en su hábitat marino.

Además de como precursor de TMA y DMA, la determinación del OTMA adquiere especial interés en la elaboración de conservas de pescado, puesto que se considera el mejor índice predictivo para la detección del "verdeado". El "verdeado" es un término usado en la industria del atún para referirse a un defecto no tóxico que aparece esporádicamente en las conservas de este tipo de pescado (BABBIT y col., 1977). Este defecto se ha descrito en diversas especies de atún, pero se hace más evidente en las conservas elaboradas a partir de albacora (*Thunnus albacora*), puesto que su carne es más clara. La aparición de este defecto es debida a una reacción redox que sucede durante el calentamiento y en la que se ven implicados el OTMA, el átomo de hierro de la mioglobina y un resto de cisteína de esta proteína.

### 3.1. TRIMETILAMINA

#### 3.1.1 ORIGEN Y RELACIÓN CON LAS MODIFICACIONES DE LA FLORA BACTERIANA TRAS LA MUERTE DEL PESCADO.

(SHEWAN, 1961; STANIER y col, 1984; HUSS, 1988)

La trimetilamina (TMA) es un compuesto que no se encuentra en el pescado vivo y que se forma en el pescado a medida que éste se deteriora por acción bacteriana.

Tras la muerte, la flora bacteriana inicial de los pescados de aguas templadas está compuesta, en su mayor parte, por bacilos aerobios, anaerobios facultativos, psicrófilos, gram-negativos de los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* y *Vibrio*. En pescados tropicales predominan bacterias de tipo

gram-positivo, como *Micrococcus* y *Bacillus*. La flora del pescado de agua dulce es algo diferente, existe presencia de *Aeromonas*, no descrita en peces marinos, aunque son también dominantes los bacilos gram-negativos psicotróficos descritos en los peces de mares templados (HUSS, 1988).

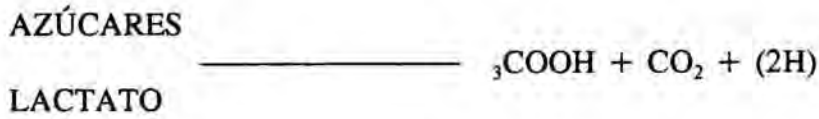
Después de una fase de demora, cuya duración depende principalmente de la temperatura, la flora bacteriana superficial entra en crecimiento exponencial y, bajo condiciones aerobias, se alcanzan recuentos de  $10^8$ - $10^9$ /g de carne o  $\text{cm}^2$ . A bajas temperaturas, el aumento del número de microorganismos va acompañado de un cambio cualitativo en la flora y, en pescados de agua de mar *Pseudomonas* y *Alteromonas* llegan a ser los géneros dominantes independientemente de la composición inicial de la flora. En condiciones anaerobias o con baja tensión de oxígeno (envasado el vacío o almacenamiento en agua de mar enfriada) se observan recuentos muy bajos ( $10^6$ , semejantes a los iniciales). Sin embargo, en la composición de la flora ocurren cambios considerables a medida que las condiciones van siendo más favorables para los anaerobios facultativos, microorganismos capaces de utilizar el OTMA u otros compuestos oxidados del pescado como aceptores finales de electrones en lugar del oxígeno.

En todas las formas de vida, la obtención de energía proviene de la oxidación de los sustratos. Los procesos oxidativos implican una transferencia de electrones liberados por un agente oxidante, y en el medio fisiológico están catalizados por enzimas. El crecimiento bacteriano se inicia en el pescado bajo condiciones aerobias; por ello, los primeros microorganismos que proliferan son aerobios y utilizan los hidratos de carbono y el lactato como sustratos dadores de energía, el oxígeno como agente oxidante y con la formación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  como productos finales.

En cierto modo, el crecimiento de los microorganismos aerobios origina la formación de microclimas anaerobios en la superficie del pescado. Bajo estas condiciones de escasez de oxígeno, las bacterias anaerobias facultativas se ven favorecidas. Sin embargo, la presencia de OTMA permite el desarrollo de aquellas bacterias que son capaces de reducirla aún siendo muchas ellas de carácter no fermentativo, es decir aerobio obligado.

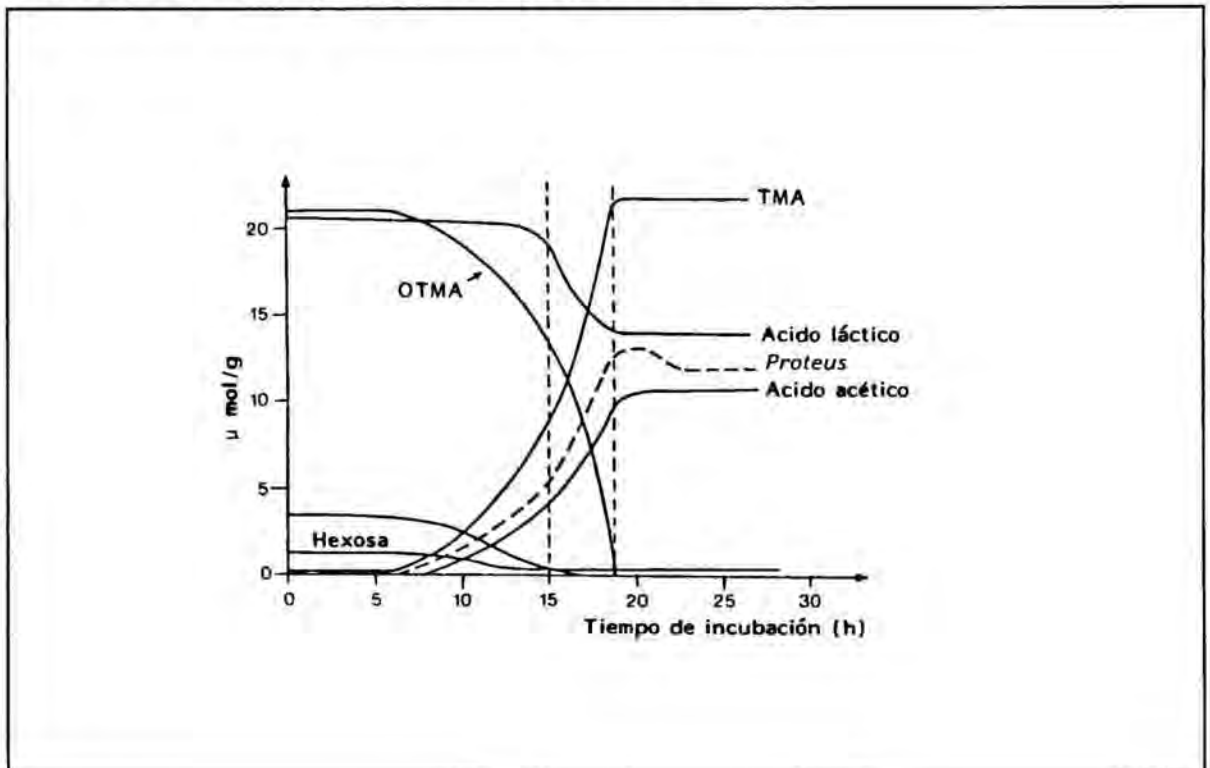
Los mecanismos de reducción del OTMA han sido estudiados, tanto en bacterias anaeróbicas facultativas (SAKAGUCHI, 1980; STEMBERG y col., 1982) como para microorganismos no fermentativos (EASTER y col., 1983; RINGO y col., 1984).

En los microorganismos anaerobios facultativos, como *Proteus* sp o *E. coli*, en condiciones de anoxia, se establece una respiración basada fundamentalmente en procesos fermentativos, siguiendo el mecanismo que se indica a continuación:



OLAFSEN y col. (1971) demostraron que *Proteus* sp. sólo utilizaba como substrato el lactato cuando existía OTMA (Figura 4).

Figura 4. Cambios químicos observados en extractos de arenque durante el crecimiento anaerobio de *Proteus* sp. (OLAFSEN y col., 1971).



SAKAGUCHI y col. (1980) indican en *Escherichia coli* la actividad OTMA reductasa se encuentra ligada a los citocromos del retículo sarcoplasmático.

Los principales responsables del deterioro del pescado de agua salada, cuando éste se mantiene en refrigeración, son los microorganismos pertenecientes a la especie *Alteromonas putrefaciens*, que a pesar de ser un microorganismo no fermentativo es capaz de proliferar en el ambiente anaerobio creado por su capacidad de reducir el OTMA (JORGENSEN y HUSS, 1989)

SHAMSHAD y col. (1990) evaluaron la capacidad OTMA -reductasa de 560 cepas aisladas de la flora del cangrejo a distintas temperaturas. Todas las cepas pertenecientes a los géneros *Alteromonas*, *Vibrio* y la mayoría de las *Pseudomonas* del Grupo III eran capaces de reducir el OTMA; mientras que las pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* del Grupo II no presentaban esta capacidad. En general, esta actividad aumentaba con la temperatura y con el tiempo de almacenamiento. Esto último sugiere la presencia de procesos inductivos, estudiados en parte por EASTER y col. (1983) sobre cepas de *Alteromonas* sp.

Además de la actividad OTMA- reductasa, ligada a los enzimas bacterianos, también se ha detectado esta misma actividad, aunque en cantidades muy bajas, en el sistema digestivo y en el tejido renal del pescado. Esta actividad, derivada de enzimas del propio pescado podría adquirir cierta importancia en el almacenamiento de productos picados a baja temperatura, cuando el crecimiento bacteriano se encontrara inhibido.

Puede además formarse TMA por descomposición térmica del OTMA, sin que en este caso intervenga ningún enzima, ni bacteriano ni del propio pescado. Ello es frecuente en la elaboración de derivados de pescado que conlleven tratamientos térmicos mas o menos intensos. Se han descrito aumentos de trimetilamina en la elaboración de conservas de atún (GALLARDO y col., 1988) y con la aplicación de temperaturas inferiores a 100°C como en el caso del ahumado del pescado (BELTRAN, 1990).

### 3.1.2. EVOLUCIÓN DE LOS CONTENIDOS DE TMA A LO LARGO DEL ALMACENAMIENTO/DESCOMPOSICIÓN DEL PESCADO.

La trimetilamina es el compuesto responsable del olor desagradable que adquiere el pescado a medida que avanza su deterioro. Existen numerosos trabajos que estudian el grado de correlación existente entre el contenido de TMA y el rechazo organoléptico de diversas especies de pescado (SHEWAN y EHRENBERG, 1957; BETHEA y HILLING, 1965; BALDINI, 1982; JHAVERI y col., 1982, FERNANDEZ-SALGUERO y MACKIE, 1987; PÉREZ-VILLAREAL y HOWGATE, 1987; WONG y GILL, 1987; WONG y col., 1988). Sin embargo, MALLE y POUMEROL (1989) describen una mejor correlación entre la valoración organoléptica y le relación NBVT/TMA (Nitrógeno básico volátil total/Nitrógeno de TMA).

Los niveles de TMA aumentan tras un período de latencia siguiendo una curva de tipo exponencial, que se ajusta a la del crecimiento de microorganismos. En general, los contenidos de TMA aparecen altamente correlacionados con los recuentos totales de microorganismos (WONG y GILL, 1987; WONG y col., 1988).

Se han efectuado estudios en los que se ha determinado la formación de TMA a lo largo del tiempo de almacenamiento del pescado. En general, a temperaturas superiores se alcanzan valores más altos de este compuesto (SMITH y col., 1980; BABBITT y col., 1987; SIMPSON y HAARD, 1987; COGUL-ARDEVOL, 1988; VECIANA-NOGUÉS, 1989; BENAIGES-BENAIGES, 1990).

JO y col. (1988) y OKA y col. (1989) determinaron el contenido de TMA en pescado mantenido en refrigeración y envasado en distintas atmósferas, concluyendo que la utilización del vacío o de atmósferas modificadas, como el CO<sub>2</sub> o el N<sub>2</sub>, disminuye la formación de este compuesto y retarda el rechazo por parte del consumidor.

JEONG y PARK (1983) y MIN y col (1988) determinanor TMA a lo largo del proceso de elaboración de salazones de pescado y observaron que a pesar de que en estas condiciones se encuentra muy limitado el crecimiento bacteriano la formación de TMA es superior a la de DMA.

### 3.3.3. TMA COMO ÍNDICE PARA EVALUAR DEL ESTADO HIGIENICO - SANITARIO DEL PESCADO

La determinación de TMA ha sido propuesta por numerosos autores como un método para evaluar de modo objetivo la calidad higiénico sanitaria del pescado de aguas saladas (DYER, 1949; CASTELL, 1973).

Las limitaciones de su uso se basan fundamentalmente en que no proporciona información acerca de los cambios autolíticos que suceden en el pescado, en la etapa previa a la colonización bacteriana del músculo, y en la variabilidad de sus contenidos cuando se consideran distintas especies. A pesar de ello, durante mucho tiempo fue una determinación analítica ampliamente extendida en aquellos casos en que la valoración organoléptica pudiera resultar dudosa.

Como muestra de la variabilidad de contenidos de este compuesto, en la tabla 4 se señalan valores descritos por algunos autores en pescados y derivados.

tabla 4. Contenidos de TMA descritos en la bibliografía para pescados y derivados.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	CONTENIDO	TIPO DE PESCADO
BETHEA y HILLIG (1965)	1.4-78.0mg/100g 1.9-34.8mg/100g	Bacalao congelado Abadejo congelado
BABBIT y col (1984)	0.20 mg/100g	Abadejo de Alaska
LEBLANC y col. (1987)	ND	Filetes de bacalao fresco
MALLE y TAO (1987)	5.10-51.24	Distintas especies de pescado fresco
TESKEREDZIC y PFEIFER (1987)	1-1.53 mg/100g	Trucha arco iris
GALLARDO y col. (1988)	0.67-0.85mg/100g 2.21-2.95mg/100g 2.09-3.59mg/100g	Albacora fresca Albacora cocida Albacora en conserva
PALKIN y HULTING (1988)	0.09-5.20mmol/100g	Patudo
SHAMSHAD y col. (1990)	3.8 mg/100g	Cangrejo
BENAIGES-BENAIGES (1990)		Sardina fresca
GALLARDO y col. (1991)	0.04-0.12 mg/100g	Merluza y Rosada congeladas
WEKEL y BARNETT (1991)	0.40-0.72 $\mu$ mol/g 0.50-1.20 $\mu$ mol/g	Atún fresco Abadejo de Alaska

Aunque es difícil señalar un valor límite de TMA, por encima del cual el pescado pueda considerarse no apto para el consumo, debido a la multitud de factores que pueden influir en su contenido, es posible utilizar los niveles de este compuesto químico como índice de evaluación objetivo, si se toman en cada caso las consideraciones oportunas. Así, será necesario establecer límites distintos en función de la especie de pescado. La cifra de 10 mg/100 propuesta por DYER y DYER en 1949 para pescados de la familia de los gádidos sigue todavía vigente (CASTELL, 1973). SHAMSHAD y col. (1990) proponen una cantidad inferior, 5 mg/100g para cangrejo, como también es inferior el límite

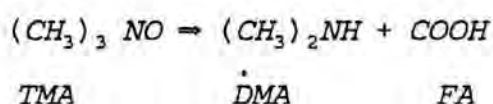
sugerido por TESKEREDZIC y PFEIFER (1987) en trucha arco iris. GALLARDO y col. (1988), teniendo en cuenta que se forma TMA a causa de los tratamientos térmicos, proponen establecer un límite superior para evaluar la calidad de las materias primas empleadas en la elaboración de conservas de atún.

Aunque para evitar el efecto de la variabilidad estacional y entre especies se recomienda la determinación de la relación OTMA/TMA (FAO, 1969), el uso de este índice no está muy extendido.

## 3.2. DIMETILAMINA

### 3.2.1. ORIGEN DE LA DIMETILAMINA EN PESCADO.

La dimetilamina se origina en algunos de los pescados en que existe su precursor OTMA las que el crecimiento de microorganismos, responsable de su conversión en TMA, se encuentra inhibido. La transformación del OTMA en DMA se produce a través de una reacción mediada por un enzima desmetilasa.



En los seres vivos la desmetilación es un importante mecanismo de destoxificación y esta actividad enzimática se sitúa preferentemente en el sistema microsomal hepático (PARKIN y HULTIN, 1987). Sin embargo, en algunos pescados la actividad enzimática capaz de desmetilar el OTMA ha sido descrita también en riñón y en las fibras musculares (REHBEIN, 1988). Esta actividad es de carácter termoestable y es más importante en las vísceras que en el músculo y dentro de el es mayor en la musculatura oscura que en la clara (CASTELL y col., 1971).

PARKIN y HULTIN (1987) estudiaron el mecanismo enzimático que origina la DMA en locha (*Urophycis chuss*), describiendo la participación de una hemoproteína asociada a la membrana en los ribosomas de las fibras musculares. Ello explicaría que en la musculatura oscura se formen mayores cantidades de DMA.

No en todos los pescados se forma DMA, de hecho este fenómeno ha sido fundamentalmente descrito en elasmobranchios, en teleosteos pertenecientes a la familia de los gádidos y en crustáceos. CASTELL y col. (1971) estudiaron la formación de DMA en 9 especies de pescado y solo la observaron en los pertenecientes a la familia de los gádidos. HSIEN en un estudio comparativo entre merluza y perca solo observó formación de este compuesto en el primero, perteneciente también a esta familia. Igualmente RAGNARSON y REGENSTEIN (1989), en un estudio sobre la pérdida de funcionalidad de proteínas ligada a la aparición de DMA y formaldehído, observaron que este proceso se verificaba fundamentalmente en los gádidos.

Dentro de la familia de los gádidos se ha descrito una actividad enzimática distinta en función de la especie (CASTELL y col., 1971). Incluso entre especies de pescado muy semejantes se observan estas diferencias. Así, GALLARDO y col. (1991) describen una mayor actividad formadora de DMA en merluzas (*Merluccius australis* y *Merluccius capensis*) que en rosada (*Xiphirus capensis*).



Además de la formación de DMA por vía enzimática, también se ha descrito la formación estrictamente química (SPINELLI y COURI, 1979) e incluso, se ha señalado que, la adición de algunos compuestos químicos acelera o retrasa su formación. Así, PARKIN y HULTIN (1987) provocan la formación de este compuesto en muestras exentas del enzima mediante la adición de ácido ascórbico. Igualmente, GALLARDO y col. (1988) describen la formación de DMA por efecto del tratamiento térmico en la elaboración de conservas de atún, destacando que debería prestarse atención a estos contenidos debido a la posibilidad del riesgo de formación de nitrosaminas. Sin embargo, estos mismos autores (GALLARDO, 1992) reconocen que este riesgo es remoto y que dado el caso igualmente deberían controlarse otros compuestos, ya que todos los grupos amino secundarios y terciarios son susceptibles de formar nitrosaminas cuando reaccionan con los nitritos.

### 3.2.2. FORMACIÓN DE DMA DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL PESCADO.

Ya en los años 40, numerosos autores describían la producción de DMA en el músculo de algunas especies de pescado mantenidas en hielo (CASTELL, 1971).

La formación de DMA se ha descrito fundamentalmente en pescado congelado, aunque también puede formarse durante el secado del pescado y su posterior almacenamiento (HUSS, 1988). Así, MIN y col. (1988) observan como durante el proceso de obtención del "Gulbi", un derivado seco-salado, se incrementan los niveles tanto de TMA como de DMA y que este aumento se hace más considerable durante el almacenamiento del producto.

Existen numerosos estudios en los que se determinan los contenidos de DMA a lo largo del tiempo de almacenamiento a temperaturas inferiores a 0°C. CASTEL y col. (1970) describen la formación de este compuesto en filetes de bacalao mantenidos a -5 y -16°C, mientras que no aparece en las muestras mantenidas a -26°C. La ausencia de DMA en pescado congelado mantenido a muy baja temperatura ha sido también comprobada por otros autores (BABBITT y col., 1977; LEBLANCH y col., 1988).

LEBLANCH y col. (1988), en filetes de bacalao congelados, observan que la formación de DMA es menor cuanto más extrema es la temperatura de congelación y que la misma se ve estimulada por las fluctuaciones de temperatura, frecuentes a veces en los procesos industriales.

BABBITT y col. (1984 y 1987), en abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) mantenido en congelación, observaron que el proceso de picado favorece la formación de DMA, mientras que no observaron diferencias en cuanto al contenido de este compuesto entre el pescado congelado entero y el fileteado. En algunos casos se ha descrito que el simple hecho de la retirada de espinas y vísceras puede aumentar la formación de DMA, ello sería atribuible fundamentalmente al poco cuidado con que se realizan estas operaciones.

BOER y FENNEMA (1989) estudian también la formación de DMA en abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*), picado y mantenido a  $-10^{\circ}\text{C}$ , y observan que el mezclado previo a la congelación que conlleva la incorporación de oxígeno atmosférico, parece inhibir la actividad OTMA- desmetilasa. También SANTOS y REGENSTEIN (1990) concluyen que la presencia de oxígeno aumenta la durabilidad de la merluza congelada.

TEJADA y CARECHE (1988) estudian el efecto de distintas temperaturas de conservación de productos congelados en músculo de merluza picado y envasado al vacío, condiciones que favorecen la formación de DMA, y nuevamente observan que la formación de este compuesto es siempre mayor cuanto más alta es la temperatura de conservación.

Dado que los contenidos de DMA son muy bajos en pescado fresco y que su aparición refleja en algún modo el tiempo transcurrido y las posibles roturas de la cadena de frío, su determinación ha sido propuesta como un método objetivo de evaluación del pescado congelado (CASTEL y col., 1971; GALLARDO y col., 1988; LEBLANC y col., 1988; RUIZ-MARTÍNEZ y col., 1988). Esta valoración será, sin embargo, solo aplicable en aquellas especies de pescado que poseyendo cantidades apreciables del precursor OTMA, presenten también una actividad desmetilasa importante. De otro modo, los cambios en el contenido de DMA a lo largo de tiempo de almacenamiento en congelación resultan casi despreciables. Así, JIMENEZ COLMENERO y col. (1988) estudian los cambios en el nivel de DMA en merluza y en sardina congeladas y en este segundo caso proponen seguir las modificaciones que sufre la fracción grasa en lugar de determinar la DMA.

En la tabla 5 se indican los contenidos de DMA descritos en la bibliografía para diversas especies de pescado.

Tabla 5. Contenidos de N-DMA descritos en la bibliografía en distintos pescados y derivados.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	CONTENIDO	TIPO DE PESCADO
PARKIN y HULTIN (1982)	0.04-1.14 mmol/100g 0.14-1.72 mmol/100g	Locha recién capturada Filetes de locha
GALLARDO y col. (1984)	0.40-0.62 mg/100g	Albacora
BABBITT y col. (1987)	0.83 mg/100g	Abadejo de Alaska
LEBLANC y col. (1987)	0.1 mg/100g	Filetes de bacalao fresco
RUIZ-MARTÍNEZ y col. (1988)	0.3-3.31 mmol/100g 0.21-7.13mmol/100g	Merluza fresca Merluza congelada
GALLARDO y col. (1991)	0.18-2.67 mg/100g	Merluzas y Rosadas congeladas

### 3.2.3. DESMETILACIÓN DEL OTMA Y MODIFICACIONES EN LA TEXTURA DEL PESCADO CONGELADO

En el pescado congelado es frecuente la aparición de cambios en la textura, con respecto al pescado fresco, debidos fundamentalmente a la agregación y desnaturalización parcial de las proteínas. Los factores que pueden desencadenar este proceso son diversos (BOER y FENNEMA, 1989):

- cambios de concentración salina en el agua líquida debidos a la formación de cristales de hielo
- cambios en los lípidos, que además propician las interacciones lípido proteína
- actividad del enzima OTMA-desmetilasa

Parece clara la relación entre actividades altas del enzima OTMA desmetilasa y el endurecimiento del pescado congelado. El formaldehído que se forma equimolecularmente con la DMA a partir del OTMA es altamente reactivo y es capaz de interactuar con las proteínas favoreciendo su agregación y la pérdida de su capacidad de retención de agua.

La mayoría de los autores sostienen la tesis de que el formaldehído interactúa con las proteínas miofibrilares, fundamentalmente la troponina y miosina. Sin embargo, RODGER (1979) sostiene que este compuesto también interactúa con las proteínas sarcoplasmáticas o solubles.

La cada día más importante producción de pescado congelado y la preocupación de que los cambios acaecidos durante el mantenimiento del pescado en congelación puedan producir rechazos por parte de los consumidores, han estimulado los estudios encaminados a conocer el mecanismo exacto de estas transformaciones, cuáles son los compuestos implicados y cuál es el modo de evitarlos.

Se han propuesto distintos mecanismos para la agregación de proteínas:

- la formación de uniones covalentes de tipo puente disulfuro
- aparición de interacciones entre los grupos hidrófobos, orientados hacia el interior de las proteínas cuando éstas se hallan en estado nativo, tras una desnaturalización parcial provocada por alguna otra causa

- formación de puentes de hidrógeno

OWUSU-ANSAH y HULTIN (1987) concluyen que la mayoría de las interacciones que desembocan en el endurecimiento de la locha (*Urophycis Chuss*) son de tipo hidrófobo y son pocos los puentes disulfuro que se forman. Señalan también que no todo el efecto de endurecimiento es debido a la interacción proteína-formaldehído, sino que se produce también cierta desnaturalización debida a los efectos de concentración salina.

La presencia de compuestos solubles de bajo peso molecular parece ejercer un cierto efecto protector frente al endurecimiento, ya que evitan las interacciones proteína-proteína (OWOSU-ANSAH y HULTIN, 1984). Por ello, resultarán especialmente sensibles a este tipo de transformaciones las preparaciones de pescado que sufren lavados, intensos que pueden retirar estos compuestos.

También los cristales de hielo, cuando son muy pequeños, se colocan de manera ordenada entre las miofibrillas dificultando así su agregación (BOER y FENNEMA 1989).

Así, al igual que la presencia de oxígeno parece inhibir la formación de DMA, también se ha ensayado la adición de productos químicos que dificulten este proceso, como el citrato sódico o el peróxido de hidrógeno (KRUEGER y FENNEMA, 1989).

### 3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DIMETILAMINA Y TRIMETILAMINA.

#### 3.3.1 MÉTODOS CLÁSICOS.

Clásicamente la determinación de **dimetilamina (DMA)** en pescados se efectúa por el método de DYER y MOUNSEY (1945). Se trata de una modificación de la técnica colorimétrica propuesta por DOWDEN (1938), para la determinación de este compuesto en tejidos biológicos. Se basa en el hecho de que la DMA forma un complejo cúprico coloreado en presencia de sulfuro de carbono y en medio amoniacal. Este complejo, extraíble con un disolvente orgánico, presenta una intensidad de coloración proporcional a la concentración de DMA. La reacción es específica para aminas secundarias, de modo que no se producen interferencias por la presencia de aminas primarias o terciarias. Por ello, durante mucho tiempo no se consideró como la técnica de elección para la determinación de este compuesto, antes de la aplicación de la cromatografía de gases.

Se han descrito una gran variedad de métodos para la determinación cuantitativa de la **trimetilamina(TMA)**, pero la mayoría de los métodos clásicos son mucho menos específicos que los utilizados en la determinación de la dimetilamina(DMA) (LUMDSTROM y RACICOT, 1983).

El primer método aplicado en la determinación de la Trimetilamina fue el de BEATTY y GIBSONS (1937), basado en la microdifusión de Conway. Al jugo de pescado se le añade formaldehído antes de la adición de alcalí. El formaldehído reacciona con las mono- y las di-metilaminas originando un compuesto no volátil (Figura 5). Pero, aún así, no es posible eliminar totalmente la interferencia de la DMA y de otras sustancias volátiles de carácter básico. De hecho, el método de Conway se utiliza para la determinación del nitrógeno básico volátil total y sólo sería aplicable a la trimetilamina asumiendo que la mayoría de la fracción volátil corresponde a este compuesto, tal como indican PEREZ-VILLARREAL y HOWATE (1987). Este supuesto no siempre es asumible, sólo lo sería en el caso de que el pescado se hubiese mantenido en unas condiciones que favorecieran la formación mayoritaria de TMA.

MALLE y TAO (1983) proponen un método con fundamento similar, pero en el que la separación de la TMA y su posterior recogida sobre ácido, para la valoración final, se efectúa, no mediante difusión, sino con una destilación. Esta técnica, aunque presente las mismas desventajas, en cuanto a la especificidad que el método de Beatty y Gibson resulta mucho más rápida en su ejecución.

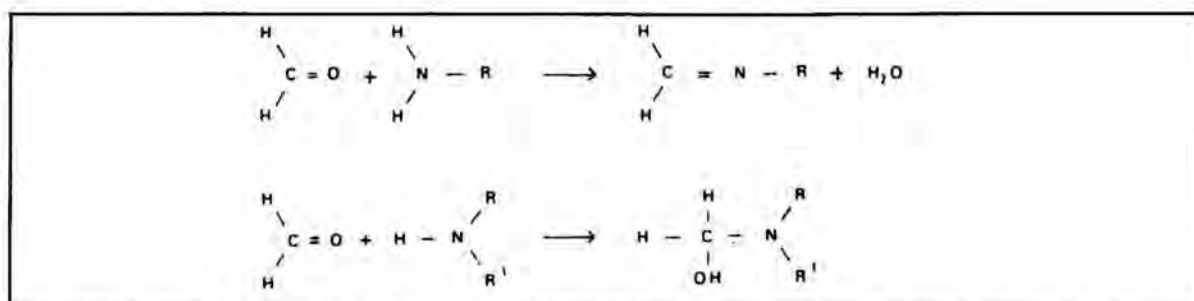


Figura 5. Bloqueo de aminas primarias y secundarias mediante la adición de formaldehído (MALLE y TAO, 1989).

El método de DYER (1945) y sus modificaciones son quizás las técnicas más utilizadas para la determinación de la TMA. El método oficial de la AOAC (1992) para la determinación de este compuesto en pescados y derivados se basa en el citado método y consta en esencia de las siguientes fases:

- extracción de la trimetilamina de la muestra con ácido tricloroacético
- alcalinización del extracto ácido y adición de formaldehído para eliminar, en lo posible, las interferencias debidas fundamentalmente a la presencia de dimetilamina
- extracción con tolueno y posterior secado de la fase orgánica, interponiéndola con sulfato sódico anhidro
- reacción de la trimetilamina contenida en la fase orgánica con solución de ácido pícrico y tolueno para formar un complejo coloreado, cuya intensidad se puede medir espectrofotométricamente.

Se han introducido diversas modificaciones en el método original de Dyer a fin de mejorar su especificidad, como la propuesta por TOZAWA y col.(1971). Este autor varía el agente alcalinizante, sustituyendo el carbonato potásico por KOH, de modo que se minimize la interferencia de la DMA, aunque no se elimine totalmente. Debido a que el pK<sub>a</sub> de ambas aminas es muy próximo, 9.79 para la DMA y 9.80 para la TMA, es difícil conseguir un pH selectivo mediante la adición de un agente alcalinizante. De hecho, ha quedado ampliamente demostrado que en especies de pescado donde se producen cantidades importantes de DMA, el valor de TMA obtenido por este método puede inducir a error. CASTELL y Col. (1968) describieron la formación de TMA en bacalao congelado y posteriormente estos mismos autores (CASTELL y Col., 1970) demostraron que en realidad se trataba de DMA. LUNDSTRON y RACICOT (1983) sugieren que la

formación de TMA en bacalao fresco, envasado con materiales permeables al oxígeno, que describen Debevere y Voets en 1971 se refiere fundamentalmente a DMA. Por ello, si se utiliza el método del picrato en la determinación de TMA deberán tenerse en cuenta sus limitaciones en cuanto a especificidad, determinándose, si fuera necesario, también la DMA. De este modo, será posible evaluar la importancia de la interferencia de este compuesto, en los casos en que se determinen cantidades importantes del mismo.

NAKASHIRA y Col. (1989) proponen un nuevo método colorimétrico. Se basa en la formación de un complejo entre el grupo  $\text{NH}_2$  de las aminas alifáticas y el 2-4-dinitrofenilazofenol (HCDPA)-Ba en medio orgánico. Como en el método de Dyer, se obtiene un extracto ácido a partir del pescado, se alcaliniza y se extrae con un disolvente orgánico, cloroformo en este caso. Sobre ésta fase orgánica se añade el HCDPA-Ba que forma el complejo coloreado. Los autores comparan éste método con el método oficial de la AOAC y comprueban que ambos métodos son equivalentes, con un coeficiente de correlación de  $r=0.9979$ , que para el número de muestras estudiado ( $n=13$ ) resulta altamente significativo. Sin embargo, posiblemente esta técnica esté sometida a problemas de especificidad semejantes a los del método del picrato, puesto que tanto el amoníaco como la DMA reaccionan también con el HCPA-Ba.

Chang y Chang (1976) describen el uso de un electrodo específico para el  $\text{NH}_3$ , modificado para la determinación de TMA. Este electrodo no está tampoco exento de las interferencias del amoníaco, la DMA y otras aminas (LUNDSTROM y RACICOT, 1983).

WONG y GILL (1987) proponen un método de carácter enzimático, que resulta más específico que los citados anteriormente y que además presenta la ventaja de su rapidez y aplicabilidad fuera del laboratorio para el análisis rutinario. Esta técnica se basa en la oxidación de la TMA contenida en el extracto ácido obtenido a partir del pescado, y previamente neutralizado, por el metosulfato de fenazina (PMA) en presencia del enzima trimetilamina deshidrogenasa (TMA-DH). El  $\text{PMSH}_2$ , producto de esta reacción redox, origina un cambio en el indicador p-iodotetrazolina de color violeta que pasa a rojo formazán. La intensidad de la coloración roja aparecida será proporcional a la cantidad de TMA presente en la muestra. En 1988 los mismos autores proponen impregnar unas tiras con los reactivos necesarios para conseguir un método de más fácil aplicación. El principal inconveniente de ésta técnica es que sólo se puede aplicar con fines semicuantitativos, puesto que su especificidad y sencillez la convierten en una técnica muy adecuada.



### 3.3.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

El problema de las interferencias junto con el de la obtención de una mayor sensibilidad han llevado al desarrollo de técnicas cromatográficas, que permiten la separación de la TMA de otros compuestos semejantes (otras aminas alifáticas de cadena corta); así como su cuantificación a niveles de concentración muy bajos (ppb) en algunos casos (KUWATA y col. 1980 que las buscan como contaminantes ambientales).

Aunque se han descrito técnicas por cromatografía líquida de alta eficacia (GILL y THOMPSON, 1984), el método más extendido es la cromatografía de gases. La resolución del problema mediante la cromatografía gaseosa tampoco está exenta de inconvenientes o problemas y prueba de ello es que desde que HUGHES (1959) describió la 1ª técnica de este tipo no han dejado de efectuarse modificaciones encaminadas a mejorar el procedimiento analítico.

La alta volatilidad de las aminas alifáticas de cadena corta (TMA, DMA y MMA fundamentalmente) hace que en su separación sea menos crítica la aplicación de una determinada temperatura y que tenga, sin embargo, una importancia fundamental la retención de estos compuestos por parte de la columna. El uso de las modernas columnas capilares, sin soporte inerte y en el que el espesor de la fase estacionaria líquida es muy delgado, no es adecuado, puesto que debido a su "rapidez" (poca retención de los analitos) sería necesario trabajar a temperaturas muy bajas para lograr la resolución de estos compuestos. La bibliografía describe una amplia gama de columnas de relleno donde la separación de los compuestos estaría especialmente influenciada por su retención en la columna debida a fenómenos de adsorción. Todas estas columnas analíticas, aunque distintas en su composición, presentan una serie de características comunes:

- longitud de 1.8 a 2 m y diámetro 1/8 pulgadas.
- carcasa de vidrio en espiral o en forma de U
- soporte silíceo, más o menos modificado para evitar una retención demasiado fuerte de los compuestos amínicos y la consiguiente formación de colas.

Para el análisis de determinados compuestos, entre los que figuran los esteroides, alcaloides y algunas aminas, deben utilizarse columnas de vidrio a pesar de su fragilidad. Con las metálicas (cobre, aluminio, acero inoxidable...) no se obtienen resoluciones satisfactorias de este tipo de compuestos (TRANCHANT, 1972).

Las aminas, debido a que son compuestos muy polares, pueden quedar retenidas en los soportes silíceos: por unión con los OH libres o por establecimiento de puentes de hidrógeno con los grupos Si-O-Si. Esta circunstancia origina que, si no se toman las precauciones adecuadas, se formen colas. Las fases líquidas que contienen grupos hidroxilo o aminas son las más adecuadas en estos casos; los grupos carbonilo y éter también desactivan el soporte aunque son menos efectivos. Si la fase líquida no contiene grupos funcionales polares no se reduce la formación de colas y es necesario añadir pequeñas cantidades de otra fase líquida polar que actuara como "supresor de cola". Actualmente se trabaja con columnas en las que la cantidad de fase estacionaria que impregna el soporte es muy baja; en estos casos la cantidad de supresor de cola a utilizar será mayor y sus características podrán, en gran parte influir en el comportamiento final de la fase estacionaria frente al analito; en estos casos estaríamos hablando de fases estacionarias líquidas mixtas (GASCÓ 1970).

Para reducir la adsorción de las aminas es muy común impregnar el soporte, tratado previamente con disolución alcohólica de KOH, con una fase estacionaria polar, el carbowax 20M por ejemplo. Cada tratamiento por separado resulta ineficaz para eliminar las colas. El mecanismo de la reducción de la actividad superficial frente a las aminas no se explica claramente. Por una parte, el reductor de colas, para ser adsorbido selectivamente, ha de ser más básico que las aminas; sin embargo las aminas forman colas cuando el soporte se recubre solamente con KOH. Este fenómeno podría explicarse suponiendo que la potasa neutralice solamente los puntos activos ácidos del soporte, pero no los grupos Si-O-Si, que han de ser desactivados por una fase estacionaria polar con hidrógenos activos. Fases estacionarias que contienen aminas primarias en su molécula (ej. tetraoxietilenamina) desactivan a la vez los dos tipos de puntos activos de adsorción de la matriz de sílice (GASCÓ, 1970).

Otro modo de desactivación de los soportes silíceos es el lavado con ácidos y también es posible reducir la formación de colas revistiendo las partículas del soporte con delgadas películas de materiales más inertes, como la polivinilpirrolidona y el teflon (TRANCHANT, 1972).

En la tabla 6 se describen las columnas utilizadas en diversos métodos analíticos para la determinación de las aminas alifáticas de cadena corta, que son ejemplos de aplicación de los modos de desactivación citados anteriormente.

Las estrategias seguidas para obtener los compuestos básicos volátiles a partir de la muestra son también muy variadas.

HUGHES y col. (1959) y GRUGER y col. (1972) obtenían un extracto ácido, lo alcalinizaban y tras una destilación lo recogían sobre un ácido. Evaporaban el agua de

modo que cristalizara el clorhidrato de TMA en el primer caso y el sulfato en el segundo. Los cristales eran redissueltos en una pequeña cantidad de disolvente orgánico e introducidos en la columna. KEAY y HARDY (1972) operan de modo semejante pero inyectan directamente el destilado recogido sobre ácido en la columna. La inyección directa de una fase acuosa disminuye la vida de la columna, de modo que será necesario reempaquetarla tras un determinado número de análisis no muy elevado y puede además provocar la aparición de picos "fantasma". En este sentido KUVATA y col. (1980) tras probar un elevado número de columnas propone el uso de una Chromosorb 102 TMCS tratada con un 5% de KOH, en la que el agua causaría pocas modificaciones y sería posible la inyección sistemática y repetida de extractos acuosos.

Para eliminar la tediosa 1ª etapa de destilación y recristalización se han utilizado mayoritariamente dos tipos de métodos: A) El análisis en espacio de cabeza (MILLER y col., 1978; KRUSE y STOECKMER, 1988; KRYMIEN y ELIAS, 1990 Y FIDDER y col, 1991) o B) la extracción con un disolvente orgánico, tras alcalinización del extracto ácido del pescado. Los disolventes utilizados son en general mucho menos volátiles que los compuestos a analizar, de modo que no interfieren en la separación cromatográfica. NONAKA (1967) extrae con n-heptano, TOKUNAGA (1977) con alcohol amílico, LUNDSTROM y RACICOT (1983) evalúan el alcohol amílico y el benceno decidiéndose por este último puesto que con él obtienen una mejor recuperación de la DMA y finalmente KRYMIEN Y ELIAS (1990) optan por el tolueno.

También los sistemas de detección son variados, siendo los más frecuentes el detector de ionización de llama (FID) y el detector selectivo de nitrógeno fósforo (NP-FID)

En los casos en que es necesario detectar cantidades muy pequeñas de estas sustancias, se pueden utilizar distintos sistemas de concentración previos a la inyección. La recristalización del primitivo método de GRUGER y col (1959) o la utilización de trampas tenax en el caso de las técnicas por espacio de cabeza o de set-paks en los métodos que utilizan una extracción, serían ejemplos de soluciones de este tipo.

Ante este amplio abanico de posibilidades será necesario en cada caso elegir la técnica más adecuada a las características de nuestro laboratorio y que nos permita a la vez resolver el problema objeto de nuestro estudio.

Tabla 6. Métodos para determinar Dimetilamina y Trimetilamina por cromatografía de gases en muestras de pescado.

REFERENCIA BIBIOGRAFICA	PREPARACION DE DE MUESTRA	COLUMNA CROMATOGRAFICA	DETECCION
GRUGER (1959)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1° Extracto PCA</li> <li>2° Neutralizar</li> <li>3° Destilar en corriente de vapor</li> <li>4° Recoger sobre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>5° Evaporación/Cristalización</li> <li>6° Disolución con metilactoato/ KOH</li> </ol>	Chromosorb P	FID
NONAKA (1967)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1° Extracto TCA</li> <li>2° Neutralizar con KOH</li> <li>3° Extraer con n-octano</li> </ol>	20% alcohol cetílico/2% KOH/ Firebrick C22	FID
HUGHES (1972)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1° Extracto TCA</li> <li>2° Neutralizar</li> <li>3° Destilar en corriente de vapor</li> <li>4° Recoger sobre HCl</li> <li>5° Evaporación/ cristalización</li> <li>6° disolución en H<sub>2</sub>O</li> </ol> <p>Precolumna de bicarbonato</p>	20% n-Hendecanol-n-octano (4= 1 v/v) en Celite tratado con alcali	FID
MILLER y col. (1972)	<p>HEAD SPACE</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1° Alcalinización del pescado con NaOH</li> <li>2° Envasado hermético y calefacción 60°C durante 10'</li> <li>3° Inyección en fase gaseosa</li> </ol>	2% tetractilen pentamino/ Graphon	NP-FID
KEAY y HARDY (1973)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1° Extracto TCA</li> <li>2° Neutralizar</li> <li>3° Destilar</li> <li>4° Recoger sobre HCl</li> </ol>	Dowfax 9N9 en Silicocell C22 Cabeza de columna con alta concentración en KOH para liberar aminas.	FID

Tabla 6. Métodos para determinar Dimetilamina y Trimetilamina por cromatografía de gases en muestras de pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	PREPARACION DE MUESTRA	COLUMNA	DETECCION
MACKIE y THOMPSON (1974)	1° Extracto PCA 2° neutralizar con KOH 3° destilar en corriente de vapor 4° Recoger sobre HCl	Chromosorb P/ 3% Igepal CO630 / 3.33% KOH	FID
RITSKES (1975)	1° Extracto TCA 2° Neutralizar 3° Destilar 4° Recoger sobre HCl 5° Neutralizar de nuevo Precolumna alcalina	Chromosorb W/ 15% Carbowax 400/ 5% polietilenamina	FID
TOKUNAGA (1977)	1° Extracto PCA 2° Neutralizar con KOH 3° Extraer con alcohol amfílico	Diasolid L / 20% escualano / 2.5% glicerina / 2.5% de KOH	FID
KUWATA y col. (1980)	Ensayos efectuados sobre disoluciones de patrones, inyección directa	Chromosob 102 TMCS / 5% KOH	FID
RAYNER y col. (1981)	1° Tejido de pescado homogeneizado con $K_2CO_3$ en la cámara de inyección 2° calentar a 140° C durante 15 minutos	Porapak Q de acero inoxidable	FID

Tabla 6. Métodos para determinar Dimetilamina y Trimetilamina por cromatografía de gases en muestras de pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	PREPARACION DE LA MUESTRA	COLUMNA	DETECCION
LUMDSTROM y RACICOT (1983)	1° Extracto PCA 2° neutralizar con KOH 3° Extracción con alcohol amílico o benceno	Chromosorb 103	NP-FID
MANTHEY (1988)	1° Extracto PCA 2° Alcalinizar con NaOH 3° Extracción con alcohol amílico	Carbopack 4 B / 4 % Carbowax 20M / 0.8 % KOH	FID
KRUSE y STOCKEMER (1989)	HEAD SPACE 1° Extracto PCA 2° Alcalinizar con KOH 3° Calentar e inyectar fase gaseosa	Carbopack B/ 4 % Carbowax 20M / 0.8 % KOH	FID NP-FID
KRZYMIEN y ELIAS (1990)	1° Extracto PCA 2° Neutralizar con KOH 3° Extraer con tolueno  HEAD ESPACE 1° Mantener a 3°C durante 3 días en recipiente cerrado 2° Inyectar fase gaseosa en trampa Tenax 3° Desorción térmica de la trampa un inyector especialmente modificado	Carbopack b / 4 % Carbowax 20M / 0.8 % KOH	FID
FIDDER y col. (1991)	HEAD SPACE 1° Extracción con HCl 2° alcalinizar NaOH 3° Calentar 55°C 15 minutos 4° Inyección fase gaseosa	Chromosorb 103	FID

## 4. ATP Y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACION

### 4.1 EVOLUCIÓN POST-MORTEM DEL ATP Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

El estudio de la degradación post-mortem del adenosin-5'-trifosfato (ATP) ha despertado gran interés en los últimos 30 años, tanto por su utilidad en el establecimiento de índices de frescura como por la implicación de los mononucleótidos y sus compuestos de degradación en el flavor del pescado.

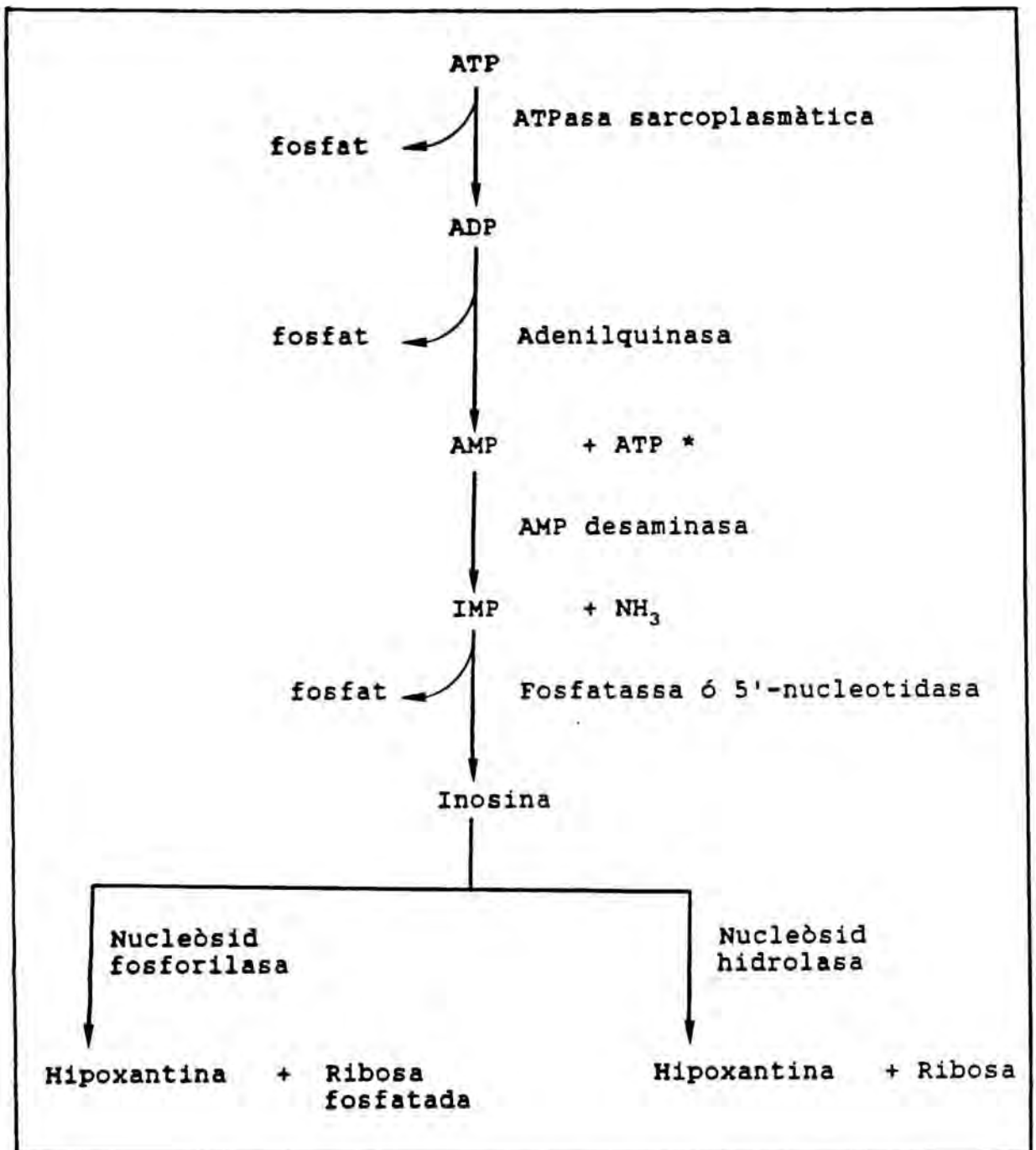
De entre las diversas técnicas empleadas para evaluar la calidad del pescado es importante diferenciar entre las pruebas de deterioro, que ignoran la degradación autolítica previa a la contaminación bacteriana y las pruebas de frescura basadas fundamentalmente en el estudio de estos procesos. Las pruebas basadas en el catabolismo del ATP se enmarcan dentro de esta segunda categoría y han sido desarrolladas fundamentalmente en el Japón, donde debido al frecuente consumo de pescado crudo, es especialmente importante un conocimiento rápido y exacto del estado del pescado.

En la mayoría de las especies de pescado la degradación del ATP sigue la secuencia especificada en la figura 6 aunque la velocidad con que estos cambios se efectúan es muy variable.

El ATP, nucleótido predominante en el músculo en reposo, experimenta una desforilación enzimática para formar adenosin-5'-difosfato (ADP) y posteriormente adenosin-5'-monofosfato (AMP). La desaminación del AMP por parte de enzimas tisulares como el AMP-desaminasa produce inosina-5'-monofosfato (IMP). Estas reacciones se efectúan a una velocidad muy rápida y por ello se origina una acumulación temprana de IMP post-mortem.

Dada la rapidez con que se realizan las primeras etapas de la secuencia de degradación del ATP, la rotura del IMP hasta Inosina (Ino) e hipoxantina es la base de la mayoría de las pruebas que utilizan estos compuestos para determinar la pérdida de frescura en el pescado.

Figura 6. Secuencia de degradación del ATP





La mayor parte del ATP, en los peces capturados por arrastre, se pierde durante la lucha y el que queda se convierte en IMP durante las primeras 24-48 horas, si el pescado se almacena en hielo. MURRAY y col. (1984) compararon los niveles de ATP en truchas anestesiadas antes de la muerte y en truchas estresadas por la captura y comprobaron que los niveles de este compuesto eran diferentes. En el primer caso se determinaron  $6.7 \mu\text{Mol/g}$ , nivel que se mantenía próximo al de ATP en músculo vivo, mientras que en el segundo el nivel descendió hasta  $1.2 \mu\text{Mol/g}$ . Los niveles de IMP fueron de  $0.93$  y  $5.65 \mu\text{Mol/g}$  respectivamente, hecho que demostraba la relación entre el esfuerzo realizado por el pez antes de la muerte y niveles de ATP bajos.

En muchas especies de pescado, el enzima AMP desaminasa se encuentra en proporciones muy elevadas y las 5'-nucleotidasas en baja concentración. Esto supone que se acumule IMP durante los primeros estadios post-mortem. El paso de IMP a Inosina se efectúa con la mediación de un enzima desforilante, pero la velocidad de degradación de esta compuesto es dependiente de la especie animal (FRASER y col., 1968) y del tipo de musculatura (FRASER y col., 1968; OBATAKE y col., 1988).

La inosina es transformada en hipoxantina por dos vías, catalizadas por dos enzimas distintos. En la vía mayoritaria, por acción de una nucleósido-hidrolasa se origina ribosa e hipoxantina. Por la vía alternativa, mediante una nucleósido fosforilasa, se incorpora fósforo del medio, libera una molécula de hipoxantina y otra de ribosa fosfatada a partir de cada molécula de inosina ( HILTZ y col 1971).

El paso de Ino a Hx presenta una mayor variabilidad entre especies que las reacciones que le preceden, tanto que ha llevado a establecer una clasificación de las especies de pescado en función de la velocidad con que la Ino es degradada. EHIRA y UCHIYAMA (1973) realizaron un extenso estudio en el que se siguió el metabolismo del ATP en 96 especies distintas que clasificaron en:

- Formadoras de Inosina, en las que se originan acúmulos de esta sustancia debido a que la actividad del enzima que cataliza su paso a hipoxantina es muy baja
  
- Formadoras de Hipoxantina, con una actividad enzimática mayor

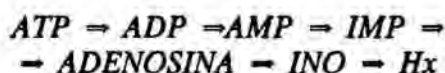
Además consideran un tercer grupo en el que sitúan aquellas especies de pescado que presentan una actividad enzimática intermedia.

Como resultado de éste estudio, estos mismos autores concluyen que cuando la proporción entre Ino/Hx es mayor que 5, el pescado pertenece a una especie productora de Inosina, mientras que si es el cociente entre Hx/Ino el que supera el valor de 5, nos encontramos ante una especie formadora de Hipoxantina.

La acumulación de Inosina o Hipoxantina parece estar directamente relacionada con las distintas actividades enzimáticas de la nucleósido-hidrolasa y la nucleósido fosforilasa en el músculo de pescado. Al respecto EHIRA (1976) describía un ensayo en que al músculo de una especie formadora de inosina se le añadía un extracto acuoso proveniente de una especie formadora de hipoxantina, de modo que se lograba acelerar el catabolismo de la inosina con la consiguiente acumulación de hipoxantina. Creelman y col. en 1960 habían citado este mismo hecho con anterioridad.

Aunque existen numerosos estudios que demuestran que los enzimas responsables del catabolismo del ATP tras la muerte del pescado, son de origen endógeno, parece claro que en el paso de inosina a hipoxantina pueden intervenir también enzimas bacterianos puesto que la producción de éste metabolito aumenta considerablemente cuando el pescado es colonizado por microorganismo (FLETCHER y STATHAM, 1988). Del mismo modo que también la última fase del catabolismo del ATP, que comportaría el paso de hipoxantina a xantina y a ácido úrico, se completaría tras la proliferación de microorganismos sobre la carne del pescado (KENNISH y KRAMER, 1986).

ARAI (1966) después de determinar el ATP y sus compuestos de degradación en 12 especies de invertebrados marinos propone la siguiente secuencia:



Sin embargo, otros autores citan la presencia de cantidades notables de IMP en langosta, camarón o cangrejo (IKEDA, 1980) por lo que no parece posible generalizar la vía de degradación del ATP a través de la inosina en todos los invertebrados.

## 4.2. CONTENIDOS EN PESCADOS Y DERIVADOS

Aunque la mayor parte de los datos de la bibliografía se refieren a contenidos de ATP y sus productos de degradación en pescado fresco, estos compuestos han sido estudiados también en derivados de pescado, en los que existe un especial interés por conocer como afectan los procesos tecnológicos aplicados para su obtención.

Los contenidos de ATP y sus compuestos de degradación en pescado fresco, citados por distintos autores (tabla 7), presentan una amplia variabilidad pero podrían agruparse en dos categorías.

La primera incluye estudios realizados a partir de pescado vivo que fue sacrificado en el laboratorio mediante distintos métodos no estresantes. Ello explica que en estas muestras los niveles de ATP sean elevados, comprendidos entre 4 y 8  $\mu\text{Mol/g}$ . Y que además aparezcan cantidades muy bajas de los demás nucleótidos y de sus productos de degradación (en ningún caso superiores a 1.7  $\mu\text{Mol/g}$ ).

En la segunda quedarían incluidos aquellos estudios realizados sobre pescado capturado con los métodos tradicionales de pesca, que implican que el pez realiza un esfuerzo y sufre agotamiento antes de la muerte. En este caso, el nucleótido mayoritario es el IMP con valores que oscilan entre 4 y 10  $\mu\text{Mol/g}$  dependiendo de la especie. Ni el ATP, ADP y AMP, ni los productos de degradación del IMP, inosina e hipoxantina se encuentran en cantidades significativas (siempre inferiores a 1.5  $\mu\text{Mol/g}$ ).

MURATA y SAKAGUCHI (1988) y WATANABE y col (1984) encontraron niveles de ATP y de sus compuestos de degradación superiores en la musculatura blanca que en la oscura. OBATAKE y col (1988) y OBATAKE y TOMITA (1988), en un estudio realizado con jureles y caballas del Pacífico, llegan a resultados semejantes tanto en peces sacrificados tras un estrés o sin él.

CHIOU y col (1989) determinan los contenidos de ADP, AMP, IMP, Inosina e hipoxantina en huevas de *Theragra chalcogramma* y los niveles encontrados fueron muy inferiores a los citados por otros autores en músculo de pescado.

Los datos referentes a contenidos de ATP y de sus compuestos de degradación en derivados de pescado fueron menos abundantes a excepción del IMP, compuesto que parece estar más estrechamente relacionado con el flavor OH y col, 1988a, 1989a, 1989b).

Tabla 7. Contenidos de ATP y derivados ( $\mu\text{M/g}$ ) en pescados.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx	TIPO de PESCADO	MUERTE
JONES y MURRAY (1962)	0.25			4-5			Bacalao	captura
TEJADA (1979)	0.20	0.20	0.30	8	0.30	-	Jurel	captura
THOMPSON y col. (1980)	tr	0.30	0.02	3.80	0.98	0.20	Bacalao	captura
RYDER y col (1984)	<0.2	<0.2	<0.2	10	0.50	0.50	Jurel	captura
MURATA y SAKAGUCHI (1986)	7-8	ND	ND	1.50	ND	ND	<i>Theragra chalcogramma</i>	decapitado
GILL y col (1987)	-	-	-	-	-	> 1.10	Atún	captura
IWAMOTO y col (1987)	4-5	-	-	tr	tr	tr	platija	inyección cerebro
JIANG y col (1987)	0.15	0.45	0.20	7.70	0.85	0.55	?	?
FLETCHER y STATHAM (1988)	6.65	-	-	1.65	-	-	pez trompeta	golpe en la cabeza
FLETCHER y HODGSON (1988)	-	-	-	10	0.50	1	pescado blanco	captura
IWAMOTO y col. (1988)	6	-	-	tr	tr	tr	platija	inyección cerebro

Tabla 7. Contenidos de ATP y derivados ( $\mu\text{M/g}$ ) en pescados.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx	TIPO DE PESCADO	MUERTE
MURATA y SAKAGUCHI (1988)	6-7.5	0.70	0.10	0.8			<i>Theragra chalcogramma</i>	decapitado
SHIRAI y col (1988)	-	<0.25	<0.25	5	3	1	Salmón	captura
MURATA y SAKAGUCHI (1989)	6.26	2.18	0.43	0.52	-	-	<i>Theragra chalcogramma</i>	decapitado
FLETCHER y col (1990)	5.60	0.90	0.01	0.70	0.25	0.05	pez trompeta	golpe en la cabeza

Tabla 7. Contenidos de ATP y derivados ( $\mu\text{M/g}$ ) en derivados de pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx	TIPO DE PRODUCTO
CHIOU y KONOSU (1988)	-	0.0146	0.0182	0.2180	0.1177	2.04	"Tarako" huevas de <i>Theragra Chalcogramma</i> maduras
HO y col (1988)	-	-	-	0.06	1.95	9.76	salsa de restos de pescado salados y madurados
HO y col. (1988)	ND	0.03	13.77	-	1.42	0.52	Sopa de sardina deshidratada
CHIOU y col. (1989)	-	tr	0.0084	0.0335	0.4344	0.253	Huevas de salmón seco-saladas
HO y col. (1989)	-	0.47	2.05	15.55	16.94	3.41	Sopa de patudo deshidratada
	-	0.43	1.79	11.26	11.17	12.90	a) laboratorio b) mercado

### 3.4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DEGRADACIÓN DEL ATP y SUS DERIVADOS

Dado que la desaparición del ATP muscular es debida fundamentalmente a cambios autolíticos y también porqué existen numerosas diferencias entre especies, son muchos los estudios encaminados a conocer los factores que influyen en estos patrones de degradación autolítica, antes de la proliferación bacteriana que acompaña a la descomposición del pescado. Sin embargo, también existen trabajos en los que se relacionan los contenidos de estos compuestos, sobre todo de los últimos de la secuencia catabólica, inosina e hipoxantina, con el deterioro del pescado.

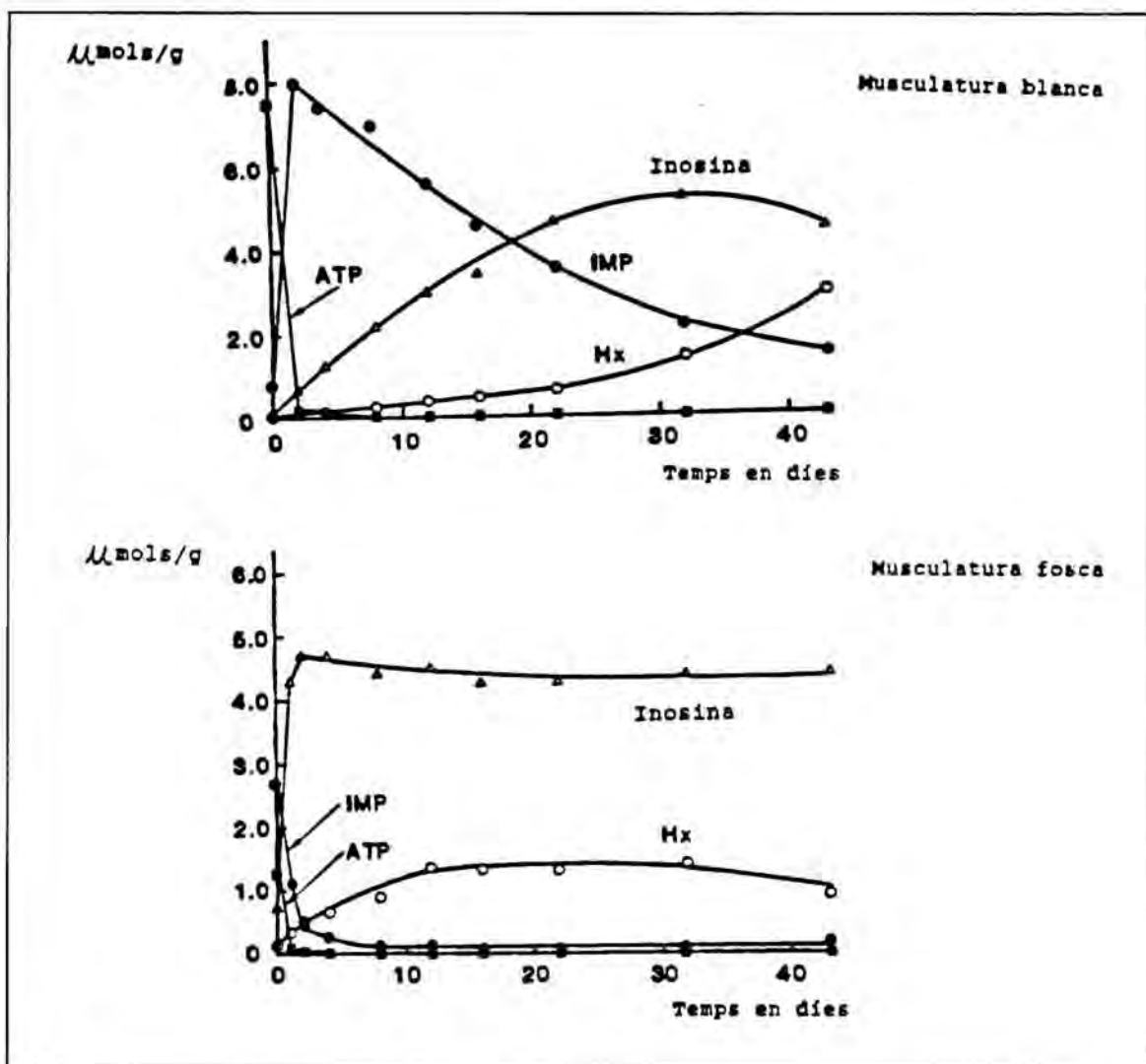
Una idea sobre las **variaciones entre especies** que pueden aparecer en el camino metabólico del ATP y sus derivados nos la proporcionan los estudios de FLETCHER y STATHAM (1988a, 1988b). En el primer caso, en el que se estudia la especie *Latridopsis fosteri* demuestran que son enzimas los responsables de este proceso. No obstante, en el segundo estudio, realizado sobre una especie próxima, *Aldrichetta fosteri*, comprobaron que los microorganismos ejercían un papel importante en el paso de Inosina a hipoxantina. Aunque los principales responsables del proceso parecen ser enzimas del propio pescado, son numerosos los autores que corroboran la participación bacteriana (JONES, 1965; COHEN, 1986; JORGENSEN y col., 1988).

El **pH** también influye en la actividad de los enzimas de degradación del ATP y sus derivados. En abadejo, las ribósido- hidrolasas tienen un máximo de actividad a pH 8.6 y un mínimo a pH 5.5. Las nucleotidasas presentan una actividad máxima a pH ligeramente alcalinos. De ahí que, pescados con un pH inicial bajo, como la caballa (pH=6.2) o el pez espada (pH= 5.7-6.1), muestren inicialmente una degradación muy lenta de estos compuestos (FRASER y col., 1968).

Referente a la importancia de la actividad autolítica, SCOTT y col. (1986) estudian la importancia del proceso de **evisceración** en el almacenamiento del pescado. No observaron diferencias durante los 13 primeros días, pero a partir de este momento se observó que el proceso de degradación era menor en el pescado eviscerado. Estos autores atribuyen tal circunstancia a una menor actividad autolítica, debida a la retirada de del tracto intestinal rico en enzimas autolíticos. Otros trabajos demuestran también que el deterioro del ATP y sus compuestos de degradación está relacionado con la propia autolisis y no con la actividad bacteriana (BREMNER y col., 1988; FLETCHER y HODGSON 1988).

Además, el proceso autolítico post-mortem del ATP presenta variaciones entre la musculatura **clara** y **oscura** dentro de una misma especie de pescado. Los estudios de MURATA y SACAGUCHI (1986) realizados sobre *Seriola quinqueradiata*, pez graso semejante al jurel, almacenado en hielo, muestran dos perfiles claramente diferenciados para la musculatura clara y oscura tal como se muestra en la figura 7.

Figura 7. Degradación del ATP post-mortem en la musculatura clara y oscura del tescado (MURATA y SAKAGUCHI, 1986)



De la observación de los gráficos de la figura 7 se puede deducir que:

- el ATP disminuye muy rápidamente en ambos tipos de musculatura, pero en la musculatura blanca se parte de niveles más altos
- No se aprecia ni ADP ni AMP, probablemente debido a una alta actividad del enzima productor de IMP en esta especie de pescado
- el IMP se degrada mucho más rápidamente en la musculatura oscura

- la inosina aumenta en ambas musculaturas, pero mientras que en la blanca se produce un aumento gradual a una velocidad moderada, en la oscura la velocidad de formación es mucho mayor y rápidamente se alcanza un contenido máximo que se mantiene
- el aumento de hipoxantina es poco importante, comparado con el de inosina, pero en la musculatura oscura los niveles son quizá ligeramente más elevados ya desde los primeros días del almacenamiento

En general, este comportamiento podría explicarse suponiendo una velocidad de degradación mayor en la musculatura oscura que en la clara, puesto que los compuestos iniciales disminuyen más rápidamente y se acumulan mayores cantidades de los productos finales, inosina e hipoxantina.

OBATAKE y col. (1988), en estudios realizados sobre esta misma especie de pescado, llegan a resultados semejantes y establecen que el pH óptimo de actuación del enzima que metaboliza el IMP en la musculatura oscura es de 6. Es estudios complementarios (OBATAKE y TOMITA 1988 y OBATAKE y col 1989) siguen el metabolismo del ATP y sus compuestos de degradación en la musculatura clara de la caballa, *Scomber japonicus*, adicionada o no con un extracto enzimático proveniente de la musculatura oscura. Observan que el efecto de adición de enzimas de la musculatura clara, efectivamente, se traduce en un aumento de la velocidad catabólica del IMP. También WATABE y col (1991) en estudios realizados en sardina, *Sardinops melanostricta*, llegan a resultados semejantes.

También ha sido citada la influencia de las **variaciones estacionales**. JONES y MURRAY (1962) estudian los contenidos de ATP y de sus compuestos de degradación en bacalao mantenido en congelación, describiendo ciertas diferencias en el catabolismo de pescados capturados en Febrero, época próxima al desove y pescados capturados en Julio.

La influencia del **tiempo** de almacenamiento en hielo ha sido objeto de estudio por parte de diversos autores.

RYDER y col. (1984) estudian la evolución de los nucleótidos en *Trachurus novazelandiae*, observando como las concentraciones de inosina y de hipoxantina incrementaban gradualmente durante los 24 días de estudio. La concentración de IMP decrecía de forma relativamente rápida durante el tiempo considerado. Por ello, estos autores proponen el IMP como indicador de frescura en este tipo de pescado puesto que tanto el ATP como el ADP y el AMP solo se encontraban en cantidades muy bajas ( $< 0.2 \mu\text{Mol/g}$ ).



Tabla 8. Contenidos de ATP y de sus compuestos de degradación ( $\mu\text{Mol/g}$ ) en pescado fresco (A) y tras n días de almacenamiento en hielo ( $B_n$ ).

	ATP	ADP	AMP	IMP	INO	Hx	REFERENCIA TIPO DE PESCADO
A B <sub>15</sub>	- -	- -	- -	4-5 -	0 2-3	0 1-2	JONES y MURRAY (1962). Bacalao
A B <sub>6</sub> B <sub>16</sub>	0.20 tr tr	0.20 tr tr	0.30 0.20 0.20	8.0 5.50 1.60	0.30 3.50 7.90	- - -	TEJADA (1978) <sub>2</sub> Jurel
A B <sub>9</sub> B <sub>18</sub>	1.00 0.50 0.50	1.20 0.20 0.20	- - -	5-6 1.50 0.50	0.50 3.50 2.20	0.30 2.20 3.10	MURRAY y col (1984). Trucha
A B <sub>20</sub> B <sub>40</sub>	7-8 ND ND	- - -	- - -	1.50 4.00 1-2	ND 4-5 4.00	ND 0.80 2.50	MURATA Y SAKAGUCHI (1986). "sèrvia"
A B <sub>4</sub>	6.55 0.30	- 0.55	- 0.15	1.65 4.70	- -	- -	FLETCHET Y COL (1988). Pez trompeta
A B <sub>9</sub> B <sub>15</sub>	- - -	- - -	- - -	10 8-9 6-7	0.50 1.75 2.00	1.00 1.25 2.00	FLETCHER Y HODGSON (1988). Pescado blanco
A B <sub>4</sub>	6.55 0.30	- 0.55	- 0.15	1.65 4.70	- -	- -	FLETCHER Y STATHAM (1988). Pez trompeta
A B <sub>20</sub> B <sub>40</sub>	- - -	- - -	- - -	8.15 3.10 1.15	0.40 4.75 4.30	ND 0.40 2.75	MURATA Y SAKAGUCHI (1988). "Sèrvia"

En la tabla 8 se muestran los niveles de ATP y de sus compuestos de degradación en pescado fresco y tras su almacenamiento en hielo, descritos por diversos autores. Se aprecia un descenso del IMP a medida que transcurre el tiempo y paralelamente se observa como aumentan de modo significativo tanto los contenidos de inosina como los de hipoxantina.

MURRAY y col. (1984), en estudios efectuados con truchas (*Salmo gairdneri*) y cigalas (*Nephrops norvegicus*), describen un "pool" inicial de 9.14  $\mu\text{Mol/g}$  en el momento de la muerte, que disminuye gradualmente hasta 6.8  $\mu\text{Mol/g}$  tras 19 días en hielo. En *Hoplostethus atlanticus* el total inicial observado era de 7.7  $\mu\text{Mol/g}$ , que igualmente disminuía quedando reducido a 6.6  $\mu\text{Mol/g}$  a los 13 días de almacenamiento (SCOTT y OLCOT, 1986).

Por el contrario, SHIRAI y col. (1988) comprobaron que el valor total de ATP y de sus compuestos de degradación se mantenía constante durante el almacenamiento, cerca de los niveles de ATP en el músculo de pescado vivo (5-8  $\mu\text{Mol/g}$  en salmón). FLETCHER y HODGSON (1988) también observaron que el "pool" inicial de 12.42  $\mu\text{Mol/g}$  en un pescado blanco originario de Nueva Zelanda (*Chrysophrys auratus*) no variaba significativamente durante el almacenamiento en hielo. La tendencia a que la suma total de estos compuestos se mantenga constante ha sido también verificada durante el almacenamiento del pescado a temperaturas superiores a la del mantenimiento del pescado en hielo (JIANG y col. 1987). OH y col (1989) también observan esta hecho durante la obtención de un derivado de pescado, pasta fermentada de anchoa, cuyo proceso de elaboración no conlleva ningún tratamiento térmico.

La influencia de la **temperatura** sobre la secuencia de degradación del ATP puede considerarse desde 2 puntos de vista. El primero relacionado con la influencia de las **distintas temperaturas de almacenamiento** del pescado, y el segundo relacionado con la **estabilidad de estos compuestos al aplicar tratamientos térmicos**.

FRASER y col (1968) observaron que el grado de desfosforilación del IMP, la acumulación de hipoxantina y la pérdida de calidad del jurel (*Scomber scombrus*) eran marcadamente más rápidas a 5-10°C que a 0°C. IWAMOTO y col (1987) estudiaron en platija (*Paralichthys olivaceus*) la evolución del ATP y de sus compuestos de degradación a distintas temperaturas de almacenamiento: 0, 5, 10, 15 y 20°C. Las concentraciones iniciales de ATP, ADP y AMP fueron muy altas, y el IMP solo fue determinado a nivel de trazas al igual que la inosina y la hipoxantina. Los niveles de ATP disminuían hasta hacerse no detectables durante las primeras 24-48 horas después de la muerte, al mismo tiempo que aumentaba el estado de rigor mortis. El estudio muestra también que la degradación del IMP era claramente más rápida a temperaturas altas.

Según JONES (1965) los enzimas responsables de la degradación del ATP todavía son activos por debajo de -14°C. Este autor comprueba concretamente la 5,-nucleotidasa solo se inactiva por debajo de -30°C. Según DYER y col (1966) las concentraciones de IMP, inosina e hipoxantina no varían durante el almacenamiento del pez espada (*Xiphias gladius*) a -26°C. La temperatura tiene un efecto importante dentro del margen de 0 a -20°C.

MURATA y SAKAGUCHI (1988) describen que las desaminasas (que actúan en el paso de AMP a IMP) son más estables a los cambios de temperatura, mientras que las 5'- nucleotidasas o fosfatasas (que catalizan el paso de IMP a inosina) son inestables. Además, señalan que el músculo de muestras guardadas poco tiempo en hielo conserva la capacidad de producir IMP a partir de ATP añadido, mientras que muestras más viejas no poseen esta propiedad; parece por lo tanto que las AMP desaminasas también pierden actividad con el tiempo.

El catabolismo de los nucleótidos es del 90% a 4°C, del 80% a -7°C, y de sólo de 30% a -18°C (temperatura de congelación). El músculo de pescado empaquetado al vacío y guardado a -18°C presenta muy pocos cambios en su concentración de nucleótidos. FLETCHER y STATHAM (1988), en estudios realizados sobre *Latridopsis forsteri*, también observaron que la degradación de inosina a hipoxantina disminuía a temperaturas inferiores a 0°C. LEE i TOLEDO (1984) observaron un comportamiento semejante en *Mugil spp*, en el que al cambiar la temperaturas de almacenamiento de 0 a -2°C la producción de hipoxantina y de trimetilamina era significativamente más baja, de modo que la vida media de este pescado se alargaba en tres días, puesto que disminuían tanto los cambios bioquímicos como el crecimiento bacteriano.

En cuanto a la **termoestabilidad** de los nucleótidos algunos autores sostienen que los últimos compuestos del catabolismo del ATP son estables a temperaturas de esterilización (MARTIN y col., 1978). Por ello, se ha sugerido su determinación para evaluar la calidad higiénica de la materia prima de las conservas de pescado (GALLARDO, 1978).

El ATP y el ADP son lábiles en comparación con el AMP, puesto que se descomponen con facilidad cuando se hierven en agua destilada (MURATA y SAKAGUCHI, 1988). Este hecho explicaría el que estos mismos autores, en un trabajo posterior, no detecten ATP en el extracto hervido del pescado objeto de estudio, a pesar de haber sido sacrificado por un método no estresante (MURATA y SAKAGUCHI, 1988b).

Estos mismos autores sugieren que la desaminación que da lugar a IMP a partir del AMP sólo puede darse a través de una catálisis enzimática. Describen como al calentar, de manera progresiva y suave, el músculo de pescado aumenta el contenido de IMP. Sin embargo, cuando el calentamiento es mas brusco la formación de IMP es menor, hecho que atribuyen a una inactivación del enzima desaminasa responsable de esta transformación. También concluyen que esta desaminasa muscular es relativamente estable, si se compara con la 5'-nucleotidasa que cataliza el paso siguiente hasta inosina.

SHIRAI y col. (1988) estudiaron los niveles de ATP y de sus compuestos de degradación en 6 especies de salmón crudo y cocido. Observaron un ligero descenso de IMP y un aumento concomitante, también muy suave, de inosina e hipoxantina. THOMPSON y col. (1979) en un estudio realizado entre muestras de bacalao fresco y cocido habían llegado a resultados semejantes. Los dos compuestos que más variaban con

el proceso de cocción eran IMP e inosina, originándose un descenso del primero que representaba un 20% de su contenido inicial. También FUJII y col. (1969) describieron un descenso del 20% del IMP inicial al cocer el salmón y un incremento de los contenidos de inosina e hipoxantina, sugiriendo que ciertos enzimas descomponían el IMP al inicio del proceso de cocción.

GILL y col. (1987) estudiaron la estabilidad térmica del AMP, IMP, inosina e hipoxantina, elaborando conservas de pescado a partir de muestras a las que adicionaban cantidades conocidas de estos compuestos. Tras calcular los porcentajes de recuperación que fueron del 50%, 75%, 64% y 92% respectivamente, concluyen que al AMP es el compuesto menos estable pero que, conociendo los porcentajes de destrucción térmica, es posible utilizar estos compuestos como indicadores del estado de la materia prima empleada.

Otros estudios realizados sobre soluciones acuosas de IMP o sobre extractos de este pescado (SHAOU Y SPORS, 1987 y MATOBA y col., 1988) proponen una descomposición del IMP por vía no enzimática. Con la aplicación del calor se rompe el enlace entre la ribosa y el grupo fosfato y se genera inosina sin la intervención de ningún enzima. Esta liberación de grupos fosfato por aplicación de calor coincidiría con la producción de ribosa libre y la disminución de la ribosa fosfatada, observada por THOMPSON y col. (1980) tras la cocción del bacalao. MATOBA y col. (1988) proponen un esquema para la degradación térmica del IMP y del GTP por dos vías alternativas, una mayoritaria y otra minoritaria (fig...).

Dado que el IMP tiene un destacado papel en el flavor de los alimentos, se ha ensayado su uso como aditivo y ello ha desencadenado estudios sobre las condiciones de estabilidad de este compuesto. KUCHIBA y col. (1990) demuestran que las degradaciones térmicas del IMP y del GTP disminuyen en presencia de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{MnCl}$ , pero no en presencia de  $\text{NaCl}$  o  $\text{KCl}$ . Explican el aumento de estabilidad sugiriendo que la combinación con cationes divalentes dificulta la liberación del grupo fosfato.

La **homogeneización** del músculo de pescado es otro factor que influye en el proceso de degradación del ATP. Como consecuencia de ella, se origina una rotura de las paredes celulares y, en consecuencia, los enzimas pasan al medio, facilitándose el contacto con sus sustratos (MURATA y SAKAGUCHI, 1989; GOMEZ y col., 1990). Así, KOIZUMI y col. (1988) y CHANG y col. (1989) justifican la aceleración del proceso durante la descongelación de la sardina, el jurel y la caballa por la desorganización de membranas y de otros tejidos que puede darse debido al proceso de congelación/descongelación.

De estudios efectuados sobre procesos de obtención de derivados de pescado, que no conlleven tratamiento tecnológico sino que se basen en la desecación en presencia de sal con o no posterior maduración, parece deducirse que no se originan productos muy diferentes a la materia prima de partida desde el punto de vista de su contenido en ATP y derivados (CHIOU y KONUSU, 1988; CHIOU y col., 1989; OH y col., 1989).

#### 4.5. INDICES BASADOS EN LA DEGRADACION DEL ATP PARA LA EVALUACIÓN DE LA FRESCURA DEL PESCADO

BURNS y KE (1985) proponen la determinación de hipoxantina como índice de frescura y de calidad del pescado. Según estos autores, este parámetro presenta diversas ventajas frente a medidas como TMA, DMA, NBV u otras que miden esencialmente la acción bacteriana en el deterioro del pescado.

Estos autores se inclinan por el uso de la hipoxantina puesto que con ello se considera tanto el deterioro autolítico como la acción bacteriana posterior. Además, destacan que las concentraciones de hipoxantina no se ven afectadas por tratamientos térmicos o de irradiación y son útiles en el caso de la evaluación de pescados de agua dulce, que no contienen OTMA, precursor de DMA y TMA. Otros autores también destacan la buena relación existente entre bajos niveles de hipoxantina y buena calidad sensorial del pescado, en estudios realizados sobre diversas especies (JONES y col., 1964; FRASER y col., 1968; HILTZ y col., 1970; GALLARDO y col. 1978).

GALLARDO y col. (1978) demuestran que la hipoxantina es utilizable como índice de frescura tanto en sardina fresca, mantenida a 7°C, como en conserva puesto que es termoestable. Este hecho permitiría determinar la calidad de la materia prima empleada en la elaboración de conservas.

De todos modos, el uso de la hipoxantina como índice de calidad no es aplicable a todas las especies de pescado. EHIRA (1976) señala que la determinación de este compuesto puede llevar a conclusiones equivocadas, en aquellas especies en que se forma mayoritariamente inosina.

GILL y col. (1987) en estudios realizados en atún reconocían que aunque los niveles de hipoxantina parecen reflejar el grado de alteración de este pescado, la proporción de diversos catabolitos entre sí podría reflejar mejor la variabilidad entre especies y entre individuos. Por ello estudiaron las relaciones:

$$\frac{\text{HIPOXANTINA}}{\text{IMP} + \text{INOSINA} + \text{HIPOXANTINA}} \quad \frac{\text{IMP}}{\text{IMP} + \text{INOSINA} + \text{HIPOXANTINA}}$$

La relación Hx/IMP+Ino+Hx no fue muy sensible a los cambios observados en la calidad del atún, debido probablemente a que la acumulación de inosina a partir del IMP no estaba tan bien reflejada como en la proporción IMP/IMP+Ino+Hx. Por el contrario, NAKAMURA y ISHIKAWA (1980) habían descrito una buena correlación entre la valoración organoléptica y la relación Hx/IMP+Ino+Hx, aunque también reconocían que este índice podía presentar variaciones en función de la especie de pescado y de las temperaturas de almacenamiento. Por ejemplo en sardina el reblandecimiento muscular y la aparición de olores desagradables coincidía con un valor del índice del 40% mientras que en caballa se llegaba a un grado de descomposición semejante con índices de tan solo

20-35%.

En 1959, en Japón, SAITO y col. ponen a punto una técnica para la detección de cambios en la frescura del pescado, basada en la determinación cuantitativa de los derivados del ATP y definen el índice K según la siguiente expresión:

$$K\% = \frac{INOSINA + HIPOXANTINA}{ATP + ADP + AMP + IMP + INOSINA + HIPOXANTINA}$$

El índice K es un valor relativo, que mide la proporción entre compuestos desfosforilados con respecto al total de ATP y sus metabolitos en una misma muestra. Permite, a diferencia de otros índices, detectar cambios muy tempranos en el pescado puesto que los adenosín nucleótidos son los primeros compuestos en degradarse tras la muerte del pescado.

En general, se considera al valor K un buen índice para evaluar la frescura del pescado, fresco o congelado, aunque en algunos casos concretos se hayan propuesto otros índices alternativos que se comentarán más adelante.

Los valores obtenidos tras la aplicación del índice K permiten clasificar el pescado en cuanto a su frescura en tres categorías (WATANABE y col, 1987):

K < 20%.....	pescado muy fresco, apto incluso para su consumo crudo
K = 20-40%.....	pescado que se puede considerar fresco pero que debe cocerse antes del consumo
K > 40%.....	pescado no fresco, no apto para el consumo humano

Esta clasificación, sin embargo, no debe considerarse de un modo absoluto, puesto que como se ha comentado con anterioridad, son muchos los factores que influyen en el proceso de degradación del ATP y consecuentemente en los índices K alcanzados. La especie del pescado, el tipo de musculatura, el tratamiento aplicado o incluso la zona donde se ha tomado la muestra son causas de orígenes de variabilidad de éste parámetro (HILTZ y col., 1971; GOMEZ y col, 1990). A pesar de estas fuentes de variabilidad el índice K ha sido utilizado en diversos estudios encaminados a determinar la frescura del pescado en muestras mantenidas en hielo. Su uso es corriente para la evaluación de la frescura del pescado en un país como el Japón, donde es frecuente el consumo de estos productos en crudo.

Así, RYDER y col. (1984) estudiaron el índice K en *Trachurus novaezalandiae* almacenado en hielo. Este índice incrementó linealmente desde el 2% hasta el 60% durante los 24 primeros días de almacenamiento post-mortem y se alcanzaron valores del 20% en el momento de considerarse que el pescado no podía ser consumido crudo (calidad sashimi), mediante el resultado de las pruebas microbiológicas y de rechazo sensorial. Ello corrobora el establecimiento del límite para el consumo de esta especie de pescado crudo en un 20% de índice K. Anteriormente (EHIRA, 1976) había establecido este mismo límite para la especie *Trachurus japonicum*.

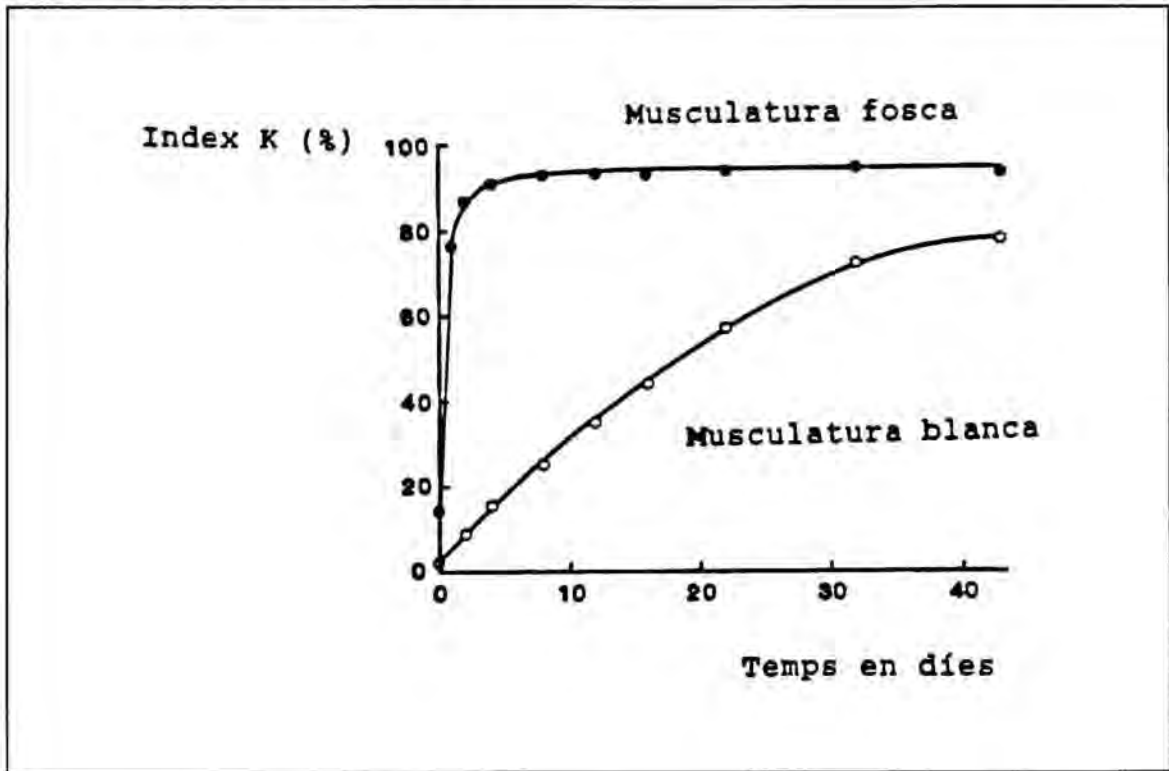
IWAMOTO y col. (1987) estudiaron la evolución del índice K en peces planos de la especie *Paralichthys olivaceus* almacenados a distintas temperaturas: 0, 5, 10, 15 y 20°C. Comprobaron que este índice aumentaba más lentamente a 0°C, alcanzándose sólo un 6% a las 48 horas, mientras que en el almacenamiento a 5-10°C se alcanzaba un 20% transcurrido el mismo período de tiempo. Sin embargo, el índice K aumentaba más rápidamente a 15 que a 20°C y en el pescado mantenido a esta última temperatura se mantenía un flavor agradable tras el paso de 24 horas, cuando ya se alcanzaban niveles del 50% en su índice K.

JIANG y col (1987b) comprobaron que el incremento experimentado por el índice K en muestras de pescado, guardadas a 25°C durante solo 6 horas, era equivalente al experimentado al mantenerlas durante 18 semanas congeladas a -20°C.

Según MURATA y SAKAGUCHI (1986), en la musculatura oscura, el índice K aumenta mucho más bruscamente que en la blanca (un 62 frente a un 3% al día). Este hecho se explica por la rápida deplección que sufre el IMP en la musculatura oscura, puesto que tanto su 5'-nucleotidasa como su fosfatasa son mucho más activas que las de la musculatura blanca. El perfil de evolución del índice K, determinado por estos autores, en ambos tipos de musculatura se muestra en la fig 8.

Algunos autores, sin embargo, no consideran el valor del índice K como definitorio para evaluar la calidad del pescado congelado. De hecho algunas muestras de pescado almacenadas a -3°C, rechazables organolépticamente para su consumo en crudo, a pesar de poseer valores del índice K inferiores a 20% (HASHIMOTO, 1974). WATANABE y col (1987) concluyen que la calidad del pescado almacenado a -3°C no tiene porque ser la misma que la del pescado almacenado a -30°C, a pesar de que se mantenga el mismo valor de índice K, puesto que otros cambios no enzimáticos, como la desnaturalización de las proteínas o la oxidación de los lípidos también influyen en la calidad final del pescado.

Figura 8. Evolución del índice K en la musculatura clara y oscura del pescado (MURATA y SAKAGUCHY, 1986)



JIANG y col (1987) investigaron el efecto de los nucleótidos sobre la desnaturalización proteica del músculo de pescado, comprobando el efecto beneficioso que estos compuestos ejercían. Plantearon la siguiente hipótesis: la fuerza de repulsión entre las moléculas de proteína y los nucleótidos con más de dos grupos cargados negativamente se intensifica y, consecuentemente se dificulta la precipitación de proteínas durante la congelación. Los compuestos que más intervienen son ATP, ADP, AMP y IMP que soportan cuatro, tres, dos y dos grupos cargados negativamente al pH del músculo del pescado (7.5-7.0). Mediante análisis estadísticos se pueden relacionar las disminuciones de ATP, ADP, AMP e IMP y los aumentos de inosina e hipoxantina con la inestabilidad de las proteínas.

KARUBE y col (1984) proponen la determinación del índice K modificado ( $K_1$ ), que no tiene en cuenta los niveles de ATP, ADP y AMP, puesto que los niveles de estos compuestos decrecen rápidamente en las primeras 24 horas tras la muerte del pescado. Con posterioridad otros autores adoptan este criterio (GREENE y col., 1990) y es la base de los modernos métodos para evaluar la frescura del pescado mediante test enzimáticos rápidos.

En los invertebrados, en los que el camino metabólico del ATP es distinto, no parece adecuado el uso del índice K. OASHI y col. (1991) proponen determinar la relación



Hx/AMP para evaluar la frescura del calamar, puesto que en esta especie el metabolismo del ATP está muy acelerado y si se determina el índice K ya se parte de niveles muy superiores al 20% propuesto para el consumo en crudo.

El índice  $K_0$  propuesto por Nakatani y col. (1986) podría ser más adecuado para la determinación de la frescura de aquellas especies, entre las que se encuentran la mayoría de los invertebrados marinos, en las que se forma adenosina como paso intermedio en la degradación de ATP. WATABE y col. (1989) ensayaron el uso de este índice en carne de ternera.

$$K_0 = \frac{INOSINA + HIPOXANTINA + XANTINA}{ATP + ADP + AAMP + IMP + ADENOSINA + INOSINA + HIPOXANTINA + XANTINA}$$

KORHONEN y col. (1990) proponen la determinación de la relación ATP/IMP, mediante dos sencillas medidas espectrofotométricas, para determinar el estado del pescado antes de que éste alcance el rigor-mortis. Este índice se diferencia de todos los anteriores en que mide los cambios que suceden en el pescado en una etapa mucho más temprana y tiene más utilidad en estudios a nivel de laboratorio que en la evaluación de la frescura del pescado que va a ser consumido como alimento.

#### 4.6. INFLUENCIA DE LOS NUCLEOTIDOS EN EL FLAVOR E INDICES PROPUESTOS PARA LA VALORACIÓN DE ESTAS PROPIEDADES.

Desde hace algún tiempo se conoce que sobre todo el IMP y otros 5'-mononucleotidos en menor grado actúan como mejorantes del gusto del pescado aún en concentraciones bastante bajas.

La inosina es bastante insípida, mientras que la hipoxantina se asocia con el gusto amargo del pescado en descomposición (SPINELLI, 1966). El IMP es el responsable del gusto a carne de pescado y su degradación es el origen de la pérdida de sabor inicial cuando el pescado se descompone. Por el contrario la progresiva acumulación de hipoxantina origina un gusto amargo que lleva al rechazo organoléptico. Se han propuesto distintos límites en la concentración de este compuesto a partir de los cuales aparecen amargores desagradables:

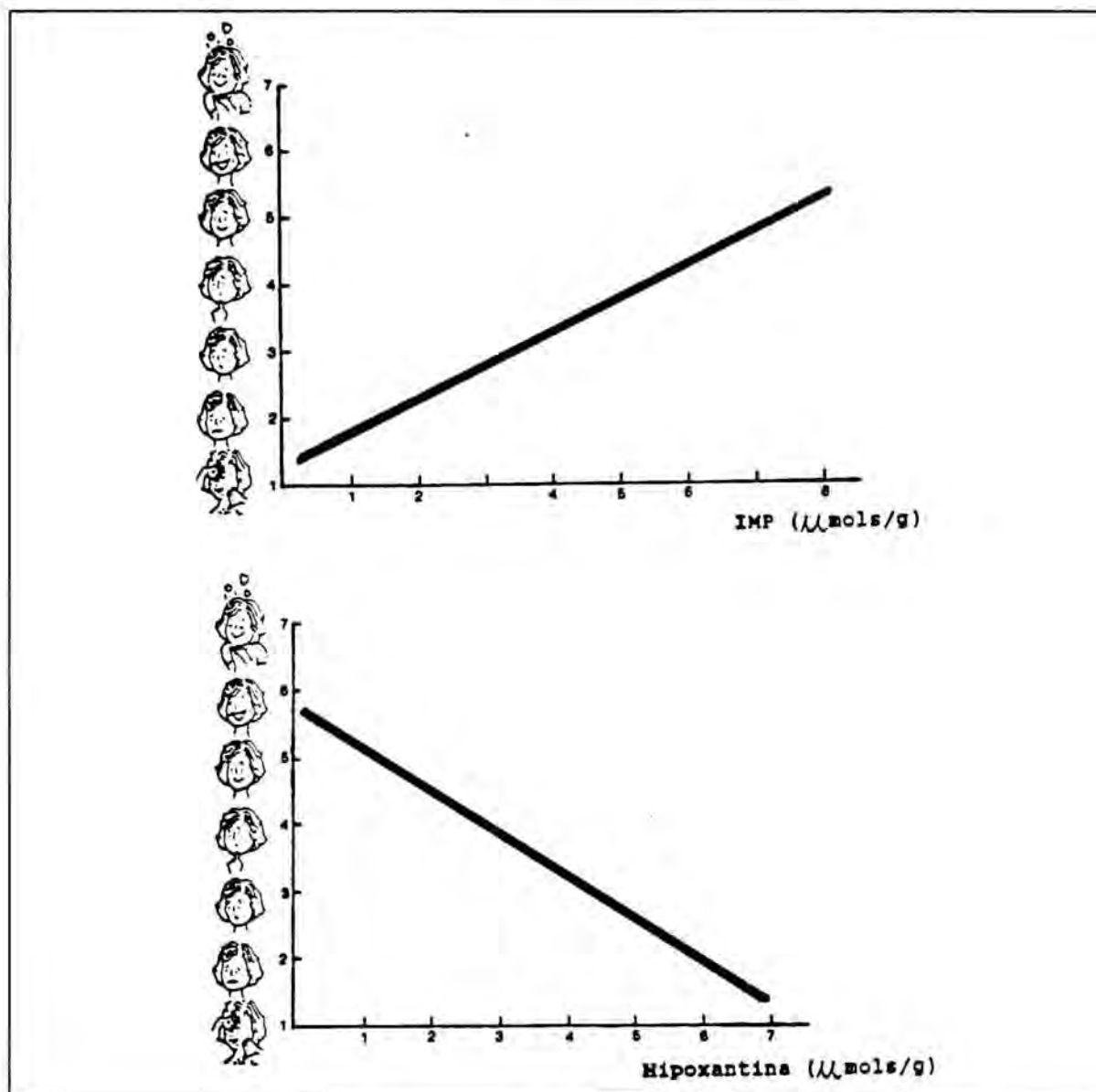
- \* 1,2-2.5  $\mu\text{M/g}$  (JONES, 1961)
- \* < 3.5  $\mu\text{M/g}$  (GALLARDO, 1978)
- \* > 3  $\mu\text{M/g}$  (GREENE y BERNATT-BYRNE, 1990)

DONDERO y col (1982) indican que las muestras son inaceptables cuando los niveles de IMP disminuyen hasta 1.22  $\mu\text{M/g}$  y los de hipoxantina alcanzan 2.45  $\mu\text{M/g}$ .

SPINELLI (1966) señala que añadir hipoxantina sobre una muestra fresca no supone un aumento del sabor amargo, puesto que los 5'-mononucleotidos presentes ejercen una supresión de este efecto. La misma prueba realizada sobre pescado no fresco condujo a un aumento del sabor amargo, puesto que en ella los 5'-mononucleotidos habían sido ya degradados.

Según FLETCHER y col (1990), cuando el pescado está recién capturado, los niveles de IMP pueden resultar demasiado bajos y ello puede originar carnes poco gustosas; por ello recomiendan dos o tres días de almacenamiento en hielo. Estos autores estudian los niveles de IMP e hipoxantina y su correlación con una escala de aceptación sensorial denominada escala de "Smiley" (Figura 9).

Figura 9. Escala de "Smiley" para evaluar la aceptabilidad del pescado en función de su contenido en IMP y en hipoxantina (FLETCHER y col, 1990)



Según ensayos realizados en diferentes especies de pescado, los niveles de aceptación estarían entre 3.4 y 4.7 y serían necesarios 16  $\mu\text{M/g}$  de IMP para llegar al nivel máximo de la escala situado en el 7. Finalmente, proponen una ecuación que tiene en cuenta tanto los valores de IMP como los de HX para predecir el grado de aceptación sensorial del pescado.

GREENE y BERNAT-BYRNE (1990) afirman que tanto el índice K como su modificación  $K_1$ , miden sobre todo la degradación del IMP pero no tienen en cuenta si la especie es formadora de inosina o de hipoxantina. Según estos autores, ninguno de los 2 índices anteriores es útil para evaluar la frescura del bacalao almacenado en hielo, proponen por ello el uso de la relación Ino/Hx ya que cuando este cociente es inferior o igual a 1 aparece un rechazo organoléptico debido a la aparición de un sabor amargo, de que es responsable la acumulación de hipoxantina. Al respecto, LUONG y col. (1992) para la detección de sabores amargos que produzcan rechazo organoléptico, proponen el uso de la relación  $Hx/IMP+Ino+Hx$  a la que denominan índice H. Este índice es inferior al índice K en las especies formadoras de inosina mientras que en las formadoras de hipoxantina es prácticamente igual.

Los nucleótidos y derivados tienen especial interés en pescados, ya que existe el peligro de que aparezcan sabores amargos cuando las muestras se congelan sin tratamiento térmico previo debido a su alto contenido en precursores de hipoxantina.

Debe señalarse, sin embargo, que los nucleótidos no son los únicos componentes que participan en el aroma y el sabor del pescado. También colaboran los imidazoles, aminoácidos libres, aminas volátiles, aldehídos, cetonas, compuestos sulfurados, sales inorgánicas, iones ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , P, Cl<sup>-</sup>), purinas e lípidos.

#### 4.7. METODOS PARA DETERMINAR EL INDICE K: ATP Y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACION

El término "índice K" fue introducido por primera vez en Japón por SAITO y col (1959) y se define como la proporción de inosina (HxR) e hipoxantina (Hx) en relación con el total de nucleotidos y nucleosidos derivados del ATP según la siguiente expresión:

$$K(\%) = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx} \times 100$$

Inicialmente el índice K se determinó mediante técnicas de cromatografía en columna con las que se obtenían dos fracciones: una correspondiente al numerador y otra al denominador de la expresión que define este índice. También algunas técnicas enzimáticas (EHIRA, 1976, KRAMER, 1977, YAMANAKA, 1985) emplean este criterio simplificador. No obstante, es mediante la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) como se consigue la identificación y cuantificación de cada uno de los compuestos implicados en el cálculo del índice K, en un período de tiempo razonablemente corto.

Común a la mayor parte de los métodos empleados en la determinación del índice K es una primera etapa que consiste en la obtención de un extracto, generalmente ácido, que contiene al ATP y sus compuestos de degradación. Para ello, se homogeneiza cierta cantidad de pescado empleando en la extracción: ácido perclórico, ácido tricloroacético o metanol. Algunos autores señalan que la solución de ácido perclórico debe mantenerse en frío (0-4°C) durante la homogeneización (RYDER y col, 1984; IWAMOTO y col, 1987); sin embargo, en la mayoría de los trabajos no se especifica nada al respecto. En el caso de extractos ácidos el pH se ajusta entre 6.5 y 7 y luego se retira cualquier precipitado que pueda haberse formado en esta operación.

Aunque existen otras técnicas, como el fraccionamiento por bario, propuesto por SAITO y col. (1959) o el análisis por electroforesis capilar (LUONG y col, 1992), las de uso más extendido en la actualidad y que a continuación se comentarán con más detalle son:

- a) técnicas de cromatografía en columna empleando, resinas de intercambio iónico,
- b) métodos enzimáticos y
- c) cromatografía líquida de alta eficacia.

#### 4.7.1. DETERMINACION DEL INDICE K MEDIANTE RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO

La técnica original diseñada por SAITO y col (1959) se basaba en la obtención de dos fracciones a partir de un extracto perclórico del pescado pasado a través de una columna rellena con Amberlita IRA-400. A pH alcalino, los nucleótidos quedan retenidos por esta resina, mientras que los nucleosidos y las purinas eluyen con la fracción acuosa. Se obtiene así: una fracción **A** que contiene HxR e Hx y otra **B** que contiene los nucleótidos. El valor del índice K se calcula tras su lectura espectrofotométrica a 250 nm, según la expresión siguiente (SAITO y col, 1959; KATO y col, 1973, GOMEZ-GUILLEN y col, 1992):

$$K(\%) = \frac{EA_{250nm}}{EA_{250nm} + EB_{250nm}}$$

El tamaño de la columna varía normalmente entre 0.6 cm de diámetro interno y 10-15 cm de altura (GOMEZ-GUILLEN, 1992) y la resina original puede sustituirse por otras, también intercambiadoras de aniones fuertemente básicos como la DOWEX 1x8 ya sea en su forma cloruro o formiato (JONES y MURRAY, 1964,; KOBAYASHI y UCHIYAMA, 1970; KENNISH y KRAMER, 1986)

Para el fraccionamiento total de los compuestos implicados en el cálculo del índice K se puede operar pasando el extracto perclórico a través de una columna rellena con la resina Dowex 1x8 en forma de formiato a pH 6.5. En estas condiciones los nucleótidos (ATP, ADP, AMP, IMP y AMP) quedan retenidos y los nucleosidos y las purinas (HxR e Hx) eluyen en la fracción acuosa que se recoge y se guarda para su posterior fraccionamiento. Pasando a través de la columna una solución fórmico/formiato se consigue que aumente progresivamente la concentración de iones formiato a la vez que disminuye el pH. De este modo, los nucleosidos se van liberando selectivamente de la resina y eluyen en el orden siguiente: AMP, IMP, ADP y ATP. Posteriormente para conseguir el fraccionamiento total se aumenta la alcalinidad hasta pH-12 del eluato que contenía los nucleosidos y las purinas no retenidos por la resina Dowex 1x8 a pH 6.5. Dicho eluato se hace pasar a través de una segunda columna rellena con una resina Dowex 1x8 (Cl-) y se consigue la elución selectiva de Hx e HxR, mediante la aplicación de un gradiente en el que la solución A contiene NH<sub>4</sub>OH 0.2N y HCl 0.02N y una solución B que se va incorporando gradualmente y que está compuesta por HCl 0.05N y Na<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 0.01M (JONES, 1960; JONES Y MURRAY, 1964; KATO y col., 1973; KENNISH y KRAMER, 1986; MURATA y SAKAGUCHI, 1986). El uso de la columna BIORAD AG1x4 (Cl-) también permite, mediante la aplicación de un gradiente, la elución selectiva de cada una de estos compuestos. Por último se ha descrito la adaptación a la salida de la columna de un espectrofotómetro con colector de fracciones que mediante un integrador digital permite obtener cromatogramas donde quedarán registrados los picos correspondientes a cada analito (GOMEZ-GUILLEN y col, 1992).

El principal inconveniente de este tipo de técnicas, para que puedan ser aplicadas a un análisis de rutina, es su larga duración ya que son necesarias de 1 a 3 horas para la obtención de resultados. Por ello, además de la aplicación de técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia han surgido otras técnicas quizás menos precisas, basadas fundamentalmente en transformaciones enzimáticas, pero mucho más rápidas.

#### 4.7.2. TECNICAS ENZIMATICAS

Los métodos enzimáticos se basan en la adición controlada sobre el extracto de pescado de los enzimas que intervienen en la degradación del ATP y sus derivados, para finalmente detectar y cuantificar, por espectrofotometría en la mayor parte de los casos, los productos finales de la citada degradación.

En las técnicas propuestas por EHIRA (1976), YAMANAKA (1985), KRAMER (1977) y GREEN y BERNAT-BRINE (1990), la determinación final se efectúa por espectrofotometría a la longitud de onda de máxima absorción del ácido úrico. LUONG y col. (1992) añaden peroxidasa y efectúan la determinación final por potenciometría. NEGISHY y KARUBE (1989) aplican una reacción colorimétrica ligada al proceso red-ox de paso de hipoxantina a xantina y posteriormente a ácido úrico. Con la ayuda de un indicador aparece una coloración rojiza cuya intensidad puede leerse a 550 nm. Finalmente, el prototipo de los llamados métodos enzimáticos de valoración rápida es quizá el FRESHNESS TESTING PAPER<sup>R</sup>, en el que los reactivos (enzimas e indicadores) están inmovilizados en una tira de papel y la determinación final se efectúa por comparación con tablas de conversión de colores.

La mayor parte de los métodos enzimáticos parten del hecho de que tras pocas horas de la muerte del pescado, la práctica totalidad del ATP del músculo ha sido degradado a IMP, vía ADP y AMP. Por ello, puede pasarse por alto la cuantificación de estos compuestos, simplificándose en gran medida la determinación del índice K, si se considera el índice modificado  $K_1$  1981, (GREEN y BERNAT-BRINE, 1990).

$$K_1(\%) = \frac{HxR + Hx}{IMP + HxR + Hx} \times 100$$

#### 4.7.3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA

El uso de la cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación del ATP y sus compuestos de degradación es muy extendido. Inicialmente la técnicas de cromatografía líquida utilizadas para tal fin se aplicaron fundamentalmente sobre muestras de tipo biológico (ANDERSON y MURPHY, 1976; BROWN y col., 1979; CURRIE y col., 1982). En los últimos años, sin embargo, han proliferado las técnicas analíticas para la determinación de esta familia de compuestos, encaminadas a la determinación de hipoxantina, la relación Inosina/Hipoxantina o el cálculo del índice K como indicadores de la frescura de la carne o del pescado.

En la tabla 9 se describen de modo somero metodos descritos por diversos autores, en los que se observan muchas características en común.

La preparación de la muestra consiste, en la mayor parte de los casos, en la precipitación de proteínas mediante la adición de ácido perclórico y la posterior neutralización y retirada del ión perclorato del extracto ácido, añadiendo KOH o  $K_2CO_3$ . Con este tratamiento se forma un precipitado de  $K_2ClO_4$  que se separa por centrifugación y/o filtración. SHIRAI y col (1988) estudian distintos procedimientos de precipitación de proteínas y descartan el uso de etanol frente a la precipitación con ácidos. CURRIE y col. (1982) proponen la retirada del ión perclorato extrayendo con una mezcla de n-octilamina/freon 133, que evita la etapa de eliminación del precipitado de  $K_2ClO_4$ .

Las columnas más utilizadas son las de fase reversa  $C_{18}$  aunque también se han descrito técnicas que emplean columnas de exclusión o de intercambio iónico (CURRIE y col., 1982; IWAMOTO y col., 1987; SHIRAY y col., 1987; LANG y RIZZI, 1989).

Con columnas de fase reversa, lo más corriente es el uso de tampones fosfato como fase móvil. La concentración y el pH de trabajo varían según los autores y en algunos casos se incorporan pequeñas proporciones de metanol o de acetonitrilo que actúan aumentando la fuerza de la fase móvil y acelerando la salida de los compuestos que quedan más retenidos en la columna (nucleósidos y bases xánticas). BROWN y col. (1979) y MURRAY y col (1986) incorporan un par iónico, por lo que el orden de elución de los analitos se ve modificado.



Tabla 9. Metodos para la determinación de ATP y sus compuestos de degradación por cromatografía líquida de alta eficacia (I).

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	ANALITO	COLUMNA	FASE MOVIL	FLUJO ml/min	TIPO de MUESTRA	PREPARACIÓN MUESTRA
ANDERSON Y MURPHY (1976)	ATP, ADP, AMP, Ino, ITP, IDP, NAD, NADH, Xantinas	FASE REVERSA C <sub>18</sub>	* (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.05M pH=6	1-2	FLUIDOS BIOLÓGICOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Precipitación con ETANOL</li> <li>* Evaporación a sequedad</li> <li>* Resuspensión H<sub>2</sub>O</li> </ul>
BROWN Y COL. (1979)	Hx, Xantina, ácido Úrico	FASE REVERSA C <sub>18</sub>	* ac.heptanosulfónico 0.025M/ acetato sódico 0.01M (1:1) pH=4.00	1.5	FLUIDOS BIOLÓGICOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Precipitación con HClO<sub>4</sub></li> <li>* Neutralización</li> </ul>
CURRIE Y COL. (1982)	ATP, ADP, AMP, IMP, Ino, Hx, NAD, IDP, ITP, ac. adenosuccinico	INTERCAMBIO IONICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>* FASE A: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.015M/ KCl 0.001M pH=4.1</li> <li>* FASE B: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M pH=4.5</li> </ul>	1.5	MÚSCULO ESQUELÉTICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Precipitación con HClO<sub>4</sub></li> <li>* Neutralización</li> <li>* Extracción con Tri-octilamina / freón 113</li> </ul>
HARMSSEN Y COL (1982)	AMP, IMP, GMP, NADP, ADP, GDP, CTP, UTP, ATP, GTP	FASE REVERSA C <sub>18</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* FASE A: H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH 0.01M pH=2.85</li> <li>* FASE B: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75M pH=4.40</li> </ul>	2	MÚSCULO CARDIACO	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Precipitación con HClO<sub>4</sub></li> <li>* Neutralización KOH</li> </ul>
BURNS Y KE (1984)	AMP, IMP, Ino, Hx	FASE REVERSA C <sub>8</sub>	* KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01M pH=4.50	0.5	PESCADO	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Precipitación con HClO<sub>4</sub></li> <li>* Neutralización KOH</li> </ul>
MURRAY Y COL (1984)	AMP, ADP, ATP, IMP, Ino, Hx	FASE REVERSA C <sub>18</sub>	* KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1M (pH=7)/ Sulfato de tetrabutilamonio 1.95 mMol/ Metanol 9.5%	1.4	PESCADO	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Precipitación con HClO<sub>4</sub></li> <li>* Neutralización KOH</li> </ul>

Tabla 9. Metodos para la determinación de ATP y sus compuestos de degradación por cromatografía líquida de alta eficacia (II).

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	ANALITO	COLUMNA	FASE MOVIL	FLUJO ml/min	TIPO de MUESTRA	PREPARACIÓN MUESTRA
RYDER y COL (1984)	ATP, ADP, AMP, IMP, Ino, Hx	FASE REVERSA C <sub>18</sub>	* KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.04M	2	PESCADO	* Precipitación con HClO <sub>4</sub> * Neutralización
SAWARR y COL. (1985)	Purinas y pirimidinas	FASE REVERSA C <sub>18</sub>	* H <sub>2</sub> O/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH=4)/ acetonitrilo 3%	0.8	LEVADURAS	* Precipitación con HClO <sub>4</sub> * Adición de (NH <sub>4</sub> OH hasta pH=4
KENNISH Y KRAMER (1986)	AMP, IMP, Ino, Hx	FASE REVERSA C <sub>18</sub>	* KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01M (pH=4.5)	0.5	PESCADO	* Precipitación con HClO <sub>4</sub> * Neutralización
LANG y RIZZI (1986)	Bases púricas, nucleótidos y nucleósidos	INTERCAMBIO IÓNICO	* FASE A: Metanol * FASE B: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.75M (pH= 4.75) * FASE C: H <sub>2</sub> O / Acetonitrilo 2%	1	HEMATIES	* Precipitación con HClO <sub>4</sub> * Neutralización
GILL y COL (1987)	AMP, IMP, Ino, Hx	FASE REVERSA C <sub>4</sub>	* KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01M pH=4.50	2	PESCADO	* Precipitación con HClO <sub>4</sub> * Neutralización KOH
IWAMOTO Y COL (1987)	AMP, ADP, ATP, IMP, Ino, Hx	INTERCAMBIO IÓNICO	* H <sub>2</sub> O para: Hx, Ino * NaCl 0.1M (pH=3) para: AMP, IMP * NaCl 0.3M (pH=1.8) para: ADP, ATP	3	PESCADO	* Precipitación con etanol o HClO <sub>4</sub> * Neutralización KOH

Tabla 9. Metodos para la determinación de ATP y sus compuestos de degradación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	ANALITO	COLUMNA	FASE MOVIL	FLUJO ml/min	TIPO de MUESTRA	PREPARACIÓN MUESTRA
BREMNER y col (1988)	ATP, ADP, AMP, IMP, Ino, Hx	FASE REVERSA C <sub>18</sub>	* K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.05M + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.04M (pH=7) / metanol 5% pH=6	1	PESCADO	* Precipitación con HClO <sub>4</sub> * Neutralización
MATOBA y col. (1988)	Hx, Ino, IMP, GMP, Guanidina	C <sub>18</sub> -P	* Metanol/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.02N (15:85)	0.5	SOLUCIONES ACUOSAS	
WATANABE y col. (1989)	ATP, ADP, AMP, IMP, Ino, Hx, Xantina	FASE REVERSA C <sub>18</sub>	* FASE A: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1M (pH=4.1) * FASE B: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1M (pH=4.1)/ Metanol (9:1) * FASE B: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5M pH=4.5	1	PESCADO	* Precipitación con HClO <sub>4</sub> * Neutralización

## 5. AMINAS BIOGENAS

### 5.1. ORIGEN Y FORMACION

Las aminas biógenas se definen como bases orgánicas de bajo peso molecular, que aparecen en animales plantas o microorganismos como consecuencia de procesos metabólicos (RICE y col, 1976; LUTEN y BOUQUET, 1991).

Bajo esta amplia definición se agrupan compuestos químicos con estructuras variadas, que tienen en común la presencia de al menos un grupo amino y su origen biótico. Es posible establecer una clasificación de estos compuestos en función de su estructura química ( SMITH, 1980-81; PALLER, 1988; IZQUIERDO PULIDO, 1991). Así, las aminas biógenas que más frecuentemente se han encontrado en alimentos se pueden agrupar en :

- a) **Aminas aromáticas:** Histamina, tiramina, serotonina,  $\beta$ -feniletil amina y triptamina.
- b) **Diaminas alifáticas:** Putrescina y cadaverina.
- c) **Poliaminas alifáticas:** Agmatina, espermina y espermidina.

Las aminas aromáticas presentes en los alimentos pueden ejercer sobre el organismo humano tanto efectos psicoactivos como vasoactivos. En el primer caso estos compuestos actúan como neurotransmisores a nivel del sistema nervioso central, mientras que en el segundo su acción, directa o indirecta se puede traducir en un efecto vasopresor en el caso de la  $\beta$ -feniletilamina o de la tiramina, o en una vasodilatación en el caso de la histamina. Los efectos de las poliaminas han sido menos estudiados, pero su presencia parece potenciar la acción de las aminas aromáticas, por un mecanismo que puede estar relacionado con los procesos de absorción intestinal o por competencia con los sistemas de detoxificación.

En condiciones normales, el cuerpo humano es capaz de detoxificar rápidamente las aminas biógenas mediante los acción de enzimas amino-oxidasas o por conjugación. Cuando por alguna circunstancia estos mecanismos se encuentran bloqueados o se saturan, debido a la ingestión de cantidades muy altas de estos compuestos, pueden aparecer una serie de problemas toxicológicos cuya gravedad varía según el caso.

Espermina, espermidina y putrescina presentan una distribución universal en animales y plantas y las dos últimas, al menos, se encuentran en la mayoría de las bacterias. El resto de estos compuestos, aunque también se encuentran en los seres vivos,

se detectan en cantidades apreciables en los alimentos, especialmente cuando estos han sufrido una contaminación bacteriana (SMITH, 1980-81).

Así, es posible establecer una clasificación de los alimentos en función del significado que se pueda asignar a la presencia de altos nivel de aminas biógenas en ellos (VIDAL-CAROU, 1987):

- a) **Alimentos en los que ya se puedan encontrar ciertas cantidades de aminas biógenas preformadas.** En este caso su presencia no sería atribuible, en principio, a ninguna actividad bacteriana. En este grupo se incluyen alimentos en cuya composición intervengan sangre o vísceras; tales como hígado o riñones (HENRY, 1960) y algunos productos vegetales como plátanos, aguacates o tomates (GARCIA-MORENO, 1981; SMITH, 1980-1981).
- b) **Alimentos que se deterioran con facilidad, en los que los microorganismos responsables de la putrefacción se desarrollan rápidamente.** En este grupo se incluirían la carne y sobre todo el pescado. La presencia de estos compuestos se hace extensiva tanto a los productos frescos como derivados, si no se mantienen durante el proceso de elaboración condiciones adecuadas que impidan la proliferación de microorganismos.
- c) **Alimentos cuya elaboración requiere la presencia de microorganismos que intervienen en procesos de fermentación o maduración.** En este grupo se incluirían: bebidas alcohólicas fermentadas, enbutidos y quesos, entre otros.

Es difícil establecer un mecanismo de formación común para todas la aminas biógenas, pero la hipótesis más ampliamente aceptada es su formación por un mecanismo de descarboxilación mediado por enzimas bacterianos. En la figura 10 se muestra la estructura química de las aminas biógenas estudiadas en este trabajo así como la de sus aminoácidos precursores. En la figura 11 se esquematizan las rutas de formación sugeridas por diversos autores (RITCHIE y MACKIE, 1980, SMITH, 1980-81, BALDINI, 1982; IZQUIERDO-PULIDO, 1991).

Para la formación de aminas en alimentos por vía de descarboxilación bacteriana se consideran necesarios varios factores (RICE y KOHELER, 1976; RICE y col., 1976):

- a) Disponibilidad de aminoácidos precursores libres.
- b) Presencia de microorganismos con capacidad de descarboxilar estos aminoácidos
- c) Condiciones favorables para el crecimiento de los microorganismos y para el desarrollo por parte de estos de su actividad aminoácido descarboxilasa.

En general, en los alimentos frescos la fracción aminoacídica libre es poco importante, pero a medida que se deterioran ésta aumenta debido a procesos de proteólisis, mediados por enzimas endógenos o de la flora bacteriana contaminante. Las condiciones favorables al desarrollo bacteriano y a la subsiguiente formación de aminas se alcanzan rápidamente en el pescado, en el que la elevada actividad de agua, la relativa laxitud de sus tejidos y la elevada proporción de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, permiten un rápido avance de la flora microbiana desde la piel o el tracto digestivo hacia el interior del músculo. Las bacterias descarboxilan inicialmente los aminoácidos libres y en fases de descomposición más avanzada los liberados a partir de las proteínas.

La capacidad aminoácido descarboxilasa no la poseen todos los microorganismos. Así, en general, se encuentra asociada a microorganismos responsable de la putrefacción y no a la flora saprófita del pescado (HUSS, 1988). Ello estaría de acuerdo con la hipótesis propuesta por Koessler y col. en 1928 (VOIGT y EITENMILLER, 1977) que postula que los microorganismos desarrollan la capacidad descarboxilasa como un mecanismo de protección frente a la acidez de medio. Se ha descrito también una cierta especificidad en la acción descarboxilasa. Así, mientras que no todas las especies bacterianas son capaces de descarboxilar la histidina y formar histamina, sí que parece muy extendida la capacidad de descarboxilar ornitina y lisina (FRANK, 1985).

Gale en 1946 (EITENMILLER y de SOUZA, 1984) señalan que para que un determinado microorganismo presente actividad aminoácido descarboxilasa hay que considerar diversos factores:

Figura 10. Estructura química de las aminas biógenas

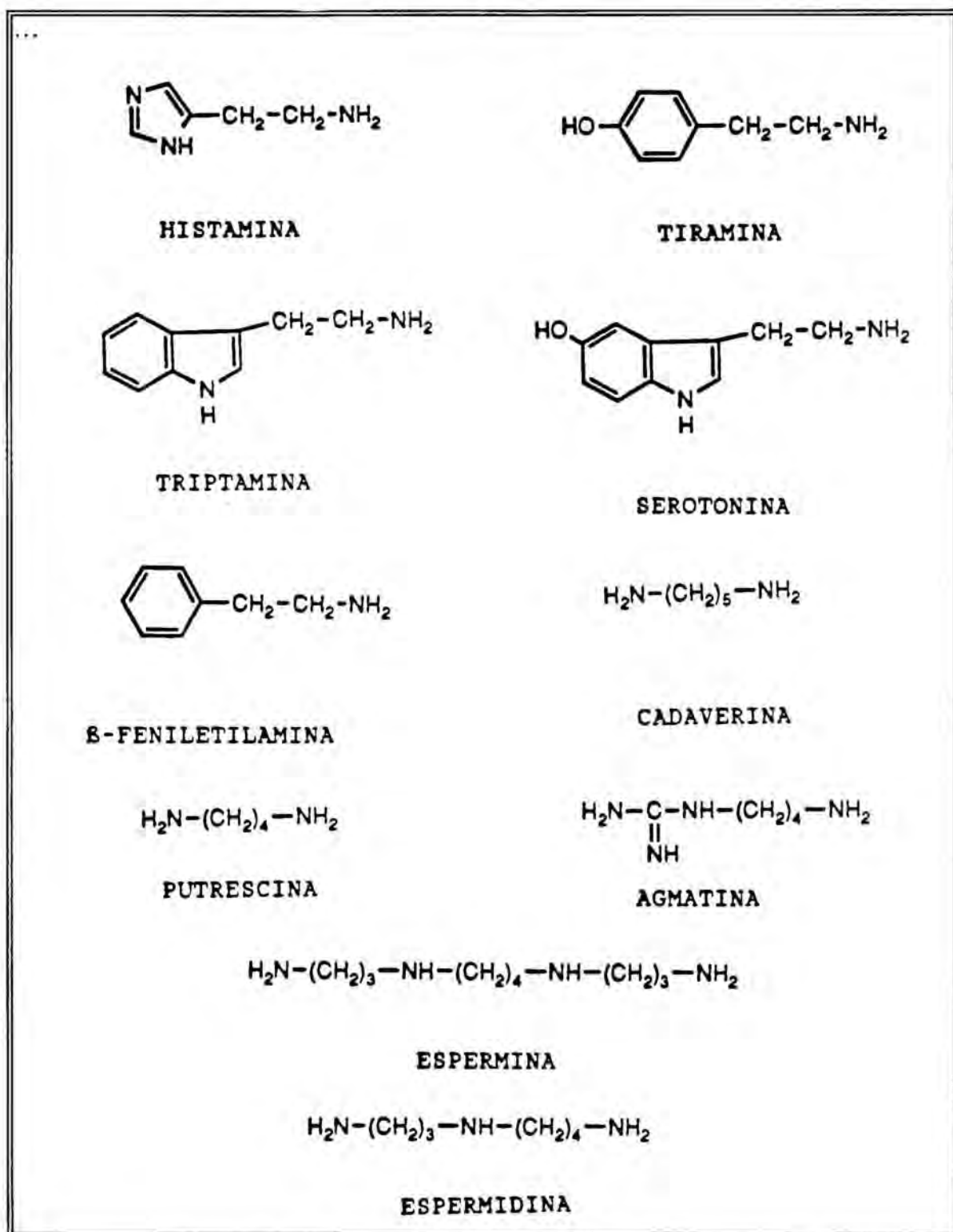
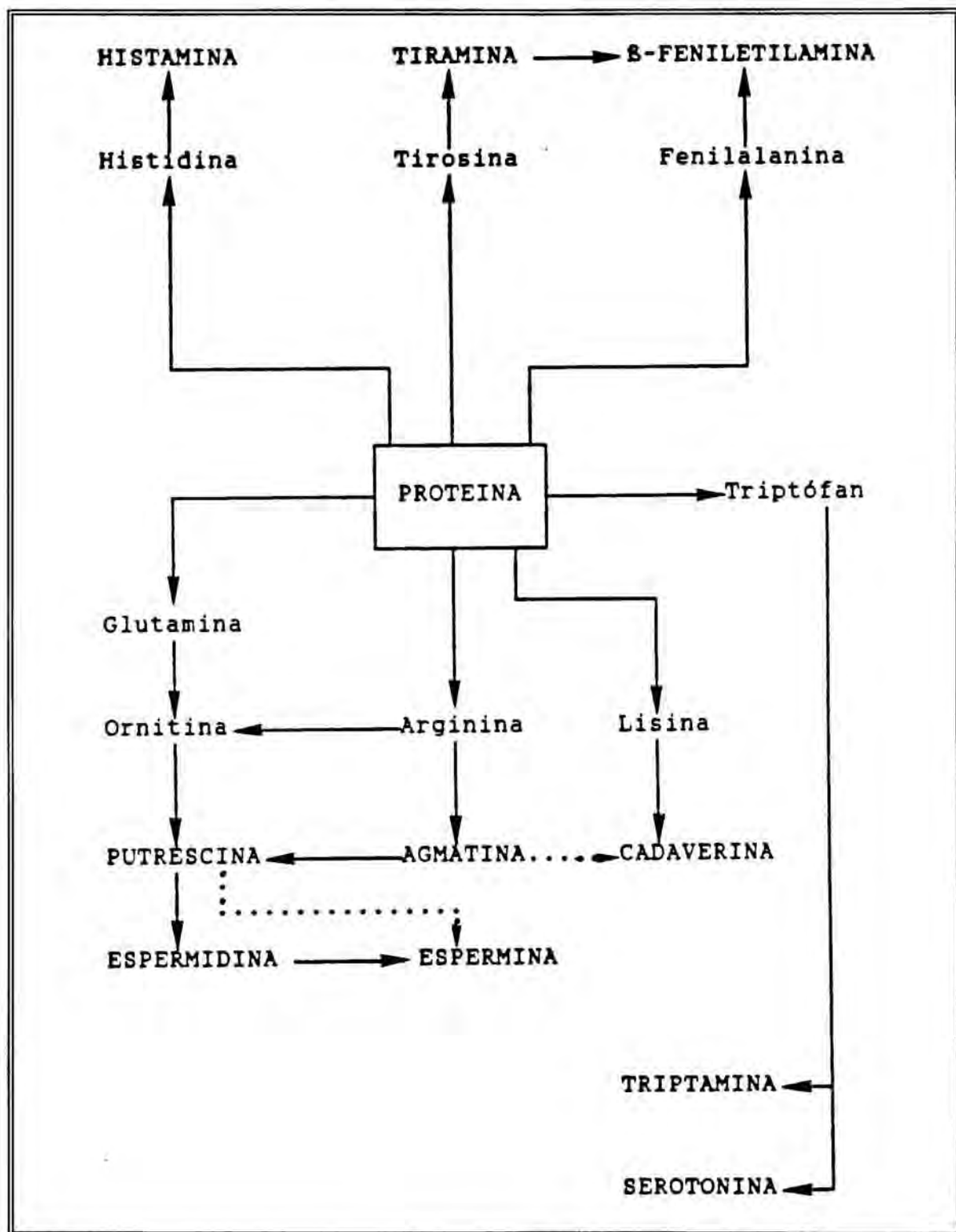


Figura 14. Rutas de formación de aminas biógenas a partir de sus precursores





- a) poseer la información genética para la síntesis de estas enzimas.
- b) presencia de los aminoácidos precursores en el medio de crecimiento,
- c) presencia de ciertos cofactores como la piridoxina o el ácido nicotínico,
- d) tener actividad enzimática más intensa cuando cesa la división celular,
- e) actividad descarboxilasa favorecida a pH ácido y
- f) temperaturas menores de 30°C como óptimas para la síntesis de enzimas con actividad descarboxilasa.

La necesidad de la coincidencia de estos factores explicaría que no todos los microorganismos sean capaces de formar aminas biógenas, y el que algunas especies presenten capacidad descarboxilasa o no dependiendo del medio en que crecen (EITENMILLER y col., 1981). Así, el hecho de que se compruebe la capacidad aminoácido descarboxilasa de un determinado microorganismo sobre un medio de cultivo no garantiza que éste produzca aminas biógenas sobre un sustrato alimenticio o viceversa.

Aunque la hipótesis de la descarboxilación por parte de los microorganismos es la más extendida, algunos autores señalan otras vías alternativas como la descarboxilación térmica, la aminación de aldehídos o cetonas, la ruptura hidrolítica de poliaminas, o N-desalquilaciones de aminas secundarias o terciarias (SMITH, 1980-81; BINDER y BRANDL, 1983; JANZ y col., 1983; ALLISON y McFARLANE, 1989)

## 5.2. RIESGOS DE LA INGESTIÓN DE AMINAS BIOGENAS DE ORIGEN ALIMENTARIO

La ingestión de aminas biógenas contenidas en los alimentos puede suponer riesgos de toxicidad. La manifestación del efecto producido por la ingestión de estos compuestos dependerá del tipo de amina y de la cantidad ingerida.

Antes de discutir la toxicidad atribuible a cada amina biógena, es necesario enfatizar que sus efectos son el resultado, salvo excepciones, del consumo de alimentos que contengan cantidades muy elevadas de estos compuestos. Es entonces cuando los mecanismos de destoxicación naturales pueden quedar saturados, de forma que las aminas alcanzan la circulación sanguínea (JOOSTEN, 1988). RAMANTANIS (1984) y CABANIS (1985) señalan también que la actividad enzimática destoxicadora puede hallarse disminuida por causas genéticas hereditarias o por patologías adquiridas. Y, finalmente, no se pueden olvidar los casos de pacientes tratados con medicamentos Inhibidores del enzima Mono-Amino Oxidasa (IMAO), en los que el mecanismo responsable de la metabolización de las aminas biógenas en el organismo se encuentra inhibido a causa del tratamiento.

En relación con su contenido en pescados, la histamina ha sido, quizás, la amina biógena mas estudiada, debido a que se la considera el principal agente causal de la intoxicación histamínica; desorden frecuentemente asociado al consumo de pescado en condiciones higiénico-sanitarias deficientes. Putrescina y cadaverina parecen potenciar los efectos de la histamina. El papel de otras aminas ha sido menos estudiado, aunque se conoce su relación con problemas toxicológicos observados tras el consumo de otros alimentos.

En la tabla 10 se resumen algunos de los riesgos toxicológicos que pueden relacionarse con las aminas biógenas contenidas en los alimentos.

Tabla 10. Riesgos toxicológicos asociados al consumo de aminas biógenas contenidas en los alimentos.

	INTOXICACION HISTAMINICA	MIGRAÑA	INTERACCION IMAO	FORMACION DE NITROSAMINAS	OTROS EFECTOS
HIS	+++	++	+++	+	toxicidad hepática
TIR	+	+++	+++	+	neuroológicos
$\beta$ -FEN	+	++	+++	+	neuroológicos
SER	-	-	+++	+	gástricos cardíacos
TRIP	+	-	+	+	-
PUT	+	-	-	+	-
CAD	+	-	-	+	-
ESMD	+	-	-	+	-
ESPM	+	-	-	+	-
AGM	-	-	-	+	-

\* La DMA también puede formar nitrosaminas (apartado 3).

### 5.2.1. INTOXICACIÓN HISTAMINICA.

La intoxicación histamínica se produce como resultado de la ingestión de alimentos que contienen niveles inusualmente altos de esta amina (TAYLOR, 1988). Sin embargo, BILLON (1978) señaló que esta intoxicación alimentaria podía ser el resultado tanto de la ingestión de alimentos con un alto contenido de histamina, como de sustancias capaces de liberar este compuesto de los tejidos del sujeto, como la adrenalina.

Durante mucho tiempo este tipo de desorden se denominó envenenamiento por escómbridos, puesto que se observaba tras el consumo de pescados pertenecientes a las familias **Scombridae** y **scomberesocidae**. TAYLOR (1985) considera que esta denominación no es la más adecuada y sugiere el nombre de Intoxicación Histamínica puesto que también se han descrito intoxicaciones de este tipo, tanto tras el consumo de pescados no pertenecientes a este grupo, como tras el consumo de otros alimentos:

- pescados pertenecientes a las familias **Pomatomidae**, **Caryphanidae**, **Carangidae**, **Clupeidae** y **Engraulidae**
- embutidos madurados (TAYLOR y col., 1978; SMILJANIC y TEODOROVIC, 1990)
- pollo (TAYLOR, 1983)
- queso (DOEGLAS y col, 1967; CHANBERS y STARUSKIEWITCZ, 1978; EDWARDS y SANDINE, 1981; JANZ y col., 1983; TAYLOR, 1985;

SIEBER y LAVANDRY, 1990)

- leche (CHANDER y col., 1989)
- chocolate (INGLES y col., 1978)
- cereales (TARJAN y JANOSSY, 1978)
- chucrut (Mayer y Pause, 1972 en TAYLOR 1986, TAYLOR, 1978)
- vino (OUGH, 1971; SCHNEYDER, 1973)
- extracto de levaduras (BLACKWELL, 1963)
- setas (YEN, 1992)

A diferencia de otros alimentos que contienen toxinas, los implicados en la intoxicación histaminica sólo la producen ocasionalmente cuando las condiciones de elaboración o de conservación han sido deficientes (LINDNER, 1984). Así, aunque se han descrito contenidos muy elevados de esta amina en pescados y derivados, difícilmente se detecta en pescado fresco, congelado o en derivados de esmerada elaboración.

## **Epidemiología**

Aunque ya en 1838 HENDERSON describía un brote de intoxicación en 5 marineros de su tripulación, que muy bien podía tratarse de un caso de intoxicación histaminica, los datos de que se dispone sobre la incidencia de este tipo de intoxicaciones son relativamente escasos.

Según TAYLOR y col. (1984 y 1986) las razones que justifican la falta de datos estadísticamente fiables acerca de la incidencia real de este tipo de intoxicaciones son:

- el que el cuadro que aparece sea muchas veces poco importante y de síntomas inespecíficos,
- diagnósticos erróneos que se contabilizan como alergias alimentarias o,
- el hecho de que en muchos países, España entre ellos, esta enfermedad no se encuentre dentro del grupo de enfermedades de declaración obligatoria.

TAYLOR (1985) señala que debería darse mayor importancia a estas intoxicaciones y considera que sería adecuada su declaración obligatoria a las Autoridades Sanitaria competentes. Sólo de este modo, podría disponerse de datos fiables sobre la incidencia de estas intoxicaciones, que ayudarían a efectuar evaluaciones reales del estado sanitario de alimentos de amplio consumo.

Bryan en 1980 y en 1986 (MATCHES y ABEYTA, 1983) recopilan datos sobre brotes de intoxicación histamínica ocurridos en los EEUU entre los años 1970-1979 y 1979-1984. Su trabajo demuestra que las intoxicaciones alimentarias atribuidas al consumo de pescados en un 25% en el primer período de estudio y en un 44% en el segundo, podrían ser atribuibles a casos de intoxicaciones histamínicas. También LISTON (1990) indica que la mayoría de los brotes de toxiinfecciones provocadas por el consumo de pescado en EEUU son debidos a intoxicaciones de este tipo.

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 la intoxicaciones producidas por *Staphilococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahemolyticus*, *Yersinia enterocolítica*..., si bien señala que se trata de una intoxicación moderadamente peligrosa y con una expansión moderada en el futuro.

Japón es el país que ha mostrado una mayor preocupación por este tema, debido fundamentalmente a su elevado consumo de pescado, ya desde los años 50 se dispone de datos sobre la aparición de brotes de intoxicación histamínica. En EEUU y en Gran Bretaña se realizan seguimientos de este tipo de intoxicaciones desde los años 70 a los que progresivamente se han ido incorporando otros países como Canadá, Francia, Alemania, Checoslovaquia o los Países Nórdicos (TAYLOR, 1986). En la tabla 11 se muestran los datos referente a la incidencia de la intoxicación histamínica en distintos países, aportados por TAYLOR (1985 y 1986) en trabajos de tipo recopilatorio.

En nuestro país, no se poseen cifras reales sobre la incidencia de este tipo de intoxicación y ello contribuye en gran parte el hecho de que no se trate de una enfermedad de declaración obligatoria, ni para el Boletín Epidemiológico Semanal del Ministerio de Sanidad y Consumo; ni en el "Butlletí Epidemiològic de Catalunya", del " Departament de Sanitat i Seguretat Social".

Tabla 11. Incidencia de la intoxicación histamínica en distintos países (TAYLOR, 1985 y 1986).

PAIS	PERÍODO DE TIEMPO	NUMERO DE BROTES	NUMERO DE CASOS
CANADA	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
NUEVA ZELANDA	1973-1974	4	11

Sin embargo, MURRAY y col. (1982) describen un brote declarado en Gran Bretaña en Diciembre de 1980 tras el consumo de una semiconserva de anchoa procedente de España y que contenía 680  $\mu\text{g/g}$  de histamina. Más recientemente, ARNEDO y col. (1989) describieron un brote de intoxicación histamínica que en verano de 1988, afectó a 21 personas del comedor de una empresa, tras consumir un plato elaborado a base de atún.

### Sintomatología y mecanismo de acción de la histamina.

Las intoxicaciones histamínicas se confunden a menudo con alergias de tipo alimentario. Ello es comprensible puesto que la histamina "in vivo" es el mediador primario de los trastornos alérgicos; por ello a estas intoxicaciones se las ha denominado también "falsas alergias alimentarias" (CABANIS, 1985). Según LERKE y col. (1978), las principales diferencias entre la intoxicación histamínica y un cuadro alérgico se basan en que:

- los brotes suelen afectar a un elevado número de comensales, no siendo así en los cuadros alérgicos;
- los comensales afectados han consumido, en otras ocasiones el mismo tipo de alimento sin presentar síntomas y una vez recuperados pueden volver a consumir pescado similar sin sufrir efectos adversos;

- el análisis de los restos de alimentos ingeridos, cuando se puede disponer de ellos, confirma la presencia de elevados contenidos de histamina.

EL período de incubación suele ser breve, varía entre unos minutos o pocas horas, y normalmente nunca supera las 8 horas (TAYLOR, 1985). Los síntomas pueden ser variados y es frecuente que todos los afectados no presenten todos los descritos, aunque el cuadro sea semejante (CLIFFORD y col., 1989). Los síntomas más frecuentes, descritos por TAYLOR (1988), se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Síntomas más frecuentes de las intoxicaciones histamínicas

<b>GASTROINTESTINALES</b>	Nauseas, vómitos, diarrea, y digestión pesada
<b>NEUROLOGICOS</b>	Cefalea, palpitaciones, rubor, prurito, ardor y picor
<b>HEMODYNAMICOS</b>	Hipotensión
<b>CUTANEOS</b>	Sarpullido, urticaria, edema e inflamación localizados.

La manifestación de esta sintomatología puede llegar a ser espectacular, pero generalmente se trata de cuadros poco graves que remiten en muy pocas horas. Son muy raros los casos de muerte. Así, Halstead en 1967 (CRUICKSHANNK y WILLIAMS, 1978) tras revisar 1660 casos declarados en EEUU solo contabilizaron un fallecimiento directamente relacionado con la intoxicación.

Si la intoxicación es ligera, los síntomas pueden pasar desapercibidos o incluso ser atribuidos a una ligera insuficiencia hepática o a una alergia alimentaria. En los pacientes alérgicos y de carácter ansioso suele presentarse una sintomatología de mayor intensidad. Es relativamente frecuente que la mayoría de los pacientes que han sufrido una intoxicación histamínica, incluso los pertenecientes a un mismo brote, solo hayan padecido unos cuantos de los síntomas anteriormente señalados, ya que la severidad del cuadro puede variar no solo dependiendo de la cantidad de histamina ingerida, sino también por la sensibilidad individual del paciente frente a esta amina (BINDER y BRANDL, 1983; TAYLOR, 1985). Se ha señalado que variaciones del pH en la mucosa intestinal, de la actividad histaminolítica del organismo y del estado de funcionamiento de la corteza

suprarrenal influyen sobre la respuesta del organismo frente a la histamina ingerida (HENRY, 1960; Del PRETE y col., 1979; PECHANEK y col., 1983).

Considerando los síntomas uno a uno, se ha observado que su frecuencia de aparición no es siempre la misma (MURRAY y col, 1982). Este hecho es fácilmente explicable teniendo en cuenta la variabilidad interindividual en la respuesta del organismo frente a la intoxicación histamínica, anteriormente comentada. Esta misma variabilidad, junto con el efecto potenciador que pueden ejercer otros compuestos, es lo que dificulta el establecimiento de unos niveles "tóxicos" de histamina contenida en alimentos. Pese a todo, algunos autores citan cifras límite que se recogen en la tabla 13. Estos valores, lógicamente, podrán tomarse como referencia pero sin olvidar las consideraciones respecto a la variabilidad interindividual y el efecto potenciados de otras sustancias.

Finalmente, se repasarán someramente aspectos relacionados con el mecanismo de acción de la histamina, que explican la aparición de los síntomas anteriormente comentados.

La histamina provoca la contracción de muchos músculos lisos, como los bronquiales e intestinales, pero relaja poderosamente otros como los vasos sanguíneos periféricos. Estas acciones son la consecuencia de la interacción de la histamina con sus receptores específicos, que se encuentran situados a nivel de la pared celular. Se han descrito dos tipos de receptores para esta sustancia,  $H_1$  y  $H_2$  situados en las membranas celulares.

Algunos efectos como la broncoconstricción y la contracción intestinal están mediados por receptores  $H_1$  y remiten fácilmente con la administración de los fármacos antihistamínicos clásicos, mientras que el aumento de secreción gástrica está mediado por receptores  $H_2$ . Otros efectos como la hipotensión debida a la dilatación de la circulación vascular periférica están mediados tanto por receptores  $H_1$  como  $H_2$  (GOODMAN GILMAN y col., 1986).

Los síntomas mas frecuentes de la intoxicación histamínica son debidos a la acción sobre el sistema cardiovascular (MORROW y col., 1991). La vasodilatación periférica explica el cuadro de hipotensión, el enrojecimiento de la piel y la aparición de cefaleas. Otro efecto de la histamina es un aumento en la permeabilidad de los vasos, responsable en muchos casos de la aparición de edemas y urticarias (MURRAY y col, 1984).

La contracción de las fibras musculares lisas mediada por receptores  $H_1$ , explicaría las contracciones intestinales que pueden traducirse en síntomas como el dolor abdominal, la diarrea, las nauseas o el vómito. Según TAYLOR (1986), la estimulación de las neuronas sensoriales y motoras, mediadas también por receptores  $H_1$ , podría ser la causa



Tabla 13. Niveles "tóxicos" de histamina citados para pescados y para alimentos en general

<b>PESCADOS</b>	<b>HISTAMINA</b>	<b>EFFECTOS</b>
SCHENEYNER (1973)	50-100mg/100g > 50mg/100g	asintomáticos tóxicos
ARNOLD y BROWN, (1978)	< 5 mg/100g 5-20 mg/100g  20-100 mg/100g  > 100 mg/100g	asintomático tóxico en individuos sensibles Posiblemente tóxico toxico
FDA 1982 (PAN y JAMES, 1985)	> mg/100g	tóxicos
TAYLOR y col.(1984)	20mg/100g	tóxicos
BARTHOLOMEW y col. (1987)	5mg/100g	tóxicos en pacientes tratados con IMAO
<b>ALIMENTOS EN GENERAL</b>	<b>HISTAMINA</b>	<b>EFFECTOS</b>
Ienestea (1973) (TAYLOR, 1985)	8-40mg 70-100mg 1500-4000mg	ligeramente tóxicos bastante tóxicos muy tóxicos
Del PRETE y col. (1979)	5-6 mg/100g 6-70 mg/100g > 70 mg/100g	tolerables ligeramente tóxicos muy tóxicos
PECHANNEK y col. (1980)	5-8 mg 10-100mg	ligeramente tóxicos muy tóxicos
Certer for Disease Control USA (KAROLUS y col., 1985)	20 mg/100g	tóxicos

de la aparición de dolor e inflamación cutánea.

En cuanto a la acción de la histamina sobre los receptores H<sub>2</sub>, estimulados de la secreción gástrica no se han encontrado en la bibliografía datos referentes a la relación con alguno de los síntomas normalmente asociados a la intoxicación histamínica.

### **Potenciación de la toxicidad de la histamina.**

Mediante estudios experimentales, se ha comprobado que el organismo humano responde de distinto modo frente a la administración por vía oral de la histamina pura, y de la histamina contenida en alimentos. La administración de dosis de histamina pura equivalentes a las contenidas en un alimento implicado en una intoxicación histamínica, no producía efecto alguno cuando se administraban a voluntarios humanos (TAYLOR, 1986). La aparente contrariedad entre la ausencia de toxicidad de la histamina pura y la toxicidad evidente, de niveles incluso menores de esta misma sustancia contenida en los alimentos, sugiere la existencia de efectos de potenciación por parte de otros compuestos (RICE y col., 1976; TAYLOR y col., 1986). Según STRATTON y col. (1991), los potenciadores de la acción tóxica de la histamina pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- a) **otras aminas biógenas**
- b) **fármacos**
- c) **bebidas alcohólicas**

Para una mejor comprensión del modo de actuación de los compuestos potenciadores de los efectos de la histamina, se exponen a continuación, y de modo somero, los mecanismos de destoxicación de la histamina que actúan en el organismo humano en condiciones normales.

La histamina ingerida por vía oral, si consigue superar la protección de la barrera intestinal, puede ser metabolizada por dos vías distintas en función de enzima que actúe: la diaminoxidasa (DMA) o la Histamin N-metiltransferasa (HMT). Ambas enzimas están presentes en los tejidos de todos los mamíferos (TAYLOR y col., 1984).

Por acción de la DAO, la histamina es degradada a Imidazolacetaldehído, peróxido de hidrógeno y amoníaco. Este enzima no es selectivo y puede actuar también sobre otras diaminas. La HMT es un enzima que presenta una elevada selectividad frente a la histamina, actúa metilándola y requiere la presencia de S-adenosilmetionina que actúa como donante del grupo metilo. Posteriormente, la N-metilhistamina es oxidada por el enzima monoaminooxidasa (MAO) dando lugar a ácido N-metilindolacético. En ambos casos el metabolito final es eliminado a través de la orina (TAYLOR y col., 1986). En la

figura 12 se muestran las dos vías de metabolización de la histamina.

Hestenberg y col. en 1984 (TAYLOR, 1986), demuestran que la HMT se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano y presenta distinta actividad según el tejido considerado. De mayor a menor actividad los tejidos podrían agruparse como sigue: hígado >> colon > bazo > pulmón > intestino delgado > estómago. El riñón, no incluido en este estudio, presenta también capacidad metiladora (TAYLOR, 1986). Contrariamente, la DAO se encuentra sólo en el intestino delgado.

Una pequeña proporción de histamina puede ser acetilada mediante enzimas microbianos, especialmente de *Escherichia coli* y *Acromobacter aerógenes*, presentes en el tracto intestinal (IENISTEA, 1971).

Cuando la ingestión de histamina es muy elevada o en presencia de agentes potenciadores de su efecto, estos mecanismos de detoxificación pueden resultar insuficientes. Además, Price y Smith observaron que, en algunos casos, las aminas biógenas contenidas en los alimentos podían ser absorbidas a través de la mucosa oral y evitar de este modo el sistema enzimático protector, localizado principalmente en intestino e hígado (TAYLOR, 1986).

#### Otras aminas biógenas

Se ha señalado que otras aminas biógenas presentes en los alimentos, como la tiramina,  $\beta$ -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 este efecto de potenciación no se conoce con precisión, pero se han indicado dos hipótesis.

La primera implicaría una inhibición de los enzimas intestinales de degradación de la histamina, DAO y HMT. Al respecto se ha comprobado que  $\beta$ -feniletilamina y triptamina son inhibidores de la HMT y putrescina y cadaverina de la DAO. Por el contrario, tiramina y cadaverina se han señalado como inhibidores de ambos complejos enzimáticos (TAYLOR, 1986; JOOSTEN, 1988). Bloqueados parcialmente estos mecanismos de detoxificación, aumentaría la absorción de la histamina a nivel intestinal e igualmente se observaría un aumento de la vida media de esta amina en el torrente sanguíneo (TAYLOR y SUMMER, 1986).

Al respecto cabe matizar que HUI y TAYLOR (1983) observaron que la potenciación de la toxicidad de la histamina, por inhibición de los enzimas encargados de su metabolización, sólo se presentaban cuando las relaciones cadaverina/histamina o putrescina/cadaverina eran 5/1 o superiores.

La segunda hipótesis o "hipótesis de la interrupción de la barrera", postula el establecimiento de una competencia en los lugares de unión a la mucina intestinal. Parrot y Nicot en 1966 (TAYLOR, 1986) sugieren que sustancias como la putrescina y la cadaverina podían interferir en la función protectora de la mucina intestinal, impidiendo la unión con la histamina y favoreciendo así la absorción de la misma. Esta hipótesis predice que el total de compuestos imidazólicos transportados a través de la barrera intestinal se incrementa en presencia de las citadas sustancias.

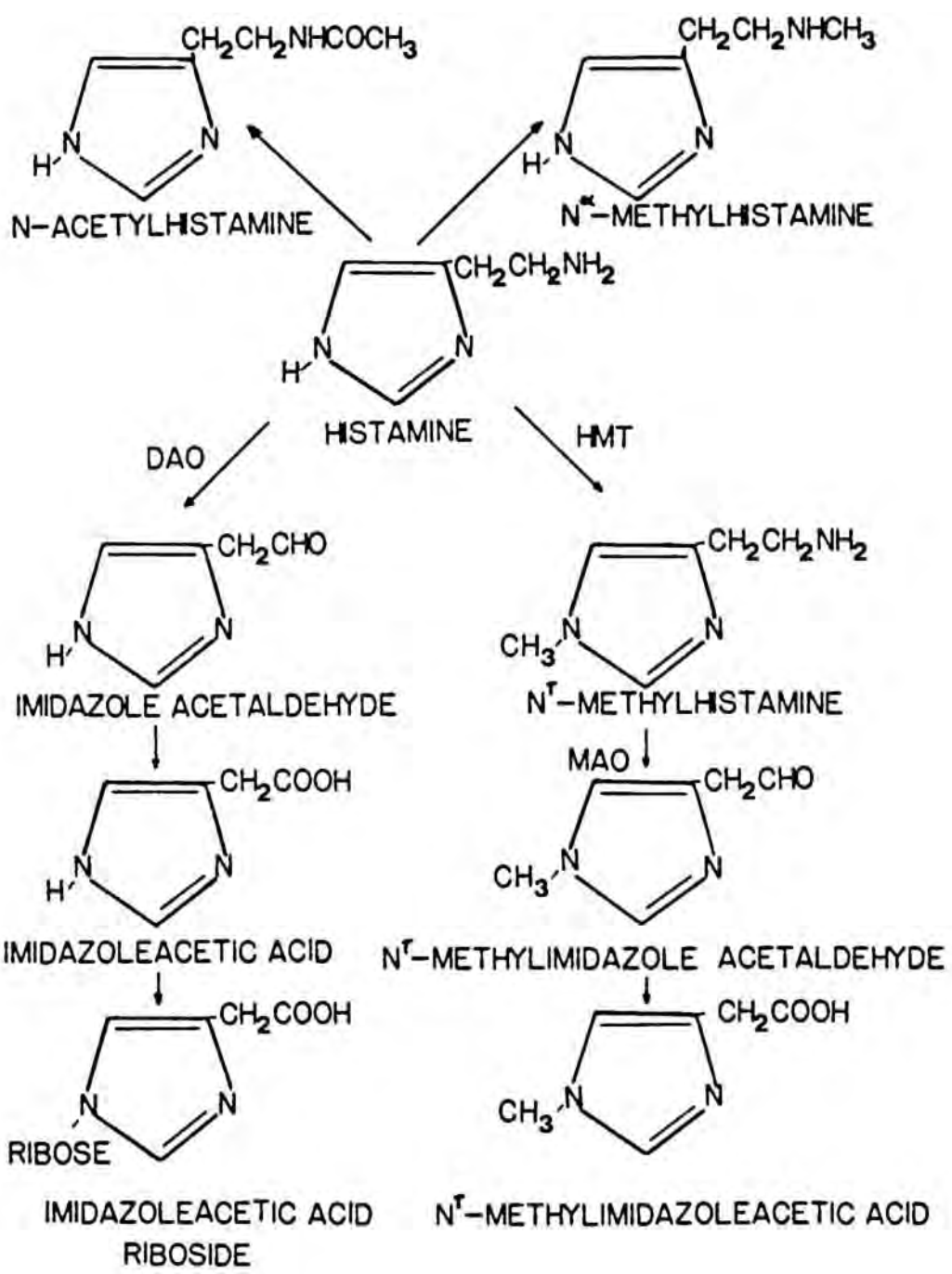
Esta teoría no está, sin embargo, totalmente apoyada por datos experimentales, sino que existen datos bastante contradictorios. En estudios "in vitro" se ha observado que la unión histamina-mucina se inhibe en presencia de espermina, espermidina, putrescina y cadaverina en un extracto de atún (CHU y BJELDANES, 1981). No obstante para que se produzca esta inhibición se requieren concentraciones de aminas muy elevadas. Se ha comprobado que un extracto de atún rico en aminas biógenas causaría sólo un 32% de inhibición de la unión histamina-mucina y todavía quedaría mucha mucina en el tracto digestivo. A la vista de estos datos se podría concluir que este mecanismo de inhibición debe de jugar un papel secundario en la potenciación de los efectos tóxicos de la histamina (TAYLOR, 1986).

Pese a que la potenciación de los efectos de la histamina, por parte de otras aminas biógenas parece ampliamente probado, al menos en estudios "in vitro", CLIFFORD y col. (1991) en un estudio realizado con voluntarios en Gran Bretaña no observaron diferencias significativas entre los efectos provocados por el consumo de diferentes lotes de caballa, que contenían distintas concentraciones de aminas biógenas (cadaverina, putrescina, tiramina, espermina y espermidina). Señalaron que probablemente estas sustancias no son las responsables de la intoxicación ni ejercen efecto sinérgico ninguno.

### Efecto potenciador del alcohol

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

MARQUAROT y WERRINGLOER (1965) demostraron, en animales de laboratorio, que el 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 lo tanto indiferente su contenido en bebidas alcohólicas.

El fenómeno de potenciación de los efectos de la histamina por el 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.

Teniendo en cuenta la potenciación de efectos ejercida por el alcohol, las cifras señaladas por diversos autores como "tóxicas" se sitúan entre 2 y 10 mg/100 (QUEVAUVILLER y MAZIERE, 1969; LAFON-LAFUORCADE, 1975; BATTAGLIA y FRÖLICH, 1978 y MATTHEY, 1979) y son sensiblemente inferiores a las marcadas para pescados y alimentos en general (tabla 13).

### 5.5.2. MIGRAÑAS DE ORIGEN ALIMENTARIO

La migraña, jaqueca o hemicraneal, es una enfermedad de origen nervioso caracterizada por cefalalgia lateral y periódica, asociada generalmente con trastornos sensoriales y digestivos.

La relación de algunos alimentos con la aparición de migrañas se conoce desde la antigüedad; así por ejemplo, ya Hipócrates advertía que la ingestión de cantidades elevadas de queso podía producir malestar y dolores de cabeza (RAMANTANIS, 1984). 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 PARGENTER (1979) señalan que, en ocasiones, son los mismos pacientes migrañosos los que por propia iniciativa excluyen una serie de alimentos de su dieta. LITTLEWOOD y col. (1988) señalan que alrededor de un 25% de los pacientes migrañosos consideran que sus crisis pueden ser desencadenadas por el consumo de algún alimento.

Entre los alimentos que con más frecuencia han sido citados como desencadenantes de migraña, por los propios pacientes, se incluyen: quesos, chocolate, bebidas alcohólicas, embutidos o café (HANINGTON, 1967; SMITH y col, 1970; PALMERO-BECARES, 1986; LITTLEWOOD y col, 1988).

SMITH y col. (1970) elaboraron un listado de alimentos relacionados con la aparición de migraña que se especifica en la tabla 14. También se incluyen los porcentajes (respecto al número total de casos) de atribución de la migraña al consumo del determinado alimento. Para llegar a estas conclusiones los autores realizaron un estudio basado en una encuesta que implicaba la entrevista de 400 pacientes migrañosos.

Las hipótesis que intentar explicar la aparición de migrañas tras el consumo de determinados alimentos, así como el establecimiento del agente causal son variadas.

HANINGTON (1967) señalaba que un 30% de las migrañas podían ser originadas por la tiramina. Igualmente, CROOK (1981) atribuye un papel importante a esta amina en el desarrollo de este tipo de afecciones, ya sea de procedencia endógena o exógena a partir de la alimentación. Sin embargo, la relación existente entre la tiramina y la inducción de la migraña no se conoce con exactitud (BRIGGS y PARGENTER, 1979) y es probable que puedan intervenir factores genéticos. De hecho, es una enfermedad que parece influida por factores de carácter hereditario y podría tratarse de un ejemplo más de "error innato del metabolismo".

Tabla 14. Alimentos relacionados con la aparición de migrañas alimentarias (SMITH y col., 1970)

ALIMENTO POSIBLE DESENCADENANTE	%ATRIBUCIONES
Chocolate	76
Productos lácteos (queso)	46
Frutas (cítricos)	30
Bebidas alcohólicas	25
Alimentos grasos fritos	18
Hortalizas y verduras (cebollas)	17
Carne de cerdo	14
Café y te	14
Alimentos de origen marino	10

Además de la histamina otras aminas biógenas podrían estar relacionadas con la aparición de la migraña:  $\beta$ -feniletilamina (GONSALVES y STEWARD, 1977); 5-hidroxitriptamina o serotonina (SMITH y col., 1970) e histamina (FARRERAS y ROTZMAN, 1978).

## Epidemiología

Los estudios epidemiológicos demuestran que si bien hasta la pubertad la incidencia de migrañas es la misma en hombres que en mujeres, después de esta etapa la frecuencia se ve incrementada en las mujeres, puesto que hasta un 60% de ellas sufren ataques migrañosos relacionados con el ciclo menstrual.

Smith y col. (1971) estimaron que la migraña afecta a un 10-15 de la población y que de esta proporción un amplio subgrupo correspondería a migrañas de origen alimentario (SANTOS-BUELGA, 1984).

## Sintomatología y mecanismo de acción de las aminas biógenas.

La cefalea lateral característica de la migraña puede aparecer acompañada de otros síntomas, que constituyen el cuadro migrañoso: náuseas, vómitos, trastornos visuales,



estreñimiento y depresión. Además es frecuente que existan antecedentes familiares y que los pacientes presenten un historial clínico con ataque biliares, mareos en viajes, eccema, asma o fiebre del heno. También es característica la presencia de períodos más o menos largos entre los accesos dolorosos (FARRERAS y ROZMAN, 1973; CROOK, 1981).

La tiramina puede ser metabolizada en el organismo humano por diversos sistemas enzimáticos. La vía mayoritaria es probablemente su desaminación oxidativa para formar ácido p-hidroxifenilacético por acción del enzima Mono-Amino-Oxidasa (MAO), presente en la mayoría de los tejidos. Otras vías son la oxidación a octopamina, mediante la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, su metilación con la ayuda de la N-metiltransferasa o la conjugación con grupos sulfato o acetato. Estos enzimas son particularmente activos en el tracto digestivo, por lo que la toxicidad oral de la tiramina es poco importante, salvo en los casos en que estos mecanismos se encuentran disminuidos por alguna razón (JOOSTEN, 1988).

SANDLER (1972) y CROOK (1981) señalan que una posible hipótesis, que explicaría la aparición de migrañas en individuos especialmente sensibles, sería un defecto en la metabolización de la 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 causas (YOUUDIM y col., 1971; TRETHERWIE y KALED, 1972; CROOK, 1981):

- a) disminución de la actividad del enzima mono-amino oxidasa (MAO).

De la disminución de la actividad enzimática de la MAO se derivaría un aumento de los niveles sanguíneos de tiramina (SANDLER y col., 1970; YOUUDIN y col., 1971; CROOK, 1981).

Si la actividad del enzima MAO desciende por debajo de ciertos niveles, que pueden variar de unas personas a otras, es menor la concentración de aminas biógenas necesaria para desencadenar un ataque. Además, CROOK (1981) señala que con la edad aumentan los niveles de este enzima y de ello podría derivar la disminución de la frecuencia y severidad de los ataques migrañosos observada en personas afectadas por este tipo de trastornos.

La relación entre niveles bajos de MAO y la aparición de la migraña es más compleja de lo que parece a simple vista. De hecho, no se ha determinado exactamente si los niveles bajos de MAO corresponden sólo a cambios transitorios durante el ataque migrañoso o bien si, por el contrario, existen individuos en los que esta actividad enzimática es permanentemente baja (GLOVER y col., 1981).

b) Déficit del enzima responsable de la conjugación de la tiramina con grupos sulfato

Este déficit obedece probablemente a causas genéticas. se traduce en la dificultad de metabolizar la tiramina, que en condiciones normales sería eliminada en un 15 en forma de tiramina orto-sulfato.

En mecanismo por el cual se desencadena la migraña parece ser múltiple y comprende una serie de factores que cuando confluyen conducen a la aparición del ataque. Los mecanismos más comúnmente citados son:

- \* La nor-adrenalina liberada por efecto de elevadas concentraciones de tiramina origina una constricción focal de los vasos cerebrales. Al agotarse la nor-adrenalina se produce por "efecto rebote" una vasodilatación cerebral que da origen a la migraña (FORSYTHE y REDMON, 1974).
- \* El desplazamiento de la serotonina de sus lugares de almacenamiento en las plaquetas por efecto de la tiramina o de su metabolito octopamina. La serotonina liberada puede ser la causante de los efectos vasculares que desembocan en la migraña (CROOK, 1981).
- \* Liberación de prostaglandinas plaquetarias por efecto de la tiramina, que también pueden ser las causantes de los efectos vasculares descritos anteriormente (SANDLER, 1970 y 1972).
- \* Debido a la actividad vasoconstrictora que presenta la tiramina, esta amina podría ser la responsable de la vasoconstricción inicial observada en la migraña (VIDAL-CAROU, 1987).

Respecto a la cantidad de tiramina necesaria para desencadenar un ataque de migraña, Hanington y col. (1971) comprobaron que 125 mg de tiramina por vía oral conducen a ataques de migraña en individuos de historial migrañoso, pero no con los individuos control (CROOK, 1981). Posteriormente, FORSYTHE y REDMOND (1974) señalaron que 100 mg de esta sustancia eran suficientes para que se desencadenara la migraña en individuos especialmente sensibilizados.

INGLES y col (1988) estudiaron el problema de la producción de migraña en uno de los alimentos que la provocan con mayor frecuencia, el chocolate; y concluyen que las aminas que se encuentran unidas a otros componentes de los alimentos sólo manifiestan su efecto si son liberadas durante la digestión, y si la proporción que se libera llega a niveles lo suficientemente elevados.

En los estudios que relacionan el consumo de alimentos y la aparición de migrañas se han obtenido resultados dispares. Una de las causas que puede justificarlo es la

variabilidad de contenido de amina biógenas, ya que pueden aparecer diferencias considerables dentro de un mismo tipo de productos (BRIGGS y PARGENTER, 1979). Esta variabilidad es más elevada aún en el caso del pescado, ya que pueden aparecer diferencias según la especie, el método de captura, el tamaño, el tipo de manipulación, el tiempo transcurrido desde la captura, el método de conservación empleado,...

Aunque la tiramina es la amina biógena más relacionada con la aparición de migraña, algunos autores, como Ryan (1974), tras investigar su efecto en un gran número de pacientes, concluyó que no se la puede considerar el agente causal de este desorden. En este sentido estudios realizados tras analizar varios tipos de chocolate exentos de tiramina, que contenían sin embargo  $\beta$ -feniletilamina, ponen de manifiesto que al menos otros compuestos también pueden participar en la aparición de la migraña (JOOSTEN, 1988).

La  $\beta$ -Feniletilamina, al igual que la tiramina, puede provocar liberación de la serotonina plaquetaria y de las catecolaminas almacenadas. También posee acción vasoconstrictora directa sobre los vasos sanguíneos cerebrales (CROOK, 1981). Se ha observado que inicialmente, y a dosis bajas, esta amina aumenta el flujo sanguíneo cerebral y su consumo de oxígeno. A dosis elevadas causa vasoconstricción cerebral.

LÜTHY y SCHLATTER (1983) estudiaron los efectos sobre seres humanos de la administración de 25 mg de histamina y 25 mg de tiramina en zumo de manzana, en un ensayo realizado por el "método del doble ciego". Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los síntomas migrañosos entre individuos problema e individuos control. Estos mismos autores, sin embargo, si observaron diferencias tras la administración de 5 mg de  $\beta$ -feniletilamina.

La  **$\beta$ -feniletilamina** provoca la liberación de noradrenalina en el sistema nervioso simpático, lo que podría explicar los síntomas migrañosos. Sin embargo, no puede aceptarse esta hipótesis como único mecanismo para la explicación de la migraña porque, desde el punto de vista de la liberación de la nor-adrenalina, la tiramina resulta 10 veces más potente que la  $\beta$ -feniletilamina.

La **Histamina** ha sido descrita como el agente causal de la "migraña histamínica de Horton" (FARRERAS y ROZMAN, 1978). La cefalea podría aparecer debido al efecto de vasodilatación de los capilares cerebrales como consecuencia de la acción vasodilatadora periférica que posee la histamina.

Se han observado cambios en los niveles sanguíneos de histamina, durante los episodios migrañosos, siendo más elevados al final, pero no está claro si esta amina es la responsable de la vasodilatación que aparece en los ataques de migraña o si es producto de una liberación secundaria al dolor de cabeza (CROOK, 1981).

Finalmente, señalamos que también se han relacionado con la aparición de migrañas **otros componentes** presentes en los alimentos distintos de las aminas biógenas, como la

cafeína o algunos aditivos alimentarios (nitrito sódico, glutamato monosódico, tartracina) (RIVAS y MARINÉ, 1983).

LITTLEWOOD y col. (1988), tras realizar un estudio con pacientes aquejados de migraña, concluían que el vino tinto contenía un agente inductor de migrañas que no era el alcohol ni la tiramina. Estos autores señalaban como posibles agentes inductores los **flavonoides fenólicos** (catequinas y antocianinas).

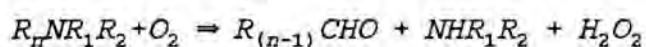
El mecanismo de acción propuesto para estos compuestos consistiría en la inhibición de enzima fenil-sulfonil-transferasa, presente en el organismo humano y encargado de metabolizar una amplia gama de fenoles endógenos y exógenos. Estos mismos autores, sin embargo, reconocen que hasta la fecha el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos como causantes de la migraña es bastante especulativo. Además esta teoría no explicaría la frecuente aparición de migrañas tras el consumo de alimentos como el queso, los embutidos o el chocolate exentos de compuestos fenólicos (IZQUIERDO, 1991).

Respecto a este trabajo KAUFMAN (1988), en una carta a LITTLEWOOD y col., señala que Singleton y col. en 1978 indicaron que los compuestos fenólicos no eran responsables de las cefaleas producidas por el vino. Asimismo, señalaba que la teoría de Littlewood y col. tampoco explicaría el hecho de que fármacos inhibidores de las prostaglandina sintetetas intervengan en las migrañas inducidas por vino tinto.

### 5.2.3. INTERACCIONES ALIMENTO-MEDICAMENTO

Las interacciones entre aminos biógenos y medicamentos tipo IMAO son el ejemplo más importante de los efectos tóxicos indirectos atribuibles a este tipo de compuestos. Los efectos adversos de la interacción entre este tipo de fármacos y alimentos fueron los primeros que hicieron prestar atención al problema de la utilización de pautas terapéuticas en las que estaba implicado más de un compuesto farmacológicamente activo (FLOREZ y col, 1987). Y también las que han ido induciendo al desarrollo de nuevos fármacos IMAO en los que la problemática de la interacción no fuera tan importante (IMAO's de 2ª y 3ª generación).

Los medicamentos inhibidores del enzima MAO están formados por un grupo de fármacos heterogéneos, desde el punto de vista de su estructura química, que tienen en común la capacidad de bloquear la acción de la MAO, encargada de transformar los compuestos monoamínicos en aldehidos, de acuerdo con la siguiente reacción (UNZETA y col., 1989):



donde  $R_1$  y  $R_2$  corresponden a hidrógeno o a un grupo metilo y  $R_n$  a una cadena carbonada lineal o aromática.

Las aminas aromáticas del grupo de las catecolaminas, como la adrenalina y nor-adrenalina, la dopamina o las indolalquilaminas (serotonina y triptamina) son sustratos endógenos de este enzima. También son sustratos de la MAO algunas aminas que se hallan en el cerebro, en concentraciones mínimas, como la  $\beta$ -feniletilamina, la triptamina y la tiramina e, igualmente, las aminas exógenas ingeridas con la alimentación. La diaminas y poliaminas únicamente son sustratos de la MAO cuando sus grupos amino se encuentran separados por 7 grupos metilo o más (UNZETA y col, 1989).

Existen isoenzimas MAO que se diferencian en función de su especificidad por el sustrato. Los sustratos preferentes del isoenzima **MAO A** son serotonina, adrenalina y nor-adrenalina, mientras que para el isoenzima **MAO B** lo es la  $\beta$ -feniletilamina. Ambos isoenzimas metabolizan tiramina, dopamina y triptamina (CROOK, 1981; JOOSTEN, 1988; UNZETA y col., 1989).

En condiciones normales, las aminas biógenas ingeridas con la alimentación se metabolizan en el tracto intestinal y el hígado por acción de la MAO. Si este enzima se encuentra bloqueado, se pierde la protección y de este modo las aminas de aporte exógeno pueden acceder a la circulación sanguínea, en cantidades lo suficientemente elevadas como para producir la liberación de nor-adrenalina por parte de las neuronas adrenérgicas, desencadenándose de este modo una serie de efectos tóxicos fundamentalmente de carácter hipertensivo.

En 1951, la isoniazida y su derivado la iproniazida fueron desarrolladas para el tratamiento de la tuberculosis. Pronto se comprobó que la iproniazida elevaba el ánimo de los pacientes tuberculosos. En 1952, Zeller y col. comprobaron que este fármaco, a diferencia de la isoniazida, era capaz de inhibir la MAO. A partir de aquí se generalizó el uso de inhibidores de la MAO en la depresión y este grupo de fármacos significaron en su momento un gran avance de la psiquiatría moderna (GOODMAN GILMAN y col., 1986). Con la aparición de los antidepresivos tricíclicos y debido a la toxicidad que presentaban muchos de los medicamentos IMAO, éstos fueron sustituidos poco a poco y en la actualidad su uso se reserva a pacientes que no responden a otro tipo de terapéuticas.

Desde el descubrimiento de las propiedades terapéuticas de los inhibidores de la MAO se han ido ensayando nuevos fármacos, a la búsqueda de compuestos más potentes, menos tóxicos y con menos problemas desde el punto de vista de las interacciones. Los primeros IMAO utilizados en el tratamiento de la depresión fueron derivados de la hidracina, sustancia fuertemente hepatotóxica, entre los que podemos citar la fenelzina y la isocarboxazida. Posteriormente se descubrió que compuestos estructuralmente semejantes a la anfetamina también inhibían la MAO, de la ciclación de su cadena lateral surgió la tranilcipromina.

Los derivados de la hidracina, IMAO de 1ª generación, inhibían de forma irreversible y de modo inespecífico el isoenzima A y el isoenzima B de la MAO. Cuando se profundizó en el conocimiento de estos

inespecífico el isoenzima A y el isoenzima B de la MAO. Cuando se profundizó en el conocimiento de estos dos isoenzimas surgieron los IMAO de 2ª generación. Estos fármacos también se unen de modo irreversible al enzima pero solamente a una de las dos formas isoenzimáticas, de modo que si queda libre una de las dos vías de metabolización los problemas de aparición de crisis hipertensivas, por interacción con aminas de aporte exógeno, disminuirán (JOOSTEN, 1987). Así la clorgilina inhibe específicamente el isoenzima A y el deprelio y la pargilina el B. La tercera generación de estos fármacos actúan a la vez de forma específica y reversible. Por ello es más fácil ajustar el grado de inhibición y la dosis adecuada, ya que la inhibición revierte en el momento en que se suspende el tratamiento. Según TILLER y col. (1986), estos compuestos presentan menos interacción con las aminas biógenas que las dos generaciones anteriores. La mayoría de los fármacos de este tipo aparecidos hasta ahora son inhibidores específicos de la MAO A, debido a su facilidad de diseño frente a los específicos para la MAO B. Son ejemplos de inhibidores reversibles, de corta acción y específicos de la MAO A: cimoxatone (DOLLERY y col., 1983) y moclobemide (TILLER y col., 1986).

## Sintomatología

A diferencia de lo que ocurría en los casos de intoxicación histamínica y en la aparición de migrañas alimentarias, las interacciones de las aminas biógenas contenidas en los alimentos con los medicamentos IMAO pueden originar cuadros de suma gravedad. De hecho se han descrito casos mortales; Blackell y col. recogieron 26 casos de interacciones de este tipo, entre los años 1963 y 1966, en 9 de los cuales el paciente murió por hemorragia intracraneal (STOCKLEY, 1981).

Los síntomas de esta interacción inicialmente se agruparon bajo la denominación de "síndrome del queso", aludiendo al alimento que con mayor frecuencia los desencadenaba. Aparece en forma de ataque, entre media y dos horas consideradas desde el momento de la ingestión del alimento que contenía las aminas biógenas. Inicialmente aparece dolor de cabeza, palpitations (con bradicardia o taquicardia según el caso), náuseas, vómitos, fiebre, sudoración, dolor pectoral, pupilas dilatadas, fotofobia y en casos muy graves hemorragia sub-aracnoidea (RIVAS-GONZALO, 1981; SANCHEZ y PLANAS, 1985). Sin embargo, es raro que queden secuelas permanentes (LIPPMANN y NASH, 1990).

El consumo simultáneo de medicamentos IMAO y alimentos con contenidos elevados de aminas biógenas no origina siempre la aparición de estos síntomas. Se presentan diferencias considerables entre individuos e influyen: sexo, edad, factores de personalidad, capacidad de metabolización de xenobióticos y reservas tisulares de catecolaminas (RIVAS-GONZALO, 1981).

Las diferencias interindividuales pueden explicarse, en parte, teniendo en cuenta el metabolismo de los medicamentos IMAO. en su mayoría se inactivan por acetilación y al igual que sucede con la isoniazida, existen dos fenotipos acetiladores: uno rápido y otro lento (PLANAS, 1986).

También será un factor importante el contenido y la naturaleza de las aminas biógenas presentes en el alimento.

## Aminas implicadas

La tiramina es la amina biógena contenida en alimentos que más corrientemente ha sido asociada con la aparición de este tipo de interacciones. En 1965, BLACKWELL y MABBIT observaron que 6mg de esta amina, ingeridos por vía oral, podían originar crisis hipertensivas en pacientes tratados con medicamentos IMAO. De igual modo PONTO y col. (1977) consideraron (también en este tipo de pacientes) que estos 6 mg pueden provocar una ligera elevación de presión arterial; 10 mg producen un efecto presor notable y con 25 mg se pueden originar crisis hipertensivas agudas.

Sin embargo, BLACKWELL y col. (1965), tras realizar un ensayo con animales de laboratorio en el que administraban un extracto de levaduras, que contenía histamina y tiramina junto con medicamentos IMAO, concluyeron que los efectos de la interacción producida no podían atribuirse únicamente a la tiramina.

Otras aminas como la  $\beta$ -feniletilamina, serotonina, 3-hidroxifenilalanina (DOPA)... se han relacionado con este tipo de interacciones. Mención especial merece el caso de la interacción entre la reserpina y los alimentos ricos en aminas biógenas, puesto que este caso los efectos observados son opuestos a los descritos anteriormente, ya que esta amina disminuye la acción presora de la tiramina (MARINÉ, 1978).

Uragoda en 1980 describió la aparición de los síntomas característicos de esta interacción, en pacientes tratados con isoniazida (IMAO), tras la ingestión de un atún que presentaba contenidos relativamente elevados de histamina (ROE, 1989).

Kriler y Lewis en 1965 describieron el desarrollo de una crisis hipertensiva en un paciente sometido a tratamiento con pargilina (IMAO), tras el consumo de 60 g de chocolate que presentaba una concentración relativamente importante de  $\beta$ -feniletilamina.

Otras aminas biógenas como la putrescina y la cadaverina no interaccionan directamente con los medicamentos IMAO pero pueden favorecer la absorción intestinal de otras aminas que si lo hacen (ANONIMO, 1965; BLACKWELL y MABBIT, 1965).

Además del contenido y de la naturaleza de la aminas biógenas presentes en el alimento, también será un factor importante el tipo de medicamento IMAO empleado. Así, por ejemplo, DOLLERY y col. (1983) realizaron distintos ensayos en los que relacionaban la cantidad de tiramina ingerida por pacientes tratados con cimoxatone (IMAO de 3ª generación) y el aumento de su presión arterial. Sujetos tratados con este fármaco toleraban dosis de tiramina de 40-80 mg sin dificultad, mientras que con los IMAO clásicos dosis de alrededor de 6 mg ya pueden causar problemas.

## **Precauciones.**

La importancia de este tipo de interacciones ha motivado la limitación del empleo de los medicamentos IMAO (JELLE-F-CARR, 1985) e incluso la retirada de un gran número de ellos, que han ido siendo sustituidos por otros de actividad terapéutica similar pero que actúan por un mecanismo distinto. Así, se han retirado la fenipramina y la eritriptamina, entre otros (SANTOS-BUELGA, 1984). No obstante, todavía continúan siendo los medicamentos de elección en algunos casos de depresión neurótica grave y de fobias en pacientes que no toleran o no responden al tratamiento con antidepresivos tricíclicos (ANONIMO, 1984).

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, que se presentan como consecuencia de este tipo de interacción alimento-medicamento (RIVAS-GONZALO, 1981).

Es frecuente que en los casos de pacientes sometidos a terapéuticas de tipo IMAO se recomiende reducir el consumo de alimentos susceptibles de contener cantidades importantes de aminas biógenas, durante el tratamiento y en un período de entre 3 o 4 semanas después de finalizado el mismo. Se considera necesario el transcurso de este período de tiempo para que puedan volver a sintetizarse los enzimas que quedaron bloqueados irreversiblemente por el uso de fármacos IMAO de 1 y 2ª generación (ANONIMO, 1984; McCABE, 1986; ROE, 1989). Se trata de las dietas denominadas "dietas bajas en tiramina" o "dietas para tratamientos con IMAO" (PEMBERTON GASTINEAU, 1984; ROJAS-HIDALGO, 1985; McCABE, 1986).

Debe tenerse en cuenta que los datos disponibles, respecto a los contenidos de aminas biógenas en alimentos, están sujetos a una gran variabilidad. El hecho de que se observen amplias variaciones incluso en productos de un mismo tipo, pero pertenecientes a distintas marcas comerciales, induce a pensar que en su contenido de aminas biógenas pueden influir factores como la preparación o la conservación del alimento. Las cifras de aminas biógenas en los alimentos recogidas en la bibliografía, proceden de los resultados de diversos autores que pueden haber utilizado métodos de análisis muy dispares en los que además no se suele especificar el número de muestras analizadas lo que no proporciona una idea exacta de la significación real de estos contenidos (PEMBERTON y CASTINEAU, 1984; McCABE, 1986; IZQUIERDO-PULIDO, 1991).



#### 5.2.4. FORMACIÓN DE NITROSAMINAS

La presencia de nitrosaminas en la alimentación fue descubierta por Ender y col. en 1964, concretamente en harina de arenque conservada con nitritos (DERACHE, 1990). Los alimentos normalmente implicados son productos de origen cárnico, conservados simultáneamente con salazón y nitritos, algunos quesos y bebidas alcohólicas en especial la cerveza (FRITSCH y SAINT-BLANQUAT, 1985).

Algunas aminas biógenas presentes en los alimentos han sido señaladas como precursores de ciertas nitrosaminas de carácter potencialmente cancerígeno, como la nitrosopiperidina, la dimetilnitrosamina y la nitrosopirrolidina (BELITZ y GROSCH, 1988). YAMAMOTO y col. (1982) señalan que tanto las poliaminas, espermina y espermidina, como las diaminas, putrescina y cadaverina, pueden ser nitrosadas o ser potenciales precursores de otras aminas capaces de formar nitrosaminas. En el caso del pescado además de las aminas biógenas existe el riesgo de formación de nitrosaminas a partir de los derivados del OTMA (óxido de trimetilamina) compuesto abundante en el pescado, marino (SMITH, 1980-81; GALLARDO y col., 1984; LIDNER, 1984).

El mecanismo de la reacción de nitrosación es complejo (figura 13), pero de forma general la formación de compuestos nitrosados se resume en la reacción del ácido nitroso, o ión nitrito, sobre una amina secundaria o terciaria (FRITSCH y SAINT-BLANQUAT, 1985). Puesto que los nitritos, además de su utilización, como aditivos se encuentran como contaminantes en la mayoría de las aguas, hará falta prestar especial atención a la presencia de aminas biógenas nitrosables

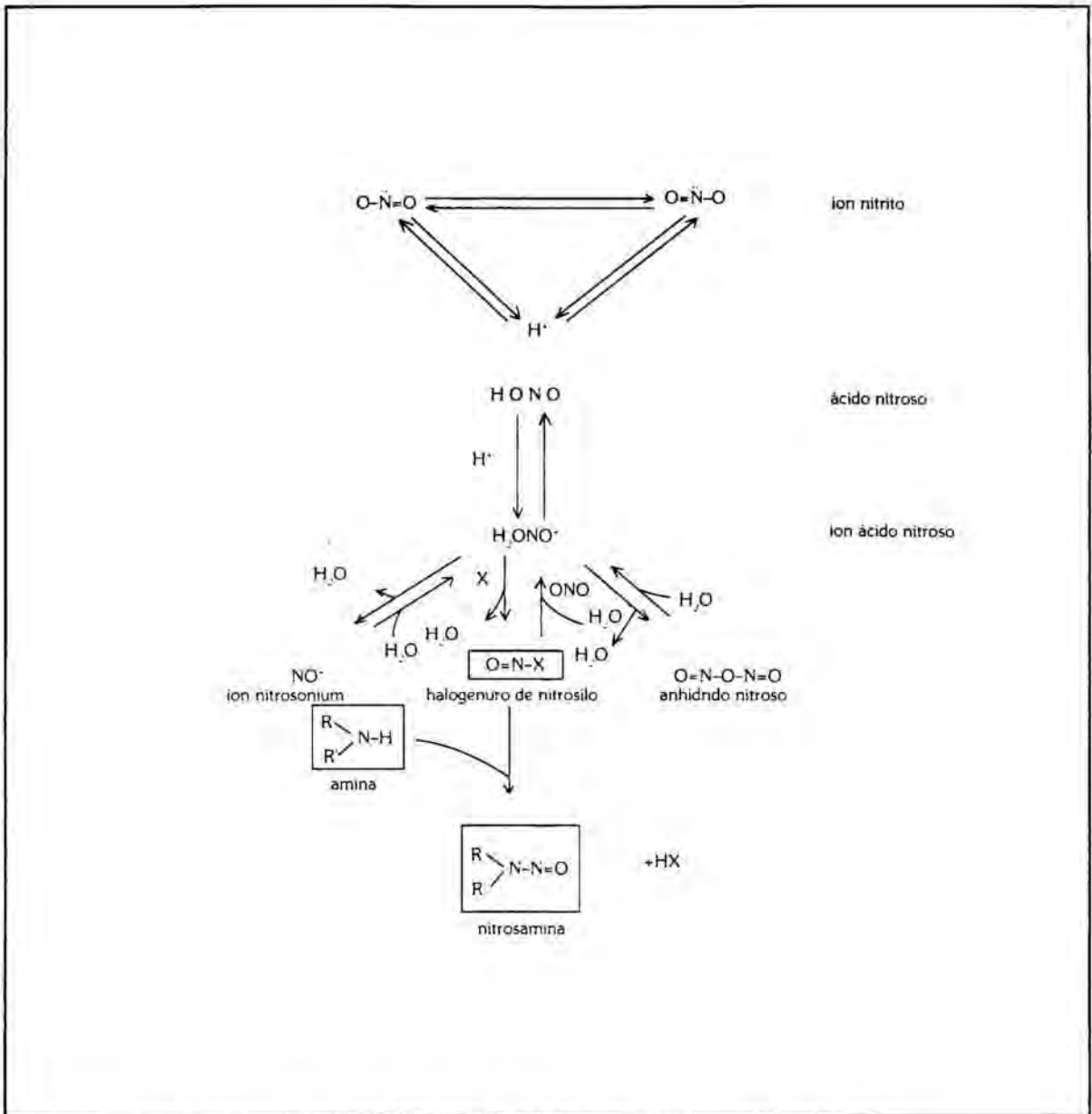


Figura 13. Reacción de Nitrosación (SCANLAN, 1975)

Además de la presencia de nitrosaminas ya preformadas en los alimentos, se puede pensar en la síntesis de las mismas en el propio organismo a partir de sus precursores. El único lugar donde potencialmente podría efectuarse esta síntesis es en el estómago. Según Mirvish, 1977, sólo en esta zona pueden reunirse las condiciones necesarias: pH ácido, nitrito libre y aminas secundarias básicas (de origen alimentario o medicamentoso). De momento esta síntesis "de novo" en el organismo es sólo hipotética; algunos autores hablan con certeza de ella mientras que otros creen que los datos disponibles no son suficientes para asegurarla (FRITSCH y SAINT-BLAQUAT, 1985).

## Aminas biógenas nitrosables

Las poliaminas con grupos amino secundarios, agmatina, espermina y espermidina son susceptibles a la nitrosación en presencia de nitritos y en las condiciones adecuadas para que se verifique la reacción.

KAWABATA y col. (1978) señalan que la agmatina puede dar lugar a la formación de una nitrosamina de poder mutagénico moderado.

Espermina y espermidina también poseen grupos amino secundarios, que pueden ser nitrosados por los nitritos. HILDRUM y col. (1975 y 1977) aislaron la 3-butenil-2-propenil-N-nitrosamina como principal compuesto volátil aparecido tras la nitrosación de estas dos aminas biógenas e identificaron también tres nitrosaminas más derivadas de la espermidina.

HOTCHKISS y col. (1977) identificaron cuatro nitrosaminas más formadas a partir de la espermidina. Estos mismos autores comprobaron posteriormente (1979), mediante un test de AMES, la capacidad mutagénica de estos compuestos y de los aislados por HILDRUM y col. (1977).

Las diaminas con grupos amino primarios, putrescina y cadaverina, pueden originar nitrosaminas por vía indirecta cuando son sometidas a tratamientos térmicos.

Lijinski y Epsen en 1970 (YAMAMOTO, 1982) y Bills y col., (NAKAMURA y col., 1979) demostraron que putrescina y cadaverina pueden ser convertidas, por la acción del calor en pirrolidina, y piperidina respectivamente. Estos dos compuestos son precursores directos de la nitrosopirrolidina y la nitrosopiperidina, sustancias de reconocida acción cancerígena.

Las aminas aromáticas con grupos amina primarios, histamina, tiramina, triptamina, serotonina o  $\beta$ -feniletilamina pueden formar compuestos nitrosados aunque de carácter muy inestable (HILDRUM y col., 1975). Sin embargo, BELITZ y GROSCHE (1988) indican que la formación de nitrosaminas es posible mediante una serie de reacciones que comprenden: nitrosación, diazotación, desaminación, dimerización y una 2ª nitrosación.

Fujita y col. en 1987 (JOOSTEN, 1988) estudiaron la formación de 3-diazotiramina a partir de tiramina y en presencia de ácido nítrico. Señalaron que este compuesto mutagénico puede formarse en el estómago. Sin embargo, la concentración de nitrito empleada fue muy alta y esta reacción no ha sido probada "in vivo".

Parece claro que la formación de nitrosaminas puede tener lugar durante el procesamiento de los alimentos que contengan, monoaminas, diaminas o poliaminas y nitritos, como sucede en el caso de la elaboración de los embutidos, que incluye la adición de nitritos como conservantes y en algunos casos tratamientos térmicos (VADEDERCKHOVE y DEMEYER, 1976; WORTBERG y WOLLER, 1982). Como ya se ha comentado anteriormente, la posibilidad de la formación de nitrosaminas en el tracto gastrointestinal, también apuntada por algunos autores (YAMAMOTO y col., 1982), parece más remota.

ALLISON y McFARLANE (1989) estudian la relación entre la putrescina y la cadaverina con el desarrollo del cáncer de colon. Proponen un mecanismo de nitrosación mediado por bacterias, que aisladas de las heces se ha comprobado que poseen la capacidad de nitrosar la aminas secundarias en presencia de nitritos y a pH neutro.

Aunque no se debe despreciar el riesgo que representa la presencia de nitrosaminas, dada la importancia cualitativa que pueden presentar los niveles traza en toxicología, debe matizarse que para que se produzcan es necesario que se den una serie de coincidencias. Además, no se conoce con seguridad el efecto que las nitrosaminas provenientes de la alimentación (de 1-6  $\mu\text{g}/\text{días}$  según FINE 1977), puede efectuar sobre la formación de cánceres. KATO y KIKUGABA (1992) sugieren, a la vista de los resultados obtenidos en ensayos "in vitro", que la presencia de proteínas y aminoácidos podría actuar como agente protector frente a la reacción de las aminas secundarias con los nitritos en el tracto intestinal. Finalmente, no podemos olvidar que el organismo posee además sistemas de protección, específicos e inespecíficos, que actúan frente a los xenobióticos detoxificándolos, sólo cuando estos mecanismos fallan o se saturan aparece el verdadero peligro.

### 5.2.5. OTROS RIESGOS TOXICOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA DE AMINAS BIOGENAS

#### **Histamina.**

RAMANTANIS (1984) señala la posibilidad de que en intoxicaciones alimentarias como la salmonelosis o la intoxicación estafilocócica, los síntomas observados no fueran solo debidos a ellas, sino que la histamina y otras aminas biógenas participasen en la sintomatología, ya que algunos de los microorganismos causantes de estos trastornos poseen también actividad aminoácido descarboxilasa. Igualmente, la histamina podría jugar un papel importante en el proceso conocido como diarrea estival infantil, dado que en las heces de los afectados se han aislado cepas de *Clostridium perfringens*, microorganismo identificado como potente formador de histamina. Ciertas cepas de *Escherichia coli*, también formadoras de histamina, son igualmente consideradas como el agente causal de este tipo de diarreas en algunos casos (IENISTEA, 1971).

Las aminas biógenas, y sobretodo la histamina, no solo dan lugar a episodios de toxicidad aguda; sino que la ingestión continuada de alimentos con niveles altos de histamina puede provocar, a largo plazo, toxicidad crónica a nivel hepático.

Entre estos efectos crónicos destaca la cirrosis hepática, ya que la histamina puede alterar el buen funcionamiento de este órgano y ser, junto con el alcohol etílico, uno de los agentes etiológicos de esta enfermedad (TRETHERMIE y KALED, 1972). La toxicidad hepática de la histamina ha sido comprobada mediante ensayos en animales de laboratorio (SCHULLER y col., 1967).

#### **Tiramina**

Schultz, en 1984, señaló que el consumo frecuente de grandes cantidades de queso madurado podía asociarse con la aparición de determinadas polineuropatías. Más recientemente Jacow y Carron, 1987, relacionaron la ingestión de alimentos ricos en tiramina con la aparición de ataques de disnea y palpitaciones. Sin embargo, en ninguno de estos dos artículos se aportan pruebas de que la tiramina sea el agente causal del desorden y no lo sean otras aminas biógenas. De hecho no se aportan datos sobre los contenidos reales de tiramina en los alimentos implicados (JOOSTEN, 1988).

## **Triptamina**

La triptamina es un neurotransmisor simpálicomimético que también puede ejercer una acción directa sobre la musculatura lisa y puede producir un incremento de la presión sanguínea debido a sus propiedades vasoconstrictoras. Este compuesto también es metabolizado por el enzima MAO (tanto por el isoenzima A como por el B). A pesar de ello, al contrario de lo que a priori podría esperarse, no se han descrito crisis hipertensivas causadas por el consumo de alimentos ricos en triptamina, probablemente porque sus contenidos nunca son muy altos (JOOSTEN, 1988).

## **$\beta$ -Feniletilamina**

Potkin y col. (1979) también destacan la observación de niveles de excreción urinaria de  $\beta$ -feniletilamina inusualmente altos en pacientes esquizofrénicos crónicos con paranoia, pero no cuando la esquizofrenia no estaba acompañada de paranoia. PAULOS y TESSEL (1982) observaron que también en casos de "stress" la excreción urinaria de  $\beta$ -feniletilamina parecía aumentada. Estas observaciones parecen indicar que la  $\beta$ -feniletilamina es un importante metabolito endógeno, sin embargo, permanece todavía sin resolver la cuestión referente a la influencia de una concentración, todavía sin determinar, de esta compuesto en la dieta (JOOSTEN, 1988).

## **Serotonina**

La serotonina parece ser la responsable de una serie de trastornos intestinales que se producen en habitantes de ciertas regiones de Uganda, donde la ingestión de plátanos, ricos en esta amina, es considerable. El mecanismo de acción parece ser una inhibición de la secreción gástrica y una estimulación de la musculatura lisa intestinal mediada por la serotonina (SMITH, 1980-81; GARCIA-MORENO, 1981).

Algunos autores señalan la gran incidencia de fibrosis de endomiocardio, enfermedad poco frecuente en los países septentrionales, en algunas regiones de África. El hecho de que se trate de una patología común en países donde el consumo de plátanos es elevado, justifica que se haya planteado la existencia de una relación entre este tipo de lesiones cardíacas y la serotonina o alguno de sus metabolitos (SMITH, 1980-1981; GARCIA-MORENO, 1980).

## **Putrescina y cadaverina**

Framer y Eysell en 1969 señalaron que tras la ingestión de cantidades muy elevadas de putrescina o de cadaverina se había observado un cuadro tóxico con los siguientes síntomas: hipotensión, bradicardia, disnea y parálisis de las extremidades (JOOSTEN, 1988). Sin embargo, no se han encontrado en la bibliografía más datos referentes a este tipo de desórdenes. La consecuencia más importante de la presencia de cadaverina y de putrescina en los alimentos puede considerarse que es su actividad potenciadora de los efectos de otras aminas biógenas.

### 5.3. AMINAS BIOGENAS EN PESCADOS: RELACIÓN CON SU DETERIORO

En pescado fresco los contenidos de aminas biógenas, excepto los de espermina y espermidina que se consideran fisiológicas, son siempre muy bajos. Aceptada la hipótesis de su formación por la vía de la descarboxilación bacteriana, a partir de sus aminoácidos precursores, existen numerosos trabajos que relacionan la aparición de estos compuestos químicos con el deterioro del pescado.

También han sido ampliamente estudiados los factores que favorecen el crecimiento bacteriano y la subsiguiente formación de aminas biógenas. Para que se puedan formar estas aminas es necesario que concurren los siguientes factores (RICE y KOHELER, 1976; RICE y col., 1976):

- 1 Disponibilidad de aminoácidos libres.
- 2 Presencia de microorganismos con capacidad para descarboxilar estos aminoácidos precursores
- 3 Condiciones favorables para el desarrollo de los microorganismos y la manifestación, por parte de los mismos, de su capacidad aminoácido descarboxilasa.

Además de la presencia de los aminoácidos precursores y de los microorganismos responsables de la descarboxilación, en la formación de aminas también influye la presencia de diversos factores que favorecerán o no el crecimiento de estos microorganismos y el desarrollo por parte de ellos de la actividad aminoácido-descarboxilásica. Se trata de caracteres físico-químicos relacionados con las condiciones del entorno en que se desarrollarán las bacterias. Entre estos parámetros cabe señalar como importantes: la actividad del agua, el pH y la temperatura.

En pescados, la histamina es la amina biógena más estudiada debido a su implicación en la aparición de Intoxicaciones histamínicas. Desde que se conoce el posible papel potenciador de otras aminas biógenas, su relación con la aparición de interacciones con medicamentos tipo IMAO y desde que se ha ido extendiendo el uso de técnicas analíticas (CLAE) que permiten la determinación simultánea de varios de estos compuestos son cada vez más frecuentes los trabajos en los que el estudio se extiende a otras aminas biógenas.



### 5.3.1. DISPONIBILIDAD DE AMINOACIDOS PRECURSORES LIBRES

La cantidad de aminoácidos precursores libres en el tejido muscular es un factor importante en la formación de aminas biógenas. Esta cantidad de aminoácidos dependerá de la composición de las proteínas del pescado, que tras una pteolisis, debida a enzimas endógenos o de bacterias contaminantes, liberarán los aminoácidos que posteriormente podrán ser descarboxilados originando estas aminas.

AKSNES y BREKKEN (1988) proponen un orden de liberación selectiva de los aminoácidos por hidrólisis de las proteínas. Así, según estos autores, se podría establecer una clasificación en orden decreciente de velocidad de liberación: arginina, serina, histidina, leucina, lisina, tirosina, alanina, treonina, prolina y ácido glutámico, áspartico y glicina que se liberan a una velocidad muy baja.

La liberación de aminoácidos por acción de los propios enzimas del pescado o por la actividad proteolítica que poseen muchos microorganismos, junto con la proliferación de especies bacterianas con capacidad selectiva para descarboxilar uno u otro aminoácido condicionará mucho más la formación de aminas biógenas que la composición inicial de la fracción aminoacídica libre, inmediatamente tras la muerte del pescado.

Sin embargo, tradicionalmente el hecho de que los pescados de la familia de los escómbridos hubieran sido los más frecuentemente relacionados con la aparición de brotes de intoxicación histamínica, se asoció a que en el tejido muscular de estos pescados se encuentran cantidades relativamente elevadas de aminoácidos básicos, y entre ellos la histidina que recordemos es el precursor de la histamina.

No obstante, existen estudios contradictorios sobre la relación: contenido de histidina y formación de histamina. Mackie Y Ritchie (1974) no encontraron proporcionalidad entre la concentración de histamina formada y la disminución del contenido de histidina (FERNANDEZ y MACKIE, 1979). Tampoco KLAUSEN y LUND (1986) observaron una formación estequiométrica de histamina y de cadaverina a partir de sus precursores histidina y lisina en un estudio efectuado en arenques y caballas eviscerados.

Sin embargo, RICE y col (1976) consideraron que el enzima histidin-descarboxilasa es inducible y por tanto niveles elevados de histidina proporcionarán una mayor actividad descarboxilásica; FOO (1977) señaló que la concentración de histidina en ciertos alimentos podría proporcionar información sobre su capacidad de generar histamina.

La falta de correlación entre estos dos parámetros podría explicarse, en parte, por varias causas:

- a) **metabolismo de la histidina:** en condiciones fisiológicas, este aminoácido en el músculo de pescado es metabolizado por desaminación originando ácido urocánico; sólo en determinadas ocasiones (contaminación bacteriana...) adquiere importancia una segunda vía de metabolización la descarboxilativa, que originará la histamina (MACKIE y FERNANDEZ, 1977).
- b) **Existencia de microorganismos histaminolíticos:** JANZ (1985a, 1985b) observó que 22 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* tenían capacidad para degradar la histamina, comprobando que a concentraciones altas de azúcar y/o de cloruro sódico, a temperaturas de alrededor de 30 grados y en medio alcalino este proceso de degradación se aceleraba.
- c) **Inhibición del enzima histidin-descarboxilasa :** según OMURA y col (1978) este enzima puede inhibirse en presencia de cantidades elevadas de histamina.

### 5.3.2. FORMACIÓN DE AMINAS BIOGENAS POR ACTIVIDAD BACTERIANA

En 1944 Geiger y col. ya señalaron que la producción de histamina era atribuible a la actividad bacteriana. Comprobaron que no se producían cantidades significativas de esta amina cuando se realizaban incubaciones de extractos de pescado en presencia de inhibidores de la actividad bacteriana (tolueno, cloroformo...), mientras que en su ausencia, aparecían cantidades importantes de histamina, manteniendo todas las demás condiciones experimentales constantes (BALDRATI y col., 1980).

La actuación de los microorganismos sobre el tejido muscular del pescado incluye también procesos previos de proteólisis, que dejan aminoácidos libres, los cuales podrán ser descarboxilados y convertidos en aminas biógenas.

Salvo quizás en derivados que requieran para su obtención procesos fermentativos (por ejemplo en las anchoas), la presencia de aminas biógenas en pescados debe considerarse como "no deseada". Aunque el músculo de pescado es estéril cuando el pescado está vivo,

tras la captura, pueden encontrarse bacterias histamino-productoras en la piel, las agallas y los intestinos. Así TAYLOR y SPECKHARD (1983) citan que si hay almacenamientos prolongados a temperaturas inadecuadas puede haber una invasión de estos gérmenes al tejido muscular.

Las propias características de composición y estructura del músculo de estos animales también son responsables de la rápida proliferación bacteriana (puesto que en ellos se instaura un "rigor mortis" que cursa con una acidificación moderada del medio, y por ello no se retrasa el crecimiento bacteriano, como sucede con otros animales).

La higiene es probablemente el factor más importante que condiciona la formación de aminas biógenas en pescados, puesto que la flora microbiana normal de estos animales (*Pseudomonas*, *Acromobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio* y *Bacillus*) no parece tener gran capacidad aminoácido descarboxilásica (TAYLOR, 1985), mientras que los microorganismos más relacionados con esta actividad aparecen en el pescado como consecuencia de contaminaciones externas. Entre ellos se citan: microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* (KAROLUS y col 1985), y los géneros *Clostridium* y *Lactobacillus* (TAYLOR, 1985).

ABABOUCH y col. (1991) observaron que a pesar de las precauciones adoptadas para evitar la contaminación post-captura, el 92.7% de la flora formadora de histamina aislada en sardina pertenecía a la familia de las enterobacteriaceas, señalando que estos microorganismos deberían considerarse como pertenecientes a la flora habitual del pescado debido a la elevada frecuencia con que son aislados.

Los estudios de Heverka en 1967, demostraron que un 71.74% de las enterobacterias aisladas del pescado tenían capacidad para producir histamina (EITENMILLER y SOUZA, 1984). Concretamente dentro de esta familia se han señalado las especies: *Proteus morgani*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei* (TAYLOR, 1985).

Aunque existen numerosos trabajos realizados sobre la actividad aminoácido descarboxilasa de la flora bacteriana del pescado (FRANCK y YOSHINAGA, 1984; YOSHINAGA y FRANCK, 1982; CATTANEO y col., 1984), se trata en su mayoría de estudios de tipo cualitativo y van encaminadas a conocer si un determinado grupo de microorganismos posee esta capacidad o no.

En este sentido Baranowski (PAN y JAMES, 1985) comenta algunos métodos para medir la actividad aminoácido descarboxilásica haciendo hincapié en la importancia de la misma, ya que existe un amplio margen de variabilidad en cuanto a la actividad

descarboxilásica en bacterias aisladas del atún (YOSHINAGA y FRANCK, 1982). EITENMILLER y col. (1981) estudian asimismo la producción de histidin-decarboxilasa e histamina por parte de *Proteus morganii* y concluyen que la máxima actividad se presenta a 37°C y a un pH de 6.5, aunque esta actividad disminuye con la "edad" del cultivo.

BEHLING y TAYLOR (1982) señalan dos grupos de bacterias productoras de histamina en función de su distinta capacidad al respecto:

- a) **bacterias formadoras de grandes cantidades de histamina** (>100 mg/100ml ), en un medio de cultivo adecuado y durante un período de incubación de menos de 24 horas, a temperaturas superiores a 15 grados Centígrados. Se incluyen en este grupo: *Proteus morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxitoca*, *Enterobacter aerógenes* y algunos microorganismos del género *Bacillus*.
- b) **bacterias formadoras de menores cantidades de histamina** (<25 mg/100 ml ), en el mismo medio de cultivo pero tras una incubación de 48 horas o más y a una temperatura de 30 grados centígrados. Entre estas se pueden citar: *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*.

Corlett y col. (1978) establecía otra clasificación de los microorganismos basada en su capacidad formadora de histamina, ya no en caldo de cultivo, sino en homogeneizados de pescados (atún fresco concretamente). La clasificación obtenida según este criterio se adapta mejor a la realidad y agrupa a los microorganismos en dos categorías, en función de si son capaces de formar cantidades de histamina superiores a 1500 mg a partir de 2500 mg de histidina o no. Así, pertenecerían al primer grupo: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxitoca* y *Enterobacter aerógenes* (SMITH y col., 1982).

Existen discrepancias entre distintos autores. Las diferencias observadas en sus resultados pueden ser debidas a la cepa o cepas utilizados en sus ensayos, ya que tanto la cantidad final de histamina como la temperatura óptima para su formación dependen de la misma. En el caso de *Proteus morganii*, todas las cepas resultan altamente productoras de histamina. *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio sp.*, ... y muchas otras, forman cantidades variables según la cepa y ello puede llevar a la obtención de resultados aparentemente contradictorios.

TAYLOR y col. (1978b) analiza un total de 112 cepas pertenecientes a 38 especies distintas y sólo en 7 de ellas detectó actividad histidin descarboxilasa.

También pueden aparecer variaciones importantes en los resultados obtenidos experimentalmente en función del medio de cultivo utilizado. Así, *Proteus morganii* aumenta su capacidad de formación de histamina si al medio se le incorpora cisteína o metionina, ya que ambos compuestos actúan disminuyendo el potencial redox (CATTANEO y col., 1984). Además, en estudios realizados en condiciones anaeróbicas, se pone de manifiesto que especies como el ya citado *Proteus morganii* aumenta su capacidad enzimática, mientras que otras como *Hafnia alvei* la disminuye (YOSHINAGA y FRANK, 1982).

Por último, no hay que olvidar que parte de las variaciones observadas pueden ser debidas al método analítico empleado en la cuantificación de las aminas biógenas formadas (TAYLOR y LIEBER, 1979).

Putrescina y cadaverina se forman por descarboxilación de los aminoácidos ornitina y lisina respectivamente. Los enzimas descarboxilasa implicados en estos procesos están ampliamente distribuidos entre los microorganismos, especialmente en los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (TAYLOR y SUMNER, 1986).

MIDDLEBROOKS y col. (1988) realizaron un amplio estudio en que realizaron pruebas de descarboxilación de lisina, arginina y ornitina con 400 cepas microbianas aisladas del pescado. Como resultado de este trabajo concluyen que un 65% de las cepas aisladas mostraba capacidad descarboxilasa sobre alguna de los tres aminoácidos ensayados.

Muchas especies pertenecientes a los géneros *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* o *Vibrio* poseen a la vez actividad ornitina e histidina-descarboxilasa. Sin embargo, salvo algunas excepciones como *Enterobacter aerógenes*, capaz de descarboxilar, histidina, ornitina y lisina o *Proteus morganii* que es descarboxilador de histidina y ornitina, los microorganismos presentan una cierta especificidad en cuanto a su capacidad formadora de aminas biógenas, debido a ello es posible la formación de cantidades importantes de histamina en pescados sin la aparición de putrescina y/o cadaverina o viceversa (TAYLOR y SUMNER, 1986).

A continuación se estudiarán con más detalle aspectos relacionados con los microorganismos que más frecuentemente se han relacionado con la formación de aminas biógenas.

## *Proteus morganii*

*Proteus morganii* ha sido la especie bacteriana que más frecuentemente ha sido identificada en relación con su elevada capacidad formadora de histamina. Diversos autores han propuesto que la presencia de este microorganismo debería ser controlada durante la manipulación y posterior conservación del pescado y que la presencia de recuentos elevados en el pescado podría ser utilizado como criterio para la identificación de brotes de intoxicaciones histamínicas (OKUZUMI y col., 1981; KLAUSEN y HUSS, 1987).

Para detectar con rapidez la presencia de *Proteus morganii*, en un alimento, KLAUSEN y HUSS (1987) proponen utilizar su capacidad de hidrolizar urea, que otras enterobacterias no poseen. Sería adecuado, por ejemplo, el uso de un test con resultado positivo en el caso de detectarse el enzima que lleva a cabo esta hidrólisis, la ureasa.

La relación de *Proteus morganii* con la formación de histamina se conoce desde hace muchos años, aunque en los primeros tiempos se registren equívocos probablemente debidos a la aplicación de distintos criterios en la sistemática de las especies bacterianas. Así, Gale (1941) estudia la presencia de histidín-descarboxilasa en numerosas especies bacteriana y no describe formación de histamina por *P. morganii*. Kimata y Kaway (1953) aíslan un microorganismo con elevada capacidad para formar histamina, que denominan *Achromobacter histaminum*; posteriormente estos mismos autores (1958) demuestran que es idéntico a *P.morganii*.<sup>1</sup> (LÓPEZ-SABATER, 1992).

Aiso y col. (1958) estudiaron la presencia del enzima histidín-descarboxilasa en 84 cepas de este microorganismo, algunas de las cuales habían sido aisladas a partir de alimentos involucrados en brotes tóxicos del Japón. Todas las cepas investigadas presentaron esta capacidad, elaborando cantidades superiores a 80 mg de histamina por cada 100 de caldo de cultivo.

El género *Proteus*, como la mayoría de las enterobacterias, tiene un crecimiento óptimo a 37 °C. Existe, sin embargo, cierta controversia en cuanto a la temperatura óptima para cepas de *Proteus morganii* aisladas en pescado. Así, mientras que según Klausen y Huss (1987) Ababouch y col. (1989) lo presentan a 20-25 °C, Niven y col. (1981) propone como temperatura óptima los 35°C (LÓPEZ-SABATER, 1992).

---

<sup>1</sup>Respecto a la cuestión de la sistemática de los microorganismos, queremos señalar que aunque los últimos estudios realizados sobre el DNA de *Proteus morganii* parecen indicar que es más correcto considerarlo como perteneciente al género *Morganella*, salvo excepciones la mayor parte de la bibliografía relacionada con su capacidad formadora de aminas biógenas se refiere a este microorganismo como *Proteus morganii*.

Mientras la inmensa mayoría de los autores coinciden al clasificar a *Proteus morganii* como potente formador de histamina, existen discrepancias en la inclusión de otras especies del género, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* y *P. rettgeri*. TAYLOR y LIEBER (1979), YOSHINAGA y FRANK (1982), FRANK y col. (1985) y ABABOUC y col. (1991) coinciden al afirmar que todas estas especies contribuyen a la formación de altos niveles de histamina. Por el contrario, CATTANEO y col. (1984) y REILLY y SANTOS (1984) ponen de manifiesto que sólo *Proteus morganii* es capaz de dar lugar a niveles tóxicos de histamina, considerando que las otras tres especies aunque producen histamina lo hacen en menor medida.

En cuanto a la capacidad descarboxilasa sobre otros aminoácidos, los datos bibliográficos son menos abundantes. TAYLOR y SUMNER (1986) no detectan capacidad lisina- descarboxilasa en ningún microorganismo del género *Proteus* mientras que citan a *Morganella morganii* y a *Proteus mirabilis* como capaces de descarboxilar la ornitina y originar putrescina.

### *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxitoca*

TAYLOR y col. (1979) describen el aislamiento de una cepa de *Klebsiella pneumoniae*, a partir de atún crudo responsable de una intoxicación histaminica en un restaurante japones. Esta cepa se reveló como potente formadora de histamina, frente a otros microorganismos aislados a partir del mismo atún que presentaron una capacidad descarboxiladora de histidina mucho menor.

BARANOWSKI y col. (1985) señalan que *Klebsiella pneumoniae* capaz de formar gran cantidad de histamina a 37, 25 y 10 °C y su presencia podría representar un riesgo potencial, ya que es capaz de formar pequeñas cantidades de esta amina incluso a 2°C, temperatura a la que crece con mucha dificultad.

Son diversos los autores que citan la presencia de *Klebsiella pneumoniae* en pescado alterado (LERKE y col, 1978; TAYLOR y col., 1979; NIVEN y col, 1981; YOSHINAGA y FRANK; 1982; BARANOWSKI y col., 1985)

Las referencias respecto a *Klebsiella oxitoca* como microorganismo formador de histamina son más recientes. Así TIECCO y col (1984) citan su potente actividad, WEI y col (1990), en un estudio realizado en atún envasado al vacío, afirman que la temperatura óptima para el desarrollo de esta actividad parece estar comprendida entre 15 y 20°C, aunque se mantiene debilmente a temperaturas inferiores a 10°C.

Ambas especies junto con otras pertenecientes a este mismo género se consideran también formadoras de cadaverina. Sin embargo, ninguna de ellas posee la capacidad de formar putrescina, vía descarboxilación de la ornitina (TAYLOR y SUMNER, 1986).

### Otras Enterobacterias

*Enterobacter aerógenes* es también un potente descarboxilador de histidina (TAYLOR y col., 1978). Las cepas utilizadas en el estudio realizado por TAYLOR y col. (1978) no eran de procedencia marina pero, posteriormente YOSHINAGA y FRANK (1982) aislaron este microorganismo de listado sometido a un proceso de alteración controlada y confirmaron su capacidad formadora de histamina.

*Hafnia alvei* es junto con *Proteus morganii* y *Klebsiella oxitoca* uno de los microorganismos aislados a partir de alimentos involucrados en brotes de intoxicación histamínica, pero su capacidad formadora de histamina es moderada (TAYLOR y col., 1978). Existen diversos trabajos que estudian las diversas condiciones en que este microorganismo es capaz de descarboxilar la histidina. BEHLING y TAYLOR (1982) citan que *Hafnia alvei* no elabora histamina a temperaturas inferiores a 30 °C, mientras que WEI y col. (1990) señalan que 20°C es la temperatura mínima para que se manifieste esta capacidad. CHEN y col. (1989) comprueban que aunque la capacidad histidin descarboxilasa de estas especies es bastante importante a pH alcalino, se ve considerablemente mermada en medio ácido.

El género *Pseudomonas* es uno de los principales responsables de la alteración del pescado, sin embargo aunque se ha descrito que algunas cepas tienen capacidad histidin- descarboxilasa (TIECCO y col., 1984; MIDDLEBROOKS y col., 1988), también son numerosos los trabajos en que no se les atribuye esta actividad (FRANK y col., 1985; TAYLOR, 1987).

TAYLOR y SUMMER (1986) citan los microorganismos perteneciente a las especies *Enterobacter aerógenes*, *Hafnia alvei* y *Pseudomonas Fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, tanto entre los descarboxiladores de ornitina como entre los de lisina.

### Bacterias aneoróbicas esporuladas

Algunas cepas de *Clostridium perfringens* se han señalado como capaces de descarboxilar la histidina (TAYLOR y col., 1978; RAMANTANIS, 1984). YOSHINAGA y FRANK (1982) aislaron a partir de pescado cepas de este microorganismo capaces de formar histamina, indicando que puede crecer y elaborar grandes cantidades de histamina sobre el músculo del pescado. Estos mismos autores, FRANK y YOSHINAGA (1984), citan que si bien este microorganismo no es capaz de crecer a temperaturas bajas (4°C),



si que desarrolla a estas temperaturas su capacidad aminoácido descarboxilasa, pudiendo ser el responsable de la formación de histamina en pescado mantenido en condiciones de refrigeración.

Taylor y Speckhard (1984) citan que *Clostridium perfringens*, a diferencia de los microorganismos perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentra frecuentemente en los fondos marinos y en el pescado, por lo que podría considerarse un componente de la microflora habitual del pescado (RODRIGUEZ-JEREZ, 1992).

TIECCO y col., (1984) y SCHEIBNER y BERGANN (1987) consideran como productores de histamina, además de a *Clostridium perfringens*, algunas cepas de otros microorganismos pertenecientes a este género como: *Cl. bifementans*, *Cl. fallax*, o *Cl. novyi*.

#### **Otras bacterias tambien relacionadas con la formación de aminas biógenas**

Algunos autores citan que ciertas especies pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* tambien presentan capacidad moderada de descarboxilar la histidina (NIVEN, y col., 1981; YOSHINAGA y FRANK, 1982; FRANK y col., 1985).

OKUZUMI y col. (1981) denominan Bacterias de grupo N a un conjunto de microorganismos no identificados que presentan la característica común de ser halófilos, psicrófilos y formadores de histamina. También microorganismos halófilos pero de caracter mesófilo pueden ser los responsable de la formación de histamina en pescado (YOGUCHI y col. 1990), constituyendo en este caso las llamadas Bacterias del Grupo C.

Otras especies bacterianas pertenecientes a géneros como *Streptococcus* o *Lactobacillus* se han identificado como formadoras de aminas biógenas en productos lácteos, derivados cárnicos o cervezas (TAYLOR, 1982; JOOSTEN, 1988; IZQUIERDO-PULIDO, 1991).

La presencia de bacterias lácticas no es frecuente en pescado fresco, pero si puede tener importancia en derivados de pescado sometidos a procesos de fermentación/maduración (TAYLOR y SUMMER, 1986). KARNOP (1988) aisló una cepa de *Pediococcus halophilus* como responsable de la formación de histamina en una semiconservas de anchoa no sometida a ningún tratamiento térmico.

### 5.3.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACION DE AMINAS BIOGENAS POR ACTIVIDAD BACTERIANA

La **actividad del agua** está directamente relacionada con el crecimiento de los microorganismos. El pescado fresco es un alimento que presenta una elevada actividad de agua y ello favorece el crecimiento bacteriano. De hecho, muchos métodos empleados para conservar el pescado se basan (además de en otros factores) en una disminución de esta actividad (BANWART, 1982).

El **pH** del medio influye en el crecimiento de los microorganismos y en la efectividad de sus sistemas enzimáticos. A su vez, la presencia de metabolitos, consecuencia de la actividad bacteriana, puede igualmente variar el pH del medio.

El pH de la carne de pescado es relativamente elevado, más alto que el de la carne de los mamíferos, debido a que su bajo contenido en glucosa y glucógeno limita la glucólisis anaeróbica que se produce tras la muerte del animal, y que es la responsable del descenso del pH por acumulación de ácido láctico.

El tejido muscular de los escómbridos se ha señalado que posee un pH entre 6 y 6.5. Los microorganismos proteolíticos se desarrollan bien en estos valores de pH, lo cual favorece la aparición de aminoácidos libres, precursores de aminas, como ya se ha señalado. A medida que el pescado se deteriora, el pH aumenta debido a la formación de metabolitos básicos (TMA, DMA...) (LUDORFF y MEYER, 1979).

El pH óptimo para la formación de histamina, según BARANOWSKI y col. (1985), se encuentra entre 5.1 y 6.5. Para el desarrollo de la actividad enzimática en *Clostridium perfringens* el pH óptimo es de 2.5 a 3.2 y para *Klebsiella Peumoniae* es un pH de 4, aunque a pH 6 sigue manteniendo en 70% de su actividad descarboxilásica.

EITENMILLER y col. (1981) estudian la producción del enzima histidin-decarboxilasa y de histamina por parte de *Proteus morgani* y su relación con el pH del medio, señalando que la máxima producción del enzima se sitúa a valores de pH próximos a 5. Sin embargo, a este pH el crecimiento bacteriano está muy inhibido. Koessler y col. en 1968 sugieren que ello es debido a una teórica acción protectora. Ienestea (1971) encuentra que el pH óptimo para la formación de histidin-decarboxilasa está entre 5 y 5.5 en la mayoría de las bacterias descarboxilásicas. Mientras que el pH de 8.5 es el óptimo para el crecimiento de estos microorganismos, a este mismo pH la actividad histidin-decarboxilásica es mínima.

En cuanto a los valores más favorables de pH para que el enzima histidin descarboxilásica tenga una actividad máxima, se ha señalado un valor de 6.5 unidades. Esta actividad desciende rápidamente a ambos lados del máximo. A pH 5 es mínimo, aunque sea el pH óptimo para la síntesis del enzima. A pH por encima de 7 la actividad histidin-descarboxilásica también desciende, puesto que la afinidad de la histidina por el centro activo del enzima disminuye (EITENMILLER y col, 1981).

El efecto de la **temperatura** en la producción de aminas biógenas, concretamente en la histamina, ha sido ampliamente estudiado. HARDY y SMITH (1976) demostraron que los pescados mantenidos a temperatura ambiente formaban mucho más rápidamente histamina que los conservados en hielo. YOSHIDA y NAKAMURA (1982) comprobaron, a partir de pescado fresco, en el que no se detectó histamina, que si permanecía a temperatura ambiente, al cabo de 24 horas se habían formado 28.4 ppm de histamina, y al cabo de 48 horas, se alcanzaban las 1450 ppm de esta amina.

YAMANAKA y col. (1980) comprobaron que con un almacenamiento a 20°C se forman cantidades importantes de histamina, sobretodo en los pescados de carne oscura. Sin embargo, estos mismos autores comprueban que aunque 20°C es la temperatura óptima de formación de histamina en estos pescados, tanto en el músculo claro como en el oscuro, los niveles máximos de histamina, se alcanzan siempre en el primero (contrariamente a lo que a priori cabría espera) (YAMANAKA y col , 1984).

En definitiva, la temperatura es un factor muy importante en la formación de aminas biógenas, puesto que a su vez influye en varios factores relacionados con ésta:

- a) puede producir modificaciones en el sustrato, carne de pescado, que favorecerán la posterior colonización bacteriana.
- b) influye en el crecimiento bacteriano
- c) es un factor importante en la inducción de la actividad aminoácido-descarboxilásica y en la actividad enzimática en general.

a) Modificaciones en el sustrato

La temperatura puede modificar el sustrato haciéndolo más propenso al desarrollo microbiano. A temperaturas bajas, la colonización bacteriana es sólo un proceso de superficie. Alrededor de los 10°C, se han observado cambios importantes en el tejido, que conllevan a que la proteólisis pueda afectar ya al tejido conectivo, poco abundante ya de por sí en los pescados, permitiendo la penetración de los microorganismos hacia el interior del tejido muscular. La temperatura es un factor importante en estas circunstancias, ya que favoreciendo el desarrollo de esta actividad enzimática se favorece también la posterior formación de aminas biógenas (Olley y col., 1978 en PAN y JAMES, 1985).

b) Crecimiento bacteriano

Ratkowsky y col., en 1982 (PAN y JAMES, 1985), describieron una ecuación lineal que relacionaba la tasa de crecimiento bacteriano con la temperatura. La ecuación fue posteriormente modificada y permitió hacer estudios con bacterias productoras de histamina, relacionando mediante tablas la temperatura con la tasa de crecimiento bacteriano. De este modo puede tenerse información de la temperatura a la que existe mayor desarrollo bacteriano y por tanto una mayor actividad potencial, aminoácido-descarboxilasica, para un determinado tipo de microorganismos. Se hace referencia a actividad potencial puesto que la temperatura óptima de crecimiento de un microorganismo no tienen porque coincidir con la de su máxima producción de aminas biógenas.

Tras la muerte del pez, la flora bacteriana se ve profundamente modificada; los microorganismos que podrían considerarse como la flora habitual van cediendo paso a microorganismos como *Pseudomonas*, *Alteromona* o *Proteus*, responsables de la putrefacción del pescado. La temperatura a que se mantenga el pescado en su almacenamiento también condicionará la composición de la flora bacteriana dominante.

BALDRATI y col. (1980) observan que en caballa conservada a 0°C, la flora microbiana está compuesta fundamentalmente por bacterias de los géneros *Achromobacter*, y *Pseudomonas*; mientras que en este mismo pescado mantenido a 18°C dominan el género *Proteus* y otras enterobacterias. El predominio de *Proteus* se hace todavía más evidente cuando la temperatura se acerca a 30°C.

MIDDLEBROOKS y col. (1988) estudian también la evolución de la flora bacteriana en otra especie de pescado, Carita (*Scomberomorus maculatus*). A 0°C predomina *Pseudomonas sp.*,

a 15°C la flora sigue estando compuesta por este microorganismo y aparecen también *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginoliticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus morganii* y aparecen también microorganismos anaerobios estrictos como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Pectococcus*. A 30°C aparecen además *Streptococcus sp*, *Alcaligenes aquamarium*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium ramosus*.

c) Actividad aminoácido-descarboxilásica.

La temperatura tiene en este punto un doble papel, puesto que aunque al elevarse aumenta la velocidad de las reacciones enzimáticas, si es muy elevada puede llevar a la desnaturalización del enzima, lo que haría disminuir o cesar la actividad y por tanto la producción de aminas.

Respecto a la termolabilidad, parece ser que los enzimas bacterianos productores de histamina son bastante sensibles a temperaturas por encima de la temperatura ambiente (Olley y Baranowski en PAN y JAMES, 1985). Así, la actividad histidin-descarboxilasa desarrollada por *Proteus morganii* es a 37°C sólo aproximadamente un 25% de la actividad mostrada por este mismo enzima a 24 grados (EITENMILLER y col., 1981). En este sentido, también Epps en 1945 señaló que el enzima aislado de *C. perfringens* perdía un 25% de su actividad al cabo de 5 min, después de mantenerlo a 38°C. Kawabata y Suzuki en 1959 señalaron también para *Proteus morganii* que manteniéndolo a 34°C durante 24 horas sólo se conservaba un 5% de su actividad (PAN y JAMES, 1985).

Así pues, aunque en general al elevarse la temperatura se favorezca el desarrollo de la flora bacteriana y su actividad enzimática, ésta última puede disminuirse por desnaturalización del enzima. Para tener unas condiciones de producción máximas de histamina será necesario que se establezca una temperatura de compromiso entre estos dos parámetros (EITENMILLER y col., 1981).

Los estudios desarrollados para determinar la temperatura óptima de formación de histamina, para los diversos microorganismo con actividad histidin-decarboxilásica, muestran discrepancias en los resultados. Debido probablemente a la utilización de cepas distintas o bien a los distintos tiempos de reacción utilizados en los diferentes ensayos. La duración de estos ensayos es un parámetro crítico al realizar los estudios sobre la temperatura óptima. Según Olley y Baranowski (PAN y JAMES, 1985) dado que estos ensayos se basan en estudios de la cantidad de producto presente, después de un tiempo determinado de reacción, la temperatura óptima en la que se observa una mayor cantidad de producto, será sólo válida para ese sistema. En lo que sí parecen estar de acuerdo los diversos autores es que a 0°C no hay formación de histamina o al menos está muy

disminuida (EDMUNDS y EITENMILLER, 1975; FERNANDEZ y MACKIE, 1979; TAYLOR, 1985).

En cuanto a los distintos tipos de microorganismos y sus temperaturas óptimas de formación de histamina, podemos citar que:

- a temperaturas bajas, determinados microorganismos mesófilos pueden desarrollar parte de su actividad enzimática. Estudios realizados con bacterias histaminogénicas demuestran que si éstas han podido proliferar antes de estar sometidas al almacenamiento en frío, una vez a esta temperatura, pueden formar histamina. Concretamente Baranowski y col. en 1984 (PAN y JAMES, 1985) observaron que a 2 °C *Klebsiella pneumoniae* no crecía, pero permaneció viable y produjo pequeñas cantidades de histamina. Resultados similares observaron Yoshinaga y Franck (PAN y JAMES, 1985) a 4°C en *K. pneumoniae* y *C. perfringens*, aunque para *P. morganii* no se pudo demostrar. Estas bacterias habían crecido previamente en una muestra de atún a 37°C, que luego se mantuvo a 4°C.
- los microorganismo mesófilos tienen mayor actividad descarboxilásica que los psicrófilos (FRANK y col., 1985), sin olvidar a *Citrobacter freundii*, que es psicrófilo y halófilo y ha sido relacionado con la producción de importantes cantidades de histamina por estos mismos autores.

En definitiva, parece claro que si quiere evitarse la formación de histamina en pescados debe controlarse la temperatura a la que se mantiene tras su captura, puesto que la conservación en atmósfera de anhídrido carbónico tampoco impide la formación de aminas biógenas (WATTS y BROWN, 1982). En presencia de antibióticos, como tetraciclinas y penicilinas, se ha comprobado que hay una menor formación de histamina (FRANK y col., 1981), pero este procedimiento es inadmisibles. Como alternativa MUTLLER y col. (1989) proponen la irradiación del pescado, ya que comprueban que con este tratamiento se detiene de modo efectivo la formación de histamina.

#### 5.3.4 FORMACIÓN DE AMINAS BIOGENAS EN PESCADO MANTENIDO A DISTINTAS TEMPERATURAS

Son numerosos los trabajos en los que se sigue la formación de aminas biógenas a lo largo del proceso de almacenamiento y/o deterioro del pescado. Los planteamientos de dichos trabajos son distintos según el caso; en algunos de ellos se estudia la influencia de distintas temperaturas, las relaciones entre los niveles de aminas biógenas y el crecimiento de determinados microorganismos, y otros parámetros organolépticos o químicos de los que clásicamente han sido utilizados para evaluar el estado higiénico sanitario del pescado (N-TMA, Hipoxantina...). En la tabla 15 se recoge información referente a algunos de estos trabajos.

Los primeros estudios sobre la formación de aminas biógenas se desarrollaron en pescados de la familia *scombridae* y por extensión en otros peces grasos, debido a su implicación en casos de intoxicación histamínica. Con el tiempo esta tendencia se ha ido ampliando al estudio de:

- peces semigrasos (EDMUNDS y EITENMILLER, 1975; YAMANAKA, 1987; YAMANAKA, 1989),
- peces magros (FERNÁNDEZ-SALGUERO y MACKIE, 1987; STEDE y STOECKEMER, 1988; SUZUKI y col. 1990),
- moluscos y crustáceos (EDMUNDS y EITENMILLER, 1975; NAGAYAMA y col., 1985; YAMANAKA y col., 1987; SUZUKI y col., 1990; NONTRADIP y col.; 1992) y

De la revisión de los trabajos de la tabla 15 se deduce la importancia de la **temperatura de almacenamiento** en la formación de aminas biógenas, tal como se comentó en el apartado 5.3.3. Podría considerarse casi como una norma general que a temperaturas elevadas existe una mayor formación de aminas biógenas y que a temperaturas inferiores a 0°C la formación de estos compuestos se encuentra muy inhibida o no se da (BALDRATTI y col., 1980; LOHS y KAMPE, 1980; ABABOUC, 1981; YAMANAKA y MATSUMOTO, 1989).

Son numerosos los trabajos en que se efectúa un seguimiento microbiológico paralelo al estudio de la formación de aminas biógenas (BALDRATTI y col., 1980; JHAVERI y col., 1982; SCHULZE y ZIMMERMAN, 1982; LEITAO y col., 1983; FRANK y YOSHINAGA, 1984; OKUZUMI y col., 1984; FRANK y col., 1985; YAMANAKA y col., 1987; MIDDLEBROOKS y col., 1988; ABABOUC, 1991; YAMAMOTO y col., 1991). En algunos trabajos incluso se efectúan estudios de contaminaciones dirigidas en muestras de pescado, a las que se inoculan microorganismos pertenecientes a especies bacterianas seleccionadas (SUZUKI y col., 1990; WEI y col.,

1990). De este modo es posible esclarecer mejor cual es la contribución de cada una de estas especies bacterianas en la formación de aminas biógenas, ya que normalmente la flora del pescado es compleja y resulta difícil atribuir a una determinada especie la causalidad en la formación de aminas biógenas.

También, en algunos casos se efectúan valoraciones organolépticas ( GALLARDO y col., 1983; OKUZUMI y col., 1984; NAGAYAMA y col., 1985; KNEZEVIC y col., 1986; YAMANAKA y col., 1986; YAMANAKA y col., 1987; YAMANAKA y col., 1989; YAMANAKA y MATSUMOTO, 1989; ABABOUCH, 1991; NONTRADIP y col., 1992).

Otros autores estudian la relación entre contenidos elevados de aminas biógenas y otros compuestos químicos también propuestos para evaluar el estado de conservación del pescado. HARDY y SMITH (1976) y KNEZEVIC y col. (1986) determinan además el índice de peróxidos, empleando en la evaluación de la calidad de pescados grasos. STEDE y STOECKEMER (1981), JHAVERI y col. (1982); GALLARDO y col. (1983), FERNÁNDEZ-SALGUERO y MACKIE (1987), COGUL-ARDEVOL (1988); YAMANAKA y col. (1989), VECIANA-NOGUES, (1990), BENAIGES-BENAIGES, 1990 optan por determinar paralelamente el nitrógeno de trimetilamina (TMA). Otros autores determinan compuestos indicadores de pérdida de frescura derivados de la rotura del ATP, cuyo último metabolito en la secuencia degradativa (hipoxantina) puede estar altamente influido por el crecimiento bacteriano, al igual que las aminas biógenas (JHAVERI y col., 1982; VECIANA-NOGUES y col., 1990; BENAIGES-BENAIGES, 1991).

En la mayoría de los casos es posible establecer una relación entre la puntuación obtenida en la evaluación organoléptica, el valor de otros indicadores químicos de deterioro del pescado y el contenido de alguna o algunas de las aminas biógenas, de modo que éstas también podrían ser útiles como parámetros objetivos para evaluar el grado de deterioro del pescado.

Histamina, putrescina, cadaverina, agmatina, tiramina y triptamina, en general aumentan al avanzar el grado de descomposición del pescado. A temperatura ambiente se alcanzan con facilidad contenidos de aminas biógenas que podrían considerarse peligrosos. Así, por ejemplo, EDMUNDS y EITENMILLER (1976) describen que en menos de 48 horas se pueden alcanzar con facilidad niveles de histamina en caballa superiores a los 20 mg/100g marcados como tóxicos por la FDA (KAROLUS y col., 1985). Si bien no es corriente mantener el pescado destinado a consumo humano a temperatura ambiente, en países cálidos y en casos de rotura de la cadena de frío podrían alcanzarse temperaturas próximas a los 20°C. En condiciones de refrigeración, aunque la formación de aminas biógenas se encuentre enlentecida, igualmente pueden alcanzarse niveles importantes de histamina (BALDRATTI y col., 1980; OKUZUMI, 1984; PRIEBE, 1984, VECIANA-NOGUES y col., 1990; BENAIGES-BENAIGES, 1991. No debe olvidarse tampoco, el papel potenciador de la toxicidad que ejercen otras aminas biógenas, putrescina y



cadaverina, las cuales se forman también en cantidades importantes en pescados (ABABOUC, 1991; WATTS y BROWN, 1982; NAGAYAMA y col., 1985; ABABOUC, 1991). En el caso de pacientes tratados con medicamentos de tipo IMAO, todavía es más fácil superar el límite de toxicidad propuesto para la histamina que en este caso se sitúa en 5 mg/100g (BARTHOLOMEW y col., 1987).

Las aminas fisiológicas, espermina y espermidina, sólo disminuyen muy ligeramente o sus contenidos se mantienen constantes a lo largo del proceso de descomposición del pescado (RITCHIE y MACKIE, 1980, NAGAYAMA y col., 1985; FERNÁNDEZ-SALGUERO y MACKIE, 1987; YAMANAKA y col., 1987c; YAMANAKA y col., 1989; YAMANAKA y MATSUMOTO, 1989; YAMANAKA, 1989; ABABOUC, 1991).

En estados avanzados de descomposición del pescado se han descrito descensos en los niveles de histamina, atribuibles a la acción de histaminasas bacterianas (SCHULZE y ZIMMERMAN, 1982b). NONTRADIP y col. (1992) observan un ligero descenso de los contenidos de cadaverina que según Takeda y Daykuara (1977) se debería a la destrucción de este compuesto por acción de una diaminooxidasa. SUZUKI y col. (1990) sugieren que la putrescina podría transformarse en agmatina por la acción combinada de un enzima descarboxilasa y del enzima agmatina-hidrolasa. YAMANAKA y MATSUMOTO (1989), en un estudio efectuada en caballa y paparda, también observaron un descenso en el contenido de agmatina en avanzados estados de descomposición. Esta disminución final en los niveles de aminas biógenas podría limitar su uso como indicadores del deterioro de pescados, pero el hecho de que sólo se observe en estados de descomposición muy avanzados, a los que difícilmente se llega en condiciones que no sean las de un ensayo de laboratorio, resta importancia a esta limitación.

La formación de aminas biógenas también vendrá influida por el tipo de pescado. Los peces pequeños parecen presentar más histamina que los grandes (WILLIAMS, 1954), quizá porque se deterioran con mayor facilidad. FERNÁNDEZ-SALGUERO y MACKIE (1987) observan una mayor formación de histamina, putrescina y cadaverina en arenque que en bacalao, mantenidos en las mismas condiciones de almacenamiento y durante el mismo tiempo. La amina de formación mayoritaria también parece depender de este factor. Así, YAMANAKA y sus colaboradores, en un conjunto de estudios realizados sobre especies de pescado distintas, proponen el uso de distintas aminas biógenas como indicadores del deterioro según el caso. Proponen la determinación de agmatina en el caso del calamar (YAMANAKA, 1987) puesto que es muy rico en arginina, su aminoácido precursor. La determinación de putrescina en moluscos lamelibranquios (YAMANAKA y col., 1989) y la de cadaverina en salmónidos y en pescados de mar. BALDRATTI y col. (1980) y ABABOUC (1991) también estudian el perfil aminoacídico libre a lo largo de la descomposición del pescado puesto que, en parte, podría explicar las variaciones en la formación de aminas biógenas que se observan al considerar distintas especies.

Dentro de una misma especie también se pueden observar diferencias en cuanto a la formación de aminas biógenas. Los contenidos de estos compuestos son superiores en las vísceras que en el músculo (STEDE y STOECKEMER, 1981). En la musculatura clara la formación de aminas biógenas es más importantes que en la musculatura oscura (al contrario de lo que a priori cabría esperar). En la musculatura clara existe menos precursor de la TMA, compuesto que se ha propuesto como inhibidor de la formación de histamina (YAMANAKA y col, 1984).

FRANK y col. (1981) describen una variación de los contenidos de histamina en función de la zona anatómica del pescado, siendo más altos en las zonas próximas al tracto digestivo. HARDY y SMITH (1976) y BENAIGES-BENAIGES (1990) concluyen que en muestras de pescado eviscerado se forman mayores cantidades de aminas biógenas, si esta operación no se efectúa con sumo cuidado.

Otros autores estudian el uso de atmósferas modificadas para evitar la formación de aminas biógenas, pero este recurso no resulta siempre eficaz (WATTS y BROWN, 1982; SUZUKI y col, 1990). Respecto a la adición de cloruro sódico, que se tratará más extensamente en el apartado 5.4.4., dedicado a las aminas biógenas en semiconservas (fundamentalmente salazones) de pescado, si que resulta eficaz para disminuir la formación de aminas biógenas (YAMAMOTO y col., 1991).

**Tabla I** Estudio de la formación de aminas biógenas a lo largo del periodo de almacenamiento descomposición del pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	ESPECIE DE PESCADO	AMINA/S BIÓGENA	ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	CONDICIONES ALMACENAMIENTO
WILLIAMS (1954)	peces grasos	histamina	--	no
EDMUNDS y EITENMILLER (1975)	Siluro trucha cangrejo salmonete caballa	histamina		temperaturas de 4 °C y 20°C
HARDY y SMITH (1976)	caballa	histamina	indice de peróxidos	Temperatura 0°C y ambiente /influencia evisceración
BALDRATTI y col. (1980)	caballa	histamina	pH histidina microbiológico	Temperaturas de -18°C, 4°C, 18°C y 30°C.
LOHS y KAMPE (1980)	sardina	histamina		temperatura -22°C, 10°C y 20°C.
RITCHIE y MACKIE (1980)	Caballa Arenque	histamina Putrescina cadaverina espermina espermidina		temperatura 1°C, 10°C y 25°C

**Tabla II** Estudio de la formación de aminas biógenas a lo largo del periodo de almacenamiento descomposición del pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	ESPECIE DE PESCADO	AMINA/S BIÓGENA	ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	CONDICIONES ALMACENAMIENTO
FRANK y col. (1981)	listado	histamina	influencia de la zona anatómica	temperatura
PARK y col. (1981)	carita paparda	histamina		temperatura 2°C y 20°C.
STEDE y STOCKEMER (1981)	Arenque caballa	histamina	TMA visceras/ músculo	temperatura: 0°C, 2°C, 3°C y 6°C.
ABABOUCH (1981)	sardina	Histamina cadaverina putrescina espermina espermidina	aminoácidos microbiológicos	Temperatura: -18°C, 0°C, 8°C y ambiente (25-28°C) concentración ClNa:
JHAVERI y col. (1982)	caballa	hiostamina	organoléptico TMA hipoxantina microbiológico	en hielo
SCHULZE y ZIMMERMAN (1982b)	atun caballa	histamina cadaverina	microbiológico	temperatura ambiente y refrigeración

**Tabla III** Estudio de la formación de aminas biógenas a lo largo del periodo de almacenamiento descomposición del pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	ESPECIE DE PESCADO	AMINA/S BIÓGENA	ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	CONDICIONES ALMACENAMIENTO
WATTS y BROWN (1982)-	Caballa	histamina putrescina cadaverina tiramina	-	Temperatura: 20°C. Atmósfera: aire, CO <sub>2</sub>
FRANK y col. (1983)	Listado	histamina	predicción mediante nomogramas	temperatura 70-100 ° F
GALLARDO y col. (1983)	caballa listado	histamina	organoléptico TMA	Temperatura:
LEITAO y col. (1983)	Caballa sardina	???	microbiológico	temperatura: 7°C, 15°C y 25°C.
FRANK y YOSHINAGA (1984)	atún	histamina	microbiológico	temperatura:
OKUZUMI y col. (1984)	caballa	histamina	microbiológico organoléptico N-BVT	temperatura: 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C y 30 °C.

**Tabla IV** Estudio de la formación de aminas biógenas a lo largo del periodo de almacenamiento descomposición del pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	ESPECIE DE PESCADO	AMINA/S BIÓGENA	ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	CONDICIONES ALMACENAMIENTO
PRIEVE (1984)	caballa	histamina	TMA influencia evisceración	temperatura 3°C
WAGENER (1984)	Atún merluza	histamina putrescina cadaverina tiramina triptamina espermina espermidina	-	temperatura ambiente
YAMANAKA y col (1984)	Bonito de altura caballa jurel paparda patudo	histamina	N-BVT influencia del tipo de musculatura	temperatura: 5°C y 20°C
FRANK y col. (1985)	anjova	histamina	microbiológicos	temperatura: 0°C y 32°C
NAGAYAMA y col. (1985)	atún caballa sardina paparda pulpo almeja	histamina cadaverina putrescina tiramina agmatina espermidina	organoléptico N-BVT pH	temperatura ambiente

**Tabla V** Estudio de la formación de aminas biógenas a lo largo del periodo de almacenamiento descomposición del pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	ESPECIE DE PESCADO	AMINA/S BIÓGENA	ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	CONDICIONES ALMACENAMIENTO
KNEZEVIC y col. (1986)	sardina	histamina	organoléptico pH N-BVT índice de preoxidos	en hielo, refrigerado y congelado
YAMANAKA y col. (1986)	paparda sardina	histamina putrescina cadaverina tiramina triptamina espermina espermidina	organoléptico N-BVT pH	temperatura: 5°C y 20°C
FERNANDEZ- SALGUERO Y MACKIE (1987)	arenque bacalao	histamina putrescina cadaverina espermina espermidina	N-TMA y N-DMA influencia del fileteado	temperatura: 0°C (en hielo) y 5°C
YAMANAKA y col. (1987a)	carpa	putrescina cadaverina tiramina triptamina espermina espermidina	microbiológico pH N-BVT	temperatura 5 °C
YAMANAKA y col. (1987)	calamar	putrescina cadaverina tiramina triptamina espermina espermidina	organoléptico pH N-VBT	temperatura: 0°C, 3.5°C y 15°C

**Tabla VI** Estudio de la formación de aminas biógenas a lo largo del periodo de almacenamiento descomposición del pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	ESPECIE DE PESCADO	AMINA/S BIÓGENA	ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	CONDICIONES ALMACENAMIENTO
YOSHIDA y NAKAMURA (1987)	caballa	histamina		temperatura ambiente
COGUL-ARDEBOL (1988)	boquerón sardina	tiramina	N-TMA	temperatura ambiente y refrigeración
MIDDLEBROOKS y col. (1988)	carita	histamina putrescina cadaverina	microbiológicos	temperatura. 0°C, 15°C y 20°C
STEDE y STOCKEMER (1988)	gallineta eglefino bacalao solla	histamina putrescina cadaverina tiramina espermina espermidina		temperatura 7°C
YAMANAKA y col. (1989)	trucha salmón	putrescina cadaverina tiramina triptamina agmatina espermidina	organoléptico N-TMA N-BVT pH	temperatura: 5°C y 10°C
YAMANAKA y MATSUMOTO (1989)	caballa paparda	histamina putrescina cadaverina tiramina triptamina agmatina espermidina	organoléptico N-BVT	temperatura: -1°C, 0°C, 5°C y 10°C



**Tabla VII** Estudio de la formación de aminos biógenas a lo largo del periodo de almacenamiento descomposición del pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	ESPECIE DE PESCADO	AMINA/S BIÓGENA	ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	CONDICIONES ALMACENAMIENTO
SUZUKI y col. (1990)	eglefino calamar	histamina putrescina cadaverina agmatina espermidina	microbiológico, contaminación con cepas seleccionadas	atmósfera: aire, N <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>
VECIANA-NOGUES y col. (1990)	boquerón	histamina tiramina	N-TMA N-BVT pH hipoxantina	Temperatura ambiente y refrigeración.
WEI y col. (1990)	atún	histamina	microbiológico, contaminado con cepas seleccionadas	temperatura: 5°C, 7°C, 10°C, 15°C y 25°C
BENAIGES-BENAIGES (1991)	sardina	histamina tiramina	N-TMA N-BVT pH hipoxantina	temperatura: 8-10°C y 20°C
WEKEL (1991)	albacora rabil listado	putrescina cadaverina		temperatura refrigeración

## 5.4 SIGNIFICACION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS EN PESCADO

### 5.4.4 EN PESCADO FRESCO REFRIGERADO O MANTENIDO EN HIELO

En el apartado anterior se ha visto como en pescado mantenido en condiciones de refrigeración es posible la formación de aminas biógenas. Asumiendo el origen bacteriano de estos compuestos y que la flora saprófita del pescado de aguas limpias no posee, en general, capacidad de formar aminas biógenas, su presencia indicaría una manipulación poco cuidada.

Son pocos los trabajos en que se exponen datos de aminas biógenas en pescado fresco (tabla 15), quizá porque, salvo excepciones, los contenidos detectados fueron siempre bajos y la atención en este sentido se desvió fundamentalmente hacia las conservas y semiconservas de pescado.

### 5.4.2. EN PESCADO CONGELADO

En general el proceso de congelación detiene el crecimiento de microorganismos y la consecuente formación de aminas biógenas. Numerosos autores congelan el pescado y lo utilizan como control en los estudios encaminados a conocer la formación de aminas biógenas. También es frecuente la práctica de la congelación desde el momento de la toma de muestra hasta que es posible realizar su análisis. Al respecto, HARDY y SMITH (1976) describen la no formación de histamina durante el almacenamiento de caballas a  $-14^{\circ}\text{C}$ ,  $-21^{\circ}\text{C}$  y  $-29^{\circ}\text{C}$ , prolongado durante 72 días. SCHULZE y ZIMMERMANN (1982) llegan a resultados semejantes con muestras de atún congelado.

Los contenidos de aminas biógenas descritos en la bibliografía (tabla 17) deberían en principio atribuirse al desarrollo de la actividad aminoácido descarboxilasa de las bacterias antes de la congelación. Sin embargo, BALDRATI y col. (1980) describen la formación de 15 mg/100g de histamina en caballa tras 3 días a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

YAMANAKA y col. (1982) describen un caso con los síntomas típicos de una intoxicación histamínica tras el consumo de marlín y albacora que habían sido congelados en alta mar. En los restos de pescado analizados se detectó un contenido de histamina anormalmente alto. Tras comparar con muestras del mercado japonés, en las muestras responsables de la intoxicación se determinó mayor contenido de histamina, mayor intensidad de sabor picante (atribuible a la histamina), mayor cantidad de nitrógeno básico volátil total (N-BVT), mientras que el recuento total de microorganismos resultó similar.

Tabla 16. Contenidos de aminas biógenas  $\mu\text{g/g}$  en pescado fresco

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	TIPO DE PESCADO	CONTENIDO AMINA/S
MIETZ y KARMAS (1978)	pescado blanco (n=9)	histamina 0.12-1.58
	salmón (n=9)	histamina 0.34-4.20
	crustaceos (n=6)	histamina ND-0.38
DEL PRETE y col. (1979)	atún y sardina (n=18)	histamina 0.06- 9.0
PECHANEK y col. (1980)	pescado blanco (n=9)	histamina ND-19.75
	tiburón (n=2)	histamina ND- 1.60
	peces de río (n=8)	histamina ND- 7.59
INGLES y col. (1985)	atún (n=2)	histamina ND-10.00 tiramina ND- 2.00 feniletilamina ND putrescina ND cadaverina ND
BENAIGES-BENAIGES (1990)	sardina (n=10)	histamina ND- 3.20 tiramina ND- 0.15

Los autores, en este caso, no atribuyen la formación de histamina a una actividad histidin Descarboxilasa de origen bacteriano, sino a una actividad enzimática anormalmente alta del músculo de pescado. Apoyan esta hipótesis en un estudio anterior (Igarishi, 1939) en que se concluía lo mismo.

Sin embargo, en estos casos de presencia de cantidades importantes de aminas biógenas en pescado congelado, no debe descartarse la posibilidad de la rotura de la cadena de frío y el efecto de las fluctuaciones de temperatura que sufren estos productos en su almacenamiento y distribución. En el proceso de congelación/descongelación la estructura de las células se ve dañada en mayor o menor grado y ello favorece la contaminación bacteriana (HUSS, 1988).

Tabla 17. Contenidos de aminas biógenas  $\mu\text{g/g}$  en pescado congelado

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	TIPO DE PESCADO	CONTENIDO AMINA/S
PECHANEK y col. (1980)	bacalao (n=17) otros pescados blancos (n=21) peces de rio (n=14)	histamina 0.1- 7.0 histamina ND- 8.7 histamina ND- 8.6
WALTERS (1984)	"Mahi-mahi" (n=4)	histamina 24-894 cadaverina 15-146 putrescina ND- 5
CALARESU y col. (1984)	merluza (n=12)	histamina ND*
GLORIA y SOARES (1992)	distintas especies	histamina 0.1-13.7

\* en este caso el límite de detección del método empleado era muy alto (8mg/100g)

#### 5.4.3. CONSERVAS DE PESCADO

Son relativamente abundantes los datos sobre contenidos de aminas biógenas en conservas de pescado. Las cifras citadas en la bibliografía abarcan igualmente unos márgenes muy amplios, desde no detectado hasta niveles que podrían suponer graves riesgos toxicológicos (tabla 18). Estas cifras altas, junto con la posibilidad de utilizar las aminas biógenas como parámetros químicos para una evaluación objetiva de este tipo de productos debido a su termoestabilidad, han potenciado los trabajos encaminados a conocer cuales son sus niveles normales, en que etapas del proceso de elaboración podrían formarse o si realmente son termoestables.

Algunos autores no citan cifras concretas sino que agrupan las muestras por intervalos de concentración. Así, LUTEN (1981), en un amplio estudio realizado sobre muestras de conservas de pescado del mercado holandés, describe que en la mayoría de las muestras de caballa, atún, arenque y sardina los contenidos de histamina fueron inferiores a 1 mg/100g. Sin embargo algunas muestras alcanzaban niveles alarmantes: 160  $\mu\text{g}$  en una muestra de caballa, 110 y 740 en muestras de atún o 1100, 2000 y 2400 en muestras de sardinas.

Tabla 18. Contenidos de aminas biógenas ( $\mu\text{g/g}$ ) en conservas de pescado (I).

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	TIPO DE PESCADO	CONTENIDO AMINA/S
LERKE y BELL (1976)	atún (n=16)	histamina 5-950
MIETZ y KARMAS (1977)	atún (n=141)	histamina 0.28-507.3 cadaverina ND- 56.42 putrescina ND- 7.62 espermina ND- 19.00 espermidina ND- 7.38
TAYLOR y col., 1978	atún (n=11) sardina (n=10) caballa (n=18)	histamina ND- 74.6  histamina 3.1-13.8  histamina 12.0-45.0
DEL PRETE y col. (1979)	atún bonito y sardina (n=60)	histamina 0.6- 9.5
KIM y BJELDANES (1979)	atún (n=34)	histamina 1.0- 17.0 cadaverina ND- 3.7 putrescina ND- 2.5 espermina ND- 2.9 espermidina ND- 7.9
YAMANAKA y col. (1980)	sardina (n=?)	histamina 25.0- 48.0
WORTEBERG y col., (1981)	sardina (n=10)  atún (n=2)  caballa (n=7)	histamina 10 - 850 tiramina 5 - 600 cadaverina <10- 270 putrescina <10- 115 histamina 60- 640 tiramina <50 cadaverina <50 - 50 putrescina <59 - 90 histamina 5 - 10 tiramina ND cadaverina ND putrescina ND
KOH y PARK (1982)	sardina (n=?) caballa (n=?)	histamina 22.4  histamina 113 -288
WAAD y col. (1982)	sardina (n=?)	histamina 613-1440
PAN y JAMES (1983)	sardina (n=?)	histamina 1100-2400

Tabla 18. Contenido de aminas biógenas ( $\mu\text{g/g}$ ) en conservas de pescado (II).

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	TIPO DE PESCADO	CONTENIDO AMINA/S
LIETAO y col. (1983)	atún (n=3) bonito (n=4) caballa (n=4) sardina (n=4)	histamina 20 -29 histamina 19- 28 histamina 21- 59 histamina 20 -54
PECHANEK y col. (1983)	sardina (n=10)	histamina <0.1 -374
SANTOS-BUELGA y col. (1984)	sardina (n=9)	tiramina ND - 1.9
WALTERS (1984)	atún (n=4)	histamina ND -3
FERNÁNDEZ-SALGUERO y MACKIE (1987)	atún (n=10)  caballa (n=11)  sardina (n=11)	histamina ND - 5 putrescina ND - 5 cadaverina ND - 5 espermina 5 - 25 espermidina ND -15 histamina ND - 5 cadaverina ND - 5 putrescina ND -15 espermina 5 - 25 espermidina ND -25 histamina ND - 5 cadaverina ND - 5 putrescina ND -15 espermina 5 - 15 espermidina ND -15
COGUL-ARDEVOL (1988)	atún (n=21) sardina (n=18) arenque (n=3) caballa (n=3)	tiramina ND-7.75 tiramina 0.65-5.35 tiramina 0.90-8.45 tiramina 1.10-2.65
VECIANA-NOGUES y col. (1990)	atún (n=12) sardinas (n=12)	histamina 1.50-10.95 tiramina 0.45- 7.75 histamina 4.40-20.80 tiramina 0.70- 8.90

PAN y JAMES (1985) describe las principales etapas del proceso de elaboración de conservas de pescado y analiza el riesgo de formación de aminas biógenas en cada una de ellas:

### 1. descongelación.

El pescado llega a la factoría generalmente congelado. El proceso de descongelación se efectúa en la mayoría de los casos por inmersión en agua corriente. Los niveles de aminas biógenas (histamina) pueden aumentar en esta etapa dependiendo del método, tiempo y temperatura de descongelación, así como de la velocidad de agua corriente empleada.

El tiempo para la descongelación es el necesario para que el centro del pescado alcance los 0°C y es proporcional al tamaño del pescado, con un coeficiente de regresión de entre 0.89 y 0.93 (Lee y Lee, 1984)

### 2. Cocción

En esta etapa el pescado se eviscera y se cuece al vapor. El tiempo de cocción también varía en función del tamaño del pescado. El contenido de aminas biógenas puede descender ligeramente durante este proceso circunstancia que se explica fácilmente suponiendo su paso al líquido de cocción (YEN y col., 1992).

Contenido de aminas biógenas ( $\mu\text{g/g}$ ) en conservas de pescado (III)

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	TIPO DE PESCADO	CONTENIDO AMINA/S
BENAIGES-BENAIGES (1990)	sardina (n=62)	histamina 0.45-25.8 tiramina ND-41.1
YEN y col. (1991)	atún, bonito y caballa (n=8)	histamina ND - 2.7 tiramina ND - 7.7 triptamina ND - 2.8 $\beta$ -feniletíl.ND- 4.0 putrescina 0.2 -7.6 cadaverina ND -20.3 agmatina 0.3 -13.1 espermina 2.1 -14.9 espermidina ND- 4.1
GLORIA y SOARES (1993)	atún (n=42) sardina (n=87) bonito (n=?) paparda (n=?)	histamina 2.8 -22.4 histamina 1.7 -36.0 histamina 10- 35.7 histamina 0.9 - 3.5

### 3. Enfriamiento

Es frecuente enfriar el pescado cocido a temperatura ambiente durante toda una noche. Mantener el pescado cocido durante largo tiempo a temperaturas medias puede dar lugar a la germinación y desarrollo de microorganismos esporulados, no eliminados en la cocción al vapor, con el consiguiente riesgo de formación de aminas biógenas, así como el aumento del N-BVT. La proliferación de este tipo de microorganismos sobre este sustrato se evita fácilmente enfriando a 4°C.

### 4. Enlatado

Al pescado cocido, una vez frío, se le retira la cabeza, las espinas y la musculatura roja. Cuando la carne aparece firme el contenido de histamina es bajo. La aparición de carnes pegajosas en esta etapa puede hacer sospechar al manipulador experto la proliferación bacteriana y la formación de aminas. El recuento de microorganismos no aumenta significativamente ni durante esta manipulación, ni con la adición del líquido de cobertura. Resulta, sin embargo, muy arriesgado que esta operación dure mucho tiempo y que se tarde en esterilizar el producto.

### 5. Esterilización

Generalmente las latas se sellan mediante un proceso de cerrado mecánico y se someten a la temperatura necesaria para conseguir una esterilidad comercial. Con este proceso se elimina cualquier riesgo de proliferación bacteriana en el interior del producto final.

WILLIAMS (1954) elaboró experimentalmente conservas de atún con distinta puntuación organoléptica y comprobó que el contenido de histamina en el producto final era muy superior en las muestras cuya materia prima había sido peor calificada organolépticamente. KIM y BJELDANES (1979) en un experimento similar señalaron contenidos de histamina, putrescina y cadaverina, superiores en muestras elaboradas con materia prima defectuosa, en comparación con los niveles a los detectados en las muestras elaboradas con materia prima en correcto estado de conservación. Los contenidos de espermina y de spermidina resultaron, sin embargo, muy similares en ambos casos.

SIMS y col. (1992) describen un alto grado de correlación entre contenidos altos de histamina y de cadaverina en conservas de atún y el rechazo organoléptico por parte de personal entrenado.

IIDA y col. (1982) evalúan la calidad de la materia prima empleada en la



elaboración de conservas, y señalan que se forma histamina en el pescado mantenido en hielo a la espera de su empleo en la elaboración. Comprueban también que la cocción al vapor a 100°C no afecta a los contenidos de histamina una vez formados.

PAVELKA (1982) y TOKONAGAI y col. (1982) estudian también el comportamiento de la histamina frente al calor y concluyen que resulta termoestable a lo largo del proceso de elaboración de conservas. RAGENES (1988) estudia además la termoestabilidad de cadaverina, putrescina, tiramina y espermidina y sólo la última resulta ligeramente afectada por el calor.

KOH y PARK (1982) determinaron los contenidos de histamina a lo largo del proceso de elaboración y el posterior almacenamiento de conservas de sardina y de caballa y afirmaron que en ningún momento se formaba este compuesto. Estos autores consideraron las conservas de pescado "seguras" en cuanto a riesgo de formación de aminas. PAN y JAMES (1985) y SIMS y col. (1992) citan estudios similares a los que se llega a las mismas conclusiones.

En estudios referentes a la formación de aminas biógenas durante la elaboración de conservas se concluye que (KOH y PARK, 1982; PAN y JAMES, 1985; RAGENES, 1988):

- a) este proceso, si se efectúa en las condiciones adecuadas, no conlleva la formación de aminas biógenas.
- b) sólo en la etapa de esterilización podría darse una ligera descarboxilación térmica.

Por ello, contenidos anormalmente altos de aminas biógenas podrían, en principio, ser atribuibles a una mala calidad de la materia prima empleada en la elaboración de la conserva.

A pesar de todo, no podemos descartar el riesgo de formación de histamina en el producto acabado, cuando la lata se abre y no se consume inmediatamente. KARNOP (1988) describe un caso de intoxicación histamínica atribuido al consumo de una conserva de atún mal manipulada o incorrectamente conservada una vez abierta. Esta última posibilidad debe tenerse en cuenta, sobre todo en casos de envases grandes destinados a hostelería que no siempre se agotan tras su apertura.

#### 5.4.4. SEMICONSERVAS

Los contenidos de aminas biógenas en semiconservas de pescado resultan a veces tan elevados como los descritos en conservas o incluso superiores. Sin embargo, estos productos han sido tradicionalmente menos relacionados con la aparición de problemas toxicológicos (tabla 19). De hecho, no debe olvidarse que las semiconservas de anchoa, por ejemplo, quedan incluidos entre los alimentos cuyo uso se recomienda restringir en pacientes tratados con medicamentos IMAO. MURRAY y col. (1982) describen un brote de intoxicación histamínica atribuido al consumo de semiconservas de anchoa de procedencia española y YAMANAKA y col. (1987b) también describen problemas toxicológicos de este tipo por el consumo de semiconservas preparadas por fermentación de dorada.

La preparación de las semiconservas de pescado no responde a un esquema común, como sucede en el caso de las conservas. Se aprovecha el efecto de la salazón, el ahumado, el descenso de la actividad de agua, o la disminución del pH originada en la fermentación, para evitar la putrefacción del pescado. Estas técnicas de preparación se utilizan desde la antigüedad y, en muchos casos, el "modus operandi" varía en función de la idiosincrasia de la zona geográfica donde se elaboran. Por ello, resulta difícil agrupar los trabajos efectuados, que a menudo se aplican a productos típicos de un determinado país.

Común a todos estos tipos de preparaciones es su carácter de semiconserva. Si bien se consigue obtener productos de mayor durabilidad que el pescado fresco, estos sólo se mantienen útiles para el consumo durante un período de tiempo relativamente corto, a diferencia de lo que ocurre con los productos en conserva.

En semiconservas de pescado podría considerarse un triple origen para la formación de aminas biógenas (SANTOS-BUELGA y col, 1986; KARNOP, 1988; VECIANA-NOGUES y col., 1989; RODRIGUEZ-JEREZ, 1992):

- empleo de materia prima defectuosa,
- formación accidental u obligada en el proceso de elaboración,
- formación por parte de bacterias o de actividades enzimáticas remanentes, puesto que se trata de productos no totalmente estabilizados.

SCHULZE y ZIMMERMAN (1982) en un amplio estudio realizado sobre productos **ahumados**, en los que se controlaba el crecimiento bacteriano y la formación de histamina y de cadaverina, concluyen que niveles elevados de aminas biógenas deben atribuirse a: a) mala calidad de la materia prima empleada, b) tiempos de conservación demasiado largos o a roturas de la cadena de frío. TRINIDAD y REILLY (19??) también describen que en el proceso de ahumado de la caballa no se forma histamina.

Tabla... Contenidos de aminas biógenas en semiconservas de pescado.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	TIPO DE PESCADO	CONTENIDOS AMINA/S
FARDIAZ y MARKAKIS(1979)	pasta fermentada anchoas (n=2)  cangrejo (n=4)	histamina 14 - 40 tiramina 3.4- 5.4 triptamina ND- 2.3 cadaverina ND histamina 8 - 64 tiramina ND-37.6 triptamina ND-16.3 cadaverina ND- 3.5
WORTEBERG y col (1981)	Caballa y arenque (n=12)	histamina 5 - 40 tiramina ND - 30
WADA y col. (1982)	salazones de pescado (n=22)	histamina ND- 1440
YOSHIDA y NAKAMURA (1982)	pasta de pescado (n=6)	histamina ND- 1050
LONBERG (1984)	arenques fermentados (n=?)	histamina > 150
COGUL-ARDEBOL (1988)	anchoas (n=10)	tiramina 9.6- 66.4
KARNOP (1988)	anchoas en sal (n=26) en aceite (n=78)	histamina 52.4* histamina 113.7*
VECIANA-NOGUÉS (1989)	anchoas (n=13)	histamina 7.7-219 tiramina 14.3- 66
GLORIA y SOARES (1992)	anchoas (n=?)	histamina 0.1 -5.9
YAMAMOTO y col. (1992)	salazones de de pescado (n=10)	histamina ND

## Tabla VII Contenidos de aminas biógenas $\mu/g$ en semiconservas de pescado

\* contenido medio

La no formación de aminas biógenas durante el proceso de preparación de productos ahumados también es demostrada por JOOKEL y col. (1986). Estos autores efectúan un amplio estudio sobre muestras de mercado en las que determinan la presencia de histamina, así como la de microorganismos totales y formadores de histamina. Concluyen que es difícil establecer una correlación clara entre el contenido de histamina y el grado de proliferación bacteriana en el producto final y relacionan contenidos altos con el empleo de materias primas defectuosas. Además, realizan el seguimiento de varios procesos de ahumado realizados a escala piloto en el laboratorio, modificando ligeramente las condiciones de elaboración a fin de determinar cuales de ellas resultan críticas para evitar la formación de aminas biógenas.

SCHULZE y ZIMMERMANN (1982) observan contenidos de histamina relativamente bajos en muestras de productos ahumados recién preparados. Estos contenidos aumentan a medida que también lo hace el recuento de microorganismos durante su período de durabilidad comercial. En este sentido, JOOKEL y col. (1986) proponen reducir este período a unas 3 semanas como máximo para evitar riesgos.

En el caso de productos **encurtidos**, las posibles causas de formación de aminas biógenas resultan más complejas. WADA y KOIZUMI (1986) estudiaron el proceso de elaboración de un encurtido de sardinas. Durante los 3 primeros meses, el pH desciende gradualmente alcanzando un mínimo de 5.5-5.6, posteriormente aumenta hasta 8 unidades a los 8 meses de maduración. Los resultados de este estudio sugieren que el pH bajo y la temperatura de encurtido (temperatura ambiente) influyen en la acumulación de histamina, observada durante el primer período de este proceso, puesto que resultan adecuadas para la expresión de la capacidad aminoácido descarboxilasa bacteriana. Los valores de pH más altos que se alcanzan en estadios más avanzados de esta maduración, por el contrario, favorecen la acción de los enzimas histaminasas. La formación y la evidente destrucción posterior de la histamina invalidaría su utilidad como índice para evaluar la calidad de este tipo de productos, pero según estos mismos autores se concluye que se acumula mayor cantidad de histamina en los encurtidos preparados partiendo de materia prima de menos calidad higiénico-sanitaria.

Las **salazones** son quizás las semiconservas más estudiadas desde el punto de vista de la formación de aminas biógenas, aunque la mayoría de los estudios están dirigidos solamente hacia la presencia y la formación de histamina.

La presencia de histamina es mayor en las vísceras que el músculo, por lo que será necesario prestar mayor atención a aquellos salazones que se consumen enteros, como los arenques pequeños salados conocidos con el nombre de espadines (STEDE y STOECKEMER 1981). La presencia o ausencia de las vísceras durante el proceso de elaboración de salazones, como ocurre en los dos procesos alternativos de preparación de anchoas empleados en las costas catalanas, también podría influir en la formación de aminas biógenas.

NAKAMURA y col (1978) señalan que con la adición de un 10% de NaCl se evita la formación de histamina, pero que concentraciones del 5% resultan insuficientes. También YAMAMOTO y col. (1991) estudian el efecto de distintas concentraciones de ClNa sobre la formación de histamina. Entre un 7.5% y un 25% casi no existe formación de este compuesto, la situación resulta distinta con el empleo de concentraciones inferiores, en las que la formación de histamina es evidente. ABABOUCH y col. (1991) señalan que la adición de un 8% de NaCl retrasa la formación de histamina, pero que este efecto es apreciable solo cuando el pescado se mantiene en hielo.

Con la adición de sal se consigue una disminución del recuento de microorganismos totales y la composición de la flora bacteriana se va modificando hacia el dominio de microorganismos halófilos. VAN SPREEKENS (1986) describe la formación de histamina por parte de bacterias halófilas (fotobacterias) en salazones de arenque. KARNOP (1988), a partir de anchoa fresca, observa la modificación de la flora microbiana hasta un dominio de *Pediococcus halophilus*. Estos mismos autores en un trabajo paralelo (KARNOP, 1988b) aíslan 1758 cepas a partir de anchoas conservadas en sal y en aceite, de las que 90% pertenecían al género *Pediococcus*, y un 34.5% de las cuales presentaba capacidad histidin descarboxilasa.

SANTOS-BUELGA y col. (1986) determinan los contenidos de tiramina durante el período de maduración de las anchoas y observan una formación y posterior descenso de este compuesto, por lo que no recomiendan su uso como índice de calidad, ni de la materia prima ni de las condiciones de maduración.

Como en el caso de los productos ahumados, existen trabajos en los que se describe la formación de histamina durante la conservación del producto acabado. Siendo especialmente importante la temperatura a que se efectúa su mantenimiento. KARNOP (1988) describe que en más de la mitad de las muestras que mantiene a 20°C se duplica el contenido de histamina al final de su vida comercial, mientras que esta circunstancia no se observa en muestras mantenidas a 5°C. VECIANA-NOGUES y col. (1989) llegan a conclusiones semejantes en un estudio efectuado a lo largo del período de vida útil de anchoas en aceite, donde señalan la formación de histamina en muestras mantenidas a temperatura ambiente y no en las mantenidas en condiciones de refrigeración.

## 5.5. AMINAS BIOGENAS COMO INDICES DE CALIDAD HIGIENICO-SANITARIA EN PESCADOS Y DERIVADOS

La determinación de una o más aminas biógenas ha sido propuesta por muchos autores como criterio para evaluar la calidad higiénica del pescado fresco y durante los procesos de obtención de derivados, desde la materia prima hasta el producto final. Las aminas podrían indicar si las materias primas, los tratamientos y la tecnología aplicada en la elaboración ha sido la más correcta e idónea.

El uso de las aminas biógenas como indicadores de calidad higiénico sanitaria estaría condicionado por dos puntos claves (VIDAL-CAROU, 1987):

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

Además, debe de considerarse también la posibilidad de que algunas contaminaciones bacterianas no poseen actividad amminoácido descarboxilasa. Mossel (1970) señala que existen una serie de microorganismos importantes desde el punto de vista higiénico que no poseen esta capacidad (BINDER y BRANL, 1983). De este modo, la ausencia de aminas biógenas no garantizaría la corrección desde el punto de vista higiénico. Ello apoya, una vez más, la idea de que es mejor realizar las evaluaciones siguiendo más de un criterio.

La **histamina** ha sido la amina biógena mas citada en la bibliografía como índice de calidad en los productos pesqueros. EDMUNDS y EITENMILLER (1975), STARUSKIEWICZ (1977), JANZ y col., (1983), PRIEBE, (1984), PAN y JAMES, (1985) entre otros muchos autores señalan la relación de esta amina biógena con el deterioro del pescado, destacando su posible importancia como indicador, ya que resiste los procesos tecnológicos aplicados en la obtención de derivados de pescado, en función de su probada termoestabilidad.

La propuesta de la histamina como índice venga quizá influenciada por el hecho de que ha sido la amina biógena históricamente más estudiada en pescados, por su implicación directa con la intoxicación histamínica. Actualmente, con el avance que han experimentado los procesos analíticos durante los últimos años, que permiten el uso rutinario de técnicas como el CLAE o la CG, se han multiplicado los estudios al respecto y muchos autores proponen el uso de otras aminas biógenas.

Algunos autores (JHAVERI y col., 1982) plantean dudas sobre la validez de la histamina como indicadora. Así MIETZ y KARMAS (1977) plantean tener en cuenta más

de una amina biógena para definir un índice de calidad. La histamina por sí sola presenta una gran variabilidad, circunstancia también apuntada por YAMANAKA y col. (1986). El índice propuesto responde a la siguiente fórmula, en la que deben indicarse las concentraciones de aminas biógenas implicadas en  $\mu\text{g/g}$ :

$$I = \frac{\text{HISTAMINA} + \text{CADAVERINA} + \text{PUTRESCINA}}{1 + \text{ESPERMINA} + \text{ESPERMIDINA}}$$

Así cuanto más avanzado resulta el deterioro del pescado mayores índices se alcanzan. Las aminas biógenas que figuran en el denominador de la expresión anterior son fisiológicas en la mayoría de los pescados (YAMANAKA, 1987a) y su concentración no aumenta a medida que estos se deterioran, como ocurre con histamina, cadaverina y putrescina (MIETZ y KARMAS, 1977; RITCHIE y MACKIE, 1980; BALDINI, 1982; NAGAYAMA y col., 1985; STEDE y STOECKEMER, 1988; YAMANAKA, 1986; NONTRADIP y col, 1992).

En función de los valores alcanzados tras aplicar la fórmula de MIETZ y KARMAS, estos autores proponen clasificar el pescado en tres categorías:

VALOR DEL INDICE	CATEGORIA	CARACTERISTICAS
0 - 1	I	pescado fresco
1 - 10	II	descomposición inicial
> 10	III	descomposición avanzada

También han propuesto el uso de una o mas aminas biógenas, distintas a la histamina, como índices para evaluar la calidad del pescado:

GOGUL-ARDEVOL (1988), tras estudiar la formación de **tiramina** a lo largo del proceso de descomposición de la sardina y el boquerón y concluía que ésta se forma en cantidades importantes y se encuentra correlacionada con el N-TMA formado, parámetro clásicamente aceptado como método de evaluación objetivo del grado de deterioro del pescado.

YAMANAKA y col. (1986) y YAMANAKA y col. (1987b) que proponen la determinación de **cadaverina** en sardina y en salmón respectivamente y proponen hacerlo extensivo también a otros pescados grasos (YAMANAKA, 1989b). En estos trabajos se efectúa un seguimiento extenso de la formación de aminas biógenas (diaminas y poliaminas) a lo largo del período de almacenamiento/descomposición del pescado,

comprobando que en las especies objeto de estudio la cadaverina era una de las aminas de formación mayoritaria y la que se correlacionaba mejor con la evaluación organoléptica. Proponen de modo semejante a MIETZ y KARMAS (1977) clasificar el pescado en categorías, pero en este caso en función del contenido en cadaverina.

CADAVERINA	CATEGORIA	CARACTERISTICAS
< 1 $\mu\text{g/g}$	I	aceptable
1 - 10 $\mu\text{g/g}$	II	descomposición inicial
> 10 $\mu\text{g/g}$	III	descomposición avanzada

STARUSZKIEWICZ y BOND (1981) y STARUSZKIEWICZ (1992) proponen el uso de la determinación de los niveles de cadaverina y en productos derivados de pescado proponen que para asignar una calidad aceptable no debe superarse la cifra de  $5\mu\text{g/g}$ .

YAMANAKA (1989) propone a la **putrescina** como índice de calidad en lamelibranquios, después de estudiar el comportamiento de los niveles de aminas biógenas y de formadas durante el almacenamiento a  $5^\circ$  y  $15^\circ$ . Concentraciones inferiores a  $1\mu\text{g/g}$  corresponderían a producto fresco, entre 1 y  $10\mu\text{g/g}$  a productos en incipiente estado de descomposición y concentraciones superiores a  $10\mu\text{g/g}$  a estados avanzados de descomposición.

STEDE y STOCKMER (1988) indican que en pescado blanco fresco (gallineta, eglefino, bacalao y solla) el contenido de **putrescina + cadaverina** debe ser inferior a  $50\mu\text{g/g}$ .

La formación de aminas biógenas parece estar claramente influenciada por el tipo de pescado de que se trata. Así YAMANAKA (1987c) propone el uso de la agmatina como índice de calidad en calamar (cefalópodo) puesto que este tipo de pescado es especialmente rico en el precursor arginina y se comprueba que la **agmatina** resulta la amina biógena de formación mayoritaria. Señalan que  $30\text{ mg}/100\text{g}$  corresponderían a un estado de descomposición inicial y  $40\text{ mg}/100\text{g}$  a estados de descomposición avanzada. En este estadio final los niveles de putrescina de formación mayoritaria en otros moluscos (YAMANAKA 1989) sólo alcanzan  $1\text{ mg}/100$  y esta amina es propuesta en este caso solo como índice auxiliar.

A pesar de que no esté definitivamente resuelta y aceptada la relación entre contenidos elevados de histamina y el grado de descomposición del pescado, algunas industrias utilizan su determinación como parámetro de calidad (LIEBER y TAYLOR, 1978; PAN y JAMES, 1985) y es la única amina sobre la que existen límites recomendaciones de carácter oficial.



Los contenidos de esta amina en pescado fresco son generalmente bajos (tabla.), sin embargo las cifras límite propuestas parecen establecidas sólo en función del riesgo toxicológico que supone su ingestión en los alimentos para la población en general, y los valores se encuentran muy alejadas de aquellos que deberían establecerse para primar la calidad.

El COMMITTEE on FOOD PROTECTION (1985) señala que la práctica de muchas industrias pesqueras de examinar rutinariamente el pescado, susceptible de contener cantidades importantes de histamina, debería extenderse como medio para prevenir al consumidor de posibles efectos toxicológicos derivadas del consumo de pescado.

Numerosos países como EEUU, URSS, Suecia, Suiza o Alemania reglamentan el control del contenido de histamina en pescados desde hace muchos años (PECHANEK y col., 1983). Así, la FDA (Food and Drug Administration) considera la histamina como índice de deterioro de conservas de caballa y atún. Un lote debe rechazarse si dos o más muestras de un total de 24 presentan un contenido de histamina superior a 200  $\mu\text{g/g}$ . En la antigua República Democrática Alemana, un Real Decreto de 1981 establecía un límite de 300  $\mu\text{g/g}$  para el rechazo de lotes de productos derivados de la pesca independientemente de la puntuación alcanzada en la valoración organoléptica (JANZ y col., 1983; KARNOPP, 1988).

La directiva 91/439 de la CEE considera que un lote de pescado es aceptable si en el análisis de 10 muestras homogéneas y representativas se obtienen los resultados siguientes:

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

En esta misma directiva, sin embargo se señala que pueden admitirse valores de hasta el doble de los permitidos en pescado fresco en pescados de las familias *Scombridae* y *Clupeidae* que hayan sido sometidos a un tratamiento enzimático en salmuera.

También existe reglamentación española reciente reflejo de la directiva de la CEE. Así, límites equivalentes se marcan en las "Normas Sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los Productos Pesqueros y de la Acuicultura" de B.O.E. de 13 de Enero de 1993.

TAYLOR (1986) señala que se pueden tomar algunas medidas preventivas destinadas a evitar la formación de histamina y otras aminas biógenas en pescados de entre las que destacan el uso de temperaturas de almacenamiento bajas i 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 riesgos derivados de la proliferación bacteriana.

TAYLOR (1986) indica que, si las bacterias productoras de histamina y de otras aminos biógenas provienen realmente de una contaminación post-captura, la formación de estas sustancias podría ser controlada de modo efectivo mediante la mejora de las condiciones higiénicas a lo largo de todo el proceso de manipulación del pescado.

## 5.6. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS

El interés de la determinación de aminas biógenas inicialmente se centró en la determinación de estos compuestos en fluidos biológicos y sólo más tarde cuando empezaron a conocerse sus implicaciones toxicológicas se extendió su determinación a los alimentos. Histamina y tiramina fueron en estos primeros tiempos las aminas biógenas más estudiadas y para su determinación se describieron una amplia gama de métodos analíticos. En la actualidad se encuentran muy extendidos los métodos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) que resultan específicos y permiten la determinación simultánea de varias aminas biógenas con la relativa rapidez a con niveles de detección muy bajos.

### Métodos biológicos

Estos bioensayos se han descrito para la determinación de la histamina y se basan en el efecto que produce esta sustancia en órganos o fluidos biológicos (WILLIAMS, 1956, 1960; HENRY, 1960). Parte del interés de estos métodos radica en evidenciar la toxicidad de la histamina, ya que la inyección intramuscular a cobayas de extractos de alimentos con cantidades altas de histamina conduce a la enfermedad e incluso a la muerte, si el extracto contiene más de 0.5 mg/g (MUÑOZ-LEIBA y col, 1992).

Se obtiene una medida semicuantitativa de la cantidad de histamina aprovechando que este compuesto estimula el tono intestinal. Esta estimulación se mide registrando las contracciones que sufre el íleon previamente extirpado de conejillos de indias (WILLIAMS, 1954; HENRY, 1960).

En otros casos se aprovecha la propiedad de la histamina de disminuir la tensión arterial por efecto de la vasodilatación periférica que produce y para ello se emplean gatos o perros anestesiados (MUÑOZ-LEIBA y col., 1992). BLONZ y OLCOTT (1978b) aprovechan el efecto que esta amina ejerce sobre un crustáceo *Daphnia magna* dosis letal dependiendo del tiempo.

Estas técnicas además de no resultar muy exactas resultan tediosas y requieren el continuo aporte de animales de experimentación por lo que su uso es cada vez más limitado (ARNOLD y BROWN, 1978)

## Metodos ópticos

Recurren a la utilización de reacciones químicas cuyo resultado es la obtención de derivados con alguna propiedad física medible mediante colorimetría, fluorimetría o alguna técnica electroquímica. Aunque estos métodos suelen precisar etapas previas de separación a menudo complicadas y laboriosas, siguen teniendo gran importancia como procedimientos oficiales de análisis (AOAC, última edición 1990).

Los reactivos empleados en los métodos con detección colorimétrica final pueden ser diversos: p-nitrobenzen- diazonio, p-nitroanilina o ninhidrina.

El empleo de la detección fluorimétrica es más reciente y en general se puede afirmar que estas técnicas resultan más específicas y presentan un límite de detección menor que las colorimétricas. El método oficial para la determinación de histamina en pescados es en la actualidad el propuesto por STARUSZKIEWICZ (1975) que consta de una primera fase en que la histamina contenido en un extracto de pescado se separa de otros interferentes por su paso a través de una resina de intercambio iónico y de una segunda en que se hace reaccionar con o-ftaldehído (OPT) en medio alcalino y se determina por lectura espectrofluorimétrica.

Empleando también OPT como reactivo de derivatización VIDAL-CAROU y col., (1989) y (1990) proponen la extracción con disolvente orgánico de la histamina en medio alcalino y su posterior transferencia a medio ácido, como etapa previa de purificación antes de formar el derivado fluorescente.

SANTOS y col. (1981) proponen un método de este tipo para la determinación de tiramina en alimentos. La etapa inicial es una extracción de este compuesto con acetato de etilo en medio alcalino con la ayuda de una matriz inerte de arena/sulfato sódico anhidro. Posteriormente la tiramina reacciona con alfa- nitroso- $\beta$ -naftol formando un complejo fluorescente.

Como reactivos derivatizantes se ha descrito también el uso de la fluorescamina y el 7-cloro-4-nitrobenzofurano conocido como cloruro de dansilo.

## Métodos enzimáticos

Estos métodos son muy utilizados actualmente debido a su gran especificidad que permite, en general, prescindir de las etapas de tratamiento previo (MUÑOZ-LEIVA, 1992).

LERKE y col. (1983) desarrollan un método enzimático de doble paso para análisis semicuantitativo de la histamina. La base de esta técnica consiste en que el enzima diamino-oxidasa, cataliza la degradación de la histamina a imidazol acetaldehído y la formación de peróxido de hidrógeno. Una peroxidasa cataliza la reacción en que se reduce el peróxido de hidrógeno a agua y se oxida el cristal de violeta. El cristal de violeta reducido se encuentra en su forma leuco y es incoloro, la forma oxidada es coloreada y la intensidad de coloración medible espectrofotométricamente resulta proporcional a la cantidad de histamina.

LÓPEZ-SABATER (1992) modifica ligeramente esta técnica y la emplea para la determinación de histamina en pescado y en medios de cultivo comprobando que es posible obtener resultados cuantitativos.

Otras técnicas enzimáticas utilizan compuestos marcados radioactivamente como la histidina o la s-adenosilmetionina, que en presencia del enzima histamina-metil-transferasa formara metilhistamina (ARNOLD y BROWN, 1978). Para determinar la actividad histidin- descarboxilasa, se utiliza l-histidina marcada con C<sup>14</sup>, y se mide el dióxido de carbono marcado resultante (EITENMILLER y col., 1981).

KARUBE y col. (1980) proponen la utilización de un biosensor formado por un electrodo de oxígeno al que se acopla un enzima inmovilizado, la monoamino-oxidasa. Este enzima oxida las aminas a aldehídos con el consiguiente consumo de oxígeno que es registrado por el electrodo. También STEBANATO y col (1990) proponen un método semejante para la determinación de diaminas y poliaminas en muestras de tejido biológico.

## Métodos cromatográficos

Inicialmente los métodos de cromatografía en columna fueron empleados como etapa previa de purificación en la determinación de aminas biógenas por métodos ópticos. También durante algún tiempo se extendió el uso de la cromatografía en capa fina como técnica semicuantitativa de screening (SCHUTZ y col., 1976; LIEBER y TAYLOR, 1978). Los métodos por CLAE son los más extendidos en la actualidad también se han descrito técnicas de cromatografía gaseoso (RENON y CANTONI, 1979; HENION y co., 1981; STARUZKIEWICZ y BOND, 1981; WADA y col, 1982; HAMANA, 1991) el uso de autoanalizadores (MURRAY y MURRAY, 1981) o la electroforésis, clásica PRIEBE, 1979; TARJAN y JANOSI, 1978) o capilar (RUBACH y col, 1984).

### 5.6.1. DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN ALIMENTOS POR CLAE

Los métodos cromatográficos empleados en la determinación de aminas biógenas en alimentos utilizan mayoritariamente columnas de fase reversa aunque en algunos casos se describe el uso de columnas de intercambio iónico.

En la cromatografía en fase reversa la fase estacionaria esta ligada a una matriz inerte se sílice y es de carácter apolar. Las fases más utilizadas en el análisis de aminas biógenas por orden de importancia son las constituidas por grupos octadecil ( $C_{18}$ ) y grupos octil ( $C_8$ ).

Como fase móvil es frecuente emplear mezclas metanol/agua o acetonitrilo/agua. Para el análisis de sustancias de carácter ácido o básico (como sucede en el caso que nos ocupa) es útil el empleo de soluciones reguladoras de pH constituídos por tampones fosfato o acetato. Mediante el establecimiento de un determinado pH y conociendo el  $pK_a$  y  $pK_b$  de las sustancias a analizar es posible controlar mejor su grado de ionización que influirá en su afinidad por la columna y permitirá se mejor resolución. Este tipo de técnicas se conocen con el nombre de métodos de supresión iónica.

Otras técnicas incorporan a la fase móvil compuestos de polaridad opuesta a los

analitos ácidos o básicos de modo que se forme un "par iónico" que resulta mucho más apolar y por tanto más retenido por la columna. De este modo es posible establecer con mayor facilidad unas condiciones en que la resolución resulte óptima (CHANG y col., 1985). En el caso de la determinación de aminas biógenas, de carácter básico, deben incorporarse iones ácidos como el heptanosulfónico, octanosulfónico, decanosulfónico... En el análisis de compuestos de carácter ácido como el ATP y sus productos de degradación (apartado 4.7.3) los reactivos empleados para la formación del "par iónico" son básicos ( sulfato de tetrabutilamonio, tetrahexilamonio, tetraoctilamonio...).

### **Preparación de la muestra**

El paso previo para cualquier determinación cromatográfica se la separación de las sustancias a analizar de una matriz que generalmente es muy compleja, el alimento. Con esta etapa previa el problema de las interferencias se ve muy reducido y además se alarga la "vida" de las columnas cromatográficas.

El caso de alimentos líquidos, esta extracción suele ser innecesaria. En el caso de sólidos es necesaria y en algunos casos, dependiendo de la complejidad del alimento, puede llegar a presentar tantas dificultades o más que el propio proceso cromatográfico (HURTS, 1990).

En **productos líquidos** como vino o cerveza, los tratamientos previos a la cromatografía son sencillos de tipo filtración, extracción con resinas o Sep-Pack<sup>R</sup> (SUBDEN y col., 1978; OUGH y col., 1987). Estos tratamientos van destinados generalmente a la eliminación de compuestos coloreados en vinos tintos o cervezas negras que podrían interferir en la determinación final (IZQUIERDO PULIDO, 1991).

En **productos sólidos** los tratamientos previos a la cromatografía son numerosos y de diversa complejidad. Algunos autores (GOUGUO y col, 1987; POZO y SAITUA, 1988), proponen una homogeneización con ácido tricloroacético o perclórico con posterior separación del residuo seco por filtración o decantación de modo semejante al propuesto para la determinación de nucleótidos por CLAE o de DMA y TMA por cromatografía de gases. Otros incluyen separaciones líquido/líquido o extracción en columnas rellenas con resinas de intercambio iónico (KOEHLER y EITENMILLER, 1978; CHANG y col; 1985; CARLUCCI y KARMAS, 1988).

### **Sistemas de detección**

En cuanto al sistema de detección empleado los métodos para la determinación de aminas biógenas por CLAE pueden agruparse en dos grandes grupos:

- a) los que utilizan la absorbancia o la fluorescencia natural de las aminas para su detección y cuantificación
- b) los que utilizan reactivo de derivatización para obtener complejos cromóforos o fluorescentes y que son los más numerosos.

#### **a) Métodos por CLAE sin derivatización.**

Estos métodos utilizan en su mayoría la medida de la absorbancia natural. Suelen ser poco sensibles y selectivos puesto que las longitudes de onda a las que se efectúa la detección (210-254nm) son muy bajas y en esta zona del espectro absorben muchos otros compuestos (tabla 20).

Para el empleo de este tipo de detección que resulta poco selectiva obliga al empleo de pautas de preparación de muestra largas y complejas para disminuir en algún modo el problema de los interferentes (HURST, 1990).

En la detección electroquímica tampoco es necesario el proceso de derivatización. el detector electroquímico es muy sensible y específico, pero su uso está limitado a las aminas biógenas que presentan un grupo catecol. WHEATLEY y TRIPTON (1987) utilizan este sistema para la determinación de tiramina en bebidas alcohólicas.

#### **b) Métodos por CLAE con derivatización.**

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

Independientemente del reactivo empleado la derivatización puede efectuarse antes o después de la separación cromatográfica de los compuestos objeto de análisis. El primer caso la técnica se denomina derivatización pre-columna (tabla 21) y en el segundo post-columna (tabla 22).

La derivatización post-columna requiere un sistema capaz de introducir el reactivo derivatizante a un determinado flujo en el sistema a la salida de la columna. Para ello se ha propuesto el uso de una segunda bomba cromatográfica o un sistema de propulsión mediado por un gas inerte. El reactivo de derivatización se introduce en el sistema y va



a parar a un receptáculo en forma de T, donde se mezcla con el fluido que sale de la columna. Posteriormente, la reacción transcurre a lo largo de un tubo capilar, denominado "coil" de reacción. La longitud y diámetro de este tubo varía en función del tiempo que sea necesario para que se verifique la reacción.

Aunque la derivatización post- columna represente un incremento de la instrumentación necesaria, y por tanto, un coste adicional, una de las ventajas más importantes que presenta es que en general se requieren preparaciones de muestra más sencillas, 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 cuanto a la repetibilidad, con los métodos post-columna se alcanzan valores que en técnicas pre-columna sólo son posibles si se dispone de un sistema de derivatización automatizado.

HURST (1990) cita el empleo de distintos reactivos derivatizantes, en función de que el sistema de detección empleado sea la lectura al UV/VIS o la determinación espectrofotométrica (Tabla 23). Algunos de estos reactivos coinciden con los empleados en los métodos ópticos clásicos o con los empleados como reveladores en la cromatografía en capa fina.

TONOGAY y col. (1987) utilizan un reactivo derivatizante distinto, el NBD-F o 7-fluoro-4-nitrobenzo-2 oxa-1,3-diazol. Se emplea como reactivo post-columna y con él, las aminas biógenas forman un complejo fluorescente que se determina a 470/530 nm.

Tabla... Reactivos derivatizantes empleados en la determinación de aminas biógenas (HURST, 1990; TONOGAY y col.;, 1987).

REACTIVO	DETECCIÓN
CI-DANS (Cloruro de dansilo o 5-N,N'-dimetilamina naftaleno 1-sulfonil cloruro)	Fluorescencia UV/Visible
CL-DABS (Cloruro de dabsilo o 4- N,N'-dimetilamino - 4 - benceno sulfónico)	UV/Visible
FLUORESCAMINA	Fluorescencia
NINHIDRINA	Fluorescencia
OPT (o - ftaldehído)	Fluorescencia
PITC (fenilisotiocianato)	UV/Visible
NBD-F (7-fluoro-4-nitrobenzo-2 oxa-1,3-diazol)	Fluorescencia

A continuación se comentarán aspectos relacionados con los reactivos derivatizantes de uso más común en la determinación de aminas biógenas y en la figura... se muestra la estructura química de estos reactivos.

### 1. CL-DANS, Cloruro de dansilo

Junto con el OPT es uno de los reactivos que más se ha utilizado en la determinación de aminas biógena y generalmente se emplea en los métodos con derivatización pre-columna.

El procedimiento de dansilación de las aminas suele ser largo y algunas metódicas emplean hasta dos días. A temperatura ambiente son necesarias unas 12 horas (MIETZ y KARMAS, 1977), aunque la reacción se puede acelerar empleando temperaturas mayores). Tras la obtención del complejo dansilado es necesaria su extracción, etapa crítica en la obtención de buenos rendimientos finales (GILL y THOMPSON, 1984). No obstante estos inconvenientes presenta la ventaja de que los derivados formados son estables durante un intervalo de tiempo bastante prolongado.

BUTEAU y col. (1984) señalan la interferencia de los compuestos fenólicos que también reaccionan con el CL-DANS. este problema resulta evidente en muestras de vinos. El CL-DANS también reacciona con el amoníaco del ambiente y con los disolventes, observándose a menudo la aparición de picos fantasmas atribuibles a este efecto. Además los aminoácidos básicos tienden a formar, aunque en pequeña proporción productos secundarios durante esta reacción de derivatización.

## 2. OPT, OPA, o-Ftaldehído.

Es un reactivo empleado tanto en técnicas de derivatización post- como pre-columna. Forma con aminas primarias un complejo fluorescente en medio básico, al reaccionar los dos grupos aldehído del OPT con el grupo  $\text{NH}_2$ . La presencia de agentes reductores como el 2-mercaptoetanol aumenta la intensidad de fluorescencia del complejo así como su estabilidad por lo que la mayoría de los autores recomiendan su incorporación al medio de reacción.

REUVER y col., (1986) señalaron la ventaja de utilizar el OPT, para el análisis de aminas biógenas en alimentos ya que presenta una mayor selectividad por las aminas primarias que el Cl-DANS. Sin embargo, presentaría el inconveniente de no reaccionar con la aminas secundarias y no permitir la determinación de aminas como la ordenina o la gramina?.

La reacción pre-columna es bastante sencilla y rápida, ya que en medio básico se verifica en menos de 5 minutos. Una vez finalizado, se acidifica el pH del medio puesto que el complejo fluorescente formado es más estable a pH bajo.

BUTEAU y col. (1984), MAYER y PAUSE, (1984), WALTERS, (1984) y POZO y SAITUA, (1988) señalan que, debido a la relativa inestabilidad del complejo amina-OPT, debe aplicarse una metódica de trabajo muy precisa. En este procedimiento debe procurarse que el intervalo de tiempo desde el inicio de la derivatización hasta la inyección sea corto, ya que la fluorescencia del complejo va descendiendo con el tiempo y por la misma razón debe de ser siempre el mismo ya que de otro modo se producirían errores que afectarían a la exactitud de la medida.

Es por esta poca estabilidad por lo que muchos autores (WALTERS, 1984; REUWERS y col, 1986; WATERS, 1988) recomiendan la derivatización post-columna, ya que el tiempo transcurrido en el "coil" de reacción es siempre el mismo si se mantiene un flujo de fases y reactivo derivatizante constantes.

### 3. Cloruro de benzoilo.

Es un reactivo de derivatización que se emplea en métodos pre-columna. La preparación del derivado benzoilado es larga y como el caso del cloruro de dansilo también se requiere un etapa de extracción del derivado con un disolvente orgánico (éter etílico), la posterior evaporación a sequedad en atmósfera de nitrógeno y la redisolución el metanol antes de la inyección cromatográfica (REDMON y col., 1979; YEN y HSIEH, 1991). Los derivados así obtenidos tras la separación cromatográfica se determinan espectrofotométricamente a 254nm.

### 4. Fluorescamina

Se trata también de un reactivo descrito también en métodos pre-columna. La fluorescamina reacciona casi instantáneamente y sin necesidad de calefacción con las aminas primarias, originando un compuesto fluorescente cuya determinación se efectúa a 390/480nm.

No debe extrañar la aparición de más de un pico en el caso de las diaminas y las poliaminas puesto que se forman mono- y di-fluorescamín derivados. Esta circunstancia debe de tenerse en cuenta en el momento de la cuantificación final (BUTEAU y col., 1984).

### 5. Ninhidrina

Es un reactivo más utilizado para la determinación de aminoácido que para la determinación de aminas biógenas. Reacciona con los grupos amino originando compuestos coloreados con tonalidades púrpura. La reacción depende estrictamente de pH y se requiere que esté situado entre 5.0 y 5.5. La detección espectrofotométrica se efectúa en la zona del espectro visible, a 546 nm.

**Ilustr. 1** Estructura química de los reactivos de derivatización mas comunes en la determinación de aminas biógenas

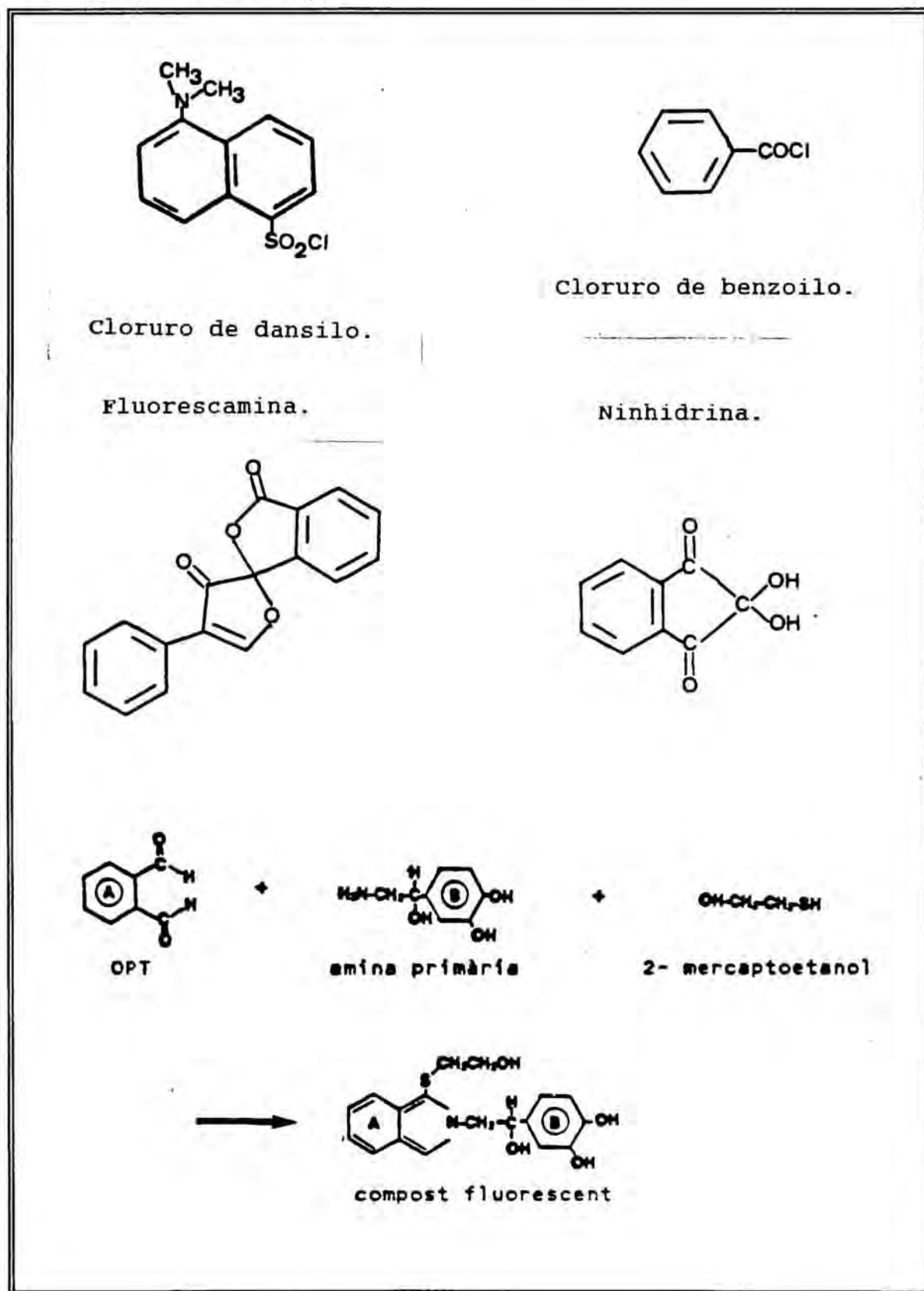


Tabla . Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos sin derivatización.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	ELUYENTES	DETECCION	AMINA/S BIOGENAS	PRODUCTO
KOEHLER Y EITENMILLER (1978)	Fase reversa con par iónico. 1.2mL/min Isocrático.	metanol:agua con ácido 1-heptano-sulfónico	Absorción (254 nm)	TIRN FENL TRIPN	Chocolate Embutidos Queso
GILL-THOMPSON (1984)	IMP("ion moderate partition") 0.5mL/min Isocrático	NaOH pH 11.0	Absorción (207 nm)	HISN CADN PUTN ESPM	Pescado
CHANG y col. (1985)	Fase reversa con par iónico. Isocrático.	acetónitrilo: agua con octano-sulfonato sódico	Absorción (220 nm)	HISN TIRN TRIPN	Queso
MOWER y col. (1989)	Intercambio iónico 1.5mL/min Isocrático	agua:solución tamponada de fosfato-Na pH 7.0	Absorción (278 nm)	TIRN	Alimentos fermentados tradicionales asiáticos

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

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	ELUYENTES	DERIVATIZACION	AMINA/S BIOGENAS	PRODUCTO
MIETZ y KARMAS (1977)	Fase reversa 1mL/min grad. ABS. (254nm)	A: acetoniitrilo: ác. acético B: acetoniitrilo: metanol:ácido acético	Cl-DANS en acetona	HISN CADN PUTN ESPM ESPD	Pescado
BATTAGLIA y FRÖHLICH (1978)	Fase reversa 1.5mL/min isoc. Fluorescencia	ciclohexano: acetato etilo	Cl-DANS en acetona	HISN	Vino Cerveza Extractos levadura
SUBDEN y col. (1978)	Fase reversa 2mL/min isoc. ABS. (220-200nm)	acetoniitrilo: tampón fosfato potásico pH 7.0	OPT en medio alcalino y mercaptoetanol	HISN	Vino
POLO (1982)	Fase reversa 2mL/min isoc. FLU (350/425nm)	acetoniitrilo: tampón fosfato potásico pH 6.4	OPT en medio alcalino y mercaptoetanol	HISN	Vino
FLORES (1983)	Fase reversa 1mL/min isoc. ABS (254nm)	metanol:agua	Clorhidrato de benzoilo en medio básico	CADN PUTN AGMN ESPM ESPD	Vegetales
HUI y TAYLOR (1983)	Fase reversa 1.5mL/min grad. 33°C ABS. (254nm)	A: metanol:aceto- nitrilo B:ác. fosfórico 0.33 M	Cl-DANS en acetona	HISN TIRN TRIPN FENL CADN PUTN	Queso Pescados

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

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	ELUYENTES	DERIVATIZACION	AMINA/S BIOGENAS	PRODUCTO
BUTEAU y col. (1984)	Fase reversa 0.5 mL/min grad. Fluorescencia (340/440nm)	A:metanol:ác. acético:acetoni- trilo B:metanol	OPT en medio básico con mercaptoetanol	HISN TIRN TRIPN FENL CADN PUTN AGMN ESPM ESPD	Vino
MAYER y PAUSE (1984)	Fase reversa 1.5mL/min grad. T 35 °C Fluorescencia (340/450nm)	A:acetato sódico:THF b:metanol	OPT en medio básico con mercaptoetanol	HISN TIRN SERN TRIPN FENL CADN PUTN	Vino
TAMASE y col. (1984)	Fase reversa 1mL/min isoc. T 40 °C Fluorescencia (390/480nm)	acetonitrilo: acetato sódico pH 6.6 con tetra-n- butilamonio	Fluorescamina	HISN	Pescado
NAGAYAMA y col. (1985)	Fase reversa 1.3 mL/min isoc. Fluorescencia (352/358nm)	acetonitrilo: agua 60:40	Cl-dansilo	PUT CAD HIS TIR SPE	Pescado
GOUYGOU y col. (1987)	Fase reversa 0.7mL/min isoc. Fluorescencia (340/430nm)	acetonitrilo: fosfato mono- sódico	OPT en metanol	HISN	Pescado



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

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	ELUYENTES	DERIVATIZACION	AMINA/S BIOGENAS	PRODUCTO
OUGH y col. (1987)	Fase reversa isocrático T 30°C Fluorescencia (370/418nm)	metanol:tampón acético pH6.5:THF	OPT en metanol	HISN	Vino
YAMANAKA y col. (1987)	Fase reversa con par iónico 1.2 mL/min grad. T 50 °C FLU (348/450nm)	A:NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 4.28 octansulfonatoNa B:metanol:solución A (1:1)	OPT en medio básico con mercaptoetanol	TIRN TRIPN CADN PUTN AGMN	Pescado
CARLUCCI y KARMAS (1988)	Fase reversa 1.5mL/min grad. ABS. (254nm)	A:fosfato con tetrabutilamonio B:metanol: acetónitrilo	Cl-dansilo en acetónitrilo	HISN CADN PUTN	Alimentos
POZO y SAITUA (1988)	Fase reversa 0.5 mL min isoc. FLU (350/447nm)	Acetonitrilo: fosfato potásico	OPT en metanol	HISN	Pescado
ROSIER y VAN PETEGHEM (1988)	Fase reversa 1mL/min grad. ABS. (254nm)	agua:metanol	Cl-dansilo en acetónitrilo	CAD PUT ESPERMINA ESPERMIDINA	Pescado
VECCHIO y col. (1989)	Fase reversa 0.5ml/min isoc. FLU. (350/447nm)	acetónitrilo: metanol:agua:ác.acético	Cl-dansilo en acetónitrilo	HISN TIRN FENL CADN PUTN	Vino

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

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	ELUYENTES	DERIVATIZACIÓN	AMINA/S BIOGENAS	PRODUCTO
OUTINEN y col. (1990)	Fase reversa 1 mL/min isoc. T 37° C	tetrahidrofurano acetoneitrilo; metanol:agua y 0.1M acetato amónico	Cl-dansilo en acetoneitrilo	HIS TYR SPERMID SPERMIN Y OTRAS AMINAS	Pescados
YEN y HSIEH (1991)	Fase reversa 1.5 mL/min grad. ABS (254 nm)	metanol:agua	Formación benzoilderivados	PUT CAD TRIP $\beta$ -phen ESPERM ESPREMID HIS TIR AGM	Pescados

Tabla \_\_\_\_ . Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos por derivatización: Post-columna (I).

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	ELUYENTES	DERIVATIZACION	AMINA/S BIOGENAS	PRODUCTO
HURST y TOOMEY (1981)	Fase reversa 1mL/min Flujo post:1mL/min isoc. T 40 °C FLU. (340/418nm)	ácido acético a pH 2.8	OPT en medio básico	TIRN SERN TRIPN FENL	chocolate
YOSHIDA y NAKAMURA (1982)	Intercambio iónico 1mL/min Fl. post:0.5mL/min isocrático FLU.(360/455nm)	tampón ácido cítrico pH 6.4	OPT en medio básico	HISN	pescado
WALTERS (1984)	Intercambio iónico 1.5mL/min Fl.post:1.2mL/min isocrático FLU.(350/445nm)	fosfato potásico: metanol	OPT en medio básico y mercaptopoetanol	HISN	pescado
JOOSTEN y OLIEMAN (1986)	Fase reversa con par iónico Flujo: 1mL/min T reacción 145°C isocrático ABS (546 nm)	tampón acetatoNa pH 5.0:dimetilsul- fóxido:agua:do- decilsulfonatoNa	Ninhidrina disuelta en la fase móvil	HISN TIRN TRIPN FENL CADN PUTN	chocolate choucrout queso pescado vino

Tabla \_\_\_\_ . Determinación de aminas biógenas en alimentos por CLAE. Métodos por derivatización: Post-columna (II).

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	ELUYENTES	DERIVATIZACION	AMINA/S BIOGENAS	PRODUCTO
REVEURS y col. (1986)	Fase reversa con par iónico 1.5mL/min isoc. Fl.post 1mL/min T reacción 40°C FLU. (350/445nm)	metanol:fosfato sódico con ácido heptanosulfónico	OPT en medio básico y mercaptoetanol	TIRN	derivados lácteos
WATERS (1988)	Fase reversa con par iónico 1.5 mL/min grad. FLU. (350/445nm)	A:acetato sódico pH 4.5 B:acetato sódico pH 4.5:metanol A y B con octa- nosulfonato-Na	OPT en medio básico y mercaptoetanol	HISN TIRN CADN PUTN AGMN ESPD	pescado
SUZUKI y col. (1990)	Fase reversa con par iónico 1.1mL/min Fl.post 0.5mL/min T 50°C	A: 0.1 M per- clorato-Na pH4.0 :0.01M hexano- sulfonato-Na b:0.1 M perclorato-Na pH3:metanol(1:3)	OPA en medio básico y mercaptoetanol	PUT CAD HIS AGM SPMD SPERM	alimento tejidos

57.PN



### III. OBJETIVOS E HIPOTESIS A ESTUDIAR

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084802

*Handwritten mark or signature.*

## OBJETIVOS E HIPOTESIS A ESTUDIAR

El consumo de pescados grasos de las familias *Escombridae* y *Cupleidae* ha sido frecuentemente asociado a la aparición de la intoxicación histamínica. La histamina junto con otras aminas biogénas se origina fundamentalmente por acción bacteriana y sus niveles pueden proporcionar información acerca del grado de deterioro de los productos sobre los que se encuentran. Su interés en la evaluación del pescado fresco es, como en el caso de otros índices químicos propuestos para tal fin, limitado, puesto que en la mayoría de los casos basta con la valoración organoléptica. La determinación de aminas biógenas resultaría especialmente indicada en la evaluación de derivadas de pescado, donde el aspecto, olor y sabor desagradables del pescado deteriorado podrían resultar enmascarados. Por su carácter termoestable podrían emplearse incluso en aquellos derivados cuya elaboración conlleva tratamientos técnicos.

El origen de las aminas biógenas en derivados de pescado puede ser múltiple:

- a) materia prima empleada en su elaboración,
- b) formación durante el proceso de obtención del derivado,
- c) y, en aquellos derivados que como las semiconservas de anchoa no se someten a ningún tratamiento térmico que garantice la ausencia de microorganismos, la posibilidad de formación de estos compuestos se extiende también al período de almacenamiento del producto acabado.

Para el estudio de la formación de aminas biógenas y su posible uso como indicadores de la calidad, se han elegido dos derivados de pescado graso de amplio consumo en nuestro país: conservas de atún y semiconservas de anchoa. Se ha planteado el estudio de la formación de aminas biógenas durante el proceso de deterioro de la materia prima, atún y boquerón respectivamente, y durante el proceso de elaboración de cada uno de estos productos. En las semiconservas de anchoa el período de estudio se ha extendido al almacenamiento del producto acabado.

Los objetivos de este trabajo se detallan a continuación:

1. Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación simultánea tanto de las **aminas biógenas** relacionadas con el deterioro del pescado, como de aquellas que se consideran fisiológicas y que siempre afectan a este tipo de productos.

Elección y puesta a punto de técnicas adecuadas para la determinación de **ATP y sus compuestos de degradación**.

Desarrollo de un método por cromatografía gaseosa para la determinación de los compuestos volátiles **dimetilamina y trimetilamina**.

Una vez establecidas las condiciones operatorias óptimas, se pretende verificar estadísticamente la **validez de los métodos** mediante el cálculo de parámetros como linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación.

2. Estudio de la evolución del perfil de aminas biógenas a lo largo del proceso de descomposición bacteriana del atún y el boquerón, estableciendo comparaciones con otros criterios de evaluación el estado higiénico-sanitario del pescado, con el fin de conocer la relación entre los niveles de aminas biógenas y el deterioro del pescado, y determinar cuál o cuales de estos compuestos se forman en mayores cantidades y qué significación se puede adjudicar a los niveles de los mismos.
3. Estudio de la formación de aminas biógenas en músculo de atún obtenido en condiciones de esterilidad e inculado con cepas bacterianas seleccionadas pertenecientes a las especies: *Plesiomonas shigelloides*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus morganii*, microorganismos aislados durante un proceso de deterioro del atún estudiado previamente.
4. Estudio de los niveles de aminas biógenas y de la evolución de los derivados del ATP a lo largo del proceso de elaboración de las conservas de atún con el fin de verificar si se forman o no estos compuestos, y de estudiar cuales de ellos resultan verdaderamente termoestables.
5. Estudio de los niveles de aminas biógenas y de la evolución de los compuestos derivados del ATP a lo largo del proceso de elaboración de las semiconservas, prestando especial interés en las dos vías alternativas empleadas para la obtención de este derivado.
6. Estudio de la evolución de los niveles de aminas biógenas durante el período de validez comercial de las semiconservas de anchoa envasadas en aceite o en sal, ensayando la temperatura de almacenamiento propuesta por el fabricante y otra superior.
7. Estudio de los contenidos de aminas biógenas y ATP y derivados en muestras de atún y boquerón fresco, conservas de atún y semiconservas de atún en aceite comercializadas en nuestro país.

#### **IV. MATERIAL Y METODOS**



## 6. DETERMINACION DE AMINAS BIOGENAS EN PESCADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (CLAE).

### 6.1. FUNDAMENTO Y DESARROLLO DEL MÉTODO

El método de cromatografía líquida propuesto para la determinación de aminas biógenas en pescado se basa en el descrito por SEILER y KNÖDGEN (1985) para la determinación de este tipo de compuestos en tejidos biológicos. Se escogió como punto de partida la técnica propuesta por estos autores puesto que combinaba la sensibilidad y especificidad que ofrece la detección fluorimétrica y la buena reproducibilidad del uso de sistemas de derivatización post-columna que permite evitar los problemas asociados a la inestabilidad del complejo amina-OPT.

Este método incluye una primera fase de obtención de un extracto ácido que contiene las aminas biógenas a partir de la muestra de pescado. Los pares iónicos formados por las aminas biógenas y un reactivo de carácter ácido, el octanosulfonato sódico, se separan en una columna de fase reversa mediante la aplicación de un gradiente cromatográfico. Posteriormente se efectúa una derivatización post-columna con OPT y la cuantificación se efectúa por lectura de la intensidad de fluorescencia.

#### 6.1.1 ENSAYOS PREVIOS AL ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones cromatográficas descritas por SEILER y KNÖGEN se modificaron para adecuarlas a nuestro utillaje y tipo de muestra que en algunos casos (semiconservas de anchoas) resultó una matriz sumamente compleja.

Inicialmente se intentó reproducir el método propuesto por SEILER y KNÖGEN (1985) en el sistema cromatográfico de que se disponía. De entre los propuestos por estos autores, se aplicó un gradiente binario con las fases y la secuencia de cambios continuación descritos a continuación:

- \* Fase A: metanol y solución de acetato sódico 0,1M (pH=4.5) con 2.16 g/l de octanosulfonato sódico (1:9).
- \* Fase B: metanol, acetonitrilo y solución de acetato sódico 0.2M (pH=4.5) con 2.16 g/L de octanosulfonato sódico (1: 1.2: 6.9).

TIEMPO DE ELUCION (min)	% FASE A	%FASE B
0	100	0
12	100	0
16	60	40
36	60	40
48	0	100

En las condiciones descritas por estos autores no fue posible la total resolución de las 10 aminas biógenas objeto de estudio: histamina, tiramina , triptamina, serotonina,  $\beta$ -feniletilamina, putrescina, cadaverina, agmatina, espermina y espermidina. Por ello se procedió a introducir una serie de cambios los más importantes de los cuales se reseñan a continuación.

#### 6.1.1.1 INFLUENCIA DE LA POLARIDAD DE LA FASE MOVIL

##### a) Composición de la fase móvil.

La primera variación ensayada fue la modificación de la composición de las fases móviles propuestas por los citados autores. Se substituyó el metanol de la fase B por acetonitrilo, solvente de polaridad semejante pero menos viscoso y que en general proporciona a la fase móvil un poder resolutivo mayor (origina picos más esbeltos). Además se aumento el porcentaje inicial de fase B . Esperando aumentar la apolaridad de las condiciones iniciales y así conseguir una elución rápida de la mayor parte de sustancias interferentes de naturaleza polar (aminoácidos y pequeños péptidos que también reaccionan con el OPT).

**b) Aplicación de curvas de gradiente:**

Nuestro sistema cromatográfico permitía la utilización de curvas en la modificación de la composición de la fase móvil a lo largo del tiempo. Estas curvas vienen representadas por la ecuación exponencial siguiente:

$$P(t) = P(i) + [P(f) - P(i)] \times \frac{(t)^n}{T}$$

\*P(t), es el porcentaje de A/(A+B) a lo largo del tiempo.

\*P(i), es el porcentaje inicial de A/(A+B)

\*t, es el tiempo en minutos

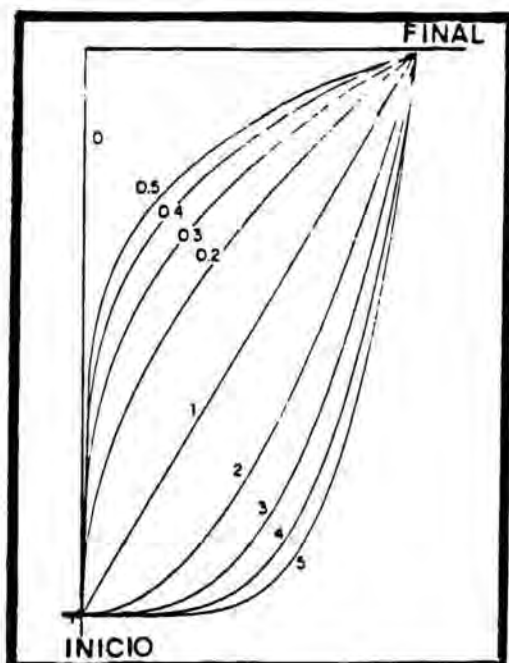
\*T, es el tiempo en minutos de duración del intervalo de aplicación de la curva

\*n, es el orden exponencial de la curva de gradiente aplicada

Con la aplicación de estas curvas es posible conseguir una modificación de la composición de fases con pendiente distinta utilizando períodos de tiempo de igual duración y de este modo ensayar condiciones de elución diferentes con mayor facilidad.

Para la resolución de nuestro problema se aplico una curva de orden 2 cuya evolución a lo largo del tiempo se muestra el gráfico... durante un período de tiempo de 50 minutos. De este modo en el período de tiempo incluido entre los 20 y los 35 minutos de elución la pendiente con que se incorporaba la fase B era mas suave que el final del cromatograma, donde desde el primer momento se presentaron menores problemas de resolución.

Figura 15 Representación grafica de la curva exponencial de orden 2 empleada en el gradiente propuesto.



### 6.1.1.2 INFLUENCIA DEL PH

El pH de las fases condiciona la polaridad de los analitos y puede por lo tanto modificar su retención por parte de la columna y la resolución de compuestos muy semejantes. Con el pH de 4.5 propuesto por SEILER y KODGEN no se conseguía una total separación de los analitos problema ya que en los pares iónicos formados por putrescina, tiramina, cadaverina y serotonina con el octanosulfonato sódico, que resultaban los mas polares y eran los primeros en eluir no se conseguía una resolución satisfactoria.

Se modificó el pH de la fase A porque "a priori" era donde parecía que este factor podría tener más importancia, puesto que tras las modificaciones en cuanto a composición de fases que se habían introducido quedaba constituida solo por tampón acetato. Además su proporción era mayor que la de fase B en el tiempo a que eluían las aminas no resueltas.

En diversos ensayos se comprobó que al aumentar el pH de la fase A se separaban mejor las 4 aminas no resueltas a pH=4.5 ( putrescina, tiramina, cadaverina y serotonina), pero por el contrario en los pares iónicos de carácter más apolar ( $\beta$ -feniletilamina, espermina y espermidina) se perdía resolución (Fig...). Era por lo tanto necesario ajustar muy bien el pH del solvente A para conseguir una resolución satisfactoria en todos los analitos objeto de estudio. Posteriormente se observó que le envejecimiento de la columna conducía a la necesidad de trabajar a pH superiores para obtener una resolución semejante a la inicial.

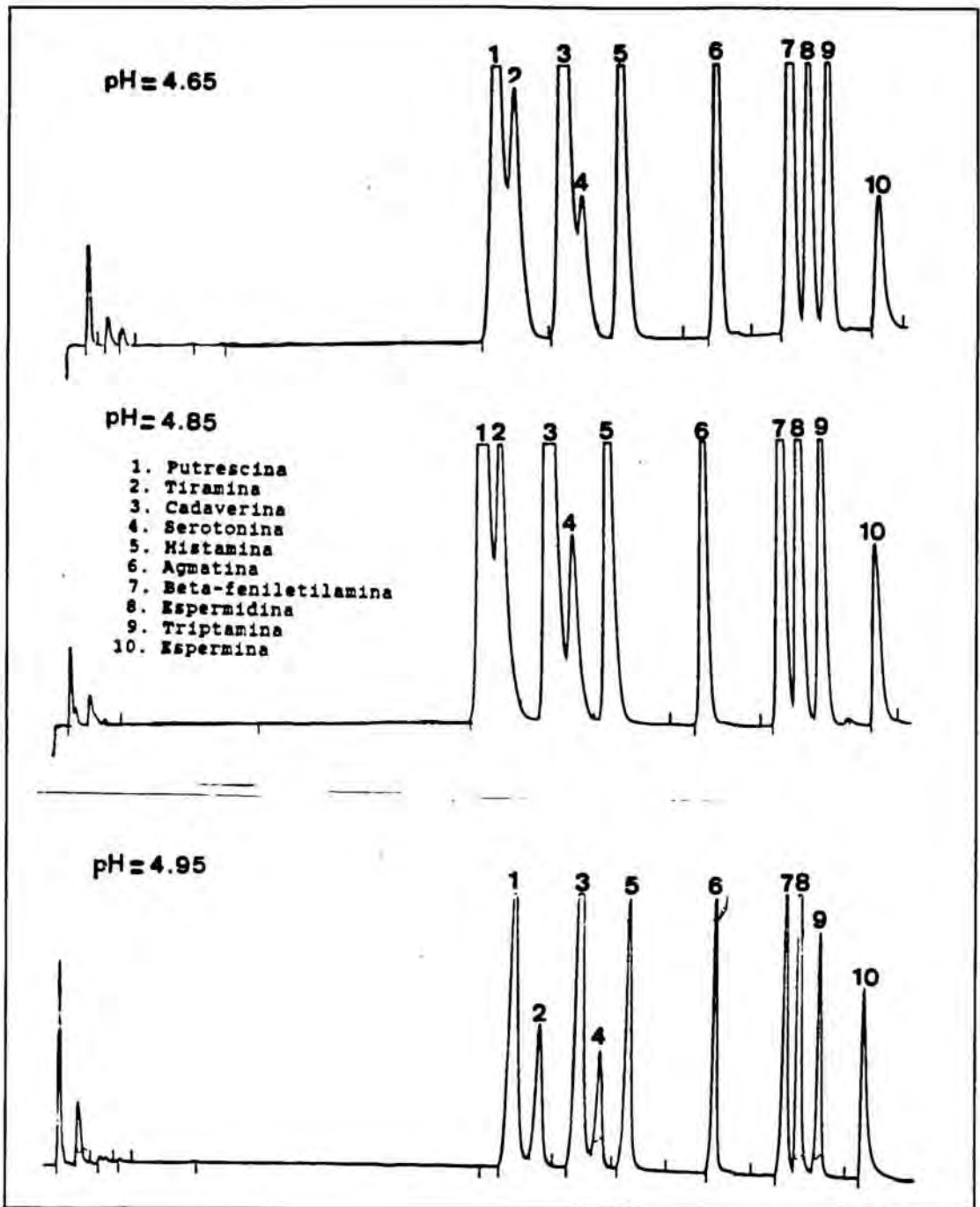


Fig 14

### 6.1.1.3. MODIFICACIONES EN EL REACTIVO DERIVATIZANTE

El reactivo de derivatización post-columna propuesto por SEILER y KNODGEN esta constituido por OPT en una matriz de tampón borato que asegura el pH básico necesario para su reacción con las amina biógenas,  $\beta$ -mercaptoetanol, que aumenta la estabilidad de los complejos formados y éter de polietilengligol que facilita la fluidez de esta mezcla dentro del circuito. Se comprobó, sin embargo, que en nuestro sistema cromatográfico la concentración de OPT y la del propio tampón borato provocaban la formación de precipitados que obturaban con facilidad las células del detector de fluorescencia.

WATERS MILLIPORE, propone también basándose en el trabajo de SEILER y KNOGEN unas concentraciones de tampón borato y de OPT inferiores. Tras varias pruebas se comprobó que utilizando unas proporciones de ambos componentes inferiores a las descritas en estos dos trabajos era posible obtener respuestas repetitivas y de intensidad satisfactoria y evitar problemas de obturación de la célula del detector de fluorescencia que podían culminar en su rotura. En la tabla se especifican las proporciones de los distintos componentes del reactivo derivatizante propuestas por SEILER y KNODGEN, WATER y en nuestro laboratorio. En definitiva respecto al método original se propone una reducción del orden de 60% en la proporción de ácido bórico y de hidróxido potásico y del 50% el la de OPT.

CANTIDAD PARA 500ml	SEILER y KNODGEN (1985)	WATERS (1988)	PROPUESTAS EN EL LABORATORIO
Acido Bórico (g)	50	39.0	31
Hidróxido potásico (g)	44	26.2	26.2
OPT (g)/ ml metanol	0.4/5	0.35/5	0.2/5
$\beta$ -Mercaptoetanol	3	2	3
BRIG 35 <sup>R</sup> 30%	3	2	3

Igualmente se comprobó que el pH del reactivo de derivatización era un importante factor a controlar. Si no se conseguían niveles lo suficientemente altos (> 10.5) la reacción amina-OPT no se establecía de un modo completo, por ello, es necesario controlar el pH cada vez que se utiliza este reactivo de derivatización.

## 6.2. DESCRIPCION DEL METODO

### 6.2.1. MATERIAL Y REACTIVOS

#### Aparatos:

- Sistema de gradientes cuaternarios para CLAE, modelo WATERS 600 MSDS.
- Inyector automático WATERS ULTRA WISP 715.
- Sistema de derivatización Post-columna WATERS RDM (Reagent Delivery Module).
- Espectrofluorímetro KONTRON SFM 25.
- Estación de Control y Tratamiento de Datos WATERS MAXIMA 820, compuesto por:
  - Ordenador NEC Powermate 386XS
  - Impresora NEC .....
  - Software MAXIMA 820 WD.
  
- Balanza de precisión ELECTRONIC BALANCE ER 180, A-AND
- Granatario SALTER ELECTROSCALE EB-300
- Centrífuga CENTRONIC S-577
- pH-metro CRISON DIGIT 501
- Baño de Ultra-Sonidos P-SELECTA
- Placas de agitación magnética A06 SBS

#### Material Fungible

- Columna WATERS NOVA-PACK C<sub>18</sub> (3.9 mm x 15 cm). Diámetro de partícula 4 $\mu$ m.
- Pre-columna WATERS GUARD- COLUM NOVA-PAK C<sub>18</sub> W15220
- Filtros para disolventes MILLIPORE, 0.45 $\mu$  de tamaño de poro y membrana de HVLP.
- Filtros para muestras MILLIPORE MILLEX-HV<sub>4</sub>, 0.45 $\mu$  de tamaño de poro y membrana de HVLP

## Reactivos

- Agua calidad MILLI-Q
- Disolventes orgánicos para CLAE: Metanol y Acetonitrilo (SHARLAU)
- Acetato sódico anhidro, MERCK.
- Acido acético glacial, MERCK.
- Reactivo de par iónico: Octanosulfonato Sódico, ROMIL.
- Acido bórico PA PANREAC.
- Hidróxido potásico PA PANREAC.
- β-Mercaptoetanol MERCK.
- Eter de polietilenglicol, BRIG 35<sup>R</sup>, MERCK.
- Orto-ftalaldehído, OPT, MERCK.
- Acido clorhídrico 37.5% PA PANREAC.
- Acido perclórico 70% PA PANREAC.

## Patrones de aminas biógenas

- Dihidroclorhidrato de histamina MERCK.
- Tiramina, base libre MERCK.
- Complejo de sulfato de creatinina-serotonina SIGMA-ALDRICH
- Hidroclorhidrato de triptamina SIGMA-ALDRICH.
- Hidroclorhidrato de β-feniletilamina SIGMA-ALDRICH.
- Dihidroclorhidrato de cadaverina SIGMA-ALDRICH.
- Dihidroclorhidrato de putrescina SIGMA-ALDRICH.
- Sulfato de agmatina SIGMA-ALDRICH.
- Trihidroclorhidrato de espermidina SIGMA-ALDRICH.
- Tetrahidroclorhidrato de espermina SIGMA-ALDRICH.

Las soluciones patrón de aminas biógenas se preparan a partir de las "soluciones madre" de 1000 µg/l (ppm) en ácido clorhídrico 0.1N de cada amina. A partir de éstas, se preparan por dilución las soluciones de trabajo, que se guardan en frascos, protegidas de la luz y refrigeradas.

### 6.2.2. PRERARACION DE LA MUESTRA

El pescado fresco se eviscera, se separa la piel y las espinas y posteriormente se trituran con el fin de obtener muestras representativas y homogéneas.

En muestras de semiconservas de anchoa y conservas de atún, en primer lugar se procede a la retirada del líquido de cobertura y posteriormente se trituran y homogeneizan como las de pescado fresco.



Se toma un peso de 10 g de muestra, ya triturada, en el caso de pescado fresco y conservas de atún. Se homogeneiza con ácido perclórico 0.6N durante 10 minutos en una placa de agitación magnética. Se separa el residuo sólido por centrifugación (10 minutos a 300rpm) y posterior filtración sobre papel.

El residuo obtenido se interpone de nuevo con otra alícuota de ácido perclórico 0.6N y se homogeneiza de nuevo durante 15 minutos con el fin de agotar la muestra. Se separa el residuo sólido por centrifugación filtración y se reúnen los dos extractos perclóricos obtenidos enrasándose a un volumen final de 25.0 o 50.0 ml, en función del contenido en aminos biógenos de las muestras.

Por último, se filtran aproximadamente 2 ml del extracto perclórico a través de un filtro de  $0.45\mu$  y se guarda refrigerado o congelado hasta el momento de la inyección.

En muestras de semiconservas de anchoa, donde generalmente el contenido en aminos biógenos es mayor así como la presencia de sustancias interferentes, se aconseja partir de menor cantidad de muestra (5g) y repetir tres veces el proceso de homogeneización y extracción con perclórico.

### 6.2.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Tras los estudios previos se establecieron unas condiciones cromatográficas en las que se conseguía la total resolución de las 10 aminos biógenos objeto de estudio en muestras de pescado fresco y conservas de atún en un período de tiempo inferior a 1 hora.

#### **\* Fase estacionaria**

Columna cromatográfica de fase reversa WATWER NOVA-PACK<sup>R</sup> C<sub>18</sub> (3.9 mmX 150mm) y diámetro de partícula de  $4\mu$ .

### \* Fase móvil<sup>1</sup>

- Fase A: Solución 0.1M de acetato sódico 0.1M y 10 mM de octanosulfonato sódico ajustada a pH=5.20 con ácido acético.
- Fase B: Solución 0.2M de acetato sódico 0.2M y 10 mM de octanosulfonato sódico, ajustada a pH=4.5 con ácido acético acetonitrilo. Se toman 340 ml de acetonitrilo y se enrasa a un litro con la solución tampón.

### \* Programa de elución

Tabla... Programa de elución para muestras de pescado fresco congelado y conservas.

	TIEMPO DE ELUCIÓN (min)	% FASE A	% FASE B
PERIODO DE ELUCIÓN	0	80	20
	50	20	80
	52	20	80
PERIODO DE RETORNO Y EQUILIBRIO	54	80	20
	64	80	20

En ambos casos el incremento en la proporción de la fase B se programó siguiendo la función exponencial de segundo orden comentada en el apartado 6.1.1.1

### \*Flujo:

- FASE MOVIL: 1 ml/min
- REACTIVO POST-COLUMNA: el necesario para obtener una línea de base estable = 0.4 ml/min

<sup>1</sup> Tanto la los eluyentes que constituyen la fase móvil como el reactivo de derivatización deben filtrarse (0.45µm) y desgasificarse antes de su uso

\***Temperatura:** Ambiente tanto en la columna como en el "coil" en que se verifica la reacción post-columna amina-OPT.

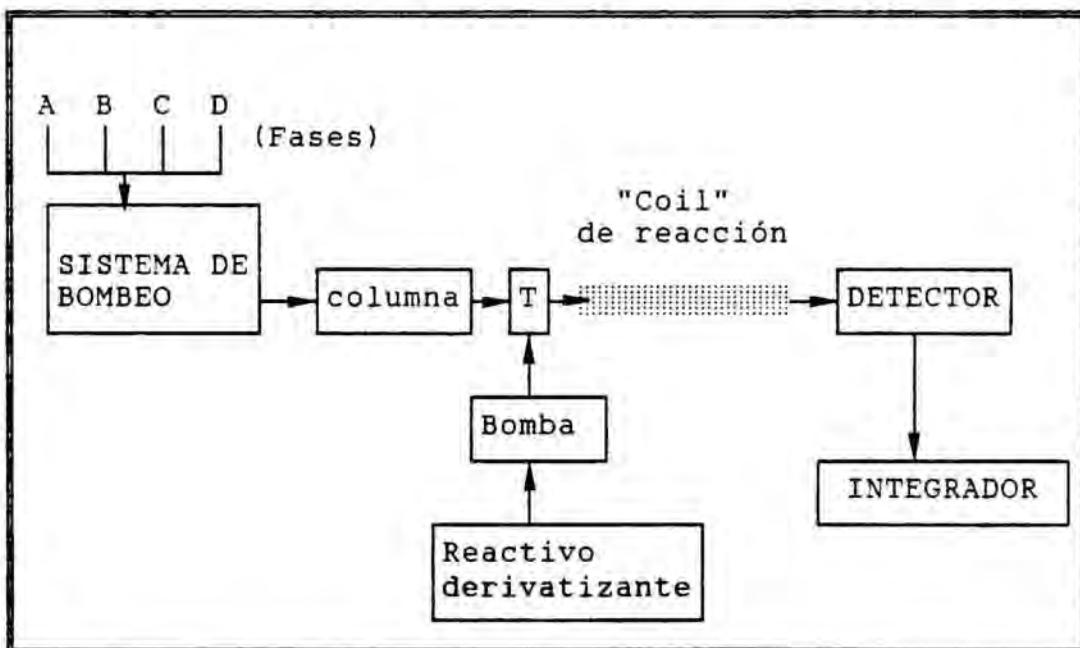
\* **Volumen de inyección:** 20  $\mu$ l

\* **Detección:** Espectrofluorimétrica, a 340 nm de excitación y 445 de emisión.

En la figura ... Se muestra de modo esquemático la estructura del sistema cromatográfico de trabajo. La derivatización post-columna requiere un segundo sistema de bombeo capaz de impulsar el reactivo derivatizante e introducirlo en el sistema a la salida de la columna para que reaccione con los analitos. La mezcla se realiza en una cámara en forma de T. Posteriormente la reacción se verifica en el interior de un tubo capilar de 3m de longitud que se denomina "coil" de reacción.

En nuestro caso el sistema impulsor del reactivo pos-columna no es una bomba convencional, sino que se trata del WATER RDM, sistema en que se impulsa el reactivo con la ayuda de un flujo constante de gas inerte, Helio. La ventaja que presenta este sistema frente a un sistema impulsor mecánico (bomba convencional) es la ausencia de pulsaciones que quedarían claramente reflejadas en oscilaciones de la línea de base, al estar situado inmediatamente antes de la entrada al detector sin pasar por la columna que amortigua este efecto.

Figura 47 Representación gráfica del sistema cromatográfico de trabajo.



#### 6.2.4. IDENTIFICACION DE PICOS CROMATOGRAFICOS

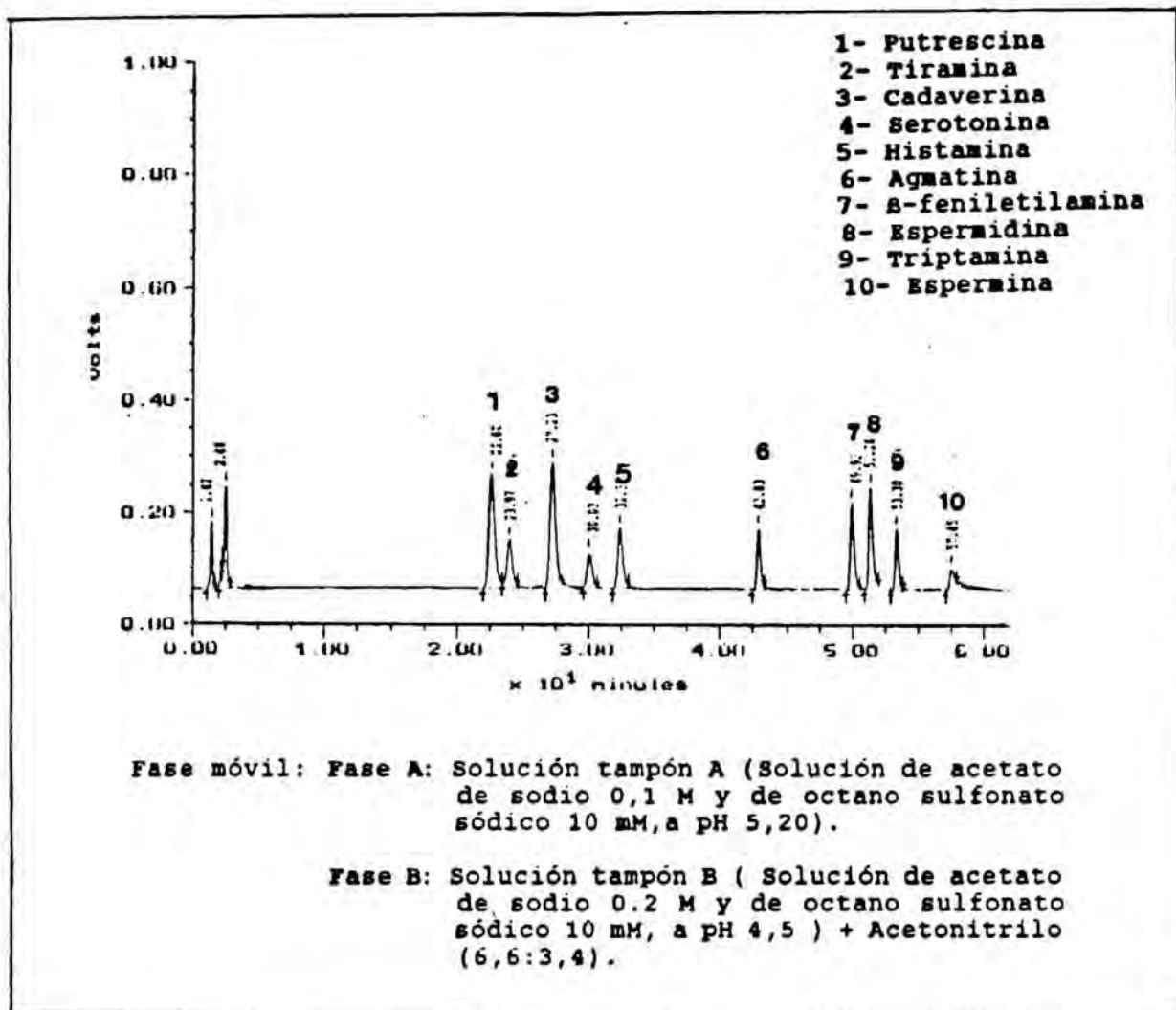
La identificación de los picos cromatograficos en las muestras se realizó por comparación de sus tiempos de retención con los de las soluciones patrón de aminas biógenas. En las tablas ... y ... se indican los tiempos de retención observados para cada amina biógena, tras la inyección repetida de 20 disoluciones patrón pertenecientes a diferentes concentraciones.

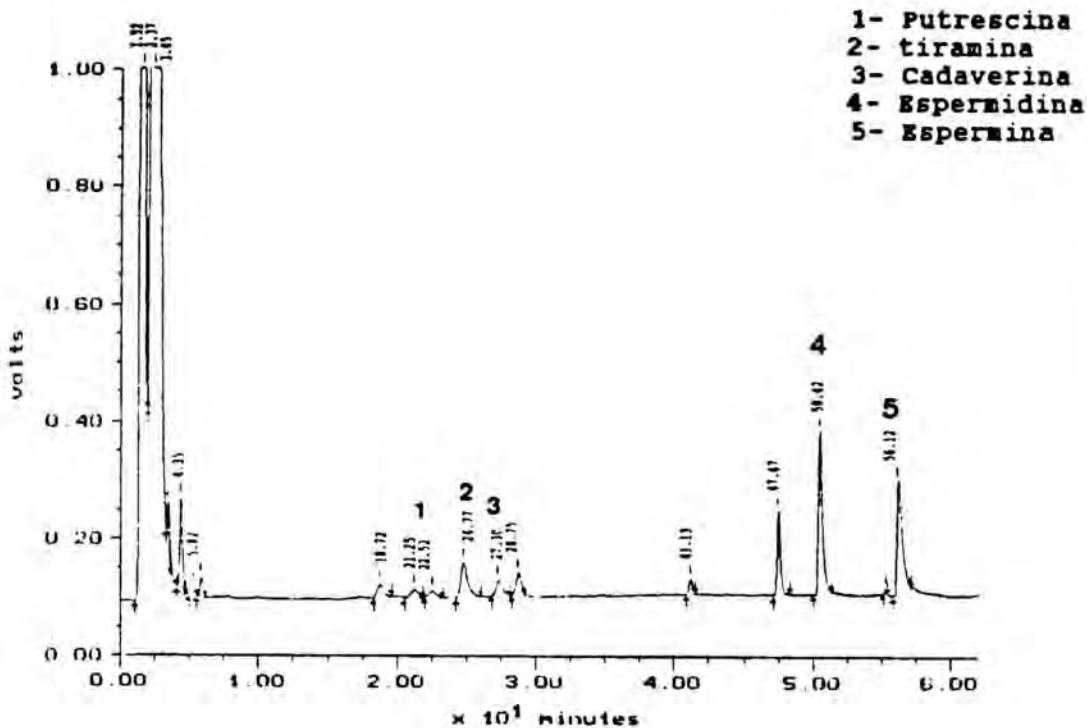
tabla... Tiempos de retención obtenidos tras la inyección de 20 soluciones patrón inyectadas en días sucesivos.

	TIEMPO DE RETENCIÓN MEDIO (min)	DESVIACION ESTANDARD	COEFICIENTE DE VARIACION (%)
TIR	25.30	0.45	1.77
SER	30.45	0.56	1.83
HIS	32.60	0.47	1.44
β-FEN	50.45	0.80	1.58
TRIP	53.55	0.95	1.77
PUT	23.85	0.25	1.05
CAD	28.40	0.55	1.93
AGM	43.65	0.85	1.94
ESPD	52.50	0.70	1.33
ESPM	57.40	0.70	1.21

La variabilidad se sitúa en todos los casos entre el 1 y el 2%. Se comprobó que utilizando 1,2-diaminoheptano como patrón interno, tal como describen SEILER y KNODGEN (1985), y considerando tiempos de retención relativos la variabilidad obtenida era del mismo orden por lo que se descartó su uso.

En las figuras 18 se muestra un cromatograma de una solución patrón de n  $\mu\text{g/ml}$  de mezcla de las 10 aminas biógenas objeto de estudio. La figura. corresponde a un cromatograma de atún fresco y la fig.19 a una muestra de conserva de atún en aceite.





Fase móvil: Fase A: Solución tampón A (Solución de acetato de sodio 0,1 M y de octano sulfonato sódico 10 mM, a pH 5,20).

Fase B: Solución tampón B ( Solución de acetato de sodio 0.2 M y de octano sulfonato sódico 10 mM, a pH 4,5 ) + Acetonitrilo (6,6:3,4).

Se puede observar que prácticamente durante los 20 primeros minutos no eluye ninguna amina biógena. Durante este periodo de tiempo eluyen compuestos de carácter más polar como aminoácidos y pequeños péptidos que se encuentran también inevitablemente en el extracto ácido obtenido a partir del pescado. Entre los 20 y los 35 minutos eluyen por este orden putrescina, tiramina, cadaverina, serotonina e histamina. La agmatina con un tiempo de retención cercano a los 40 minutos eluye separada del resto de aminas biógenas.  $\beta$ -feniletilamina, espermidina, triptamina y espermina eluyen al final del cromatograma puesto que los pares iónicos formados con el octanosulfonato sódico quedan más retenidos por la columna en las condiciones de trabajo.

Los tiempos de retención de los analitos sufren un ligero atraso a medida que envejece la columna cromatográfica. Este efecto, sin embargo no origina ninguna confusión en la identificación puesto que parece afectar en igual medida a todos los analitos. Tras el lavado intenso de la columna con disolventes de polaridad creciente y en flujo inverso pueden recuperarse los tiempos de retención originales.

#### 6.2.5. CUANTIFICACION

El cálculo del contenido de aminas biógenas de la muestra se realiza por interpolación a partir de una recta de calibrado preparada con patrones de distinta concentración de cada uno de los analitos.

En el trabajo rutinario se trabajó con rectas de concentraciones comprendidas entre 0.25 y 10  $\mu$ /ml en el caso de tiramina, serotonina, histamina, agmatina,  $\beta$ -feniletilamina, triptamina, espermina y espermidina. Las rectas para la putrescina y la cadaverina, que presentaron una menor intensidad de respuesta, se construyeron en el intervalo comprendido entre 0.25 y 8  $\mu$ g/ml, puesto que a concentraciones superiores se observaba un claro efecto de saturación del detector.

Las muestras con concentraciones altas, fueron extraídas de nuevo partiendo de menor cantidad de muestra y empleando volúmenes de perclórico 0.6N mayores a los 25ml de la rutina, de modo que la concentración final quedara dentro del intervalo de la recta de trabajo.

### 6.3. ESTUDIO DE LA VALIDEZ DEL METODO

#### 6.3.1 LINEALIDAD

El término linealidad expresa la proporción entre la cantidad de analito y respuesta y también el intervalo de concentración del analito para el cual el metodo resulta satisfactorio. Por tanto la linealidad podría definirse como la capacidad que tiene un método para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito presente en la muestras, dentro de un determinado intervalo.

La linealidad del método se ha comprobado mediante el cálculo de rectas de calibrado a partir de soluciones patrón de cada uno de los analitos objeto de estudio. Para ello se tomaron disoluciones patrón , en ácido clorhídrico 0.1N correspondientes a 0.25, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8  $\mu\text{g/ml}$ .

El análisis de cada una de estas disoluciones patrón se realizó por quintuplicado, según el metodo analítico descrito en el apartado 6.2. A se calculan las rectas de calibrado por el método de los mínimos cuadrados, entre las concentraciones de patrón inyectadas y el valor de la respuesta obtenida (área expresada en voltios).

Las rectas de calibración obtenidas así los coeficientes de regresión y su significación estadística se muestran en la tabla... junto con el coeficiente de determinación  $R^2$ .

tabla... Coeficientes de regresión, grado de significación y coeficientes de determinación de las rectas de calibrado obtenidas con patrones de aminas biógenas.

	RECTA	r	GL(n-1)	P	$R^2(\%)$
HIS	$y=0.9298X+0.0400$	0.9959	54	<0.001	99.20
TIR	$y=2.2850X-0.2633$	0.9971	54	<0.001	99.43
SER	$y=0.6600x-0.0515$	0.9991	54	<0.001	99.82
TRIP	$y=0.4181x+0.0071$	0.9997	54	<0.001	99.94
$\beta$ -FEN	$y=0.94060x-0.118$	0.9997	54	<0.001	99.94
PUT	$y=0.8479x-0.1208$	0.9989	54	<0.001	99.78
CAD	$y=1.6500x+0.1000$	0.9998	54	<0.001	99.96
AGM	$y=0.7243x-0.1598$	0.9993	54	<0.001	99.86
ESPD	$y=1.15251+0.1005$	0.9990	54	<0.001	99.80
ESPM	$y=0.4181-00860$	0.997	54	<0.001	99.94



El coeficiente  $r$  hallado experimentalmente, tras ser comparado con la  $r$  de las tablas para  $n-1$  grados de libertad (DOMENECH MASSON, 1989) resultó altamente significativo en todos los casos, siempre con una probabilidad inferior al 0.001.

El coeficiente de determinación  $R^2$  indica la proporción de la varianza total de la respuesta ( $y$ ) que puede ser explicada por el modelo lineal de regresión. En todos los casos esta proporción resultó muy próxima al 100%.

### Tests de linealidad.

Existen diversas pruebas que pueden emplearse para evaluar la linealidad de una recta, a partir del coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados para distintas concentraciones, por la significación estadística de la varianza de la pendiente o mediante un análisis de la varianza de la regresión. Según CASTRO y col (1989) esta última prueba es la más rigurosa desde el punto de vista matemático pero sólo puede aplicarse cuando se dispone de replicas de cada concentración. Por ello, se efectuó paralelamente al calculo de las rectas de regresión el correspondiente análisis de la varianza cuyos resultados se muestran en la tabla...

Tabla... Analisis de la varianza de la regresión de las rectas correspondientes a patrones de aminos biógenos.

	$F_{Exp}$	GL	p
HIS	6539.21	1, 53	<0.001
TIR	9294.15	1, 53	<0.001
SER	2799.15	1, 48	<0.001
TRIP	8124.38	1, 43	<0.001
$\beta$ -FEN	3699.74	1, 53	<0.001
PUT	5742.78	1, 53	<0.001
CAD	9611.58	1, 53	<0.001
AGM	4216.62	1, 53	<0.001
ESPD	2659.34	1, 53	<0.001
ESPM	10308.81	1, 48	<0.001

$$F_{Tab(1,53, 0.001)} = 12.19$$

$$F_{Tab(1,48, 0.001)} = 12.35$$

La  $F_{Exp}$  se calcula a partir de la expresión:

$$F_{Exp} = \frac{\text{Variación de la regresión}(S^2_{REG})}{\text{Variación residual}(S^2_{REG})}$$

y se compara con el valor de F dado por las ley de Snedecord para 1 y n-2 grados de libertad.

El valor de la  $F_{Exp}$  representa la relación entre la variabilidad atribuible de la curvatura o la no linealidad (debida a la falta de ajuste entre la recta de regresión y los datos experimentales) y la atribuible al error experimental cometido dentro de cada serie. Si la  $F_{Exp}$  es mayor que la F de las tablas de la ley de SNEDECOR asumiendo un determinado riesgo (generalmente 0.05 o 0.01) implica que la linealidad es correcta. En todos los casos los valores de  $F_{Exp}$  obtenidos son muy superiores a los marcados por la ley de Snedecor para considerar la linealidad correcta.

### 6.3.2. PRECISION

La precisión de un método analítico expresa el grado de concordancia (en una zona definida de valores) entre medidas repetidas (ensayos analíticos) sobre una misma muestra y en unas condiciones constantes. Es decir, indica la distribución de los valores analíticos alrededor de su media, suponiendo esta como una estimación válida del valor verdadero (LINDER, 1978; CASTRO y col., 1989; IZQUIERDO-PULIDO, 1991).

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 en un intervalo de tiempo corto.

Para estudiar la precisión del método se realizaron 7 determinaciones repetidas de una muestras de atún fresco adquirido en el mercado de Barcelona.. los resultados obtenidos respecto al contenido de cada analito así como sus valores medios, desviaciones estandard y coeficientes de variación se muestran en la tabla...

Según HORWITZ (1982) la precisión de un método analítico en un ensayo **interlaboratorio** puede considerarse aceptable si su coeficiente de variación experimental es inferior al valor obtenido mediante la siguiente expresión:

$$CV=2^{(1-0.5\log C)}$$

donde C es la concentración media del analito expresada en  $\mu/g$

Este mismo autor señala que la precisión expresada como CV, en un ensayo **intralaboratorio** como el del caso que nos ocupa, se consideran aceptable valores comprendidos dentro del intervalo de 1/2 a 3/2 del valor hallado a partir de la fórmula propuesta para los cálculos interlaboratorio. En la tabla también se muestran el intervalo de CV permitidos para considerar la precisión correcta según el criterio anterior. Se observa que incluso aplicando él límite más exigente que comportaría considerar 1/2 del valor obtenido mediante la fórmula los coeficientes de variación experimentales resultaron siempre inferiores a los calculados, pudiéndose considerar correcta la precisión del método.

Tabla ... Estudio de la precisión del método propuesto para la determinación de aminas biógenas en pescados y derivados.

	CONTENIDOS ( $\mu\text{g/g}$ )										CV <sub>Exp</sub>	DE	X	CV INTRALAB.
	A	B	C	D	E	F	G							
HIS	4.30	4.35	4.30	4.30	4.30	4.25	4.30	4.30	0.03	1.30	6.40-8.55			
TIR	0.35	0.35	0.40	0.40	0.35	0.40	0.35	0.35	0.03	7.70	9.40-12.50			
SER	2.10	2.10	2.05	2.10	2.15	2.10	2.05	2.05	0.03	1.30	7.15-9.55			
TRIP	0.25	0.25	0.30	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.02	7.60	9.85-13.15			
$\beta$ -FEN	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	2 <sup>-10</sup>	2.40	16.00-21.30			
PUT	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.15	0.15	0.20	9.75	10.20-13.60			
CAD	1.80	1.80	1.90	2.05	1.85	1.80	1.95	1.95	0.09	5.00	7.25-9.70			
AGM	1.60	1.65	1.65	1.60	1.70	1.60	1.70	1.70	0.05	2.70	7.40-9.90			
ESPD	1.20	1.15	1.15	1.10	1.10	1.20	1.15	1.15	0.04	3.55	6.60-8.80			
ESPM	4.25	4.10	4.20	4.10	4.25	4.25	4.25	4.25	0.07	1.70	6.45-8.60			

### 6.3.3 EXACTITUD -RECUPERACION

La exactitud indica la capacidad de un método analítico para dar resultados lo más próximo posible al valor verdadero. La exactitud se expresa matemáticamente como la diferencia entre el valor hallado y el valor real. Como este último es imposible de conocer cuando no se dispone de material de referencia certificado, en la práctica la exactitud se expresa como porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra tras haber adicionado cantidades conocidas de éste.

El procedimiento habitual para calcular la exactitud de un método analítico expresada en porcentaje de recuperación, es analizar bajo las mismas condiciones, una determinada muestra y la misma adicionada de una cantidad conocida de los analitos a estudiar.

Teniendo en cuenta los contenidos de cada una de las aminas biogénicas en una muestra de atún fresco, se prepararon tres soluciones patrón para ser adicionadas:

- Solución patrón 15  $\mu\text{g/ml}$  de putrescina, tiramina, histamina,  $\beta$ -feniletilamin y triptamina.
- Solución patrón de 60  $\mu\text{g/ml}$  de cadaverina, agmatina y espermidina
- Solución patrón de 150  $\mu\text{g/ml}$  de serotonina y espermina.

La recuperación del método cromatográfico propuesto se calculó tras adicionar sobre diversas fracciones de una misma muestra de atún fresco, 1 y 2 ml respectivamente de cada una de las soluciones anteriormente especificadas con el fin de estudiar dos niveles de adición diferente y comprobar si la exactitud del método era o no independiente de la cantidad de analito presente.

Para conocer si la exactitud era independiente de los niveles de aminas biogénicas adicionados se efectúa la prueba de homogeneidad de variancias de Cochran, planteando como hipótesis nula ( $H_0$ ), que la variancias observadas en los dos niveles de adición considerados son homogéneas.

En la tabla ... se muestra los contenidos de aminas biogénicas determinados en las muestras correspondientes a los niveles de adición I y II. En la tabla siguiente el porcentaje de recuperación obtenido en cada caso y finalmente en la tabla... el resultado las variancias correspondientes a cada nivel de adición y la  $C$  experimental de Cochran. Se observa como en todos los casos este valor resulta inferior al valor marcado en las tablas para  $C_{(5,2, 0.05)}=0.8772$  por lo que podemos concluir que ambas variancias son homogéneas y la variabilidad observada es independiente del contenido de aminas biogénicas en la muestra.

TABLA.. Contenidos de aminos biógenas ( $\mu\text{g/g}$ ) en atún fresco y en la misma muestra adicionada de patrones.

	ATUN	MUESTRA ADICIONADA	
	$X \pm \text{DE}$ (n=7)	+15 $\mu\text{g/g}$	+30 $\mu\text{g/g}$
HIS	22.1 $\pm$ 0.20	34.50, 35.75, 36.25, 37.00, 53.75, 36.25	51.75, 54.00, 54.25, 53.00, 51.25, 52.25
TIR	16.5 $\pm$ 0.50	30.75, 30.25, 31.75, 29.00, 34.22, 32.50	46.75, 48.50, 46.25, 47.25, 49.25, 46.50
TRIP	ND	14.50, 14.00, 15.50, 13.50, 15.00, 14.75	28.50, 28.75, 28.50, 29.25, 29.75, 27.50
$\beta$ -FEN	ND	14.52, 16.00, 15.75, 14.25, 16.00, 15.75	28.50, 28.75, 28.50, 29.25, 29.75, 27.50
PUT	9.50 $\pm$ 0.55	23.75, 23.25, 23.75, 26.25, 23.75, 26.25	42.50, 41.25, 41.25, 42.50, 47.20, 40.00
		+60 $\mu\text{g/g}$	+120 $\mu\text{g/g}$
CAD	53.0 $\pm$ 0.10	113.25, 113.75, 113.00, 116.525, 109.75, 114.50	170.25, 166.25, 166.50, 170.25, 173.00, 164.25
AMG	49.70 $\pm$ 0.15	105.00, 98.75, 107.50, 105.25, 101.50, 106.25	159.75, 161.75, 163.25, 160.00, 164.00, 165.25
ESPD	71.50 $\pm$ 0.20	141.25, 145.50, 147.25, 126.75, 137.25, 133.00	185.25, 186.25, 190.00, 190.75, 185.25, 185.75
		+150 $\mu\text{g/g}$	+300 $\mu\text{g/g}$
SER	96.00 $\pm$ 0.20	227.75, 232.50, 234.75, 236.25, 240.00, 236.00	405.25, 401.25, 401.00, 399.75, 405.45, 395.00
ESPM	192.10 $\pm$ 0.20	230.00, 232.50, 234.75, 236.25, 230.00, 236.00	445.00, 443.25, 444.75, 443.75, 443.25, 446.25

Tabla.. Porcentaje de medios de aminas biógenas correspondiente a cada nivel de adición.

	NIVEL I	NIVEL II	$X_1 \pm DE$	$X_n \pm DE$
HIS	92.95, 96.40, 97.70, 99.75, 95.70, 100.40	99.35, 103.65, 104.15, 101.75, 98.40, 100.30	97.15 $\pm 2.75$	101.27 $\pm 2.32$
TIR	96.35, 94.75, 99.47, 90.85, 106.50, 101.80	99.65, 103.40, 98.60, 100.70, 104.95, 99.10	98.29 $\pm 5.52$	101.06 $\pm 2.55$
TRIP	95.60, 106.70, 105.00, 98.30, 101.70, 106.70	95.00, 95.80, 95.00, 97.50, 99.20, 91.70	102.33 $\pm 4.63$	95.70 $\pm 2.54$
$\beta$ -FEN	96.70, 93.30, 103.30, 100.00, 90.00, 98.30	95.00, 95.80, 100.00, 97.50, 100.80, 95.00	96.93 $\pm 4.75$	97.35 $\pm 2.54$
PUT	96.90, 103.60, 96.50, 99.20, 107.30, 107.30	107.60, 104.40, 104.40, 107.60, 101.30, 102.50	101.80	104.63
CAD	100.20, 100.65, 100.00, 97.10, 102.90, 110.35	98.40, 96.10, 96.25, 98.40, 100.00, 94.95	100.37	97.35
AGM	95.75, 90.00, 98.00, 95.95, 96.85, 92.55	94.15, 95.30, 96.20, 94.30, 96.65, 97.40	94.85 $\pm 2.99$	95.66 $\pm 1.31$
ESPD	107.40, 110.60, 111.95, 99.45, 99.80, 101.5	96.75, 97.25, 99.20, 96.75, 99.60, 98.05	105.11 $\pm 5.57$	97.93 $\pm 1.24$
SER	92.60, 94.50, 95.45, 96.05, 97.55, 95.90		95.34 $\pm 1.67$	
ESPM	93.55, 94.20, 93.30, 93.55, 94.30, 93.65	90.45, 90.10, 90.40, 90.10, 90.20, 90.70	93.75 $\pm 0.40$	90.32 $\pm 0.23$

Tabla... Prueba de Cochran para comprobar la independencia de la variabilidad de resultados frente en contenido de analito en la muestra.

	VARIANCIA I	VARIANCIA II	C <sub>Exp</sub>
HISTAMINA	0.6930	1.4750	0.6803
TIRAMINA	3.356	1.4416	0.6993
TRIPTAMINA	0.5100	0.5854	0.5344
β-FENILETILAMINA	0.6118	0.5850	0.5085
PUTRESCINA	1.8702	6.9900	0.7708
CADAVERINA	4.9005	3.2698	0.5990
AGMATINA	10.7010	4.9100	0.6860
ESPERMIDINA	3.2910	6.2121	0.8299
SEROTONINA	17.030	15.000	0.5316
ESPERMINA	8.099	1.512	0.8425

Finalmente puesto que no se observaban diferencias atribuibles a los distintos contenido de aminas biógenas se calculo el porcentaje de recuperación medio considerando los dos niveles de adición ensayados para cada una de las 10 aminas biógenas objeto de estudio y se comprobó si difería estadísticamente del valor teórico de recuperación del 100 %. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla...

Tabla.. Comparación del porcentaje medio de recuperación de aminas biógenas con el valor ideal 100.

	MEDIA GLOBAL	t <sub>Exp</sub>
HISTAMINA	99.20	2.570
TIRAMINA	99.70	0.255
TRITAMINA	98.95	0.714
β-FENILETILAMINA	97.15	2.717
PUTRESCINA	103.20	2.570
CADAVERINA	98.85	1.656
AGMATINA	95.25	7.415
ESPERMIDINA	101.50	0.964
ESPERMINA	92.05	15.228

t<sub>(11, 0.001)</sub> = 4.437



Como se deduce de la tabla., en de los 10 analitos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la recuperación media y el valor teórico de 100%. En los casos en que existía diferencias los valores de recuperación obtenidos eran próximos a 100, 95.25 y 92.05 para agmatina y espermidina respectivamente. Por ello se puede considerar que el metodo globalmente resulta satisfactorio en cuento a su exactitud.

#### 6.3.4. SENSIBILIDAD: LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION

El **Límite de deteccion (LD)** de un método analítico, según la IUPAC (LONG y WINEFORDNER, 1983), es la menos concentración o cantidad de analito detectable por un procedimiento analítico dado.

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.

De entre los distintos métodos propuestos para evaluar la sensibilidad de un metodo analítico y calcular su límite de detección y cuantificación se eligio el análisis repetido de un blanco propuesto por LONG y WINEFORDNER (1983) que es el más frecuentemente utilizado en el caso de procedimientos cromatográficos (CASTRO y col., 1989).

Para ello se aplica la siguiente fórmula:

$$LD \text{ o } LC = \frac{Y_{bl} + K \times S_{bl}}{b}$$

donde  $Y_{bl}$  es la media de la respuesta de  $n$  blancos,  $S_{bl}$  su desviación estandard,  $b$  la pendiente de una recta de calibrado de concentraciones bajas y  $K$  una constante cuyo valor es 3 cuando se calcula el límite de detección y 10 cuando se calcula el límite de cuantificación.

Para emplear esta formula la desviación estandard del blanco debe de ser mayor la de la pendiente y la del término independiente de la recta de regresión empleada. y el número de determinaciones del blanco  $n$  igual o superior a 10.

Dado que no fué posible disponer de una muestra de pescado exenta de aminas biógenas, se inyectaron en el cromatógrafo 10 alicuotas correspondientes a la solución de ácido perclórico 0.6N empleada para extraer las aminas biógenas de la muestra sólida y se disminuyó el filtrado del ruido de fondo la señal en el sistema de recogida de datos (THRSH) hasta obtener un valor numérico de oscilación de la línea de base. Las lecturas numéricas de este ruido de fondo en el tiempo de retención de cada analito son las que se emplean para calcular  $Y_{bl}$  y su desviación estándar. Se construyeron rectas de calibración de concentraciones bajas (0.1, 0.25, 0.3, 0.5 y 1  $\mu\text{g/g}$ ) (tabla...)

Tras comprobar los supuestos de aplicabilidad se calcularon los límites de detección y cuantificación mediante la fórmula propuesta por LONG y WINEFODNER. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla...

Tabla.. Ecuaciones de las rectas de concentración baja empleadas en el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

HISTAMINA	$y = 56.73x + 1.26^*$	0.9992
TIRAMINA	$y = 39.96x + 3.14$	0.9989
SEROTONINA	$y = 20.83x + 1.08$	0.9995
TRIPTAMINA	$y = 44.10x + 1.30$	0.9989
$\beta$ - FENELETILAMINA	$y = 50.39x + 2.84$	0.9974
PUTRESCINA	$y = 62.97x + 9.36$	0.9954
CADAVERINA	$y = 102.40x + 5.90$	0.993
AGMATINA	$y = 41.33x + 3.96$	0.9958
ESPERMIDINA	$y = 61.80x + 2.28$	0.9992
ESPERMINA	$y = 19.50x - 3.70$	0.9987

\* la respuesta y se tomó en este caso en milivoltios.

Tabla... Límites de detección y cuantificación de las aminas biógenas calculados según el criterio de LONG y WINEFORDNER (1985).

	LIMITE DE DETECCION	LIMITE DE CUANTIFICACION
HISTAMINA	0.045	0.10
TIRAMINA	0.090	0.85
SEROTONINA	0.20	1.75
TRIPTAMINA	0.05	0.75
$\beta$ -FENILETILAMINA	0.02	0.20
PUTRESCINA	0.045	0.35
CADAVERINA	0.06	0.35
AGMATINA	0.015	0.10
ESPERMIDINA	0.030	0.40
ESPERMINA	0.15	2.80

#### 6.4 DETERMINACION DE AMINAS BIOGENAS EN ANCHOAS

Las muestras tomadas a lo largo del proceso de elaboración de las anchoas así como el producto final obtenidos resultaron mucho más complejas que las de pescado fresco, congelado o en conserva. En ellas aparecían multitud de picos interferentes, cuya aparición podría asociarse a la atapa de maduración donde existe una intensa proteólisis, ya que estos picos no se detectaban en la materia prima, aparecían a los pocos días de maduración y se efecto interferente se hacia más importante a medida que aumentaba el tiempo de maduración.

Estos picos asociados al proceso de maduración dificultaban la identificación y cuantificación de las aminas biógenas (fig...). Por ello, tras descartar diversos métodos de extracción en fase líquida o sólida previos a la inyección debido al bajo rendimiento obtenido, se optó por establecer un programa de elución distinto, con unas fases móviles ligeramente modificadas, en el que la apolaridad de la fase móvil iba aumentando de un modo mucho más lento. De este modo el tiempo de elución total era más largo pero se conseguía una mayor resolución de las aminas biógenas y sus interferentes.

La fases móviles propuestas son las mismas que en el apartado 6.2.3 con la única diferencia de que el pH de la fase A se ajusta en este caso a un valor de 4.90.

- Fase A: Solución 0.1M de acetato sódico 0.1M y 10 mM de octanosulfonato sódico ajustada a pH=4.90 con ácido acético.
- Fase B: Solución 0.2M de acetato sódico 0.2M y 10 mM de octanosulfonato sódico, ajustada a pH=4.5 con ácido acético acetonitrilo. Se toman 340 ml de acetonitrilo y se enrasa a un litro con la solución tampón.

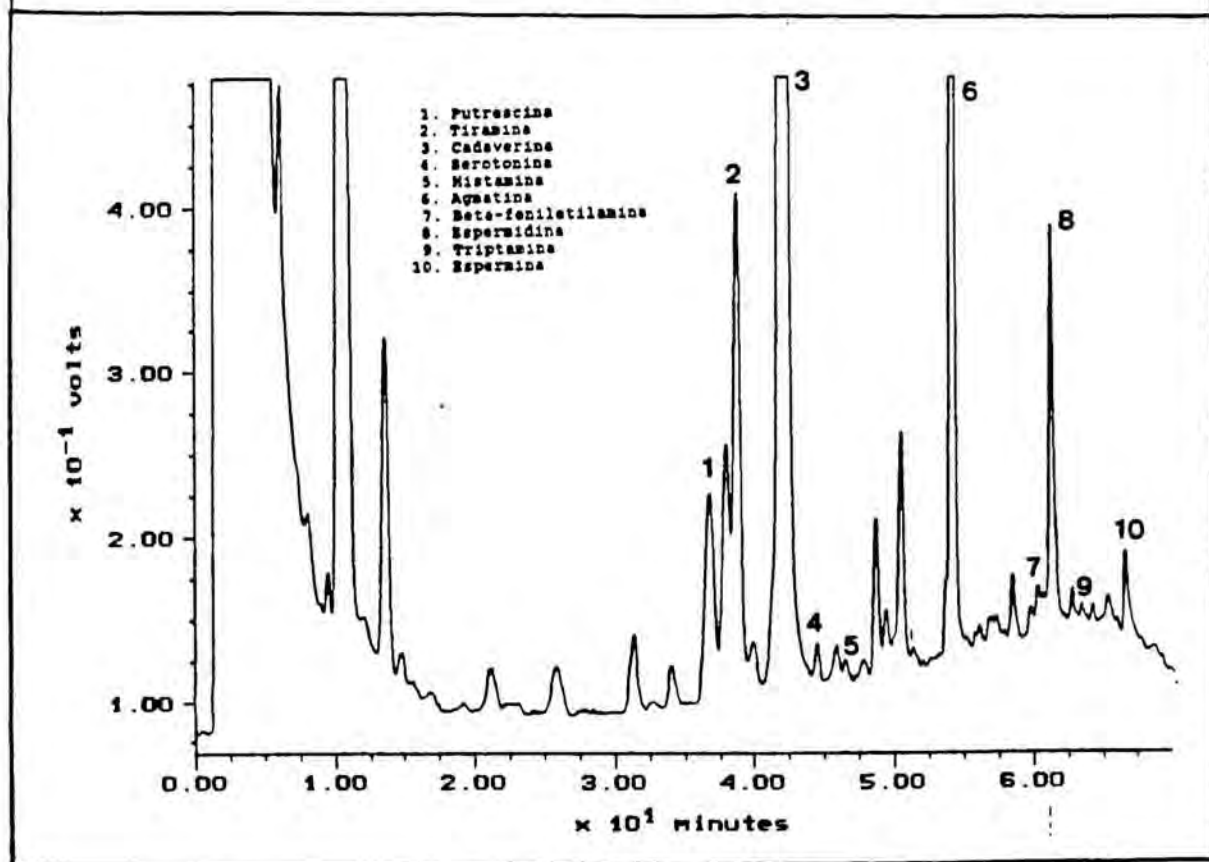
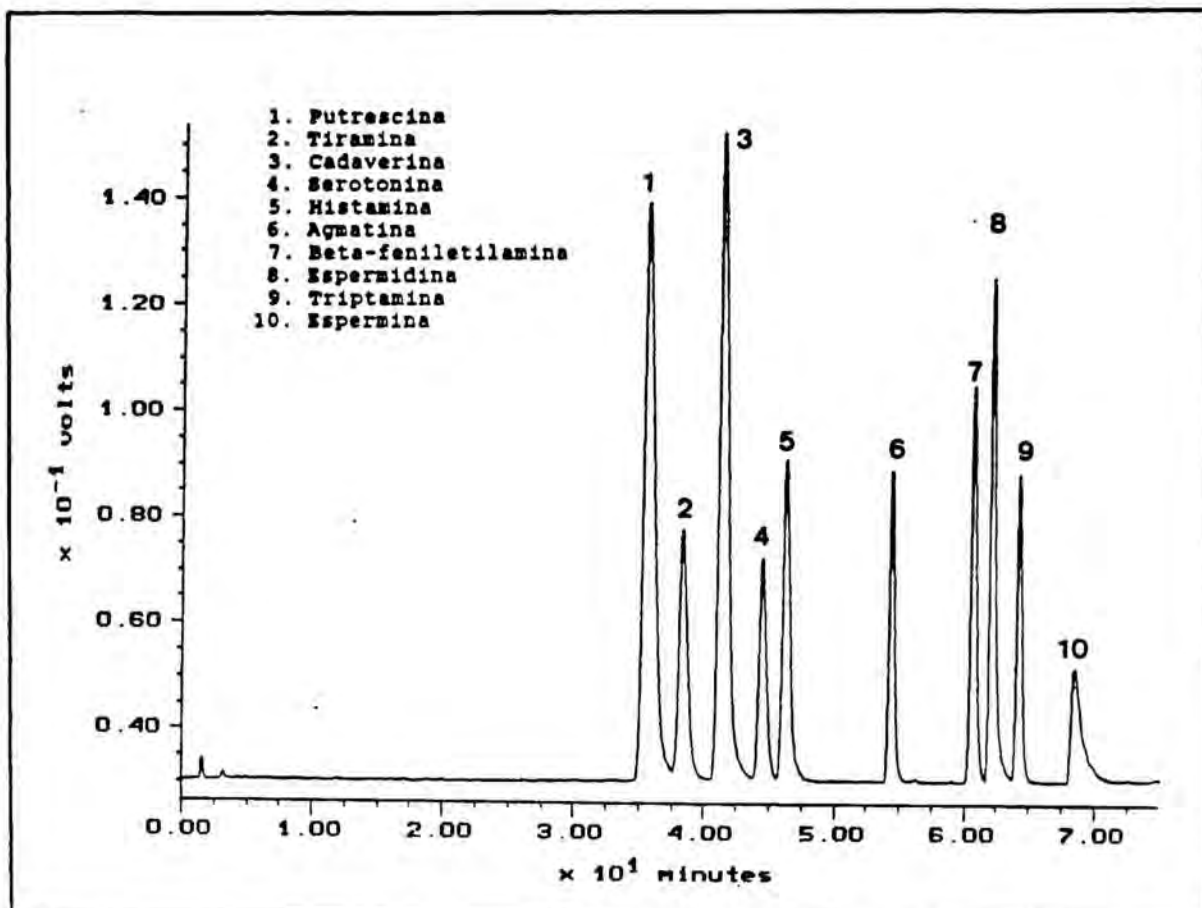
Tabla... Programa de elución para muestras de semiconservas de anchoa.

	TIEMPO DE ELUCIÓN (min)	% FASE A	% FASE B
PERIODO DE ELUCIÓN	0	90	10
	70	0	100
	72	0	100
PERIODO DE RETORNO Y EQUILIBRIO	74	90	10
	94	90	10

En la figura ... Se muestran el aspecto de un cromatograma correspondiente a una muestra de semiconservas de anchoa por el método general propuesto para pescados y por el modificado para este tipo de muestras. Se observa que en el segundo caso la resolución es mucho más satisfactoria.

Dada la complejidad de este tipo de muestras en la mayoría de los casos la determinación analítica se efectuó paralelamente a la de la misma muestra adicionada de  $10 \mu$  de cada una de las aminas problema. De este modo se facilitaba la identificación de los picos cromatográficos correspondientes a los analitos.

En las paginas siguientes se muestra un cromatograma correspondiente a una muestra de semiconservas anchoa y una correspondiente a una mezcla de patrones de aminas biógenas obtenidos con la aplicación de las condiciones cromatográficas anteriormente descritas.



## **7. DETERMINACION DE ATP Y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (CLAE)**

Tras el estudio de las condiciones propuestas por diversos autores en la bibliografía se ensayaron dos métodos analíticos prototipos de dos estrategias distintas para la resolución cromatográfica del ATP y sus compuestos de degradación. El método **I** se basa en el descrito por RYDER y col. (1984) en que se separan ATP, ADM, AMP, IMP Inosina e Hipoxantina en una columna de C<sub>18</sub> de fase reversa con una fase móvil constituida por un tampón fosfato. El método **II** se basa en la técnica de la supresión iónica para lo que se incorpora a la fase móvil un reactivo de carácter básico, el sulfato de tetrabutilamonio que forma al combinarse con los analitos compuestos más grandes y apolares, que quedan más retenidos por la columna y eluyen en orden inverso al establecido sin la incorporación de este reactivo.

### **7.1 METODO I PARA LA DETERMINACIÓN DE ATP Y DERIVADOS POR CLAE**

#### **7.1.2. ENSAYOS PREVIOS AL ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS**

En la puesta a punto del método se partió de las especificaciones de RYDER y col. (1984) que lograban la resolución de ATP, ADP, AMP, IMP, Inosina e Hipoxantina, en una columna de fase reversa, en condiciones isocráticas y con una fase móvil constituía por un tampón fosfato 0.1M a un pH de 7. Estas condiciones fueron modificadas con el fin de lograr la mejor resolución posible en nuestro tipo de muestras y con el utillaje de que se disponía.

De las diferentes pruebas realizadas en la puesta a punto del método pueden destacarse los siguientes aspectos:

- Los analitos se separan cromatograficamente y eluyen en orden inverso a su apolaridad. El primero en eluir es el IMP, el mas polar, seguidamente lo hacen ATP, ADP y AMP y finalmente eluyen los compuestos más apolares por los que la columna presenta una mayor afinidad, hipoxantina e inosina.

- El aumento de pH de la fase móvil (desde 4 hasta 6 unidades) se traduce en la obtención de una mejor resolución de los picos cromatográficos y en una ligera disminución de los tiempos de retención. El pH óptimo de trabajo coincide con el valor 7 propuesto por RYDER y col (1984).
- Al aumentar la apolaridad de la fase móvil (con la adición de metanol o acetonitrilo) el ATP y sus compuestos de degradación son más fácilmente desplazados por la fase móvil y eluyen antes y peor resueltos.
- Se comprobó que para una resolución satisfactoria de los analitos resultaban adecuadas concentraciones de tampón fosfato comprendidas entre 0.08 y 1M. Las concentraciones inferiores ensayadas, 0.02 y 0.06M no resultaron eficaces. Dado el riesgo de formación de precipitados en el interior del circuito de CLAE cuando se trabaja con tampones fosfato, se eligió una concentración del margen inferior del intervalo en se obtenían resoluciones satisfactorias.
- La inosina, analito que eluía en último lugar lo hacía formando un pico muy ancho y asimétrico. Por lo que se modificó el programa de elución. Tras 8 minutos de elución en isocrático con la fase móvil constituida solamente por tampón fosfato se incorporó una pequeña cantidad de metanol de modo que aumentaba la apolaridad de la fase móvil el analito problema se separaba de la columna con mayor facilidad. Para aumentar la fuerza de la fase móvil se incorporó acetonitrilo en lugar de metano puesto que es más económico y el tiempo de estabilización requerido entre dos inyecciones sucesivas resultaba inferior.

## 7.1.2 DESCRIPCION DEL METODO

### 7.1.2.1 MATERIAL Y REACTIVOS

#### **Aparatos:**

- HPLC System KONTRON 600 (binario) con controlador y programador KONTRON 205.
- Inyector manual REHODYNE 7125
- Espectrofotómetro KONTRON SFM 25.
- Integrador HEWLETT PACKARD HP 3396 A Serie II.
- Balanza de precisión ELECTRONIC BALANCE ER 180, A-AND
- Granatario SALTER ELECTROSCALE EB-300
- Centrifuga CENTRONIC S-577
- pH-metro CRISON DIGIT 501
- Baño de Ultra-Sonidos P-SELECTA
- Placas de agitación magnética A06 SBS



## Material Fungible

- Columna TRACER SPHERISORB ODS 2 (0.4 cm x 25 cm). Diámetro de partícula 5 $\mu$ m.
- Pre-columna WATERS GUARD- COLUMN NOVA-PAK C<sub>18</sub> W15220
- Filtros para disolventes MILLIPORE, 0.45 $\mu$  de tamaño de poro y membrana de HVLP.
- Filtros para muestras MILLIPORE MILLEX-HV<sub>4</sub>, 0.45 $\mu$  de tamaño de poro y membrana de HVLP
- Jeringa HAMILTON 705 RHEOD

## Reactivos

- Agua calidad MILLI-Q
- Disolventes orgánicos para CLAE: Metanol y Acetonitrilo (SHARLAU)
- Dihidrogenofosfato de potasio P.A., MERCK.
- Dipotasio hidrogenosulfato trihidratado P.A., MERCK.
- Hidróxido potásico PA PANREAC.
- Acido perclórico 70% PA PANREAC.

## Patrones de ATP y sus compuestos de degradación

- Adenosina 5'-trifosfato, sal trisódica, SIGMA.
- Adenosina 5'-difosfato, sal de di- monociclihexilamonio, SIGMA.
- Adenosina 5'-monofosfato, sal sódica, SIGMA.
- Inosina 5'-monofosfato, sal disódica, SIGMA.
- Hipoxantina base FLUKA.
- Inosina base SIGMA.

Las soluciones patrón de ATP y derivados se preparan a partir de las "soluciones madre" de 1000  $\mu$ g/l (ppm) en tampón fosfato 0.1N a ph=7. A partir de éstas, se preparan por dilución las soluciones de trabajo, que se guardan en frascos, protegidas de la luz y refrigeradas.

### 7.1.2.2 PREPARACION DE LA MUESTRA

El pescado fresco se eviscera, se separa la piel y las espinas y posteriormente se tritura con el fin de obtener muestras representativas y homogéneas.

En muestras de semiconservas de anchoa y conservas de atún, en primer lugar se procede a la retirada del líquido de cobertura y posteriormente se trituran y homogeneizan como las de pescado fresco.

Se toma un peso de 10 g de muestra, ya triturada. Se homogeneiza con ácido perclórico 0.6N durante 10 minutos en una placa de agitación magnética. Se separa el residuo sólido por centrifugación (10 minutos a 300rpm) y posterior filtración sobre papel.

El residuo obtenido se interpone de nuevo con otra alícuota de ácido perclórico 0.6N y se homogeneiza de nuevo durante 15 minutos con el fin de agotar la muestra. Se separa el residuo sólido por centrifugación filtración y se reúnen los dos extractos perclóricos obtenidos enrasándose a un volumen final de 25.0 o 50.0 ml, en función del contenido en aminas biógenas de las muestras.

Se toman 10ml del extracto ácido y se neutralizan con unas gotas de KOH del 30% hasta alcanzar un pH de entre 6.5 y 7 unidades.

Se filtra para eliminar el precipitado formado en la operación anterior (perclorato potásico) y se enrasa a 20.0 con tampón fosfato. De este modo se obtiene un extracto neutro que contiene los analitos y tras filtración por una membrana de  $0.45\mu\text{m}$  se encuentra listo para el análisis cromatográfico.

Por último, se filtran aproximadamente 2 ml del extracto perclórico a través de un filtro de  $0.45\mu$  y se guarda refrigerado o congelado hasta el momento de la inyección.

En muestras de semiconservas de anchoa, donde generalmente el contenido en aminas biógenas es mayor así como la presencia de sustancias interferentes, se aconseja partir de menor cantidad de muestra (5g) y repetir tres veces el proceso de homogeneización y extracción con perclórico.

### 7.1.2.3 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

#### \* Fase estacionaria

Columna cromatográfica de fase reversa TRACER SPHERISORB ODS2 (0.4 cmX 25cm) y diámetro de partícula de  $5\mu$ .

#### \* Fase móvil

- Fase A: Solución tampón 0.09M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7) con KOH del 30%.
- Fase B: Metanol

### \* Programa de elución

Tabla... Programa de elución para la determinación de ATP y sus compuestos de degradación por el método I.

	TIEMPO DE ELUCIÓN (min)	% FASE A	% FASE B
PERIODO DE ELUCIÓN	0	100	0
	8	100	0
	9	70	30
	13	70	30
PERIODO DE RETORNO Y EQUILIBRIO	14	100	0
	25	100	0

El programa de elución consta de tres fases. Un primer periodo isocrático, del minuto 0 al 8, en el que eluyen IMP, ATP, ADP, AMP e Hipoxantina y la fase móvil esta constituida únicamente por tampón fosfato. Se incorpora continuación un 10% de metanol para acelerar la salida del último analito Inosina y se programa la vuelta a las condiciones iniciales manteniendo en periodo es estabilización de 11 minutos.

\*Flujo: 1 ml/min

\*Temperatura: Ambiente

\* Volumen de inyección: 20  $\mu$ l

\* Detección: Espectrofotométrica a 254 nm.

#### 7.1.2.4 IDENTIFICACION DE PICOS CROMATOGRAFICOS

La identificación de los picos cromatograficos en las muestras se realizó por comparación de sus tiempos de retención con los de las soluciones patrón de ATP y derivados. En la tabla ... se indican los tiempos de retención observados para cada analito, tras la inyección repetida de 10 disoluciones patrón pertenecientes a diferentes concentraciones.

tabla... Tiempos de retención obtenidos tras la inyección de 10 soluciones patrón, en el método I para la determinación de ATP y derivados, inyectadas en días sucesivos.

	IMP	ATP	ADP	AMP	Hx	Ino
X	2.95	3.90	4.45	5.50	7.10	11.9
DE	0.05	0.080	0.05	0.10	0.08	0.21
CV(%)	1.69	1.90	1.12	1.81	0.01	1.76

Los tiempos de retención resultaron relativamente estables presentando en coeficiente de variación de entre en 1 y el 2.0· %

En las figuras 21, 22 y 23 se muestra un cromatograma correspondiente a una solución patrón de 10 $\mu$ g/g de cada uno de los analitos, de un extracto perclórico de una muestra de conserva de atún y de una muestra de semiconserva de anchoa respectivamente.

#### 7.1.2.5 CUANTIFICACION

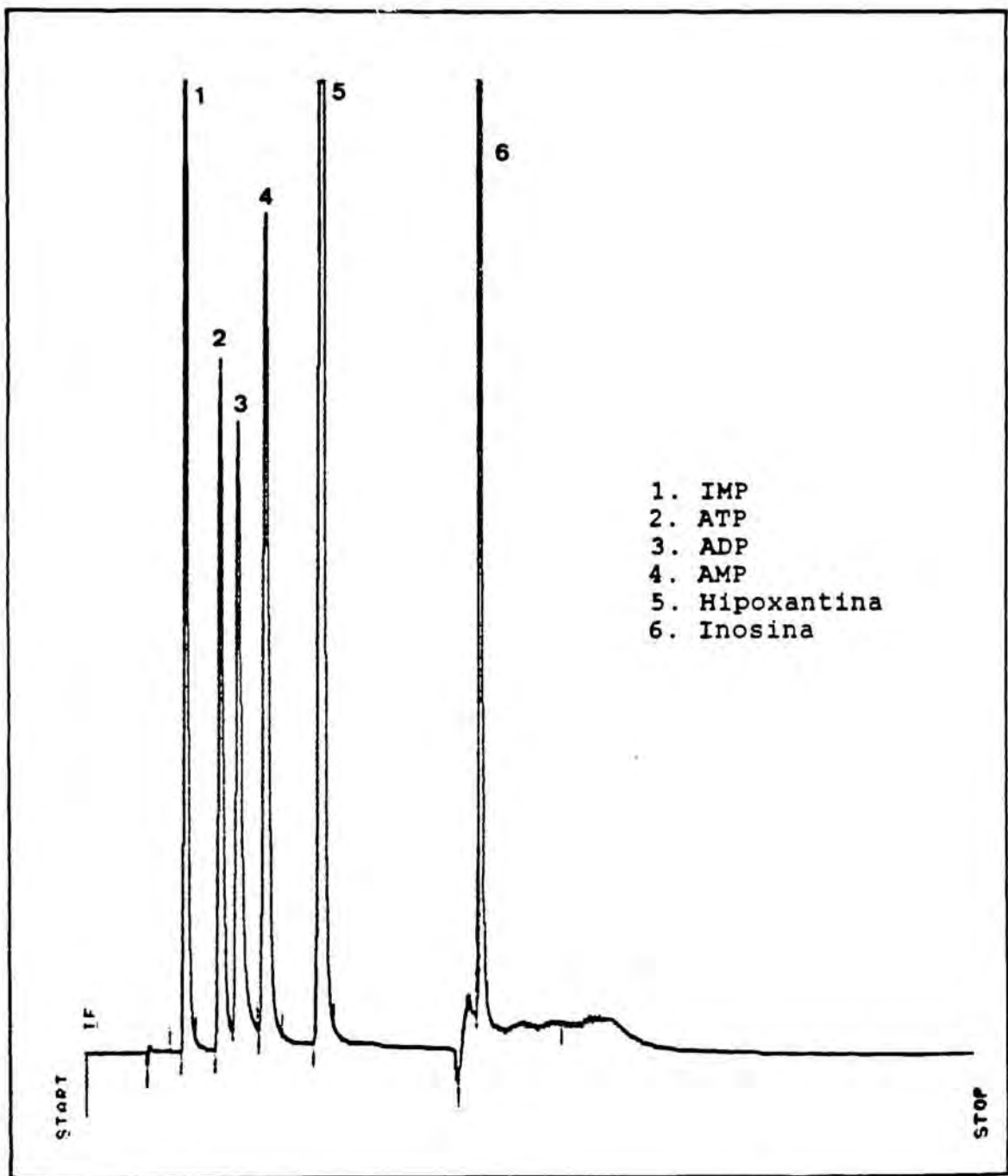
El cálculo del contenido de ATP y sus compuestos de degradación de la muestra se realiza por interpolación a partir de una recta de calibrado preparada con patrones de distinta concentración de cada uno de los analitos.

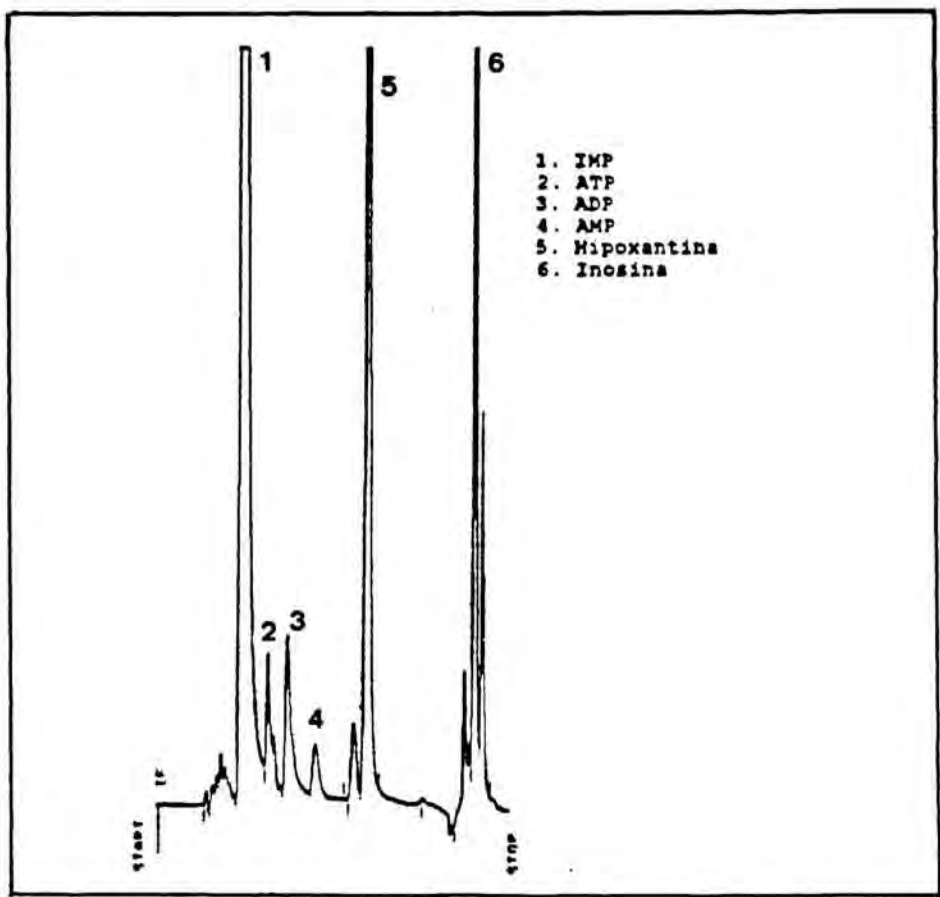
En el trabajo rutinario se trabajó con rectas de concentraciones comprendidas entre 2 y 250  $\mu$ /ml en función de las concentraciones en que se encontraba en las muestras

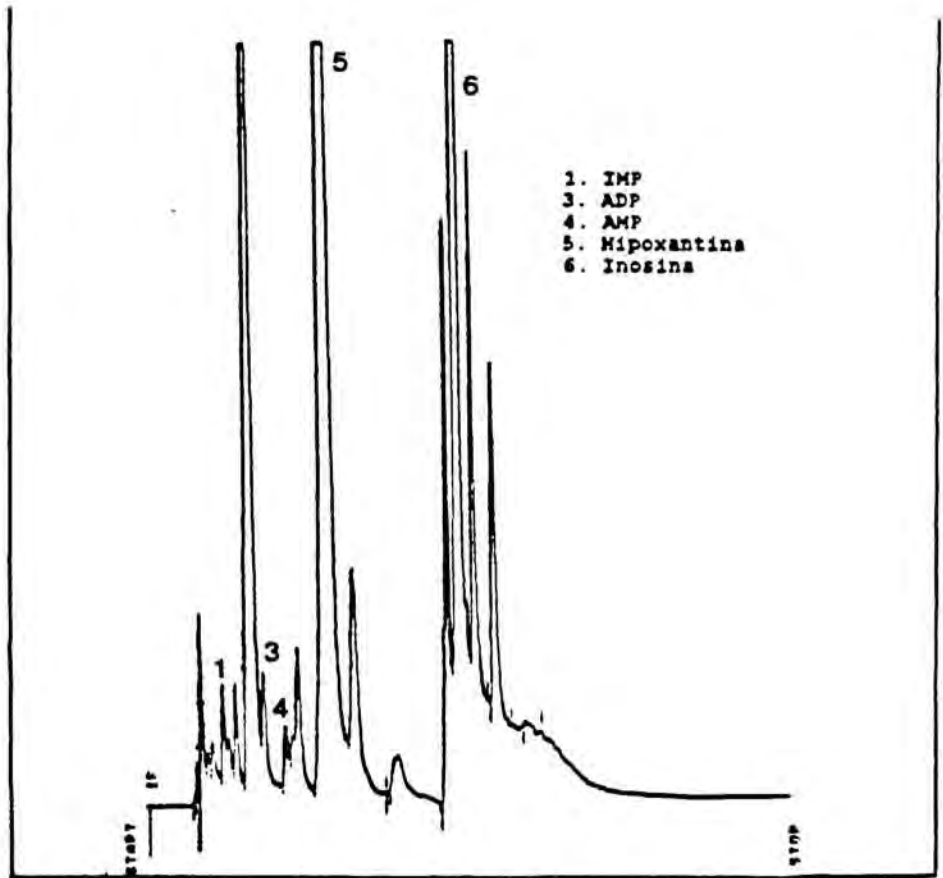
Una vez calculada la concentraciones cada analito mediante la recta de calibrado deben de tenerse en cuenta las diluciones efectuadas a partir del peso de muestras tomado inicialmente para la obtención del extracto neutro descrito en el apartado 7.1.2.2.

El las muestras analizadas la concentración de ATP y derivados se expresó en  $\mu$ mol/g para así adecuarse mejor al criterio seguido por la mayoría de los autores en la bibliografía referente a este tipo de compuestos. Para ello se utilizaron los factores de conversión siguientes:

- 1  $\mu$ g/g de ATP equivale a 0.00197  $\mu$ mol/m
- 1  $\mu$ g/g de ADP equivale a 0.00232  $\mu$ mol/m
- 1  $\mu$ g/g de AMP equivale a 0.00288  $\mu$ mol/m
- 1  $\mu$ g/g de IMP equivale a 0.00287  $\mu$ mol/m
- 1  $\mu$ g/g de ATP equivale a 0.00372  $\mu$ mol/m
- 1  $\mu$ g/g de ATP equivale a 0.00734  $\mu$ mol/m







## 7.1.2 ESTUDIO DE LA VALIDEZ DEL METODO

### 7.1.2.1 LINEALIDAD

Para comprobar la linealidad del método se prepararon soluciones patrón, en tampón fosfato 0.1 pH=7 correspondientes a las siguientes concentraciones: 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250.

La determinación de cada una de estas soluciones se efectuó por quintuplicado y las rectas construidas a partir de ellas así como su significación estadística obtenida mediante el análisis de la varianza de la regresión ( apartado 6.3.1) se muestran en la tabla

...

tabla... Rectas de calibrado, coeficiente de regresión  $r$ , grado de significación  $p$  y coeficientes de determinación  $R^2$  calculados para el ATP y sus compuestos de degradación determinados por el metodo I.

	Recta de calibrado	$r$	$R^2$	$F_{Exp}$	$p$
IMP	$y = 0.33x + 0.032$	0.9998	99.96	94971	<0.001
ATP	$y = 0.25x + 0.130$	0.9985	99.70	12638	<0.001
ADP	$y = 0.30x - 0.09$	0.9999	99.98	189971	<0.001
AMP	$y = 0.30x + 0.22$	0.9999	99.98	189979	<0.001
Ino	$y = 0.38x + 3.29$	0.9963	99.26	5160	<0.001
Hx	$y = 0.81x + 0.47$	0.9999	99.98	189985	<0.001

$$F_{(1,48; 0.001)} = 12.746.$$

Los coeficientes de determinación indican que en todos los casos más del 99% de la variabilidad de la respuesta y esta explicada por la regresión. De análisis de la varianza se deduce también que en todos los casos la linealidad es correcta, puesto que los valores de  $F_{Exp}$  obtenidos son muy inferiores a los que las tablas señalan para el número de datos disponibles. La inosina es la que presenta el valor mas bajo de  $F_{Exp}$ , es decir mayor proporción de variancia residual(debida al error experimental) frente a la variancia de la regresión, pero aún así el valor obtenido experimentalmente (5160) es unas 400 veces superior al valor marcado por las tablas para un grado de significación  $p=0.001$ . Por todo ello podemos concluir que las rectas construidas para cada analisis presentaron una correcta linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado.



### 7.1.2.2 PRECISION

Para determinar la calcular la precesión del método se realizaron 8 determinaciones sucesivas sobre una misma muestra de atún fresco adquirido en el mercado de Barcelona. Los análisis se realizaron dentro en un intervalo de 48 horas y con los mismos reactivos y aparatos.

En la tabla... se muestran los resultados de estas determinaciones su variabilidad en términos de CV(%) y el coeficiente de variación máximo permitido para ensayos **intralaboratorio** calculado según el criterio de HORWITZ. Los contenidos de cada analizo en la muestra se expresan en  $\mu\text{g/g}$  en lugar de en  $\mu\text{mol/g}$  como en el resto de la memoria puesto que estas unidades resultan más adecuadas para se tranformación en las requeridas para la aplicación de la formula de HORWITZ (mg/g).

tabla... Precisión del método cromatográfico I para la determinación de ATP y sus compuestos de degradación.

Nº	IMP	ATP	ADP	AMP	Hx	Ino
1	2066.20	30.53	86.20	15.88	137.60	241.93
2	1864.11	25.25	85.20	18.83	110.35	217.74
3	2041.81	25.50	77.58	19.50	121.25	228.44
4	1888.50	30.30	73.25	17.36	113.07	230.45
5	2048.78	27.25	73.40	17.50	116.89	233.85
6	1905.92	28.32	85.20	18.20	126.70	235.80
7	2083.63	30.00	73.22	17.12	134.87	225.85
8	1891.92	25.60	77.21	16.22	117.16	236.55
X	1985.10	27.55	78.90	17.45	122.23	231.32
DE	87.67	2.28	5.75	1.04	9.97	7.46
CV% <sub>Exp</sub>	4.41	8.28	7.29	5.99	8.15	3.22
CV% <sub>HI</sub>	3.40	9.71	5.25	6.94	5.43	4.70

\*CV%<sub>HI</sub> = coeficiente de variación intralaboratorio máximo permitido según el criterio de HORWITZ (2/3 del interlaboratorio calculado por la fórmula)

Se observa que tres de los analítos, ATP, AMP e Inosina, presentan una precisión correcta desde el punto de vista del criterio de HORWITZ para ensayos intralaboratorio. Los valores obtenidos mediante esta fórmula no deben interpretarse de un modo rígido sino que deben tomarse como un carácter orientativo (CASTRO y col., 1989).

Kolthoff propone a modo orientativo unos intervalos de coeficientes de variación permitidos en función de la riqueza de la muestra en un determinado analito (CASTRO y col., 1989). Así para analitos en una concentración entre el 0.01 y 0.001% caso del ATP, ADP y AMP estaría permitido hasta un 10% de variación. Si la concentración se encuentra entre 0.1 y 0.01, caso de la hipoxantina y la inosina se permite entre un 5 y un 10% de variación y para concentraciones de entre 0.1 y 1% como sucede en el IMP se marca un intervalo de 2-5 de coeficiente de variación permitido. En definitiva según este criterio la precisión del método resultaría correcta para 5 de los 6 analitos objeto de estudio, ATP, ADP, AMP, Ino, Hx.

### 7.1.2.3 EXACTITUD-RECUPERACION

La exactitud del método cromatografico propuesto se calculó tras el análisis repetido de una muestra homogeneizado una cantidad adicionada de una cantidad conocida de solución patrón de cada una de los analitos (apartado 6.3.3). Se estudiaron dos niveles de adición cuyo valor fue distinto según el analito considerado. Se trabajo con un nivel de adición I del mismo orden que la cantidad de analizo presente en la muestra y con un nivel II en que se adicionaba una cantidad de patrón de aproximadamente el doble en las muestras de concentración baja y de la mitad en las de concentración alta. Así tras una determinación previa del ATP y sus derivados en una muestra de atún fresco se establecieron los siguientes niveles de adición:

	ANALITO EN MUESTRA $\mu\text{mol/g}$	NIVEL I $\mu\text{mol/g}$	NIVEL II $\mu\text{mol/g}$
IMP	14.35	14.35	7.20
ATP	0.60	0.60	1.20
ADP	1.40	1.70	3.50
AMP	0.50	0.60	1.20
Hx	9.20	11.00	---
Ino	8.60	7.40	14.80

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla...donde se especifican las cantidades de cada analito detectadas experimentalmente en la muestra adicionada y los porcentajes de recuperación obtenidos en cada caso. En la tabla... se indican los resultados la prueba de Cochram para demostrar la independenciam de la variabilidad obtenida en los resultados frente a la concentración de aminos biógenos en la muestra. Se observa como en todos los casos este valor resulta inferior al valor marcado en las tablas para  $C_{(5,2,0.05)}=0.8772$  por lo que podemos concluir que ambas variancias son homogéneas y la varibilidad observada es independiente del contenido de analito en las muestra.

Tabla... Contenidos de ATP y derivados en las muestras adicionadas de patrones, porcentajes de recuperación.

	NIVEL I		NIVEL II	
	$\mu\text{mol/g}$	RECUPERACION %	$\mu\text{mol/g}$	RECUPERACION
IMP	28.30, 31.30 29.30, 28.10 24.20, 32.30	100.00, 109.05 102.90, 97.90 84.30, 112.55	20.60, 22.50 26.00, 25.40 18.50, 24.80	95.70, 104.5 104.50, 117.90 120.75, 115.20
ATP	1.00, 1.20 1.10, 1.30 1.30, 1.10	83.88, 100.00 91.66, 108.34 108.34, 83.33	1.80, 1.70 1.80, 1.80,	100.44, 94.86 100.44, 100.44
ADP	2.90, 3.20 3.00, 3.20 3.40, 2.90	90.90, 106.58 94.04, 100.38 106.58, 90.90	4.90, 5.30 4.40, 4.80 5.10, 4.70	99.39, 107.50 89.24, 97.46 103.44, 95.33
AMP	1.30, 1.20 1.10, 1.00 1.00	116.48, 107.52 98.56, 89.60 98.60	1.50, 2.00 1.70, 1.50 1.60	88.65, 118.20 100.47, 88.65 118.20
Hx	17.80, 18.10 18.70, 17.60 18.50, 18.90	88.18, 89.67 92.64, 87.19 91.65, 93.63		
INO	16.30, 15.60 15.00, 14.60 16.30, 17.00	101.62, 97.25 93.51, 91.02 101.62, 105.98	22.50, 21.00 22.20, 23.10 21.90, 21.20	96.15, 89.74 94.87, 98.71 93.58, 90.59

tabla .. Prueba de Cochram para comprobar la independancia de la variabilidad de resultados frente al contenido de analito presente en la muestra.

	VARIANCIA I	VARIANCIA II	$C_{\text{Exp}}$
IMP	8.11	8.85	0.5218
ATP	1.16	0.25	0.8226
ADP	0.04	0.09	0.6923
AMP	0.01	0.04	0.7186
HIPOXANTINA	0.26	-	-
INOSINA	0.81	0.63	0.5631

Finalmente puesto que no se observaban diferencias atribuibles a los distintos contenido de aminos biógenas se calculo el porcentaje de recuperación medio considerando los dos niveles de adición ensayados para cada una de las 10 aminos biógenas objeto de estudio y se comprobó si difería estadísticamente del valor teórico de recuperación del 100 %. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla...

tabla... Comparación del porcentaje de recuperación medio en el metodo I para la determinación de ATP y derivados por CLAE con el valor teórico del 100%.

	GL (n-1)	VALOR MEDIO	$t_{Exp}$	p
IMP	11	130.82	1.1408	<0.001
ATP	9	97.12	1.0273	<0.001
ADP	11	98.47	0.8050	<0.001
AMP	9	99.22	0.2148	<0.001
Hx	5	90.50	9.0999	>0.05
Ino	11	96.22	2.6061	<0.001

$$t_{(11, 0.001)} = 4.437$$

$$t_{(9, 0.001)} = 4.781$$

$$t_{(5, 0.001)} = 6.869$$

En todos los casos, excepto en uno, la recuperación media no presento diferencias estadísticamente significativas con el valor hipotético 100. En el caso de la hipoxantina la recuperación resultó inferior, con un valor medio de 90.50 y una desviación estandard de 2.55.

#### 7.1.2.4 LIMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección se calculó mediante el criterio de LONG y WINEFORDNER del análisis repetido de un blanco de muestra (apartado 6.3.4).

El blanco ideal correspondería a un extracto perclórico de pescado, neutralizado con KOH como las muestras y exento de ATP y sus derivados. Se ensayaron diversos métodos para degradar los analitos aplicando diversos tratamientos:

- Calentamiento a 80-100°C, durante 6 horas, del extracto neutro, del mismo extracto acidificado (pH=1, aproximadamente) y alcalinizada (pH=12).
- Tratamiento de la muestra de pescado con NaOH o con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrados durante varios días. Posteriormente se obtenía a partir de las muestras así tratadas el extracto perclórico y el extracto neutro.

- Tratamiento con distintas concentraciones de un agente oxidante fuerte, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sobre al extracto neutro.

Ninguno de estas tratamientos resultó efectivo para obtener muestras exentas de ATP y derivados por ello se utilizó como blanco ácido perclórico 0.6N neutralizado con KOH (pH=6.5-7) y filtrado 0.45µm. Este blanco se inyectó 10 veces y se registró el valor numérico del ruido de fondo al tiempo de retención correspondiente a cada analito.

Las lecturas numéricas de este ruido de fondo en el tiempo de retención de cada analito son las que se emplean para calcular Y<sub>bl</sub> y su desviación estándar. Se construyeron rectas de calibración de concentraciones bajas (0.1, 0.25, 0.3, 0.5 y 1 µg/g) (tabla...)

Tras comprobar los supuestos de aplicabilidad se calcularon los límites de detección y cuantificación mediante la formula propuesta por LONG y WINEFODNER. los resultados de este estudio se muestran en la tabla...

Tabla.. Ecuaciones de las rectas de concentración baja empleadas en el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

IMP	$y = 269332x + 104119^*$	0.9957
ATP	$y = 207892x + 72124$	0.9989
ADP	$y = 344482x + 36235$	0.9988
AMP	$y = 319879x - 27297$	0.9989
Hx	$y = 714929x - 6219$	0.9899
Ino	$y = 1903298x - 174360$	0.9982

\* la respuesta y se tomó en este caso en microvoltios.

Como se observa en la tabla siguiente la sensibilidad del método resultó satisfactoria, los límites de detección y cuantificación resultaron muy bajos y suficientes para el objetivo de nuestro estudio. El analito para el que el método resulto menos sensible, el ADP presentaba un límite de cuantificación de 5.07µg/g de muestra, cifra muy baja correspondiente a 0.01 µmol/ml

Tabla... Límites de detección y cuantificación para ATP y derivados calculados según el criterio de LONG y WINEFORDNER (1985).

	LÍMITE DE DETECCIÓN		LÍMITE DE CUANTIFICACION	
	E*	M**	E	M
IMP	0.26	1.63	0.68	4.25
ATP	0.06	0.41	0.28	0.70
ADP	0.31	1.94	0.81	5.07
AMP	0.13	0.78	0.31	1.94
Hx	0.20	1.27	0.55	3.46
Ino	0.35	2.10	0.81	1.76

\* E =  $\mu\text{g/g}$  en el extracto neutro

\*\*M =  $\mu\text{g/g}$  en la muestra de pescado, teniendo en cuenta las diluciones aplicadas (10/25+10/25 en el trabajo de rutina)

## 7.2 METODO II PARA LA DETERMINACIÓN DE ATP Y DERIVADOS POR CLAE

### 7.2.1 ENSAYOS PREVIOS AL ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Partiendo de las condiciones cromatográficas descritas por MURRAY y col. (1984), se modificó ligeramente la composición de la fase móvil y la elución en condiciones isocráticas propuesta por los citados autores se transformó en un gradiente, para como el caso del método I, mejorar el pico correspondiente al último analito.

### 7.2.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

#### 7.2.2.1 MATERIAL Y REACTIVOS

El material y los reactivos empleados coinciden con los empleados en el método I, descritos en el apartado 7.1.2.1. Únicamente se empleó además el reactivo hidrogenosulfato de tetrabutilamonio incorporado a la fase móvil con el fin formar los pares iónicos correspondientes a cada analito que posteriormente se resuelven de modo satisfactorio en las condiciones cromatográficas propuestas.

#### 7.2.2.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

También coincide con la descrita para el método I en el apartado 7.1.2.2.

#### 7.2.2.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

##### \* Fase estacionaria

Columna cromatográfica de fase reversa TRACER SPHERISORB ODS2 (0.4 cmX 25cm) y diámetro de partícula de 5 $\mu$ .

##### \* Fase móvil

- Fase A: Solución tampón 0.1M: 0.04 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.06M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ajustado a pH=7 con KOH del 30%, que contiene 1.95 mM/l de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio.
- Fase B: Metanol

### \* Programa de elución

Tabla... Programa de elución para la determinación de ATP y sus compuestos de degradación por el método II.

	TIEMPO DE ELUCIÓN (min)	% FASE A	% FASE B
PERIODO DE ELUCIÓN	0	100	0
	5	100	0
	5.2	90	10
	14.2	90	10
PERIODO DE RETORNO Y EQUILIBRIO	14.4	100	0
	25.4	100	0

El programa de elución consta de tres fases. Un primer periodo isocrático, del minuto 0 al 5, en el que eluyen Hipoxantina, IMP, Inosina y AMP y la fase móvil esta constituida únicamente por tampón fosfato que contiene el reactivo formador de par iónico. Se incorpora continuación un 10% de metano para acelerar la salida de los últimos analitos ADP y ATP y se programa la vuelta a las condiciones iniciales manteniendo en periodo es estabilización de 10 minutos.

\***Flujo:** 1.5 ml/min

\***Temperatura:** Ambiente

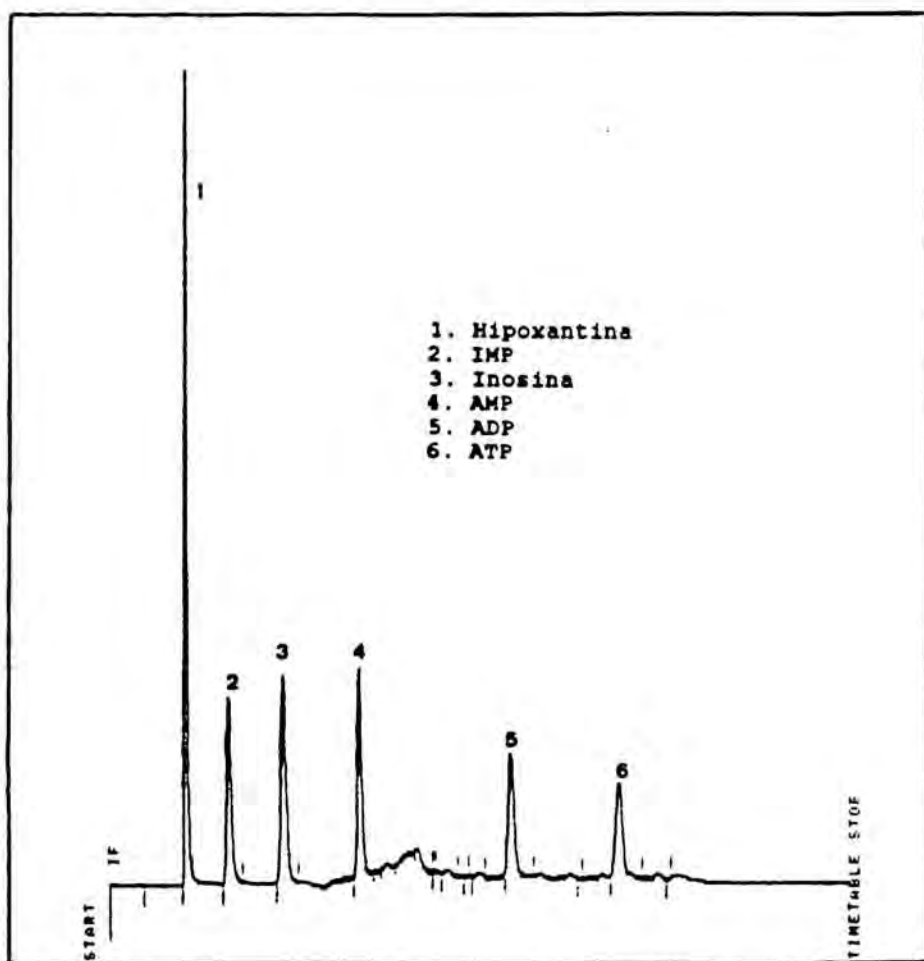
\* **Volumen de inyección:** 20  $\mu$ l

\* **Detección:** Espectrofotométrica a 254 nm.

#### 7.2.2.4 IDENTIFICACION DE PICOS CROMATOGRAFICOS

La identificación de los picos cromatograficos en las muestras se realizó por comparación de sus tiempos de retención con los de las soluciones patrón de ATP y derivados. En la tabla ... se indican los tiempos de retención observados para cada analito, tras la inyección repetida de 10 disoluciones patrón pertenecientes a diferentes concentraciones.





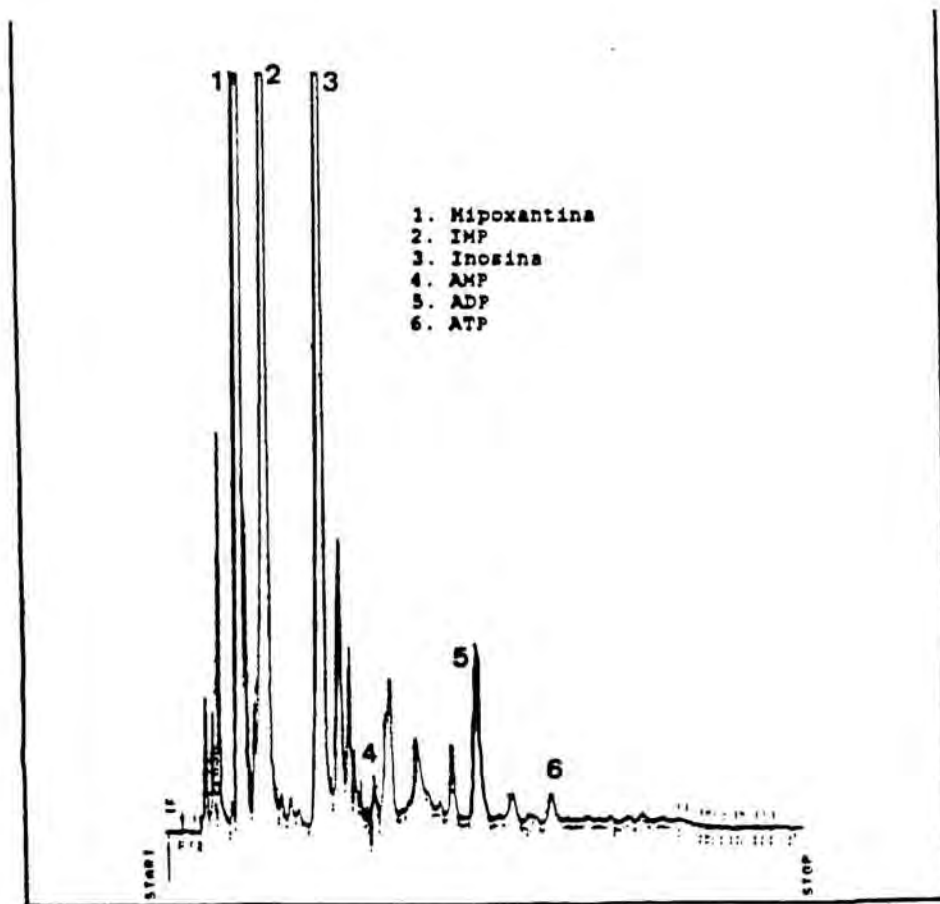
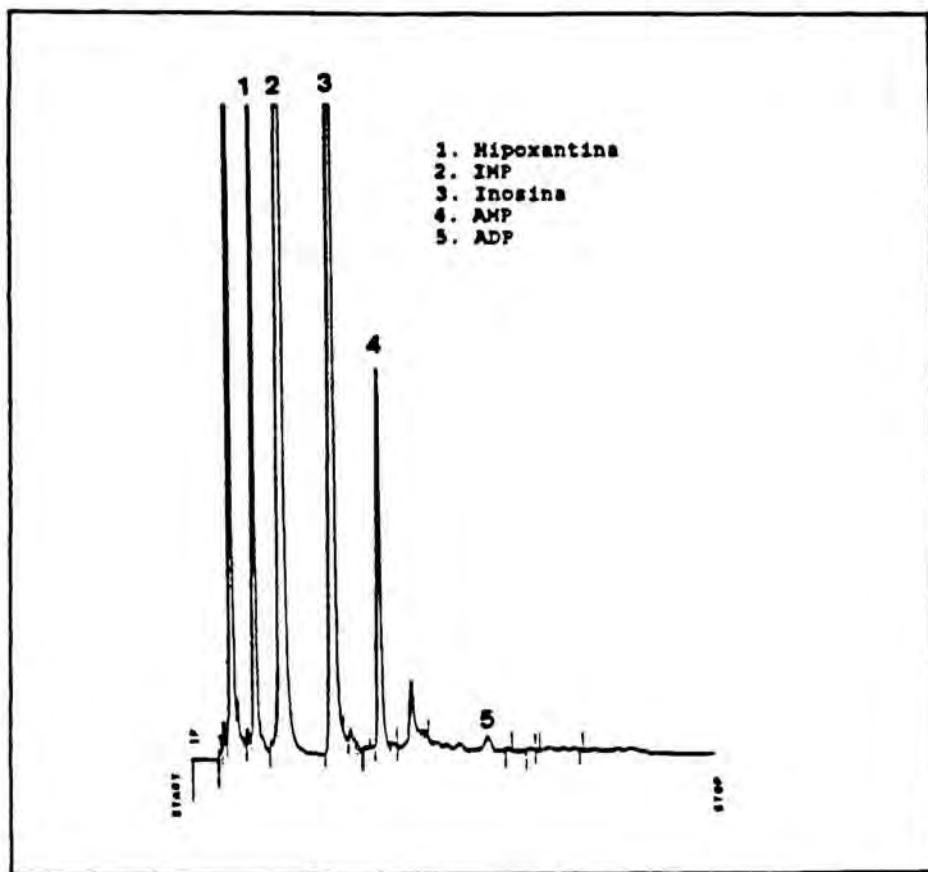


tabla... Tiempos de retención obtenidos tras la inyección de 10 soluciones patrón, en el método II para la determinación de ATP y derivados, inyectadas en días sucesivos.

	Hx	IMP	Ino	AMP	ADP	ATP
X	1.0891	1.68	2.26	3.73	8.03	9.88
DE	0.024	0.028	0.041	0.052	0.160	0.177
CV(%)	2.27	1.69	1.81	1.39	2.02	1.77

Los tiempos de retención resultaron relativamente estables presentando en coeficiente de variación de entre en 1 y el 2.5·%

En las figuras 24, 25 y 26 se muestra un cromatograma correspondiente a una solución patrón de 10µg/g de cada uno de los analitos, de un extracto perclórico de una muestra de semiconserva de atún y de una muestra de semiconserva de anchoa respectivamente.

## 7.2.2. ESTUDIO DE LA VALIDEZ DEL METODO

### 7.2.2.1 LINEALIDAD

Para comprobar la linealidad del método se prepararon soluciones patrón, en tampón fosfato 0.1 pH=7 correspondientes a las siguientes concentraciones: 10, 20, 40, 60, 100, 200, 240 µg/ml.

La determinación de cada una de estas soluciones se efectuó por quintuplicado y las rectas construidas a partir de ellas así como su significación estadística obtenida mediante el análisis de la varianca de la regresión ( apartado 6.3.1) se muestran en la tabla ...

Los coeficientes de determinación indican que en todos los casos más del 99% de la variabilidad de la respuesta y esta explicada por la regresión. De análisis de la varianca se deduce también que en todos los casos la linealidad es correcta puesto que los valores de  $F_{Exp}$  obtenidos son muy inferiores a los que las tablas señalan para el número de datos disponibles. IMP y ATP es son los que presentan valores más bajos de  $F_{Exp}$ , es decir mayor proporción de varianca residual(debida al error experimental) frente a la varianca de la regresión, pero aún así el valor obtenido experimentalmente (14975 y 1266.) son del orden de unas 1000 veces superior al valor marcado por las tablas para un grado de significación  $p=0.001$ . Por todo ello podemos concluir que las rectas construidas para cada analito presentaron una correcta linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado.

tabla... Rectas de calibrado, coeficiente de regresión  $r$ , grado de significación  $p$  y coeficientes de determinación  $R^2$  calculados para el ATP y sus compuestos de degradación determinados por el metodo II.

	Recta de calibrado	$r$	$R^2$	$F_{Exp}$	$p$
Hx	$y = 0.52x + 0.38$	0.9997	99.94	54975	<0.001
IMP	$y = 0.23x + 0.44$	0.9989	99.78	14975	<0.001
Ino	$y = 0.35x - 0.07$	0.9999	99.98	164967	<0.001
AMP	$y = 0.26x + 0.26$	0.9998	99.96	82475	<0.001
ADP	$y = 0.23x - 0.15$	0.9993	99.86	23546	<0.001
ATP	$y = 0.21x - 0.30$	0.9987	99.74	12667	<0.001

$$F_{(1,33 ; 0.001)} = 13.08$$

#### 7.2.2.2 PRECISION

Para determinar la calcular la precesión del método se realizaron 8 determinaciones sucesivas sobre una misma muestra de atún congelado empleado como materia prima en la industria conservera. Los análisis se realizaron dentro en un intervalo de 48 horas y con los mismos reactivos y aparatos.

En la tabla... se muestran los resultados de estas determinaciones su variabilidad en términos de CV(%) y el coeficiente de variación máximo permitido para ensayos **intralaboratorio** calculado según el criterio de HORWITZ. Los contenidos de cada analito en la muestra se expresan en  $\mu\text{g/g}$  en lugar de en  $\mu\text{mol/g}$  como en el resto de la memoria puesto que estas unidades resultan más adecuadas para se tranformación en las requeridas para la aplicación de la formula de HORWITZ (mg/g).

tabla... Precisión del método cromatográfico II para la determinación de ATP y sus compuestos de degradación.

Nº	IMP	ATP	ADP	AMP	Hx	Ino
1	2024	4.51	13.66	30.79	159.37	574.84
2	2058	4.67	12.81	29.66	179.58	534.81
3	1996	4.46	11.81	29.38	160.26	530.28
4	2043	4.49	14.77	31.63	171.33	530.30
5	2064	4.38	13.29	30.51	166.04	578.26
6	1989	4.46	11.81	29.38	152.22	531.18
7	1889	4.49	12.92	27.41	160.06	580.26
8	2054	4.25	11.81	28.25	150.30	525.45
X	2014	4.46	12.78	29.62	162.39	548.45
DE	57	0.12	1.08	1.40	9.69	4.92
CV% <sub>Exp</sub>	2.82	2.66	8.46	4.62	5.96	4.51
CV% <sub>HI</sub>	1.69	19.15	7.26	6.40	4.97	4.12

\*CV%<sub>HI</sub> = coeficiente de variación intralaboratorio máximo permitido según el criterio de HORWITZ (2/3 del interlaboratorio calculado por la fórmula)

Se observa que el ATP y AMP presentan una precisión correcta desde el punto de vista del criterio de HORWITZ para ensayos intralaboratorio, y el coeficiente de variación experimental calculado para el Hx se encuentra muy próximo a este límite. Los valores obtenidos mediante esta fórmula no deben interpretarse de un modo rígido sino que deben tomarse como un carácter orientativo (CASTRO y col., 1989).

Como en el caso del método I se comparó también con los límites propuestos por el criterio de Kolthoff que propone a modo orientativo unos intervalos de coeficientes de variación permitidos en función de la riqueza de la muestra en un determinado analito (CASTRO y col., 1989). Así para analitos en una concentración entre el 0.01 y 0.001% caso del ATP, ADP y AMP estaría permitido hasta un 10% de variación. Si la concentración se encuentra entre 0.1 y 0.01, caso de la hipoxantina y la inosina se permite entre un 5 y un 10% de variación y para concentraciones de entre 0.1 y 1% como sucede en el IMP se marca un intervalo de 2-5 de coeficiente de variación permitido. En definitiva según este criterio la precisión del método resultaría correcta para 5 de los 6 analitos objeto de estudio, ATP, ADP, AMP, Ino, Hx.

En los dos métodos propuestos para la determinación de ATP y derivados por CLAE, la precisión resultó semejante, solo para El IMP, analito presente en la muestra en concentraciones superiores no se obtenían resultados satisfactorios aunque en ambos casos los coeficientes de variación experimental obtenidos no eran muy lejanos a los marcados según los criterios de HORWITZ y Kholtoff.

### 7.2.2.3 EXACTITUD-RECUPERACION

La exactitud del método cromatográfico propuesto se calculó tras el análisis repetido de una muestra adicionada de una cantidad conocida de solución patrón de cada una de los analitos (apartado 6.3.3). Se estudiaron dos niveles de adición cuyo valor fue distinto según el analito considerado. Se trabajó con un nivel de adición I del mismo orden que la cantidad de analito presente en la muestra y con un nivel II en que se adicionaba una cantidad de patrón de aproximadamente el doble en las muestras de concentración baja y de la mitad en las de concentración alta. Así tras una determinación previa del ATP y sus derivados en una muestra de atún fresco se establecieron los siguientes niveles de adición:

	ANALITO EN MUESTRA $\mu\text{g/g}$	NIVEL I $\mu\text{g/g}$	NIVEL II $\mu\text{g/g}$
IMP	2014	2000	1000
ATP	4.25	5	10
ADP	12.79	15	30
AMP	29.62	30	60
Ino	548.45	500	250
Hx	162.36	150	75

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla...donde se especifican las cantidades de cada analito detectadas experimentalmente en la muestra adicionada y los porcentajes de recuperación obtenidos en cada caso. En la tabla... se indican los resultados de la prueba de Cochram para demostrar la independencia de la variabilidad obtenido en los resultados frente a la concentración de analito en la muestra.

Se observa que en todos los casos la C calculada experimentalmente es inferior al valor marcado en las tablas para una  $p=0.05$ ,  $n-1$  grados de libertad y  $K=2$  grupos, por lo que podemos concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los resultados obtenidos en función de la cantidad de analito presente en la muestra.

Finalmente puesto que no se encontraban diferencias entre los dos niveles de adición ensayados se calculó el porcentaje de recuperación medio total y se comprobó si el valor obtenido presentaba diferencias estadísticamente significativas con el valor teórico de 100% (tabla...) Del resultado de este cálculo se deduce que todos los casos, la recuperación media no presento diferencias estadísticamente significativas con el valor hipotético 100.

Tabla... Contenidos de ATP y derivados en las muestras adicionadas de patrones, porcentajes de recuperación.

	NIVEL I		NIVEL II	
	µg/g	RECUPERACION %	µg/g	RECUPERACION
Hx	314.18	100.60	201.25	85.14
	297.35	95.30	263.34	117.04
	295.07	94.57	252.64	106.60
	292.30	93.68	207.93	87.73
	301.44	96.61	212.01	89.45
	374.27	116.96	265.21	111.14
	349.90	111.85	240.32	101.27
	320.32	102.67	235.05	99.17
IMP	3892	96.96	2885	95.71
	3942	98.20	-	-
	4001	99.67	3122	103.58
	3798	94.61	3200	106.17
	4102	102.92	3004	100.02
	3688	91.87	2625	87.09
	3950	98.40	2760	91.57
	3525	87.81	2841	94.26
Ino	730.69	92.02	894.10	85.64
	847.61	106.75	923.25	88.40
	838.41	105.94	1100.50	105.41
	686.76	86.49	968.25	92.72
	690.07	86.91	1125.68	107.82
	725.36	91.35	926.50	88.74
	834.00	105.03	935.00	89.55
	820.00	103.27	980.00	93.86
AMP	63.05	105.75	88.01	98.49
	65.72	110.23	82.37	83.47
	61.30	102.28	101.87	103.30
	56.92	95.47	88.01	98.40
	56.04	94.00	85.32	95.20
	59.25	99.39	91.95	102.60
	59.84	100.37	96.10	107.33
	55.46	93.02	95.45	106.51
ADP	29.00	104.39	45.29	105.89
	26.00	95.15	46.74	109.27
	31.94	114.98	42.25	98.79
	25.85	92.08	38.22	89.34
	28.52	102.66	39.57	92.49
	27.98	100.71	40.98	95.79
	29.05	97.37	44.12	103.13
	26.80	96.47	39.85	93.15
ATP	7.82	84.56	13.25	92.92
	9.50	102.70	14.50	101.75
	9.70	104.86	12.01	84.28
	8.25	89.18	13.70	96.14
	8.60	92.97	15.00	105.26
	8.50	84.86	14.90	104.56
	10.00	108.10	12.98	91.08
	9.50	102.70	13.20	92.62

tabla... Prueba de Cochran para comprobar la independencia de la variabilidad de resultados frente al contenido de analitos en la muestra.

	Variancia I	Variancia II	$C_{Exp}$
Hx	870.12	638.36	0.5768
IMP	41053	3472	0.5450
Ino	7335	4876	0.6006
AMP	41.46	10.70	0.7948
ADP	9.08	3.93	0.6968
ATP	13.76	8.98	0.6051

$$C_{(2, 7, 0.005)} = 0.8332^1$$

tabla... Comparación del porcentaje de recuperación en cada nivel de adición, media global en el metodo II para la determinación de ATP y derivados por CLAE y comparación estadística con el valor teórico del 100%.

	NIVEL I	NIVEL II	GLOBAL	t	GL(n-1)	p
Hx	89.03 ± 32.08	99.69 ± 11.60	100.61 ± 9.91	0.2467	15	<0.001
IMP	96.30 ± 4.75	96.91 ± 6.75	95.54 ± 5.56	2.3759	14	<0.001
Ino	97.22 ± 8.84	94.10 ± 8.20	95.61 ± 8.40	2.0847	15	<0.001
AMP	99.41 ± 7.67	98.40 ± 6.96	99.73 ± 6.63	0.1615	15	<0.001
ADP	100.47 ± 7.12	98.48 ± 7.05	99.47 ± 6.92	0.3011	15	<0.001
ATP	96.57 ± 7.75	95.24 ± 9.44	95.58 ± 5.56	3.0784	14	<0.001

$$t_{(15, 0.001)} = 4.073$$

$$t_{(14, 0.001)} = 4.140$$

<sup>1</sup> Cuando los dos grupos a comparar no poseen en mismo número de datos pero los valores  $n_1$  y  $n_2$  no presentan grandes divergencias, la prueba de Cochran puede efectuarse con un pequeño sesgo utilizando el mayor de los tamaños de muestra, en este caso  $Gl = 8 - 1 = 7$ .



#### 7.2.2.4 LIMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección se calculó mediante el criterio de LONG y WINEFORDNER del análisis repetido de un blanco de muestra (apartado 6.3.4).

Se utilizó como blanco ácido perclórico 0.6N neutralizado con KOH (pH=6.5-7) y filtrado 0.45 $\mu$ m. Este blanco se inyectó 10 veces y se registró el valor numérico del ruido de fondo al tiempo de retención correspondiente a cada analito.

Las lecturas numéricas de este ruido de fondo en el tiempo de retención de cada analito son las que se emplean para calcular  $Y_{bl}$  y su desviación estandar. Se construyeron rectas de calibración de concentraciones bajas (0.25, 0.5, 0.75, 1 y 1.5  $\mu$ g/g) (tabla...)

Tras comprobar los supuestos de aplicabilidad se calcularon los límites de detección y cuantificación mediante la formula propuesta por LONG y WINEFODNER. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla...

Tabla.. Ecuaciones de las rectas de concentración baja empleadas en el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

Hx	$y = 459247X - 55929$	$r = 0.9985$
IMP	$y = 242362x + 3202$	$r = 0.9915$
Ino	$y = 348862x + 10362$	$r = 0.9986$
AMP	$y = 214157x - 5664$	$r = 0.9984$
ADP	$y = 172612x + 59355$	$r = 0.9957$
ATP	$y = 245708x + 2466$	$r = 0.9984$

\* la respuesta y se tomó en este caso en microvoltios.

Como se observa en la tabla ... la sensibilidad del método resultó satisfactoria, los límites de detección y cuantificación resultaron muy bajos y suficientes para el objetivo de nuestro estudio. El analito para el que el método resultó menos sensible, el Inosina presentaba un límite de cuantificación de 4.99 $\mu$ g/g de muestra, cifra muy baja correspondiente a ...  $\mu$ mol/ml

Tabla... Límites de detección y cuantificación para ATP y derivados calculados según el criterio de LONG y WINEFORDNER (1985).

	LIMITE DE DETECCION		LIMITE DE CUANTIFICACION	
	E*	M**	E	M
Hx	0.17	1.08	0.40	2.51
IMP	0.11	0.68	0.19	1.18
Ino	0.30	1.91	0.80	4.99
AMP	0.19	1.17	0.46	2.92
ADP	0.08	0.52	0.23	1.43
ATP	0.06	0.42	0.18	1.11

\* E=  $\mu\text{g/g}$  en el extracto neutro

\*\*M=  $\mu\text{g/g}$  en la muestra de pescado, teniendo en cuenta las diluciones aplicadas (10/25 + 10/25 en el trabajo de rutina)

### 7.3. ESTABILIDAD DE ATP Y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACION

Dado que se reconoce que el ATP y sus derivados son lábiles durante su almacenamiento en determinadas condiciones, se planteó un estudio de estabilidad a lo largo del tiempo de estos analitos mantenidos en distintas condiciones:

- Estabilidad de patrones de ATP, ADP, AMP, IMP, inosina e hipoxantina, en solución en 5 medios distintos y almacenadas a una temperatura 6-8°C.
- Estabilidad del extracto neutralizado mantenido a dos temperaturas distintas: 6-8°C (refrigeración) y -20°C (congelación).
- Estabilidad de ATP y derivados en la muestras de pescado triturada y homogeneizada y mantenida a -20°C.

Se consideró necesario este estudio previo para poder establecer las condiciones de trabajo en la determinación de ATP y derivados, con la confianza de no cometer errores atribuibles a la falta de estabilidad de estos compuestos.

#### 7.3.1 ESTABILIDAD DE PATRONES MANTENIDOS A 6-8°C

Se disolvieron los seis patrones de los analitos objeto de estudio (ATP, ADP, AMP, IMP, Inosina e Hipoxantina) en cinco soluciones diferentes para analizar su respuesta con el tiempo. No se estudió en este apartado el efecto del calor sobre la degradación de ATP y derivados, puesto que se mantuvo la temperatura constante y cercana a 6°C.

Los disolventes utilizados para preparar las soluciones patrón de estudio fueron los siguientes:

- Acido clorhídrico 0.1N
- Acido perclórico 0.6N
- Agua bidestilada neutra
- Solución tampón fosfato pH=7.8
- Solución tampón fosfato pH=7.0

Se planteó el estudio de la estabilidad de patrones en solución ácido porque es común extraer estos analitos del pescado previa precipitación de proteínas en medio ácido.

El agua neutra fue descrita por BURNS y KE (1985) como medio para disolver los patrones de ATP y sus compuestos de degradación y se consideró necesario conocer la estabilidad de los analitos en este medio.

El tampón fosfato pH=7.8 se consideró también porque es el medio en que se disuelve el patrón de hipoxantina en su determinación clásica por el método enzimático de JONES y MURRAY (1964). El tampón a pH=7 se ensayó puesto que el extracto ácido obtenido a partir de las muestras de pescado se neutraliza hasta alcanzar un pH= 6.5-7.

Cada patrón se disolvió por separado en cada una de las soluciones anteriormente comentadas, y se analizó cromatográficamente cada cierto período de tiempo. En las tablas... y ..., se muestran, para cada analito, y en los distintos medios ensayados la respuesta (área) expresada en voltios.

Los resultados de este estudio muestran que:

■ El ATP resultó estable durante los 71 días de estudio sólo en las soluciones tampón a pH=7.8 y pH=7. En agua neutra, a partir de la determinación efectuada el día 28, se observa una disminución del área de aproximadamente el 58% de la respuesta inicial. Se observó también un aumento gradual del área correspondiente al ADP y al AMP que se forman por degradación del ATP en la solución de estudio.

En medio ácido, tanto en la solución clorhídrica como perclórico, el ATP se degrada rápidamente a partir del segundo día de estudio originando ADP y AMP tal como se muestra en la figura 27. Debe matizarse, sin embargo, que la velocidad de degradación es superior en ácido perclórico donde a los 8 días no se detecta, que en clorhídrico en el que se detecta hasta en final del periodo de estudio.

■ EL ADP también resultó estable durante los 71 días de estudio en las soluciones tampón de pH=7.8 y 7. En agua neutra inicia su degradación a partir del día 298, tal como sucedía en el caso del ATP, registrándose en este caso un 43% en la disminución de la respuesta inicial. En la determinación efectuada en día 51 este nucleotido ya no se detectaba en medio acuoso.

En medio ácido, El ADP resultó estable hasta en día 37 en HCL y solamente hasta en día 8 en HClO<sub>4</sub>. También en este caso se confirma la tendencia de que la degradación resulta más rápida en ácido perclórico que en ácido clorhídrico.

■ La Inosina resultó estable a lo largo de los 71 días de estudio en medio ácido, en agua neutra y en la solución tampón de pH=7.8, pero no en la solución tampón pH=7 donde este compuesto no fué ya detectado.

■ La Hipoxantina resultó también estable en los dos medios ácidos ensayados y también en la solución tampón pH=7.8. No lo fue en cambio ni en agua neutra ni en tampón pH=7. En ambos casos se observa una disminución apreciable de la respuesta a partir del día 51 de estudio.

En la tabla .. Se muestran de modo resumido las conclusiones del estudio de estabilidad de patrones de ATP, ADP, AMP, IMP, inosina e hipoxantina en distintos solventes mantenidos en refrigeración durante 71 días.

Tabla.. estabilidad de patrones en distintos medios.

	HCl 0.1N	HClO <sub>4</sub> 0.6N	H <sub>2</sub> O	Tampón pH=7	Tampón pH=7.8
ATP	1 día	1 día	22 días	**	**
ADP	28 días	8 días	22 días	**	**
AMP	**	**	22 días	**	**
IMP	**	**	37 días	**	**
Ino	**	**	**	51 días	**
Hx	**	**	%1 días	51 días	**

\*\* estable a lo largo del periodo de estudio (71 días)

Por tanto, en resumen, se puede concluir que los analitos más inestables en medio ácido resultan el ATP y el ADP, mientras que los demás no presentaron disminución en su respuesta a lo largo de los 71 días de estudio.

A la vista de los resultados de nuestro estudio podríamos considerar el agua neutra como un medio poco idóneo puesto que 3 de los 6 analitos se degradan antes de un mes.

En definitiva los mejores medios resultaron las soluciones tampón fosfato y sobre todo parece más más indicada la de pH= 7., propuesta por JONES y MURRAY para disolver la Hipoxantina en 1964, ya que que todos los analitos resultaron estables al menos durante en periodo de tiempo en que se prolongó en estudio.

Tabla.. Estabilidad de patrones de ATP en solución

DIAS	HCl 0.1N	HClO <sub>4</sub> 0.6N	H <sub>2</sub> O	Tampón pH=7	Tampón pH= 7.8
1	23.59	29.70	21.57	23.19	22.30
2	26.65	10.08	23.25	23.88	22.02
5	17.93	6.55	18.80	23.56	22.62
6	16.60	3.83	21.74	22.61	21.62
7	13.58	2.45	22.33	21.88	19.58
8	13.01	1.65	21.20	22.81	22.84
9	12.35	ND	20.19	23.70	21.81
12	11.52	ND	21.83	21.68	21.49
13	9.95	ND	20.30	22.60	20.42
22	6.14	ND	20.65	24.41	23.44
28	8.47	ND	8.26	18.56	-
37	ND	ND	9.72	24.01	22.19
51	ND	ND	7.50	22.61	21.54
71	ND	ND	ND	ND	21.49
X±DE CV(%)				22.61±1.47 6.49	21.81±1.04 4.7

Tabla.. Estabilidad de patrones de ADP en solución

DIAS	HCl 0.1N	HClO <sub>4</sub> 0.6N	H <sub>2</sub> O	Tampón pH=7	Tampón pH= 7.8
5	23.78	17.70	21.67	24.02	22.22
6	23.37	11.35	21.50	23.95	23.34
7	23.31	15.10	23.06	23.86	23.33
8	20.76	13.69	20.04	22.14	23.01
9	18.83	13.22	19.04	23.40	21.85
12	20.04	8.33	17.75	21.78	20.09
13	20.92	11.33	19.76	21.10	20.77
22	22.76	7.75	21.32	24.70	22.52
28	19.92	3.65	13.60	18.40	-
37	20.31	ND	6.55	22.30	20.70
51	ND	ND	ND	21.04	25.61
71	ND	ND	ND	19.78	24.10
X±DE CV(%)				22.15±1.84 8.33	22.66±1.61 7.14

Tabla.. Estabilidad de patrones de AMP en solución

DIAS	HCl 0.1N	HClO <sub>4</sub> 0.6N	H <sub>2</sub> O	Tampón pH=7	Tampón pH= 7.8
1	28.77	30.47	27.60	31.33	29.31
2	16.96	29.48	29.81	30.01	33.95
5	34.46	33.56	33.54	35.26	34.57
6	32.22	33.87	32.73	34.57	34.40
7	34.07	34.36	33.16	33.22	34.55
8	33.40	33.77	31.37	34.30	34.38
9	32.90	32.71	29.79	30.89	30.20
12	31.17	30.12	31.72	32.26	32.44
13	33.30	31.86	31.14	33.77	28.42
22	35.44	33.54	31.81	36.11	35.70
28	34.47	26.02	16.89	28.45	24.71
37	36.37	35.23	ND	30.11	37.65
51	36.41	33.34	ND	34.85	35.57
71	36.32	33.92	ND	36.26	34.82
X±DS	32.79±4.26	32.30±2.48		32.81±2.51	32.90±3.50
CV(%)	13.00	7.68		7.67	10.60

Tabla.. Estabilidad de patrones de IMP en solución

DIAS	HCl 0.1N	HClO <sub>4</sub> 0.6N	H <sub>2</sub> O	Tampón pH=7	Tampón pH= 7.8
1	28.79	32.30	27.63	26.79	28.93
2	-	26.46	26.55	30.79	29.42
5	32.78	33.70	31.46	31.72	32.74
6	31.12	33.02	31.18	32.13	27.37
7	30.72	32.02	30.50	31.50	32.57
8	25.95	23.48	29.01	34.87	29.28
9	29.03	29.04	29.88	30.71	23.26
12	29.75	31.20	26.99	25.94	30.71
13	27.28	29.66	28.20	27.97	29.10
22	32.49	31.57	29.93	32.76	32.64
28	29.73	30.20	26.76	24.65	21.70
37	32.85	31.63	25.23	33.76	33.57
51	32.33	31.24	ND	32.77	32.75
71	34.21	28.54	ND	29.69	29.14
X±DS	30.50±2.44	30.27±2.74		30.42±3.08	29.51±3.54
CV(%)	8.01	9.07		10.13	12.00

Tabla.. Estabilidad de patrones de Inosina en solución

DIAS	HCl 0.1N	HClO <sub>4</sub> 0.6N	H <sub>2</sub> O	Tampón pH=7	Tampón pH= 7.8
1	35.12	39.46	35.56	70.61	38.74
2	41.17	42.04	35.58	34.45	38.05
5	43.48	43.86	45.81	-	-
6	44.02	44.00	45.01	42.45	44.80
7	44.42	44.49	44.32	41.09	43.05
8	43.07	41.68	43.24	41.27	45.25
9	39.92	40.90	40.04	41.79	40.35
12	34.81	38.88	38.70	38.17	39.59
13	41.72	44.16	38.83	41.10	41.25
22	45.19	32.37	44.99	45.16	47.38
28	44.71	44.66	45.13	-	-
37	45.59	42.52	48.60	47.47	47.88
51	44.76	42.33	47.32	25.57	47.77
71	43.92	41.45	36.50	ND	45.22
X±DS V(%)	42.61±3.37 7.94	41.64±3.34 8.03	42.11±4.46 10.594		43.09±3.72 8.63

Tabla.. Estabilidad de patrones de Hipoxantina en solución

DIAS	HCl 0.1N	HClO <sub>4</sub> 0.6N	H <sub>2</sub> O	Tampón pH=7	Tampón = 7.8
1	63.84	61.96	63.17	119.52	64.32
2	63.58	61.89	69.25	70.45	68.68
5	71.63	71.99	76.05	-	-
6	71.44	71.04	72.92	71.64	77.42
7	70.15	70.60	74.60	70.88	76.04
8	69.00	70.76	72.85	72.96	76.95
9	66.68	68.62	72.25	68.59	71.81
12	65.74	68.98	66.66	70.05	71.12
13	70.79	66.63	70.09	71.41	72.96
22	74.91	75.94	79.46	72.54	82.91
28	71.55	59.53	71.76	34.94	-
37	75.35	77.37	80.17	57.79	83.99
51	75.85	71.81	59.04	ND	80.75
71	71.30	78.10	ND	ND	79.28
X±DS CV(%)	70.16±3 .99 5.68	69.58±5.88 8.02			75.99±6.00 7.98



## 7.3.2 ESTABILIDAD DEL ATP Y DERIVADOS EN EL EXTRACTO NEUTRO OBTENIDO A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE PESCADO

### 7.3.2.1 EXTRACTO MANTENIDO A TEMPERATURA DE REFRIGERACION

Dos extractos neutros A y B, obtenidos a partir de sendas muestras de atún fresco adquirido en el mercado, se guardaron en el refrigerados a una temperatura de 6-8°C y se analizaron cada determinado periodo de tiempo con el fin de estudiar la estabilidad del ATP y sus derivados en este medio. Este estudio se prolongó durante 17 semanas y por duplicado con el fin de dilucidar si el hecho de guardar los frascos protegidos o no de la luz influía en los resultados obtenidos. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla... en la que los frascos protegidos por la luz se señalan como P y los no protegidos como NP.

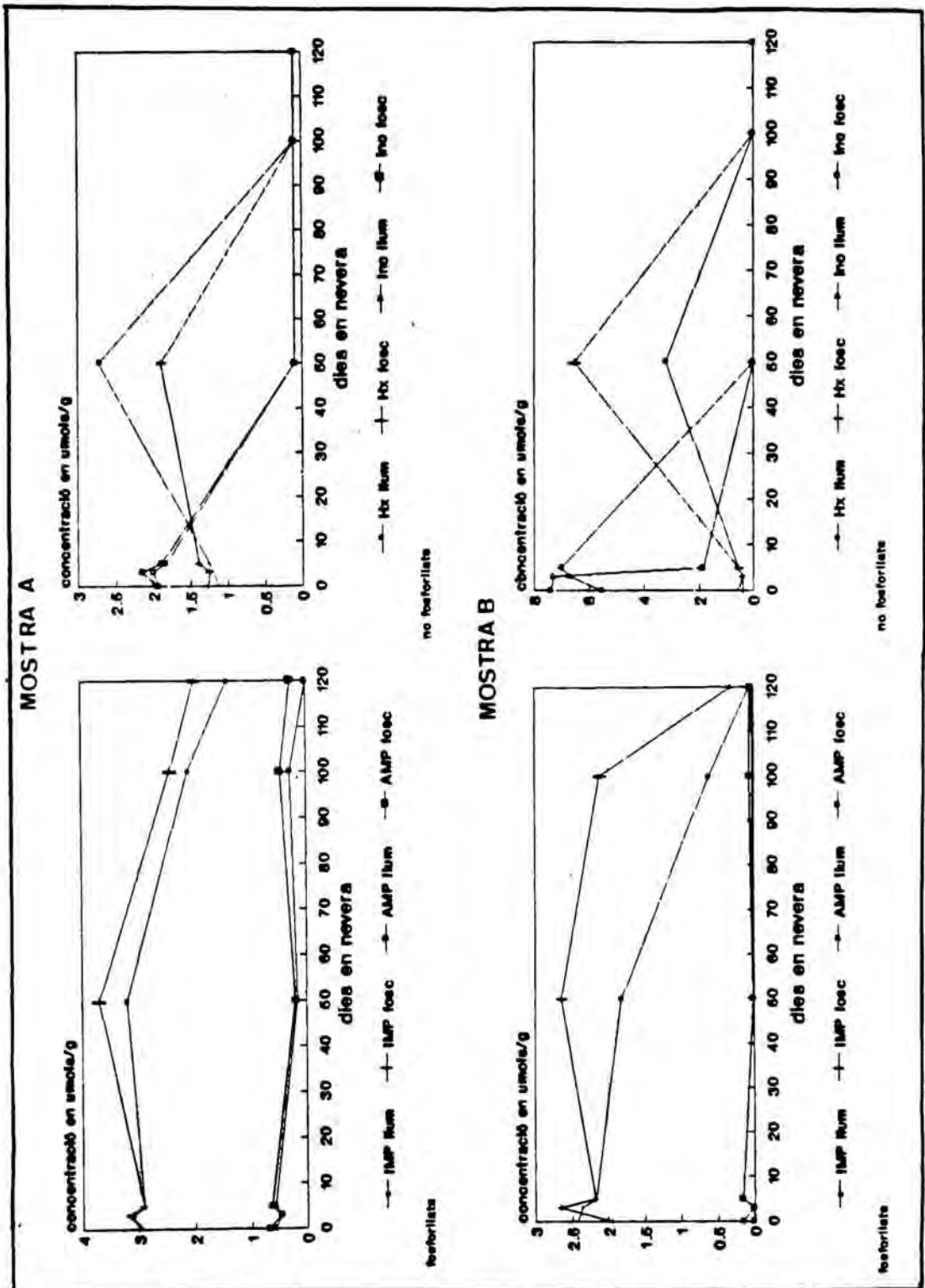
Tal como se muestra en la tabla .. y se observa gráficamente en la figura 27 el ATP y sus derivados, en general no son estables en el extracto neutro mantenido en refrigeración salvo durante periodos de tiempo cortos. Debemos matizar sin embargo, que en cuanto al ATP, ADP, y AMP, no es posible llegar a conclusiones definitivas puesto que los niveles determinados en las muestras objeto de estudio resultaron siempre muy bajos.

IMP, Inosina e Hipoxantina, manifiestan una tendencia a degradarse siguiendo el orden secuencial normal de estos compuestos, es decir, El IMP disminuye de forma gradual, mientras que la inosina lo hace de un modo brusco generando Hx. La concentración de esta último analito también disminuye pero mucho más tardíamente, alcanzándose niveles inferiores a nuestro límite de detección la final del estudio. En cuanto al efecto de protección que puede ejercer el hecho de mantener los frascos protegidos de la luz en la figura .. se observa que en los frascos NP la degradación de IMP, inosina e hipoxantina es ligeramente más rápida.

Tabla... Estabilidad de ATP y derivados ( $\mu\text{mol/g}$ ) en el extracto neutro mantenido en refrigeración.

DIAS	IMP		ATP		ADP		AMP		Hx		Ino		
	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	
A	0	2.4	1.9	ND	ND	ND	ND	0.2	ND	0.6	0.4	5.5	7.4
	3	2.3	2.7	0.5	0.5	ND	ND	ND	ND	0.4	0.4	6.7	7.3
	5	2.2	2.2	ND	ND	ND	ND	0.2	0.2	0.6	0.6	7.0	1.8
	49	1.8	2.6	0.8	0.8	ND	ND	ND	ND	3.2	6.5	ND	ND
	98	0.6	2.1	0.4	0.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	119	ND	0.3	ND	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	0	2.9	3.0	ND	ND	ND	ND	0.6	0.7	1.1	1.2	1.9	1.9
	3	3.1	3.1	ND	ND	ND	ND	0.5	0.5	1.2	1.3	2.2	2.0
	5	2.9	2.9	ND	ND	ND	ND	0.6	0.6	1.3	1.4	1.9	1.8
	49	3.2	3.7	ND	ND	ND	ND	0.2	0.2	2.7	1.9	ND	ND
	98	2.1	2.4	ND	ND	ND	ND	0.3	0.5	ND	ND	ND	ND
	119	1.4	2.0	ND	ND	ND	ND	ND	0.3	ND	ND	ND	ND

Figura 27 Estabilidad del extracto neutro en la nevera



## 7.3.3.

EXTRACTO NEUTRO MANTENIDO EN CONGELACION

Del mismo modo que en el caso anterior, una alícuota de los extractos A y B se mantuvo congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , protegida (P) y no protegida (NP) de la luz. Se efectuaron determinaciones a lo largo del tiempo durante un periodo de 26 semanas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla y se expresan de modo gráfico en la figura 2.8

Ninguno de los analitos objeto de estudio varió significativamente durante el periodo de estudio.

Se puede concluir que está justificada la necesidad de mantener los extractos neutros congelados cuando su análisis no va a ser inmediato, tal como señalan la mayoría de los autores, puesto que la simple refrigeración no resulta efectiva como sistema de protección frente a la degradación de los analitos en este medio.

Tabla... Estabilidad de ATP y derivados en extracto neutro mantenido en congelación.

DIA S	IMP		ATP		ADP		AMP		Hx		Ino		
	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	
A	0	2.2	1.9	ND	ND	0.4	ND	ND	ND	0.5	0.4	6.9	4.6
	3	2.1	1.9	ND	ND	0.1	0.2	ND	ND	0.3	0.3	6.2	6.1
	5	1.6	1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.3	0.3	6.2	6.2
	91	2.1	1.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.5	0.4	-	7.8
	112	2.6	2.3	ND	ND	0.2	0.1	ND	ND	0.7	0.6	-	4.0
	126	2.4	2.2	ND	0.1	0.1	0.1	ND	ND	0.5	0.5	4.9	4.5
	154	2.6	2.7	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.2	0.5	0.6	5.3	5.4
	182	2.6	2.7	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.7	0.7	6.4	6.8
B	0	3.0	3.1	ND	ND	ND	ND	0.7	0.7	1.2	1.3	1.2	1.3
	3	2.9	3.0	ND	ND	ND	ND	0.4	0.4	1.1	1.2	1.9	2.0
	5	2.8	2.8	ND	ND	ND	ND	0.5	0.6	1.2	1.3	1.9	1.7
	91	2.9	3.0	ND	ND	ND	ND	0.4	0.4	1.2	1.3	2.9	2.8
	112	3.2	3.5	ND	ND	ND	ND	0.4	0.4	1.2	1.3	1.7	2.0
	126	3.4	3.2	ND	ND	ND	ND	0.4	0.4	1.2	1.2	2.5	2.2
	154	3.3	3.2	ND	ND	ND	ND	0.4	0.4	1.1	1.1	2.0	1.9
	182	3.4	3.3	ND	ND	ND	ND	0.6	0.6	1.3	1.3	2.1	2.1

