



UNIVERSITAT^{DE}
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^{te} Veciana

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084803

Dos muestras de Atún fresco distintas, adquiridas en el mercado de Barcelona, se trituraron y homogeneizaron. Se envasaron en papel de aluminio en pequeñas fracciones y se congelaron. Estas muestras se mantuvieron congeladas a -20°C y cada determinado período de tiempo se analizó una de las porciones correspondientes a cada una de las dos muestras, con el fin de evaluar si la concentración de ATP y derivados se mantiene constante o bien, si por el contrario, actúan enzimas endógenos variando las concentraciones iniciales. Este estudio se prolongó durante un período de tiempo de 28 semanas.

En la tabla ... se expresan los resultados obtenidos en este estudio y en la figura 29 se representan gráficamente la evolución de los contenidos de los compuestos mayoritarios IMP, inosina e hipoxantina.

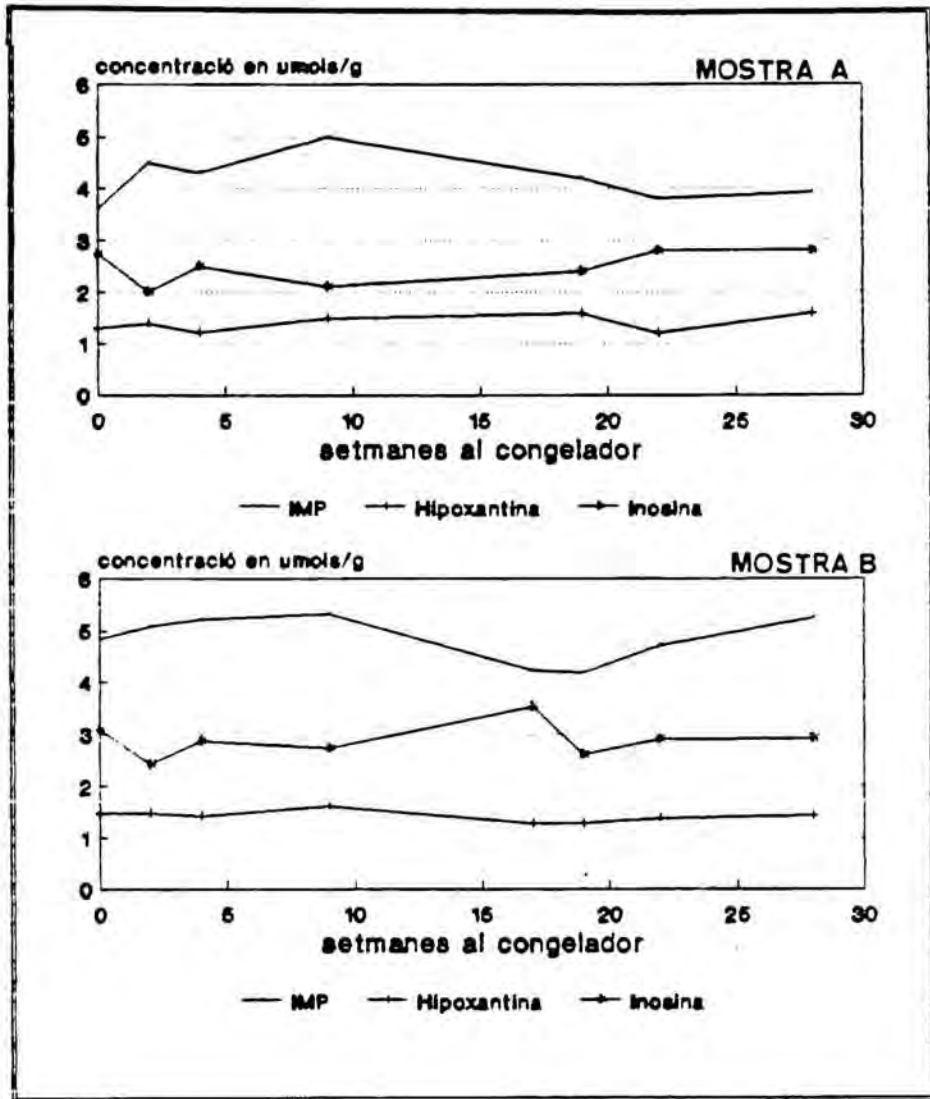
Se observa que en ambas muestras los contenidos de IMP, Inosina e hipoxantina se mantuvieron estables durante las 28 semanas de estudio.

Los coeficientes de variación obtenidos para cada analito considerando las 9 determinaciones efectuadas a lo largo del tiempo, no fueron mucho mayores que los obtenidos en el estudio de la precisión del método I para la determinación de ATP y derivados por lo que se concluye que al menos durante el período de estudio no se degradan los analitos, si la muestras se mantienen congeladas.

Tabla.. ATP y derivados ($\mu\text{mol/g}$) en muestra de atún homogeneizada y mantenida en congelación.

	SEMANAS	IMP	ATP	ADP	AMP	Hx	Ino
A	0	3.60	0.11	ND	ND	1.30	2.75
	2	4.50	ND	0.10	ND	1.40	2.55
	4	4.30	0.22	ND	ND	1.20	2.50
	9	5.00	ND	0.10	ND	1.50	2.50
	17	3.50	ND	ND	ND	1.20	2.95
	19	4.20	0.05	0.15	0.10	1.55	2.45
	22	3.80	0.01	0.10	0.07	1.20	2.80
	28	3.90	0.03	0.10	0.10	1.60	2.80
	X DE CV(%)	4.10 0.50 12.20				1.37 0.16 11.60	2.66 0.18 6.70
B	0	4.80	0.25	0.15	0.10	1.45	3.05
	2	5.10	ND	0.15	ND	1.45	2.45
	4	5.20	0.40	ND	ND	1.40	2.85
	9	5.30	ND	0.05	0.05	1.60	2.75
	17	4.25	ND	ND	0.05	1.30	3.50
	19	4.20	0.10	0.20	0.07	1.30	2.60
	22	4.70	0.05	0.10	0.03	1.40	2.90
	28	5.25	0.35	0.20	0.07	1.45	2.90
	X DE CV(%)	4.85 0.44 9.10				1.42 0.09 6.30	2.87 0.31 10.80

Figura 29. Estabilidad de IMP, Inosina e Hipoxantina en muestra de atún fresco triturada y mantenida en congelación



8. DETERMINACION DE DIMETILAMINA Y TRIMETILAMINA POR CROMATOGRAFIA DE GASES

8.1. FUNDAMENTO Y DESARROLO DEL MÉTODO

El método propuesto para la determinación de **dimetilamina** y **trimetilamina** se basa en la obtención de un extracto ácido del pescado, del cual se extraen los componentes básicos con la ayuda de un disolvente orgánico, previa alcalinización del extracto. La fase orgánica obtenida, se inyecta en un cromatografo de gases equipado con una columna de relleno donde los analitos quedan retenidos y se resuelven, separándose de los interferentes y del disolvente mediante la aplicación de un programa de temperaturas. La detección se efectúa mediante el uso de un detector de ionización de llama (FID).

8.1.1. ENSAYOS PREVIOS A LA DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES FINALES

Tras la revisión bibliográfica de métodos descritos para la determinación de di- y trimetilamina por cromatografía de gases (tabla...) se ensayaron diversas posibilidades y se desarrolló un método tal como se indica a continuación.

Se descartaron los métodos de cromatografía por espacio de cabeza dada la dificultad que presentan en cuanto a repetibilidad si no se dispone de un sistema termostatzado acoplado al sistema cromatográfico.

Los compuestos objeto de nuestro análisis pueden ser extraídos del músculo del pescado previamente triturado y homogeneizado mediante la obtención de un extracto ácido. Tras ensayar los distintos ácidos descritos en la bibliografía para tal fin (clorhídrico, perclórico o tricloroacético) y viendo que se obtenían resultados muy semejantes se eligió al ácido perclórico (GRUGER, 1959; MACKIE y THOMPSON, 1974; TOKOUNAGA, 1977; LUSDSTROM y RACICOT, 1983; MANTEY, 1988; KRZYMIEN y ELIAS, 1990) puesto que a partir del extracto obtenido con ácido perclórico 0.6N es posible también efectuar la determinación analítica tanto de aminas biógenas como del ATP y de sus compuestos de degradación.

A partir del extracto ácido, tras añadir un exceso de reactivo alcalinizante se pueden extraer los componentes básicos con ayuda de un disolvente orgánico. Nuevamente las opciones de elección según la bibliografía consultada son diversas.

Se ensayaron dos disolventes benceno (LUDSTRON y RACICOT, 1983) y tolueno propuesto más recientemente por FIDDER y col. (1991). Para ello se prepararon patrones de concentraciones crecientes de mono-, di- y trimetilamina a los que se añadieron 100 μ l de solución de patrón interno de 100 μ g/ml i que se extrajeron paralelamente y por triplicado con ambos disolventes. los resultados obtenidos en este ensayo de muestran en la tabla.....

Tabla.. Respuesta relativa (área del analito/área del patrón interno) de patrones de mono-, di- y trimetilamina extraídos con benceno (B) y tolueno (T) respectivamente.

MONOMETILAMINA			DIMETILAMINA			TRIMETILAMINA		
μ g/l	B	T	μ g/ml	B	T	μ g/ml	B	T
28	0.029	0.015	22	0.179	0.207	22	0.325	0.229
56	0.049	0.043	44	0.330	0.372	44	0.704	0.685
140	0.065	0.056	110	0.463	0.534	110	1.192	1.336
280	0.152	0.115	220	1.225	1.251	220	2.652	2.897

De acuerdo con los resultados obtenidos se escogió el tolueno como disolvente de extracción puesto que con el se obtuvo una mejor respuesta en cuanto a la di- y la trimetilamina. Aunque con benceno se logró una respuesta más satisfactoria en el caso de la monometilamina su uso se desestimó puesto que este compuesto químico, que tiene interés en el análisis de crustáceos, fue incluido en éste estudio con el fin de evaluar los posibles efectos interferentes debidos a su presencia.

En cuanto a la elección de la columna cromatografica en primer lugar se ensayó y descarto la columna capilar..... aconsejada por el fabricante para al análisis de compuestos amínicos no aromáticos por su incapacidad de separar mono- y dimetilamina incluso a temperaturas de trabajo muy bajas. Además la resolución conseguida entre di- y trimetilamina tampoco fue satisfactoria como se muestra la figura. 30 Los compuestos objeto de este estudio son tan volátiles que se desaconseja su resolución por cromatografía capilar ya que la delgadez de la película de la fase líquida impide que se establezcan interacciones que retengan el analito en la columna el tiempo suficiente para que luego se de una liberación selectiva por efecto de la temperatura.

De entre las columnas de relleno descritas en la bibliografía se eligió una Carbowax 20M 4% / KOH 0.8% 2m/1/4/2mm (MANTEY, 1988; KRUSE y STOCKME 1989 y KRYZMIEN y ELIAS, 1990). Mono-, di- y trimetilamina se resuelven manteniendo el horno a 75°C. Tras éste período isoterma es necesario elevar la temperatura hasta 150°C y mantenerla durante unos 10 minutos a fin de conseguir eliminar el tolueno, disolvente muy pesado cuyo punto de ebullición es de 98°C. En la figura se muestra un cromatograma de una solución patrón de $x\mu\text{g/ml}$ y de una muestra de pescado. Las condiciones exactas de trabajo se describen en el apartado siguiente.

8.2. DESCRIPCION DEL METODO

8.2.1. MATERIAL Y REACTIVOS

Aparatos

- Cromatografo de gases HEWLETT PACKARD 5890 serie II, con detector de ionización de llama (FID)
- Integrador HEWLETT PACKARD 3396 A serie II
- Sistema de almacenamiento y reprocesado de datos. Unidad de discos Hp) 9114B

- Granatario SALTER ELECTROSCALE EB300
- Balanza de precisión ELECTRONIC BALANCE ER 180 A-AND
- Magnetoagitadores A-06 SBS
- Agitador de tubos HEIDOLPH REAX 2000
- Centrífuga CENTRONIC s-577

Reactivos

- Acido perclórico del 70% PA PANREAC
- Solución de ácido perclórico 0.6N
- Hidróxido potásico PA PANREAC
- Solución de hidróxido potásico al 65%
- Tolueno PAR PANREAC

Patrones

- Clorhidrato de Metilamina SIGMA
- Clorhidrato de Dimetilamina SIGMA
- Clorhidrato de Trimetilamina FLUKA
- Clorhidrato de n-Propilamina SIGMA

- Las soluciones patrón de trabajo se prepararon a partir de soluciones madre de aproximadamente 1000 $\mu\text{g/ml}$ cuya concentración exacta se determinó mediante destilación en medio alcalino, recogida sobre ácido bórico y titulación final con ácido clorhídrico 0.01N utilizando como indicador azul de metileno (AOAC, 1990).

8.2.2. PREPARACION DE LA MUESTRA

Obtención del extracto ácido del pescado

Se toman 10 g de músculo de pescado previamente triturado, se adicionan 10 ml de ácido perclórico 0.6N y se agita durante 10-15 minutos.

Se centrifuga a 300 rpm durante 10 minutos y se separa el sobrenadante por decantación/filtración.

El residuo sólido se interpone con 10 ml más de ácido perclórico y se repiten las operaciones de agitación, centrifugación y separación.

Finalmente se reúnen ambos sobrenadantes y se enrasa a 25.0 ml.

Extracción de los componentes básicos volátiles

Una alícuota del extracto perclórico, 1 ml, se introduce en un tubo de rosca. Se añaden 0.1 ml de solución de 100 $\mu\text{g/ml}$ de propilamina como patrón, 1 ml de tolueno, 1 ml de solución de KOH al 65% y se cierra el tubo. Se mantiene a 60°C durante 10 minutos y se somete a agitación magnética durante 2 minutos. Con el fin de precipitar el K_2ClO_4 formado por la adición de KOH y de conseguir una mejor separación entre la fase acuosa y la fase toluénica se centrifugan los tubos herméticamente cerrados a 300 rpm durante 5 minutos. Una alícuota de la fase orgánica superior se inyecta en el cromatografo de gases.

8.2.3. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA.

Se inyecta 1 μ l de la epifase toluénica en un cromatografo de gases bajo las siguientes condiciones.

- **Columna** de vidrio (2mx1/4x2mm) Carbopack B 60/80 con Carbowax 20M 4% + KOH 0.8%.
- **Gas portador** Helio a un flujo de 23 ml/min
- **Temperatura** de: inyector 190°C, y horno según el programa siguiente:

Duración del período (min)	Temperatura de horno (°C)	Programa de temperatura	Función
5	75	Isotermo	Liberación de los analitos
2.5	75 - 150	rampa de temperatura 30°C/min	eliminación del tolueno
10	150	Isotermo	
?	150 - 75	Rampa de temperatura descendente	Recuperación de las condiciones iniciales
1	75	Isotermo	Periodo de estabilización

Detector : FID, temperatura 190 °C

8.2.4. IDENTIFICACIÓN DE PICOS CROMATOGRÁFICOS

Los picos cromatográficos correspondientes a los analitos y al patrón interno se determinaron mediante sus tiempos de retención. Para ello se inyectaron separadamente soluciones patrón de cada uno de estos componentes y se registró su tiempo de retención. En la tabla.. se indican los tiempos de retención obtenidos para cada componente tras la inyección de 10 disoluciones patrón de distintas concentraciones.

Tabla... tiempos de retención obtenidos tras la inyección de 10 soluciones patrón inyectadas en días sucesivos.

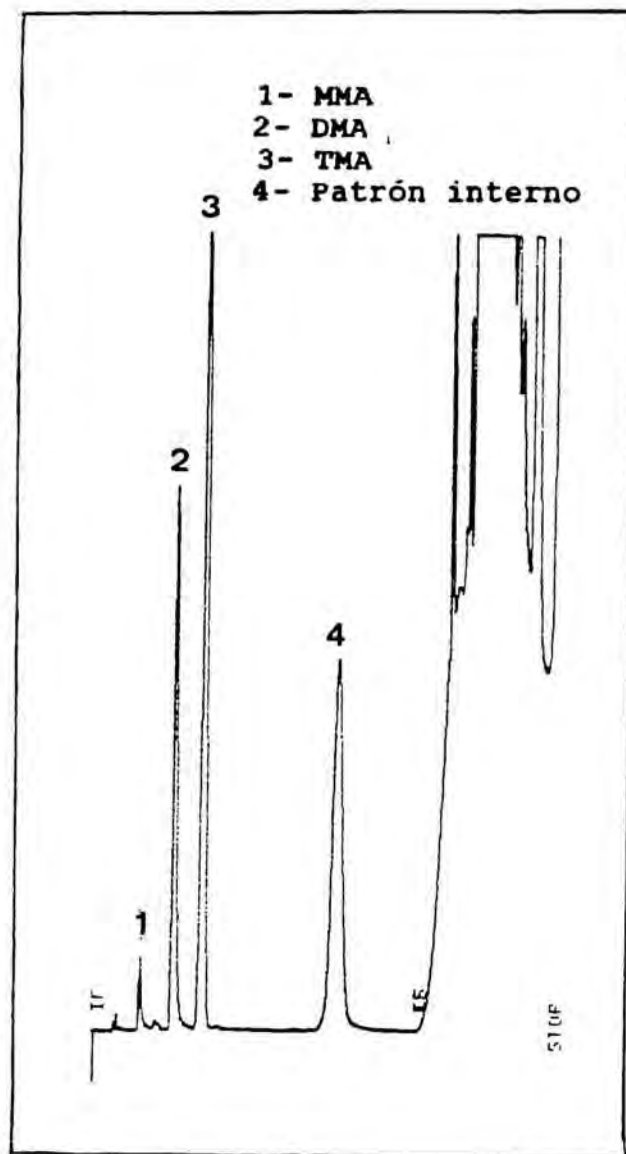
	TIEMPO DE RETENCION MEDIO	DESVIACION ESTANDARD	COEFICIENTE DE VARIACION (CV%)
MMA	0.93	0.02	2.15
DMA	1.56	0.04	2.56
TMA	2.14	0.05	2.33
PA Patrón interno	4.74	0.05	1.05

En las figuras 31 y 32 se muestran los cromatogramas correspondientes a una solución de patrones y a una muestra de pescado donde se han identificado los compuestos objeto de esta estudio. Al inicio no se observa el típico frente de disolvente puesto que el tolueno es mucho menos volátil que los analitos y eluye más tarde.

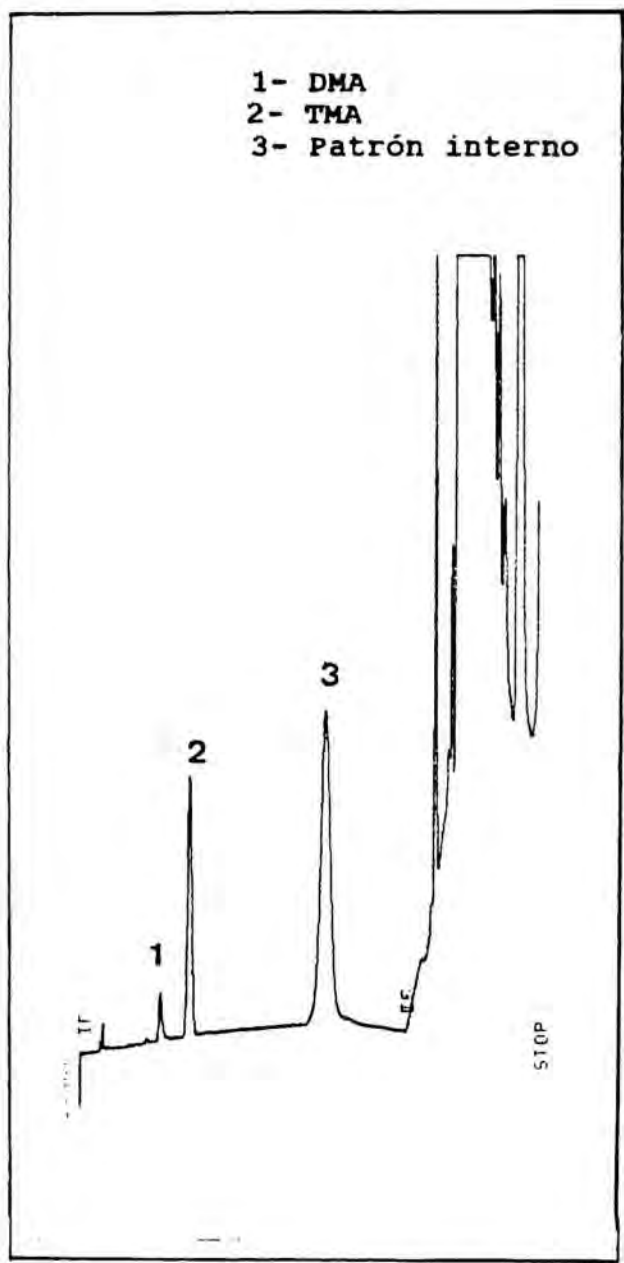
8.2.5. CUANTIFICACIÓN:

El cálculo del contenido de cada analito en las muestras se realizó utilizando rectas de calibrado con patrón interno. Este tipo de calibración es muy frecuente en cromatografía de gases, ya que con ella se eliminan los posibles errores debidos a diferencias en el volumen de muestra inyectado o a la no total volatilización de la muestra en la cámara de inyección.

La rectas de calibrado se prepararon mediante diluciones de las soluciones madre en HCl 0.1N previamente valoradas. Las concentraciones de estas soluciones patrón de



- 1- DMA
- 2- TMA
- 3- Patrón interno



trabajo fueron distintas para cada analito de modo que abarcara un intervalo lineal y adecuado para la cuantificación de cada compuesto. A todas estas soluciones patrón se les añadió una cantidad constante de patrón interno, la misma que se añadiría luego a las muestras objeto de estudio. Las rectas de calibrado se construyeron considerando como respuesta y el valor relativo obtenido del cociente Area patrón/ Area del patrón interno.

8.3 ESTUDIO DE LA VALIDEZ DEL METODO

8.3.1 LINEALIDAD

Para comprobar la linealidad del método se prepararon disoluciones patrón de las siguientes concentraciones:

Monometilamina: 280, 140, 56, 28, 11.2, 2.4 $\mu\text{g/ml}$

Dimetilamina: 220, 110, 44, 22, 8.8, 1.76, 0.19 $\mu\text{g/ml}$

Trimetilamina: 220, 110, 44, 22, 8.8, 1.76, 0.176 $\mu\text{g/ml}$

A cada una de estas disoluciones patrón de trabajo se le añadieron 100 μl de una solución de 100 $\mu\text{g/ml}$ del patrón interno, propilamina. De este modo cada solución de trabajo contiene la misma cantidad de patrón interno que es exactamente igual a la añadida en cada muestra. Se alcaliniza y se extrae con tolueno siguiendo en mismo procedimiento que el descrito para las muestras en el apartado....

Tras 5 inyecciones repetidas de cada una de estas soluciones patrón se calculan las rectas de calibrado entre la respuesta observada (área del patrón/área del patrón interno) y la concentración teórica correspondiente. En la tabla.. se muestran la rectas de calibración correspondientes a cada analito así como su coeficiente de regresión y su significación estadística (apartado ... Validación del metodo).

Tabla... Rectas de calibrado, coeficiente de regresión R, coeficiente de determinación R^2 y significación estadística calculada para MMA, DMA y TMA por cromatografía de gases.

	Recta de calibrado	r	R^2	F_{Exp}	p
MMA	$y = 0.00341x + 0.00085$	0.9967	99.34	4221	<0.001
DMA	$y = 0.05322x + 0.16222$	0.9985	99.70	9312	<0.001
TMA	$y = 0.1100x + 0.4001$	0.9991	99.82	15534	<0.001

$$F_{(1, 28; 0.001)} = 13.39$$

Los coeficientes de determinación indican que en todos los casos más del 99% de la variabilidad de la respuesta (y) esta explicada por la variable concentración de patrón. Del análisis de la varianza de la regresión se deduce que en todos los casos la linealidad es correcta en el intervalo de concentraciones considerado. Los valores de F_{Exp} obtenidos son muy inferiores a los que las tablas señalan para el numero de datos disponibles. La MMA es el analito que presente la F_{Exp} inferior, es decir la mayor proporción de varianza residual, pero aún así el valor obtenido experimentalmente $F=4221$ resulta del orden de 300 veces superior al valor límite marcado por las tablas para considerar la linealidad correcta asumiendo en nivel de riesgo del 0.001. Por todo ello se puede concluir que las rectas construídas con la respuesta relativa de cada analito frente al patrón interno presentaron una linealidad correcta en el intervalo de concentraciones considerado.

8.3.2. PRECISIÓN

Para evaluar la precisión del método, entendida como la concordancia entre medidas repetidas efectuadas sobre una misma muestra en condiciones constantes y determinadas se analizó 8 veces una muestra de atún congelado empleado como materia prima en una industria conservera. Estas 8 determinaciones analíticas fueron efectuadas por el mismo analista, con los mismos reactivos y aparatos y en un intervalo de tiempo de 48 horas. En la tabla ... se muestran los resultados obtenidos así como sus coeficientes de variación experimentales y los teóricos para ensayos intralaboratorio aplicando el criterio de Horwitz. La monometilamina no fué detectada en la muestra y no se incluyó en el estudio de la exactitud del metodo.

tabla...Precisión en la determinación de DMA y TMA con el método cromatográfico propuesto.

DETERMINACIÓN	DIMETILAMINA	TRIMETILAMINA $\mu\text{g/ml}$
1	7.72	7.22
2	8.21	7.49
3	8.21	7.38
4	9.20	6.29
5	8.71	7.67
6	8.71	6.85
7	9.20	7.25
8	9.00	7.27
X	8.63	7.18
DE	0.5317	0.4295
$CV(\%)_{exp}$	6.16	5.98
$CV\%_{HI}^*$	5.78 - 7.07	5.94 - 7.93

* $CV\%_{HI}$ Coeficiente de variación intralaboratorio máximo según el criterio de HORWITZ (de 1/2 a 2/3 de coeficiente interlaboratorio calculado por la fórmula).

Se observa que tanto para en caso de la DMA como para la TMA los coeficientes de variación experimentales son inferiores a los marcados determinado según el criterio de Horwitz para ensayos intralaboratorio, incluso tomando el criterio más exigente (de 1/2 del coeficiente de variación calculado a partir de la fórmula de Horwitz para ensayos interlaboratorio). Por lo tanto se puede considerar que el método resulta correcto en cuanto a precisión para ambos analitos.

Además se efectuó un estudio para determinar la variabilidad debida al sistema cromatográfico mediante inyecciones repetidas de una solución patrón que contenía 13 $\mu\text{g/ml}$ de DMA y TMA, 15 $\mu\text{g/ml}$ de MMA 10 $\mu\text{g/ml}$ del patrón interno. Los resultados obtenidos expresados en $\mu\text{g/ml}$ se muestran en la tabla...

tabla... Variabilidad de resultados debida al sistema cromatográfico.

ANÁLISIS n ^o	MONOMETILAMIN A $\mu\text{g/ml}$	DIMETILAMINA $\mu\text{g/ml}$	TRIMETILAMINA $\mu\text{g/ml}$
1	15.38	13.44	13.16
2	14.79	13.36	13.07
3	16.29	13.05	12.81
4	15.72	12.96	12.87
5	15.44	12.90	12.34
6	15,53	12.92	12.83
7	14.59	12.89	12.96
8	16.00	13.11	12.96
X	15.46	13.07	12.87
DE	0.5688	0.2154	0.2467
CV (%)	3.67	1.64	1.94

Se observa que los coeficientes de variación experimental de las distintas inyecciones de la misma solución patrón son muy bajos tanto para la DMA (1.64%) como para la TMA (1.94) de modo que la variabilidad debida al sistema cromatográfico vendría a representar el 28.42% y el 30.07% de la variabilidad total del método con respecto a estos 2 analitos. Las variaciones observadas en la determinación de MMA fueron sensiblemente superiores presentando un CV de 3.67% . Como ya se comento en el apartado... el tolueno no es el disolvente óptimo para la determinación de MMA puesto que usándolo se obtienen respuestas muy bajas y rectas de calibración con una pendiente muy poco pronunciada. De este modo pequeñas variaciones de la respuesta nos conducen a resultados muy distinto hecho que en parte podría explicar la menor precisión en la determinación de MMA.

8.3.3. EXACTITUD - RECUPERACION

La exactitud expresa la capacidad de un método analítico para proporcionar resultados lo más próximos posible al valor real. Matemáticamente se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra.

Para el cálculo de la exactitud de adicionaron a una muestra de atún congelado, que había sido analizado con anterioridad en las pruebas de precisión del apartado anterior, cantidades conocidas de MMA, DMA y TMA. Se trabajó con 2 niveles de adición distintos y se efectuaron 8 determinaciones repetidas desde el inicio del proceso analítico para cada uno de ellos.

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla.. donde se indican los contenidos de cada analito en la muestra, las detectadas experimentalmente en las muestras adicionadas así como el porcentaje de recuperación obtenido en cada caso. En la tabla .. se indican los resultados de la prueba de Cochram para demostrar la independencia de la variabilidad obtenida en los resultados frente a la concentración de analito en la muestra.

Tabla... Contenidos de MMA, DMA y TMA en muestras adicionadas de patrones y porcentaje de recuperación.

ANALITO X±DE*		NIVEL I 55µg/g		NIVEL II 110 µg/g	
		µg/g	RECUPERACION	µg/g	RECUPERACION
MM A	ND	65.87 65.02	118.00 98.58	116.1 110.2	105.4 92.08
		54.22 54.75	108.00 99.54	102.7 95.5	94.39 93.36
		54.75 58.85	99.54 92.04	103.9 95.5	86.89 94.51
		50.62 54.11	107.04 98.39	11.3 97.8	101.2 88.94
DM A	8.30 ±.53	59.37 60.00	93.31 94.29	109.9 104.6	92.62 88.14
		64.00 68.00	100.58 108.83	120.0 116.3	101.3 98.01
		55.25 64.50	86.83 101.36	115.2 109.4 114.8	97.13 92.26
		67.75 62.10	106.47 97.63	119.0	96.79 99.49
TM A	7.18 ±.43	72.25 67.12	109.8 104.02	119.1 123.2	101.8 104.2
		65.50 64.24	102.3 102.35	119.7 109.3	102.2 93.33
		54.87 66.00	88.50 97.64	102.2 117.4	87.21 100.2
		62.62 63.62	96.70 96.70	104.2 127.7	88.98 108.9

* Contenido medio (n=8) en una muestra de atún congelado tras 8 determinaciones

Tabla... Prueba de Cochran para comprobar la independencia de la variabilidad de resultados frente al contenido de analito en la muestra.

	VARIANCIA I	VARIANCIA II	C_{Exp}
MONOMETILAMINA	30.39	66.79	0.3127
DIMETILAMINA	18.95	27.67	0.5999
TRIMETILAMINA	23.89	83.59	0.7777

$$C_{(2,7; 0.05)} = 0.8332$$

Para los tres analitos la C de Cochran calculada experimentalmente resultó inferior al valor marcado por las tablas para comparar $K=2$ grupos de 8 casos cada uno (0.8332). Ello significa que las variancias de los valores medios obtenidos en los dos niveles de adición considerados son equivalentes, es decir que la exactitud no depende de la concentración del analito presente en la muestra.

Finalmente y para calcular si la exactitud del método, expresada en porcentaje de recuperación, es aceptable, se ha comparada la media global obtenida para cada analito con el valor hipotético del 100%.

Tabla.. Porcentaje de recuperación en cada nivel de adición , porcentaje global obtenido para cada analito en el metodo propuesto para la determinación de MMA, DMA y TMA y comparación estadística con el valor hipotético del 100%.

	NIVEL I $\bar{X} \pm DE$	NIVEL II $\bar{X} \pm DE$	GLOBAL $\bar{X} \pm DS$	t	GL (n-1)	p
MMA	102.64 ± 8.01	94.59 ± 6.09	98.61 ± 8.03	1.3813	15	<0.001
DMA	98.66 ± 7.21	95.72 ± 4.35	97.19 ± 5.95	1.3357	15	<0.001
TMA	99.75 ± 6.34	98.35 ± 7.68	99.05 ± 6.84	0.3925	15	<0.001

$$t_{(15, 0.001)} = 3.9665$$

Para todos los analitos la t espermental calculada resultó inferior al valor marcado por las tablas para el número de datos disponible. Ello demuestra que las medias globales del porcentaje de recuperación para cada analito no presentan diferencias estadísticamente significativas con el valor hipotético de 100 por lo que la exactitud del método puede considerarse correcta.

8.3.4. SENSIBILIDAD: LIMITE DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION

Los límites de detección y cuantificación se determinaron siguiendo el método del análisis repetido de un blanco propuesto por LONG y WINEFODNER (1985).

El blanco se obtuvo a partir de una solución de ácido perclórico 0.6N, adicionada de 100 µg/ml de patrón interno, alcalinizada y extraída con tolueno tal como se procedía en la preparación de la muestra. Este blanco se inyectó 10 veces y se registraron las lecturas, en forma de área relativa (área /area de patrón interno), correspondientes al ruido de fondo al tiempo de retención de cada analito.

Se prepararon soluciones patrón de concentración baja (5.28, 3.7, 1.7, 0.9 y 0.35 µg/ml para TMA y DMA; 8.8, 5.28, 3.7 y 1.7 para MMA). Se Añadieron 100µg/ml de patrón interno a cada disolución. Se alcalinizaron, extrajeron con tolueno y se pincharon en el sistema cromatográfico para posteriormente calcular las rectas de calibrado entre la concentración de analito y su respuesta relativa frente al patrón interno (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 para el calculo de los límites de detección y cuantificación de MMA, DMA y TMA.

MONOMETILAMINA	$y = 0.00465x - 0.0114$	$r = 0.9974$
DIMETILAMINA	$y = 0.04442x + 0.0210$	$r = 0.9990$
TRIMETILAMINA	$y = 0.11521x + 0.00603$	$r = 0.9990$

Tabla.. Límites de detección y cuantificación calculados según el criterio de LONG y WINEFODNER para MMA, DMA y TMA.

	LIMITE DE DETECCION		LIMITE DE CUANTIFICACION	
	E *	M **	E	M
MMA	0.67	1.67	1.65	4.19
DMA	0.44	1.10	1.09	2.73
TMA	0.15	0.38	0.40	1.01

* E = µg/g en el extracto ácido

**M = µg/g en la muestra de pescado, teniendo en cuenta las diluciones
trabajo de rutina)

aplicadas (10g/25ml en el

De los resultados de este estudio se deduce la sensibilidad del método resultó adecuada para los objetivos de nuestro trabajo. El analito para el que el método resultaba menos sensible, la MMA, con un límite de cuantificación de $4.19 \mu\text{g/ml}$ solo se incluyó en el estudio con el fin de asegurarnos de que no interfería, de hecho la determinación de este compuesto solo tiene interés en algunos invertebrados marinos y no se han encontrado datos al respecto referentes a las especies animales objeto de estudio en esta memoria.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

8. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS DURANTE EL ALMACENAMIENTO / DETERIORO DEL PESCADO.

Existen en la bibliografía numerosas referencias de estudios en los que se relaciona la formación de determinadas aminas biógenas con el deterioro de pescado. Estos trabajos son difíciles de agrupar, puesto que en cada caso se estudian unas determinadas aminas biógenas en distintas especies de pescado, generalmente autóctonas de la región en que se ha efectuado el trabajo. Aunque la mayoría de los trabajos se refieren a la formación de histamina, el conocimiento del papel potenciado de otras aminas biógenas y el desarrollo de las técnicas instrumentales que permiten la determinación simultánea de varios de estos compuestos, el interés ha derivado también hacia el estudio conjunto de otras aminas biógenas.

Diversos autores proponen la determinación de una o varias aminas biógenas como índices para determinar la calidad higiénico sanitaria del pescado (apartado 5.5), aunque la histamina ha sido la amina biógena más estudiada y es la única sobre la que existen recomendaciones o limitaciones legisladas. YAMANAKA y col. (1986, 1987b, 1987c, 1989b) y YAMANAKA (1989), tras realizar estudios de descomposición acompañados de la determinación simultánea de varias aminas biógenas, proponen la determinación de aminas biógenas distintas en función del tipo de pescado.

Por ello, se planteó el estudio de los niveles de aminas biógenas: histamina, tiramina, serotonina, triptamina, β -feniletilamina, putrescina, cadaverina, agmatina, espermina y espermidina en dos especies de pescado de amplio consumo en nuestro país, ya como pescado fresco o como materia prima en la elaboración de derivados.

Generalmente el seguimiento del proceso de descomposición del pescado se efectúa mediante la valoración organoléptica, recuentos microbianos o con el uso de otros compuestos químicos de carácter volátil, clásicamente empleados como evaluadores del pescado. En este trabajo paralelamente a la determinación de aminas biógenas, se determinó el contenido en ATP y sus compuestos de degradación, el contenido de DMA y TMA y el valor del pH a lo largo de todo el período de estudio. Los ensayos efectuados sobre atún se realizaron en colaboración con la Unidad de Higiene e Inspección de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

8.1 ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS Y OTROS PARÁMETROS QUÍMICOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO DESCOMPOSICIÓN DE BOQUERÓN.

El boquerón *Engraulis encrasicolus* es de frecuente consumo en España como pescado fresco en el período de tiempo comprendido entre finales de Mayo y Septiembre-Octubre. Al mismo tiempo es empleado como materia prima en la industria de elaboración de semiconservas de anchoa centralizada principalmente el la costa cantábrica y el Norte de las costas catalanas.

8.1.1 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS

Se diseñó un ensayo encaminado a conocer la evolución de las 10 aminas biógenas objeto de estudio en esta memoria a lo largo del proceso de almacenamiento deterioro del boquerón. Para ello se adquirieron 10 Kg de boquerón fresco, capturado en la bahía de Rosas, procedentes de un mercado central de Barcelona y suministradas directamente por un mayorista que se trasladaron el laboratorio en condiciones de refrigeración.

Los ejemplares de boquerón se distribuyeron aleatoriamente en tres lotes de estudio

- a) lote mantenido a temperatura constante en una cámara termostatzada a $20 \pm 1^\circ\text{C}$
- b) lote mantenido en condiciones de refrigeración a $8-10^\circ\text{C}$
- c) lote control mantenido a -20°C

Se tomaron 6 muestras en el momento de llegar al laboratorio y su valor medio de las cuales se consideró como valor de la muestra inicial. La toma de muestra se efectuó cada 4-6 horas en el lote mantenido a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, cada 8-12 en las muestras mantenidas en refrigeración y a las 52 y 97 horas de iniciado en el estudio en las muestras control congeladas a -20°C . La toma de muestras del lote control se hizo coincidir con el momento final del período de estudio de los lotes mantenidos a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y $8-10^\circ\text{C}$ respectivamente.

Cada toma de muestra se efectuó tomando 10 boquerones al azar pertenecientes el mismo lote que se limpiaban, evisceraban y homegeneizaban para proceder a su posterior análisis. La toma de muestras se efectuó por duplicado y, tanto en el punto final de cada estudio como las muestras control se efectuó por sextuplicado con el fin de poder determinar, en los casos en que no se observara una clara evolución, si los contenidos finales de aminas biógenas, ATP y derivados o DMA o TMA, alcanzados eran significativamente distintos de los determinados en la muestra inicial mediante una comparación de medias.

8.1.2 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS

8.1.2.1 CONTENIDOS INICIALES Y MUESTRAS CONTROL.

En las tablas ... se muestran los contenidos de aminas biógenas en la muestra inicial, analizada inmediatamente a la llegada al laboratorio y en las muestras control tomadas tras 52 y 97 horas de almacenamiento a -20°C . Se indica también su valor medio y desviación estandar necesarios para el cálculo del intervalo de confianza del 95%, posteriormente utilizado como criterio para determinar a partir de que momento las muestras mantenidas a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $6-8^{\circ}\text{C}$ presentaban contenidos distintos de los iniciales.

En la tabla ...se observa que los contenidos de aminas biógenas en la muestra inicial fueron en general muy bajos. De las 10 aminas objeto de estudio solo se detectaron 9 y como era de esperar para muestras de pescado fresco espermidina y espermina, cuya presencia se considera normal en este tipo de productos fueron los analitos cuantificados en mayor cuantía, 2.95 y 6.94 $\mu\text{g/g}$ respectivamente.

Aunque existen estudios en que se demuestra que no se forma histamina durante almacenamientos prolongados a bajas temperaturas (SCHULZE y ZIMMERMANN, 1982; LHOS y KÄMPKE, 1980), sin embargo, BALDRATTI y col. (1980) describen la formación de 15 mg/100g de este compuesto en caballa congelada. Ante esta circunstancia, la escasez de datos referentes al comportamiento de otras aminas biógenas y la imposibilidad de analizar todas las muestras inmediatamente después de su toma debido al alto número generado en poco tiempo, estas se mantuvieron en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis y se tomaron las muestras control I y II con la finalidad de poder calcular un factor de corrección se efectivamente se registrara algún cambio en las muestras mantenidas a -20°C .

Los resultados obtenidos en las muestras control I y II fueron muy semejantes a los obtenidos en la muestra inicial de modo que cualquier evolución observada en los contenidos de aminas biogenas a lo largo del estudio podría ser atribuible al tiempo en que las muestras fueron mantenidas a $8-10^{\circ}\text{C}$ o $20 \pm 0^{\circ}\text{C}$ y no al período de tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta el análisis, que nunca fue superior a 4 días.

Tabla.. Contenidos de aminas biogenas ($\mu\text{g/g}$) en muestras iniciales (In) y en muestras control (I) y (II) correspondientes a 52 y 97 de almacenamiento a -20°C .

	INICIAL (n=6)		CONTROL I (n=6)		CONTROL II (n=6)	
	X	DE	X	DE	X	DE
HIS	0.50	0.55	1.00	0.55	1.00	0.69
TIR	0.55	0.63	0.22	0.35	0.75	0.64
SER	ND	-	ND	-	ND	-
β -FEN	1.50	0.45	1.75	0.60	1.40	0.20
TRIP	0.10	0.15	ND	-	0.10	0.22
PUT	0.15	0.11	0.25	0.24	0.40	0.35
CAD	0.11	0.07	0.15	0.15	0.25	0.18
AGM	0.65	0.30	0.25	0.25	1.24	0.71
ESPD	2.95	1.04	2.45	0.60	2.22	0.55
ESPM	6.35	2.18	6.55	1.33	5.75	1.75

X = Contenido medio

DE= Desviación estandard

8.1.2.2 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIÓGENAS EN BOQUERON MANTENIDO A $8-10^{\circ}\text{C}$ Y $20\pm 1^{\circ}\text{C}$.

los resultados obtenidos a lo largo del ensayo de almacenamiento / descomposición del boqueron a las 2 temperaturas de estudio se muestran en las tablas ... a Las aminas biógenas se han agrupado por su estructura química en aminas aromáticas (histamina, tiramina, β -feniletilamina, serotonina y triptamina) y poliaminas y diaminas (putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina y espermina).

Los perfiles de evolución de las aminas biógenas fueron semejantes a las dos temperaturas de ensayo a pesar de que, evidentemente, a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ la velocidad de formación y los niveles máximos alcanzados en las aminas biógenas en que se observó una clara formación resultaron superiores. Por ello se ha abordado el análisis y comentario de los resultados obtenidos en ambos ensayos de un modo global.

Tabla... Niveles de aminas aromáticas ($\mu\text{g/g}$) a lo largo de la descomposición del boquerón *E. encrasicholus* mantenido a 8-10 °C.

Horas	HIS	TIR	β -FEN	SER	TRIP
2	0.50	0.55	1.60	ND	ND
9	1.15	3.65	1.90	ND	1.05
16	2.90	5.85	2.60	ND	1.65
23	8.90	8.30	2.50	ND	1.50
35	20.65	11.55	3.15	ND	1.20
47	217.25	105.55	5.75	ND	11.70
59	331.40	126.85	7.65	ND	12.30
71	688.45	248.05	11.80	ND	17.25
84	1129.55	279.85	22.30	ND	18.85
97	1505.75	376.45	37.50	ND	42.90

tabla.. Niveles de diaminas y poliaminas ($\mu\text{g/g}$) a lo largo de la descomposición del boquerón *E. encrasicholus* mantenido a 8-10°C

Horas	PUT	CAD	AGM	ESPD	ESPM
2	0.15	0.10	0.65	2.95	6.35
9	1.05	1.40	3.60	3.45	9.75
16	1.15	3.05	6.25	3.70	8.25
23	1.85	8.05	19.10	4.40	7.10
35	3.10	15.30	45.51	4.05	6.90
47	9.00	175.15	180.75	5.95	5.55
56	16.40	229.40	119.40	4.90	6.35
71	82.10	397.95	84.40	7.85	5.80
84	107.00	467.00	38.25	8.40	5.50
97	114.10	575.25	13.70	6.90	5.75

Tabla... Niveles de aminas aromáticas ($\mu\text{g/g}$) a lo largo de la descomposición del boquerón *E. encrasicholus* mantenido a $20\pm 1^\circ\text{C}$.

Horas	HIS	TIR	β -FEN	SER	TRIP
2	0.50	0.55	1.60	ND	ND
4	2.05	3.85	1.15	ND	ND
8	1.20	0.85	1.35	ND	ND
12	4.50	4.05	2.00	ND	0.65
16	33.05	25.80	2.75	ND	0.60
22	380.70	71.20	3.95	ND	1.15
26	1235.55	132.00	16.85	ND	2.15
30	596.10	126.95	45.70	ND	3.15
35	1769.00	144.10	34.45	ND	2.10
40	2228.95	167.90	53.55	ND	4.30
48	3707.85	201.45	63.15	ND	5.95
52	2648.30	319.00	88.65	ND	12.40

Tabla... Niveles de diaminas y poliaminas ($\mu\text{g/g}$) a lo largo de la descomposición del boquerón *E. encrasicholus* mantenido a $20\pm 1^\circ\text{C}$.

Horas	PUT	CAD	AGM	ESPD	ESPM
2	0.15	0.10	0.65	2.95	6.35
4	0.20	0.35	1.95	3.55	4.20
8	0.65	0.75	2.25	2.35	4.40
12	1.15	10.55	19.10	4.00	8.10
16	2.20	62.75	75.35	4.45	4.05
22	4.65	172.10	193.70	2.90	5.85
26	27.90	601.55	86.35	5.20	6.30
30	80.55	511.45	24.65	5.00	7.05
35	112.45	514.60	4.50	6.50	4.20
40	101.95	478.95	2.20	4.05	7.10
48	144.40	443.95	1.45	7.35	5.15
52	183.45	653.50	0.65	6.95	5.50

Independientemente de su estructura química, las aminas biógenas presentaron comportamientos diferentes entre sí, que generalmente fueron similares a los dos temperaturas de ensayo.

Serotonina, no detectada en la muestra inicial, tampoco se detectó en ningún momento ni durante las 52 horas de estudio a 20 ± 1 °C ni durante las 97 horas en que las muestras se mantuvieron a 8-10°C. Aunque esta amina biógena podría formarse a partir de triptófano, su aminoácido precursor, con la mediación de reacciones de descarboxilación e hidroxilación, no se han encontrado en la bibliografía consultada referencias de la presencia o formación de esta amina en pescados y derivados.

En las muestras mantenidas a 8-10°C los contenidos de **espermidina** (Tabla..) presentan una tendencia que podría interpretarse como de ligero aumento en el tiempo ($r=0.8960$ y $p<0.001$). No debe, sin embargo adjudicarse demasiada importancia a este hecho puesto que la pendiente de la recta obtenida es muy baja (0.0527) lo que indicaría, que de existir formación esta sería muy lenta. Además, se observa que la variabilidad a lo largo del tiempo expresada en forma de variancia total (3.70) no resulta estadísticamente distinta de la que presentaban los contenidos de esta amina en las 6 muestras que constituían el punto inicial del estudio (1.08), tras comprobar mediante la prueba de Cochran que la $C_{Exp}=0.7700$ resultaba inferior a la de las tablas $C_{(2,10, 0.05)}=0.7880$. Un comportamiento semejante se observó en las muestras mantenidas a 20 ± 1 °C ($r=0.8292$, $p<0.001$) con una pendiente algo superior a la obtenida a 8-10°C pero igualmente baja y una igualdad de variabilidades considerando las muestras iniciales y las obtenidas a lo largo del tiempo ($C_{Exp}=0.7137 > C_{(2,12, 0.05)}=0.7520$).

Del comportamiento de la **espermidina** podría deducirse una ligera tendencia a la disminución a lo largo del tiempo ($r=-0.6891$, $p>0.05$) en las muestras mantenidas a 8-10°C. En este caso la significación estadística es inferior a la obtenida para el caso de la espermidina y la pendiente de la recta resulta también muy pequeña (0.002). Tampoco en este caso la variabilidad observada a lo largo del tiempo expresada en términos de variancia (1.98) resulta distinta de la observada en los contenidos de esta amina determinados en las muestras iniciales (4.75) dado que de nuevo se comprueba que $C_{Exp}=0.7057$ resulta inferior a la correspondiente de las tablas $C_{(2,10, 0.05)}=0.7880$. en las muestras mantenidas a 20 ± 1 °C no se observa ninguna tendencia evolutiva, la r calculada al correlacionar los contenidos de esta amina con el tiempo de almacenamiento transcurrido resulta solo de 0.0614 lo que indica que solo un 3.7% de la variabilidad de las muestras a lo largo del ensayo sería explicable por la variable tiempo.

En definitiva podríamos considerar que no se puede suponer que exista una clara evolución de los contenidos de espermidina y de espermina en ninguna de las dos temperaturas estudiadas puesto que la variabilidad observada entre muestras semejantes (las 6 muestras analizadas inicialmente) impide tomar en consideración los coeficientes de correlación obtenidos entre el contenido de estas aminas biógenas y el tiempo de almacenamiento.

En la figur. se muestra el comportamiento de los contenidos de serotonina, espermidina y espermina a las dos temperaturas de ensayo. Se observa que en general los contenidos de espermina resultan superiores a los de espermidina. Esta circunstancia coincide con lo observado en el estudio de mercado de boquerón fresco (apartado 12) donde el contenido medio de espermina se situaba en $7.11 \mu\text{g/g}$ y el de espermidina en $10.85 \mu\text{g/g}$. además, en todo momento los contenidos de ambas aminas se mantuvieron dentro del intervalo que podría considerarse como habitual, obtenido tras en análisis de las muestras de mercado.

El resto de las aminas biógenas aumentó considerablemente con el tiempo. Aunque para establecer un orden de precocidad en la formación de estos compuestos habría sido necesaria una toma de muestras menos espaciada en el tiempo, se podría construir una aproximación. Para ello se ha considerado el inicio del aumento como el momento en que se sobrepasa el límite superior del intervalo de confianza del 95% calculado a partir de las 6 determinaciones efectuadas al inicio del estudio. En las muestras mantenidas a $8-10^\circ\text{C}$, putrescina, cadaverina, agmatina, histamina y tiramina superaban este límite en la muestra tomada a las 9 horas de iniciado el estudio, mientras que β -feniletilamina y triptamina lo hacían a las 16 horas. En las muestras mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, cadaverina, agmatina, histamina y tiramina aumentaban con respecto al contenido inicial a partir de la muestra tomada a las 4 horas de iniciado el estudio, la putrescina lo hacia a partir de muestra tomada a las 8 horas y nuevamente la β -feniletilamina y triptamina presentan un aumento más tardío.

Podría también establecerse una clasificación de estas aminas biógenas en función de los contenidos máximos alcanzados y su velocidad de formación.

Así **Triptamina** y **β -feniletilamina** podrían considerarse aminas de formación poco importante. Se alcanzan $12.38 \mu\text{g/g}$ de triptamina y $88.55 \mu\text{g/g}$ de β -feniletilamina tras mantener las muestras 52 horas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. En el caso de la triptamina los niveles máximos alcanzados tras períodos de almacenamiento similares fueron del mismo orden en las muestras mantenidas a las dos temperaturas de estudio ($12.30 \mu\text{g/g}$ a las 59 horas en las muestras mantenidas a $8-10^\circ\text{C}$ frente a $12.28 \mu\text{g/g}$ en las mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$). Respecto a los contenidos de triptamina se observa un comportamiento claramente diferencial, existiendo una mayor formación de este compuesto en las muestras mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. En las muestras mantenidas a $8-10^\circ\text{C}$ los contenidos correspondientes al punto final fueron de $37.50 \mu\text{g/g}$ de β -feniletilamina y de $42.90 \mu\text{g/g}$ en el caso de la triptamina.

En la figura se muestra de modo gráfico la evolución de los contenidos de β -feniletilamina y triptamina a lo largo del tiempo de almacenamiento a las dos temperaturas de estudio y en ella se pueden observar las semejanzas y diferencias anteriormente comentadas. Estas dos aminas biógenas podrían considerarse aminas de formación tardía, a ambas temperaturas de estudio son las últimas en aumentar de un modo evidente aunque tanto a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ como a $8-10^\circ\text{C}$ la β -feniletilamina lo hace antes que la triptamina. el hecho

de considerar estos dos aminas como indicadores tardíos de descomposición en el pescado coincide con la ausencia de estos dos compuestos en las muestras de boquerón fresco correspondientes al estudio de mercado.

En un segundo grupo, y estableciendo un orden creciente de importancia que coincide en ambas temperaturas de estudio se situarían **putrescina, tiramina y cadaverina** (figura 1). En las muestras mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ se alcanzaron en el punto final del estudio, 52 horas, $183.45 \mu\text{g/g}$ de putrescina, $319 \mu\text{g/g}$ de tiramina y $653.5 \mu\text{g/g}$ de cadaverina. Transcurridos períodos de tiempo similares los contenidos de estas aminas biógenas fueron siempre superiores en las muestras mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ que en las mantenidas a $8-10^\circ\text{C}$. En estas últimas se alcanzaron tras 97 horas de almacenamiento $114.10 \mu\text{g/g}$, $319.00 \mu\text{g/g}$ y $575.25 \mu\text{g/g}$ respectivamente.

La **histamina** resultó la amina biógena de formación mayoritaria. Durante las 8 primeras horas de almacenamiento a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y las 16 primeras en las muestras mantenidas a $8-10^\circ\text{C}$ los contenidos de esta amina son del mismo orden que los de las demás aminas biógenas, pero a partir de este momento se inicia una clara diferenciación de modo que la histamina se va convirtiendo en la amina mayoritaria. Al final del período de estudio su contenido es aproximadamente tres veces superior al de cadaverina en las muestras mantenidas a $8-10^\circ\text{C}$ y entre 4-5 veces superior en las muestras mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

En el estudio a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ se observa una disminución en el contenido de histamina entre la toma de muestras efectuada a 48 y 52 horas. ABABOUCH y col. (1991) en un estudio realizado en sardina y previamente SCHULZE y ZIMMERMANN (1982) en caballa citan también un hecho semejante. Estos últimos autores atribuyen esta comportamiento a la presencia de microorganismos con actividad histaminolítica que actuarían en avanzados estados de descomposición, cuando ya prácticamente no quedara histidina libre.

El comportamiento de las muestras con respecto al contenido en agmatina a lo largo del tiempo merece un tratamiento diferencial. Si bien aumenta durante el período inicial con un ritmo semejante al de la histamina se observa una clara disminución a partir del 2º día de almacenamiento a $8-10^\circ\text{C}$. Este comportamiento se hace todavía más evidente en las muestras a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ donde disminuye a partir del primer día y se alcanza un valor extremadamente bajo al fin del período de estudio $0.66 \mu\text{g/g}$.

Finalmente para aquellas aminas biógenas que presentaron una clara tendencia a aumentar durante el almacenamiento del boquerón a $8-10^\circ\text{C}$ y a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ se estudió si este comportamiento se podía ajustar a algún modelo de regresión considerando como variable independiente el tiempo. Para cada una de estas aminas biógenas, se ensayaron los ajustes lineales correspondientes a una recta ($y=Bx+A$), y las curvas exponencial ($y=e^{(Bx+A)}$) y multiplicativa ($y=AX^B$). Los resultados de este estudio se muestran en la tabla...

Tablas ... Ajustes lineales correspondientes a las aminas biógenas formadas durante el almacenamiento del boquerón a 8-10°C y a 20±1°C.

		8°C			20±1°C		
		RECTA	EXP	MUL*	RECTA	EXP	MUL
HIS	r	0.9218	0.9698	0.9351	0.9420	0.9208	0.9446
	A	-285	-0.155	-4.02	-605	0.1130	-4.311
	B	15.26	0.0888	2.320	70.79	0.1884	3.1747
TIR	r	0.9568	0.9520	0.9541	0.9520	0.8992	0.9338
	A	-62.61	0.4786	-2.54	-40.67	0.3954	-2.534
	B	4.045	0.0650	1.7777	5.7164	0.1209	2.0689
β-FEN	r	0.9172	0.9918	0.8389	0.9331	0.9570	0.8697
	A	0.2578	0.3054	-0.80	-14.82	-0.1552	-1.915
	B	-2.756	0.0310	0.7500	1.6782	0.0971	1.4539
TRIP	r	0.9002	0.9418	0.9690	0.8637	0.9645	0.9462
	A	-5.43	-0.391	2.82	-3.690	-1.332	-5.55
	B	0.3670	0.0435	-3.928	0.2337	0.0699	1.9159
PUT	r	0.8977	0.9757	0.9307	0.9388	0.9579	0.9510
	A	-24.03	-1.072	-3.928	-36.01	-1.62	-3.50
	B	1.30	0.0669	1.730	3.701	0.1534	2.850
CAD	r	0.9426	0.9383	0.9759	0.8795	0.8615	0.9653
	A	-126.6	-4.770	-4.958	-55.08	-0.2827	-4.94
	B	7.4967	0.0859	2.40	13.59	1.1658	3.062

* A = log A

En todos los casos los tres ajustes ensayados explicaban entre el 74 y el 95% de la variabilidad observada en función de la variable tiempo de almacenamiento y su significación estadística se encontraba entre 0.0002 y 0.0001.

Cabe destacar que para el caso de la tiramina, donde a pesar de que en la representación gráfica puede observarse un cierto cambio de pendiente tanto a en las muestras mantenidas a 8-10°C como a 20±1°C, el mejor modelo resultaba el ajuste lineal a una recta.

En la mayoría de los casos el modelo óptimo de entre los ensayados resultaba el ajuste a la ecuación lineal correspondiente a una curva exponencial. Este perfil coincidiría con la ecuación general propuesta para el crecimiento de microorganismos antes de llegar a su fase de estabilización, circunstancia fácilmente explicable si se supone el origen bacteriano, ampliamente reconocido de las aminas biógenas en alimentos.

La histamina y la cadaverina formadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ se ajustan mejor a una curva de tipo multiplicativo, porque refleja la fase final de estancamiento y descenso final observado en el caso de la histamina.

La fase de estancamiento podría explicarse suponiendo un descenso de la velocidad de formación. OMURA y col (1978) observaron experimentalmente que en presencia de grandes cantidades de histamina en el medio *P. Morganii*, gran productor de esta amina, inhibía la síntesis del enzima histidin-descarboxilasa. EITENMILLER y col. (1981) señalan que el contenido en histamina puede actuar como inhibidor de la reacción de descarboxilación. En el caso de la cadaverina podría pensarse también en una hipótesis semejante.

No podemos olvidar tampoco la hipótesis apuntada anteriormente de destrucción de la histamina por parte de microorganismos con capacidad histaminolítica en avanzados estados de descomposición. En el último punto del estudio a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ se observa una disminución en el contenido de histamina que podría explicarse en función de esta hipótesis y que colabora también a la mejora observada al aplicar el ajuste a una curva de tipo multiplicativo en lugar de la curva exponencial, óptima en la mayoría de los casos.

Aunque son numerosos los estudios de formación de aminas biógenas a lo largo del almacenamiento/descomposición de pescado en un amplio número de especies no se han encontrado en la bibliografía referencias respecto el contenido de aminas biógenas en boquerón *Engraulis encrasicolus*.

En nuestro laboratorio se realizaron estudios previos sobre esta misma especie de pescado en las que se determinaba únicamente el contenido de las aminas biógenas histamina y tiramina (COGUL-ARDEBOL, 1988 y VECIANA-NOGUES, 1990). En ambos casos, sin embargo, los ensayos se efectuaron sobre una pasta triturada y homogeneizada, por lo que el proceso de descomposición resultaba acelerado y los resultados obtenidos en cuanto a los niveles máximos alcanzados no son en ningún caso comparables. Si se observó sin embargo, como en el ensayo realizado en este trabajo, que la formación de histamina resultaba muy superior a la de tiramina y que se observaba cierto cambio de pendiente en la formación de ambos compuestos tras un cierto período inicial de latencia.

Si comparamos los resultados obtenidos con los de estudios realizados en una especie de pescado próxima, la sardina, se observa los contenidos alcanzados tras períodos de tiempo a temperaturas de almacenamiento similares son del mismo orden.

NAGAYAMA y col. (1989) estudia el comportamiento de histamina cadaverina, tiramina, putrescina y espermidina a lo largo del tiempo en muestras de sardina mantenidas

a temperatura ambiente. Histamina también resultaba la amina biógena de formación mayoritaria con respecto al resto de las aminas biógenas estudiadas, seguida de cadaverina, putrescina y tiramina. Para la espermidina se describe solamente una formación muy ligera a lo largo de los tres días de estudio. Los niveles máximos alcanzados resultaron algo inferiores a los de nuestro ensayo a $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

ABABOUC y col (1991) Estudian el comportamiento de histamina, cadaverina, putrescina espermina y espermidina en muestras de sardina también mantenidas a temperatura ambiente. Los niveles obtenidos en este caso tras períodos de almacenamiento similares fueron algo superiores a los obtenidos en nuestro estudio a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. De nuevo la amina con mayor formación resultó la histamina, seguida de cadaverina y putrescina. espermina y espermidina mostraron muy poca variación a lo largo del tiempo.

De la comparación con otros estudios podemos destacar que los niveles de aminas biógenas alcanzados en nuestro ensayo fueron intermedios entre los descritos por YAMANAKA y col (1989) y los descritos por ABAOUC y col (1991) en estudios similares. Siempre se describe que la histamina es la amina de formación mayoritaria seguida en importancia por cadaverina tiramina y putrescina. En el caso de las poliaminas espermina y espermidina la formación a lo largo del tiempo es siempre muy ligera o casi inexistente.

Figura 33 Evolución de los contenidos de serotonina, espermina y espermidina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de boquerón mantenidas a $8-10^\circ\text{C}$ y $20\pm 1^\circ\text{C}$.

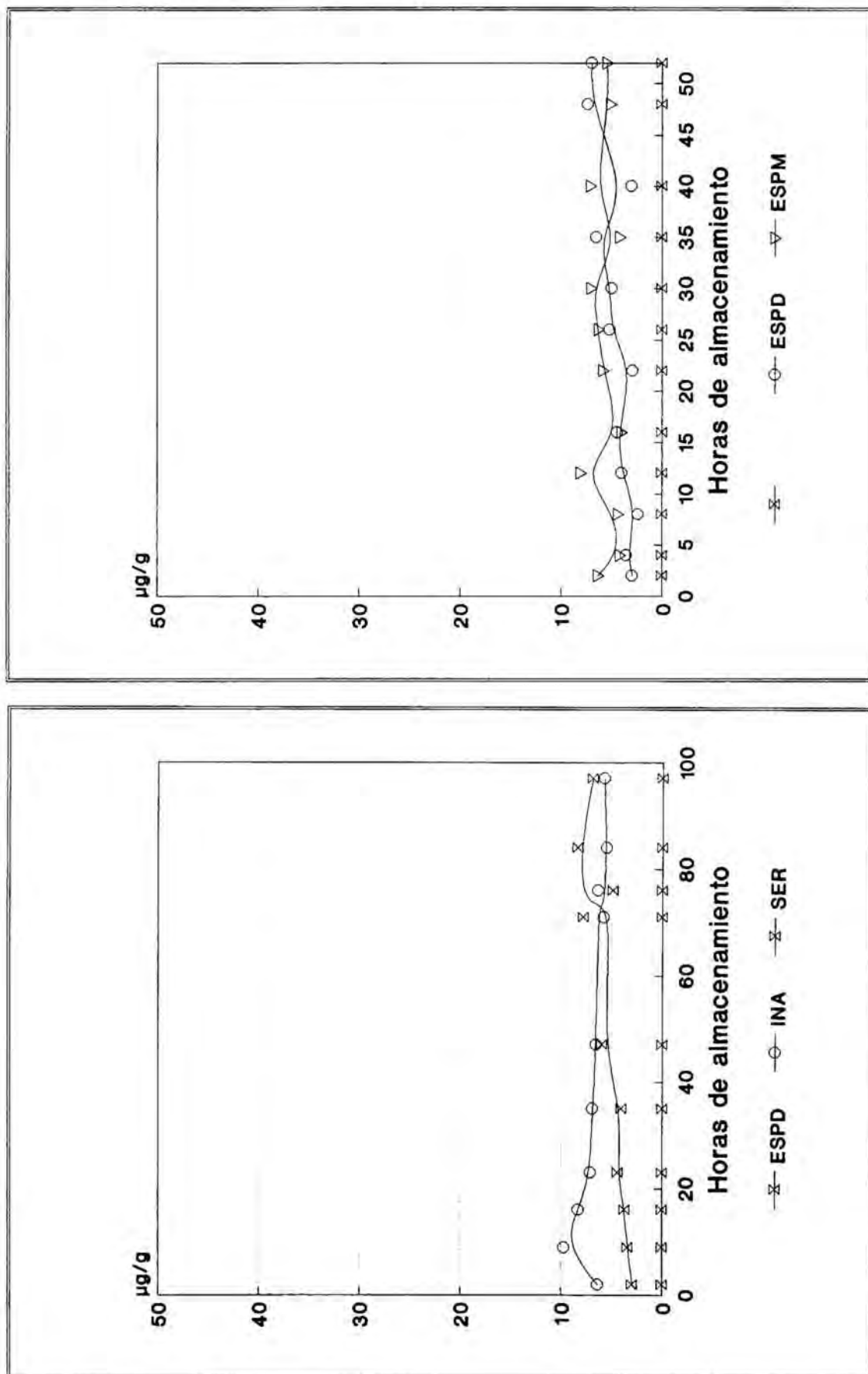


Figura.34 Evolución de los contenidos de β -feniletilamina y triptamina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de boquerón matenidas a $8-10^\circ\text{C}$ y $20\pm 1^\circ\text{C}$.

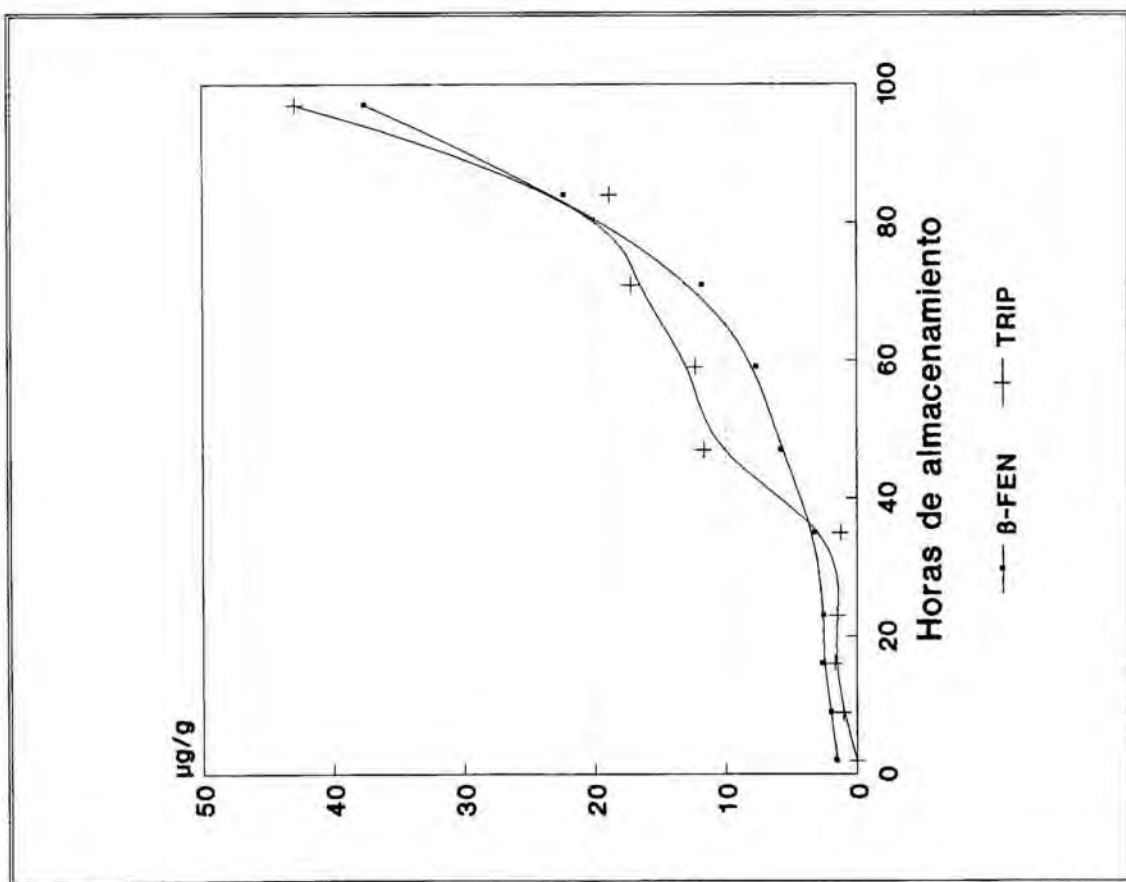
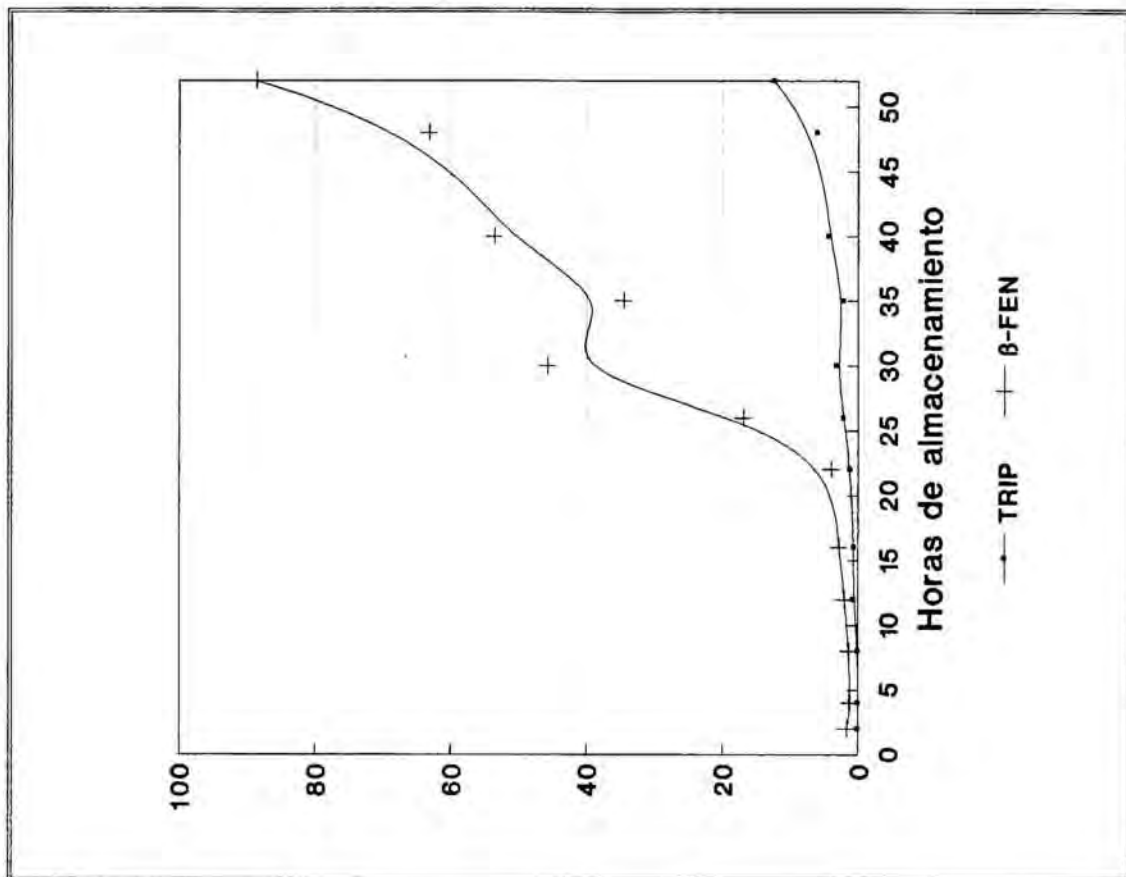


Figura.35 Evolución de los contenidos de putrescina, cadaverina y tiramina, ($\mu\text{g/g}$) en muestras de boquerón matenidas a $8-10^\circ\text{C}$ y $20\pm 1^\circ\text{C}$.

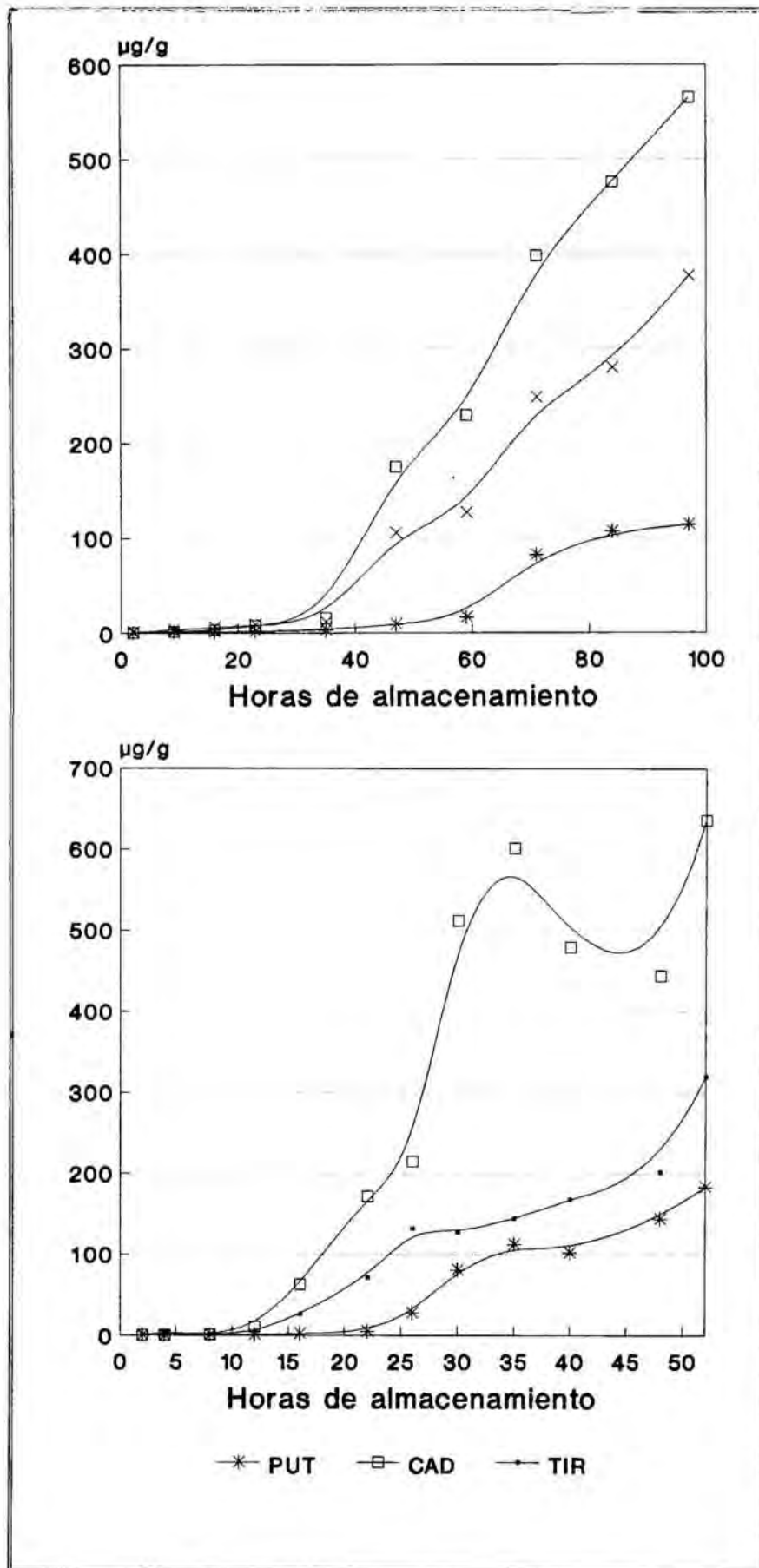
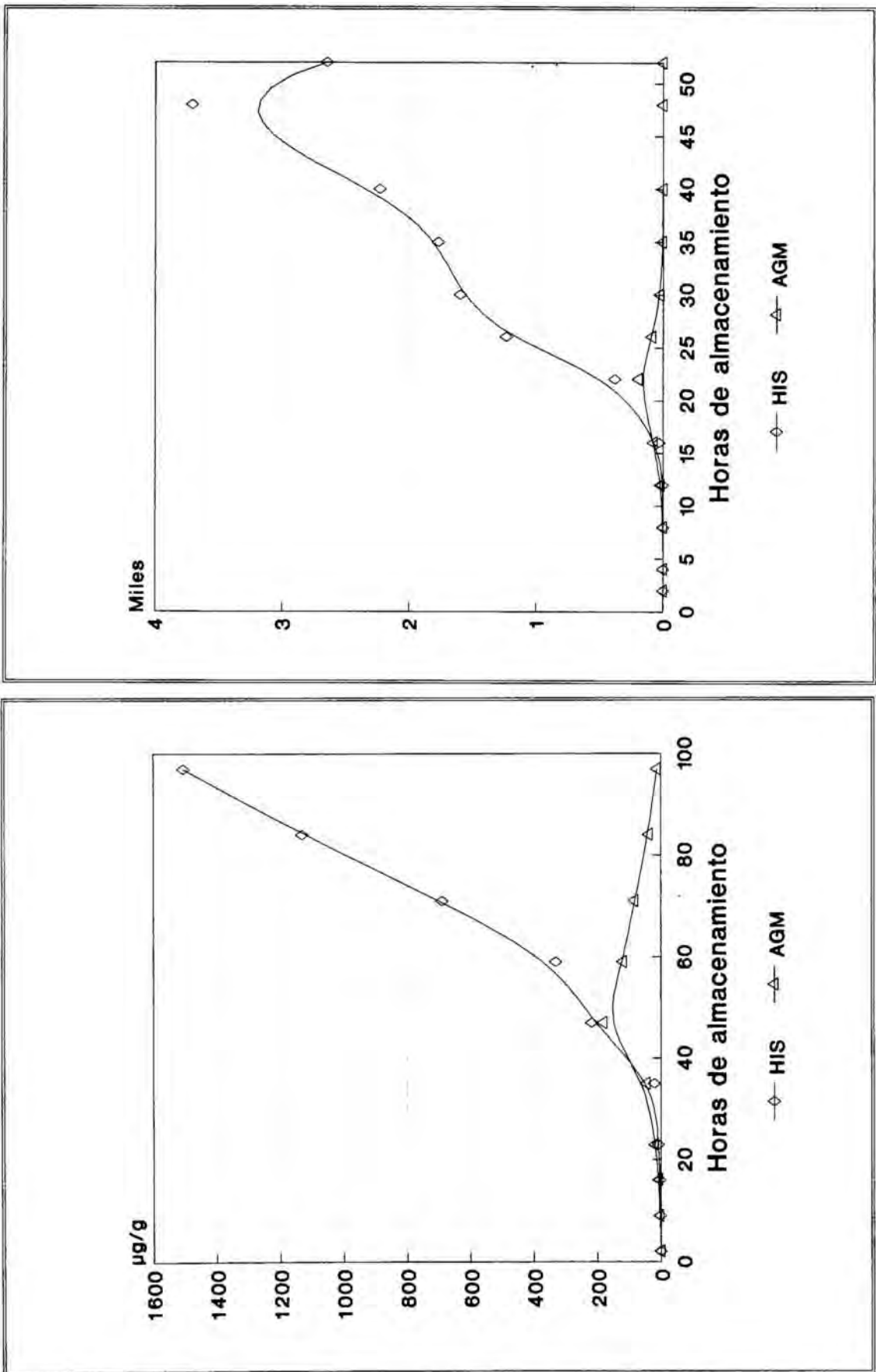


Figura.36 Evolución de los contenidos de agmatina e histamina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de boquerón matenidas a $8-10^\circ\text{C}$ y $20\pm 1^\circ\text{C}$.



8.1.3 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE ATP y SUS METABOLITOS

Tradicionalmente, la medida de los niveles de ATP y sus metabolitos se viene utilizando como criterio para evaluar la pérdida de frescura del pescado en etapas previas a las de la proliferación bacteriana por efecto de los enzimas del propio músculo de pescado, aunque se ha descrito la participación de microorganismos en el paso de inosina a hipoxantina.

En este trabajo se siguió la evolución de estos compuestos a lo largo del proceso de degradación del boquerón con el fin de observar si presentaban alguna ventaja frente a estas, sobre todo en la primera etapa de este proceso, cuando la formación de aminas biógenas no es todavía muy evidente. O bien, si por el contrario, no permiten llegar a conclusiones definitivas en el caso de pescados capturados por métodos tradicionales y destinados al consumo humano puesto que los cambios iniciales, de ATP a IMP se verifican a una velocidad muy elevada y además de variabilidad dentro de la especie de pescado pueden influir el estado nutricional del pez y el método de captura empleado.

8.1.3.1 CONTENIDOS INICIALES Y EN LAS MUESTRAS CONTROL

En las tablas.. y ... se muestran los resultados obtenidos en las muestras iniciales y en las muestras control mantenidas en congelación durante 52 y 97 horas respectivamente.

Tabla... Contenidos de ATP y derivados ($\mu\text{mol/g}$) en muestras iniciales y en muestras control (I) y (II) correspondientes a 52 y 97 horas de almacenamiento a -20°C .

	INICIAL (n=6)		CONTROL I (n=6)		CONTROL II (n=6)	
	X	DE	X	DE	X	DE
ATP	ND	-	ND	-	ND	-
ADP	0.04	0.06	0.04	0.02	0.05	0.06
AMP	0.06	0.07	0.04	0.10	0.05	0.10
IMP	3.17	1.23	2.90	0.28	2.87	0.65
Ino	0.95	0.45	0.85	0.07	0.98	0.06
Hx	1.01	0.07	1.04	0.13	1.09	0.13

Al igual que el caso de las aminos biógenas los niveles de estos compuesto determinados en las muestras iniciales fueron muy semejantes a los determinados en las muestras control I y II. Por ello se podrá considerar en adelante, que cualquier variación observada en sus niveles podrá atribuirse al tiempo en que las muestras fueron almacenadas a 8-10°C o $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y no al tiempo en que las muestras se mentuvieron congeladas a la espera de su análisis. Este hecho se habia comprobado previamente durante un periodo de tiempo más largo en el estudio de estabilidad de nucleotidos descrito en el apartado 6.

ATP, ADP y AMP, no fueron detectados o se determinaron en cantidades muy bajas. En la tabla (.....) referente a los contenidos de ATP y derivados en distintas especies de pescado se observa que en la mayoría de los estudios efectuados sobre especímenes muertos en la captura y no en el laboratorio los niveles de estos tres metabolitos iniciales son siempre muy bajos, resultando como en nuestro caso el IMP el metabolito mayoritario.

La presencia de inosina y hipoxantina en cantidades proximas a $1 \mu\text{mol/g}$ origina, que al calcular los diversos índices propuestos para evaluar la frescura del pescado en funcion del contenido de ATP y derivados, se obtengan valores proximós o superiores al los límites de aceptabilidad según estos criterios a pesar de que la inspección organoléptica del pescado, destinado al consumo humano, resultó satisfactoria.

8.1.3.2 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE ATP Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACION EN BOQUERON MANTENIDO A 8-10°C y a $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Los resultados obtenidos a lo largo del ensayo de almacenamiento/descomposición del boquerón a las dos temperaturas ensayadas se muestran en las tablas y

El ATP, no detectado en las muestras iniciales, tampoco se detectó en ninguna de las muestras tomadas a lo largo de todo el tiempo de estudio. ADP y AMP se detectaron esporádicamente en algunas muestras, pero los niveles fueron siempre muy bajos por lo que no es posible establecer ninguna evolución a lo largo del tiempo en ninguna de las dos temperaturas de estudio.

Tabla... Contenidos de ATP y derivados ($\mu\text{mol/g}$) en muestras de boquerón mantenidas a 8-10°C

	ATP	ADP	AMP	IMP	INO	HX
2	ND	0.05	0.10	3.18	0.95	1.01
9	ND	0.08	0.20	2.63	1.47	2.34
16	ND	0.05	0.08	1.74	1.04	1.53
23	ND	ND	0.22	2.26	1.95	2.12
35	ND	0.03	0.20	1.10	2.30	2.49
47	ND	0.08	ND	0.59	2.10	3.39
67	ND	0.05	0.08	0.21	1.88	3.51
71	ND	0.02	0.03	0.50	1.40	4.42
84	ND	ND	0.02	ND	1.22	4.85
97	ND	0.05	ND	ND	1.02	5.10

Tabla... Contenidos de ATP y derivados ($\mu\text{mol/g}$) en muestras de boquerón mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$

	ATP	ADP	AMP	IMP	INO	HX
2	ND	0.05	0.10	3.17	0.95	1.01
4	ND	0.04	0.20	3.03	1.06	1.63
8	ND	0.02	0.30	2.57	1.86	2.55
12	ND	0.03	0.10	1.74	1.41	2.20
16	ND	ND	ND	2.00	2.36	1.76
22	ND	ND	ND	1.67	2.63	2.14
26	ND	0.03	0.05	0.36	2.50	3.87
30	ND	ND	0.10	0.10	1.45	4.77
35	ND	ND	0.06	ND	1.24	5.92
40	ND	ND	0.05	ND	1.32	5.05
48	ND	ND	0.02	ND	ND	6.05
52	ND	ND	ND	ND	ND	6.20

En la figura 37 se muestra la evolución de los tres metabolitos mayoritarios a la largo del tiempo a las dos temperaturas de estudio.

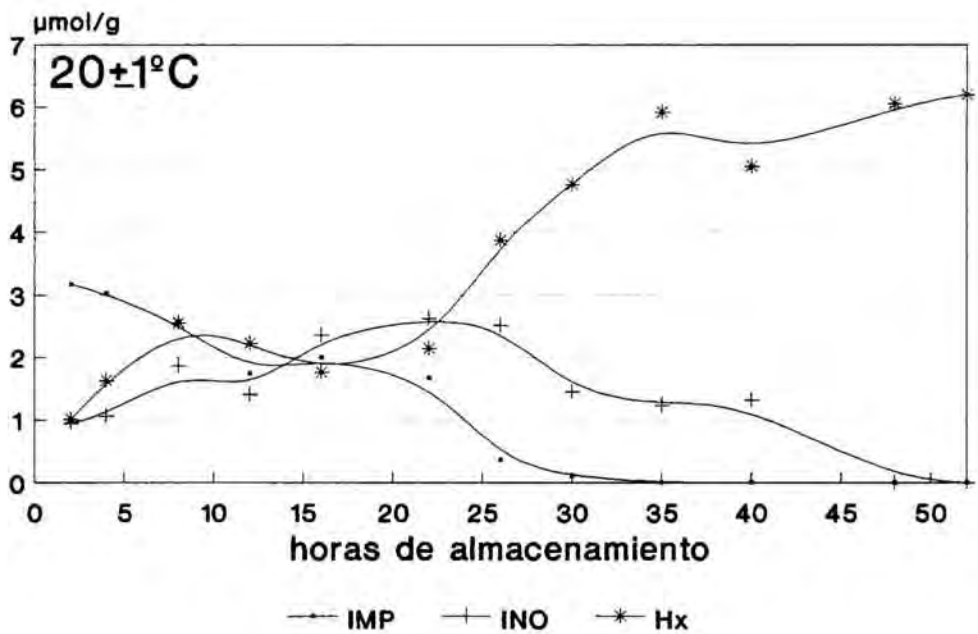
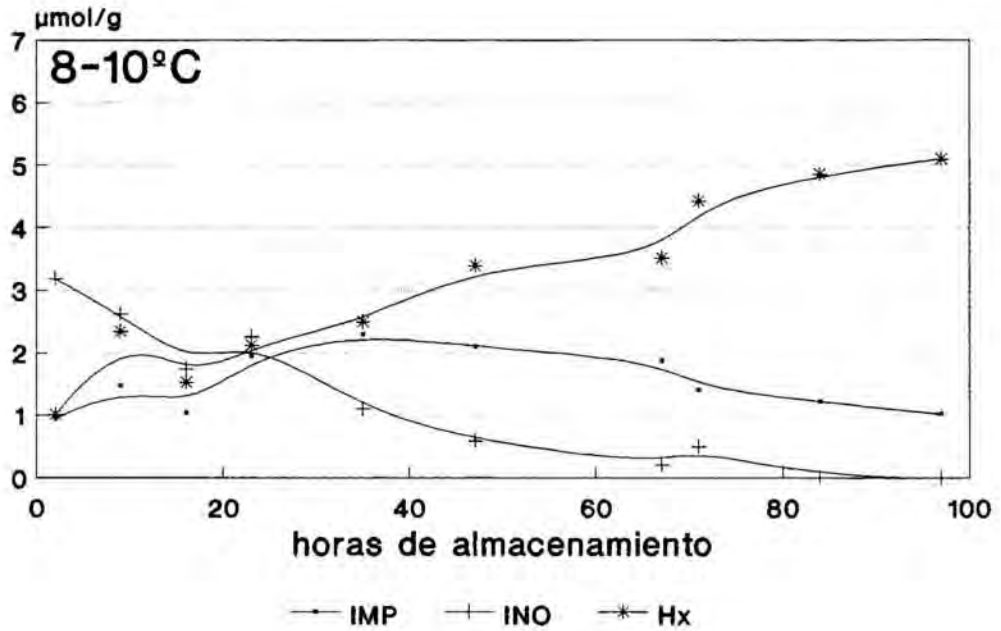
Se observa que los niveles iniciales de **IMP**, $3.17 \mu\text{mol/g}$ descienden durante al almacenamiento de las muestras hasta niveles no detectables tras 84 horas a $8-10^\circ\text{C}$, y tras 30 horas de almacenamiento a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Lógicamente, se observa que la desaparición del IMP mediada por enzimas del propio pescado se verifica con mayor rapidez en las muestras mantenidas a temperatura a alta. Esta diferencia se confirma con las pendientes obtenidas en la rectas de regresión construidas entre los niveles de IMP y el tiempo de almacenamiento. Estas rectas a la vez explicaban un alto porcentaje de la variabilidad observada en función de tiempo ($y = -0.0321x + 2.6958$, $r = -0.9402$, $p < 0.0001$ en las muestras mantenidas a $8-10^\circ\text{C}$; $y = -0.0700x + 2.9420$, $r = -0.9247$ $p < 0.0001$ para las mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$).

El contenido de **Hipoxantina** aumenta a lo largo del tiempo a las dos temperaturas de estudio desde los $1.01 \mu\text{mol/g}$ iniciales se alcanzan niveles de $5.10 \mu\text{mol/g}$ a $8-10^\circ\text{C}$ y de $6.20 \mu\text{mol/g}$ a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Aunque nuevamente el comportamiento frente al tiempo se ajusta al modelo lineal de una recta ($y = 0.0392x + 1.2840$, $r = 0.9504$, $p < 0.0001$ a $8-10^\circ\text{C}$ y $y = 0.1073x + 0.9562$, $r = 0.9390$, $p < 0.0001$ a $20 \pm 1^\circ\text{C}$) en las muestras mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ se observa un cierto incremento en la pendiente entre la 20 y las 25 horas de almacenamiento. Este momento, es próximo al momento en que las aminos biógenas empezaban a incrementar de modo apreciable. Este comportamiento es explicable si se supone la participación bacteriana en la transformación de inosina a hipoxantina descrita previamente por otros autores (KENNISH y KRAMER, 1986; FLETCHER y STATHAM, 1988).

La **Inosina** metabolito intermedio entre IMP y e hipoxantina, aumentó durante las 35 primeras horas a $8-10^\circ\text{C}$ mientras que a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ esta tendencia solo se mantuvo durante 22 horas. A partir de este momento disminuyó de modo que parece que su formación a partir de IMP por parte de los enzimas del propio pescado es superada por la transformación a hipoxantina, paso en el que pueden participar también los microorganismos contaminantes.

Aunque no se han encontrado en la bibliografía datos respecto al carácter formador de inosina o de hipoxantina referidos al boqueron, *Engraulis encrasicolus*, EHIRA y UCHIYAMA (1973) sitúan una especie de pescado perteneciente al mismo género *Engraulis Japonicum* entre las especies formadoras de inosina. Esto supondría que en esta especie la transformación de inosina en hipoxantina por parte de los enzimas propios del pescado es baja por lo que deberían originarse acumulaciones de inosina. El que esto no suceda y el que la disminución de este compuesto coincida con el momento en que también empiezan a formarse de modo importante otros compuestos de origen bacteriana (aminas biógenas), estaría en consonancia con la hipótesis de que en el paso de inosina a hipoxantina participan también los microorganismos.

Figura 37. Evolución de los contenidos de IMP, Inosina e Hipoxantina ($\mu\text{mol/g}$) en muestras de boqueron mantenidas a $8-10^{\circ}\text{C}$ y $20\pm 1^{\circ}\text{C}$.



Aunque existen estudios en que se relacionan hipoxantina, IMP e Inosina con la pérdida de frescura del pescado, en estos trabajos se estudia su correlación con el grado de aceptación organoléptica pero no es frecuente su asociación con otros parámetros indicadores de deterioro del pescado. No se han encontrado en la bibliografía datos de IMP o inosina al respecto en especies de pescado próximas el boquerón, si existen estudios similares en el caso de la hipoxantina.

GALLARDO (1978) estudian comparativamente los niveles TMA e hipoxantina a lo largo del almacenamiento de sardina a $7 \pm 1^\circ\text{C}$. Los niveles máximos alcanzados tras tiempos de almacenamiento similares son del mismo orden de los alcanzados en las muestras mantenidas a $8-10^\circ\text{C}$. BENAIGES-BENAIGES (1990) obtiene resultados similares en un estudio efectuado en sardinas almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración en el que se determinaron los contenidos de histamina, tiramina, hipoxantina y pH.

En estudios previos efectuados en nuestro laboratorio en pasta de boquerón triturada y homogeneizada mantenida a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración los contenidos de hipoxantina alcanzados habían resultado sensiblemente superiores transcurridos periodos de tiempo semejantes.

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio la determinación de ATP, ADP y AMP no parece resultar útil para evaluar los cambios ocurridos en el pescado en el periodo previo a la proliferación bacteriana en boquerón capturado por métodos tradicionales, puesto que los niveles detectados son siempre muy bajos. Los cambios en el IMP, Inosina e hipoxantina se hacen evidentes a partir de las primeras horas de almacenamiento debido a su origen autolítico y para este último metabolito parece evidente la participación de las bacterias cuando estas proliferan sobre el pescado.

8.1.4 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE TRIMETILAMINA, DIMETILAMINA Y DEL VALOR DEL pH.

Dimetilamina y trimetilamina son dos compuestos químicos que no se encuentran en el pescado vivo, se forman tras la muerte a partir del mismo precursor, el óxido de trimetilamina. La trimetilamina se origina por acción de enzimas bacterianos mientras que la dimetilamina se origina por la actividad de los enzimas del propio pescado. Ambos mecanismos compiten por el mismo sustrato y la aparición de cantidades importantes de dimetilamina solo es posible en aquellos casos en que el crecimiento bacteriano se ve inhibido por alguna razón, en el pescado congelado por ejemplo. Excepto en este caso, a lo largo del proceso de deterioro del pescado se acumula TMA, que es uno de los compuestos químicos clásicamente empleados para rechazar o no el pescado en casos de duda tras aplicar la valoración organoléptica.

8.1.4.1 CONTENIDOS INICIALES Y EN MUESTRAS CONTROL

Los contenidos de TMA, DMA y el valor del pH determinado en las muestras iniciales y en las muestras control mantenidas 52 y 97 horas a -20°C se muestran en la tabla

Tabla... Contenidos de N-TMA, N-DMA ($\mu\text{g/g}$) valor del pH en las muestras iniciales y en las muestras control (I) y (I) correspondiente a 52 y 97 horas de almacenamiento a -20°C.

	INICIAL (n=6)		CONTROL I (n=6)		CONTROL II (n=6)	
	X	DE	X	DE	X	DE
DMA	3.70	0.200	3.97	0.157	3.95	0.102
TMA	7.60	0.500	7.31	0.400	7.55	0.441
pH	6.30	0.014	6.28	0.017	6.30	0.015

X= Contenido medio

DE= Desviación estandard

Los contenidos de DMA y TMA en la muestras iniciales fueron bajos, del mismo orden que los descritos por otros autores para pescado fresco (tablas 4 y 5). En las muestras control mantenidas en congelación los niveles de ambos analitos resultaron muy similares a los de las muestras iniciales. Aunque este descrita la formación de DMA en pescado congelado este fenómeno solo se hace evidente en períodos de almacenamiento muy largos y en especies de pescado, como las pertenecientes a la familia de los gádidos, que presenten una actividad enzimática óxido de trimetilamina desmetilasa importante y en las que la cantidad de precursor es superior a la del boqueron.

El valor inicial del pH es el reflejo de la acumulación de ácido láctico debido al establecimiento de la glucólisis anaeróbica y se ve fuertemente influenciado por el estado nutricional del pescado y de las reservas en forma de glucógeno que tuviera cada individuo en el momento de la muerte. Se determinó como parámetro acompañante y más que su valor inicial tiene interés su evolución a lo largo del tiempo reflejo de la acumulación de sustancias de carácter básico que se forman durante el deterioro del pescado (TMA, aminas biógenas o hipoxantina).

8.1.2.3 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE TRIMETILAMINA, DIMETILAMINA Y PH EN BOQUERON MANTENIDO a 8-10°C y 20±1°C.

Los resultados obtenidos en los ensayos efectuados a ambas temperaturas de estudio se muestran en las tablas ... y y se expresan de un modo gráfico en la figura 38

Los contenidos de **DMA** experimentaron tan solo un ligero aumento a lo largo del tiempo a las dos temperaturas ensayadas. Aunque en ambos casos es posible ajustar su comportamiento a una curva de tipo multiplicativo ($y = Ax^B$) y la variabilidad a lo largo del tiempo resulte algo superior a la observada en las muestras iniciales, el aumento efectivo de unos 2µg/g. Dado que se han descrito amplias variabilidades en el contenido del precursor óxido de trimetilamina incluso dentro de una misma especie y la formación de dimetilamina se verá también influída por otros factores como la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Una variabilidad tan pequeña como la observada no sería útil para evaluar el estado de conservación del pescado fresco. De Hecho el uso de la DMA como índice se ha descrito para pescado congelado, donde se encuentra inhibido el crecimiento bacteriano y no existe competencia por el precursor, y fundamentalmente en aquellas especies en que la cantidad de óxido de trimetilamina es alta y existe una elevada actividad OTMA desmetilasa.

En el caso del **pH** ocurre algo semejante, también presenta una correlación altamente significativa con el tiempo de almacenamiento ajustándose al modelo lineal de una recta ($y = 0.004x + 6.27$, $r = 0.9700$, $p = 1.76 \times 10^{-7}$ a 8-10°C; $y = 0.0126x + 6.28$, $r = 0.9648$, $p = 6.35 \times 10^{-6}$ a 20±1°C) la variación observada se sitúa en un intervalo estrecho, de 6.30 a 6.90 unidades de pH. En este caso también los valores iniciales además de la variabilidad entre especies es necesario considerar variabilidad dentro de individuos de la misma especie en función del estado nutricional o del tipo de captura.

En ambos ensayos se formaron cantidades importantes de TMA alcanzándose cerca de 100 µg/g al final de cada período de almacenamiento. Aunque inicialmente la velocidad de formación resultó superior en las muestras mantenidas a 20±1°C, entre las 22 y 26 horas se observó un estancamiento en la producción que se mantuvo hasta el final del estudio. Por ello al ensayar distintos modelos lineales de regresión a 8-10°C, el mejor modelo resultó en ajuste a una curva exponencial ($y = e^{1.97x0.03}$, $r = 0.9751$, $p = 1.60 \times 10^{-6}$), en consonancia con el origen bacteriano de la trimetilamina.

Tabla... Contenidos de N-DMA, N-TMA ($\mu\text{g/g}$) y Valor del pH a lo largo de la descomposición del boquerón *E. encrasicholus* a 8-10°C.

TIEMPO horas	N-DIMETILAMINA $\mu\text{g/g}$	N-TRIMETILAMINA $\mu\text{g/g}$	pH
2	3.70	7.60	6.30
9	4.45	7.60	6.35
16	4.65	9.75	6.33
23	4.65	14.60	6.37
35	4.75	21.65	6.40
47	6.55	48.10	6.48
59	5.10	62.25	6.50
71	5.70	78.45	6.59
84	5.15	84.55	6.64
97	5.25	6.20	6.73

Tabla... Contenidos de N-DMA, N-TMA ($\mu\text{g/g}$) y valor del pH a lo largo de la descomposición del boquerón *E. encrasicholus* a 20 \pm °C.

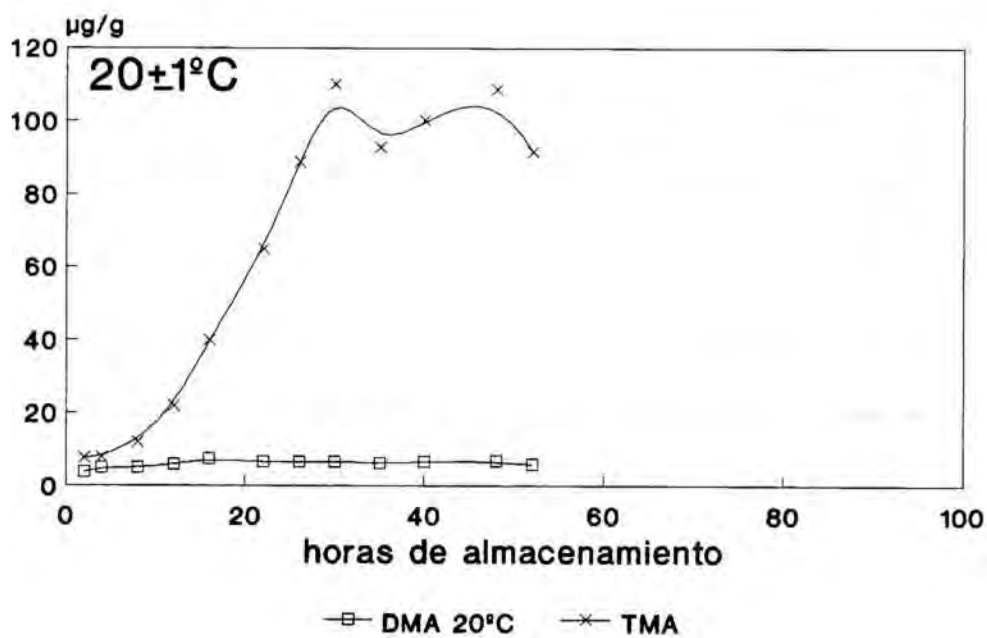
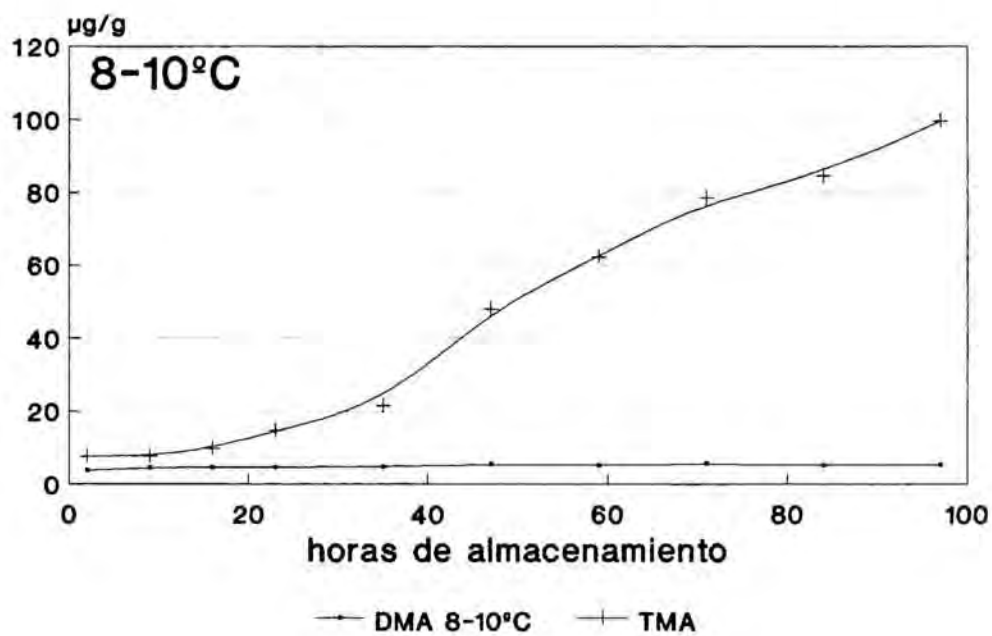
TIEMPO horas	N-DIMETILAMINA $\mu\text{g/g}$	N-TRIMETILAMINA $\mu\text{g/g}$	pH
2	3.70	7.60	6.30
4	5.01	7.88	6.40
8	4.91	11.98	6.45
12	5.85	21.93	6.38
16	7.39	39.86	6.41
22	6.50	64.97	6.57
26	6.58	88.77	6.52
30	6.64	110.06	6.69
35	6.26	92.83	6.73
40	6.60	100.17	6.82
48	6.81	108.75	6.94
52	5.84	91.59	6.91

GALLARDO Y col. (1978) en un estudio realizado sobre sardinas mantenidas a temperatura de refrigeración también sugiere este modelo de ajuste para la evolución de los contenidos de TMA a lo largo del tiempo.

A 20 ± 1 el mejor ajuste resultó el de la curva de tipo multiplicativo que refleja el estancamiento final ($r=0.9586$, $p=8.91 \times 10^{-7}$). Este efecto de saturación observado también en el contenido de cadaverina mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ resulta en este caso algo más precoz en el tiempo. Aunque no se han localizado en la bibliografía consultada datos referente a este efecto de saturación en la formación de TMA, dado que el boquerón no es una especie de las tradicionalmente consideradas como ricas en OTMA y podría pensarse en un agotamiento de este su precursor.

Este efecto de saturación observado a $20 \pm 10^\circ\text{C}$ mientras que en el ensayo a $8-10^\circ\text{C}$ se mantenía un crecimiento exponencial era semejante al del los contenidos de cadaverina. Podríamos suponer que en ambas temperaturas el comportamiento sigue modelos semejantes y que a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ el proceso se encuentra más avanzado llegándose a la fase final de la curva de crecimiento de los microorganismos por agotamiento del sustrato.

Figura 38. Evolución de los contenidos de DMA y TMA en muestras de boquerón mantenidas a 8-10°C y 20±1°C.



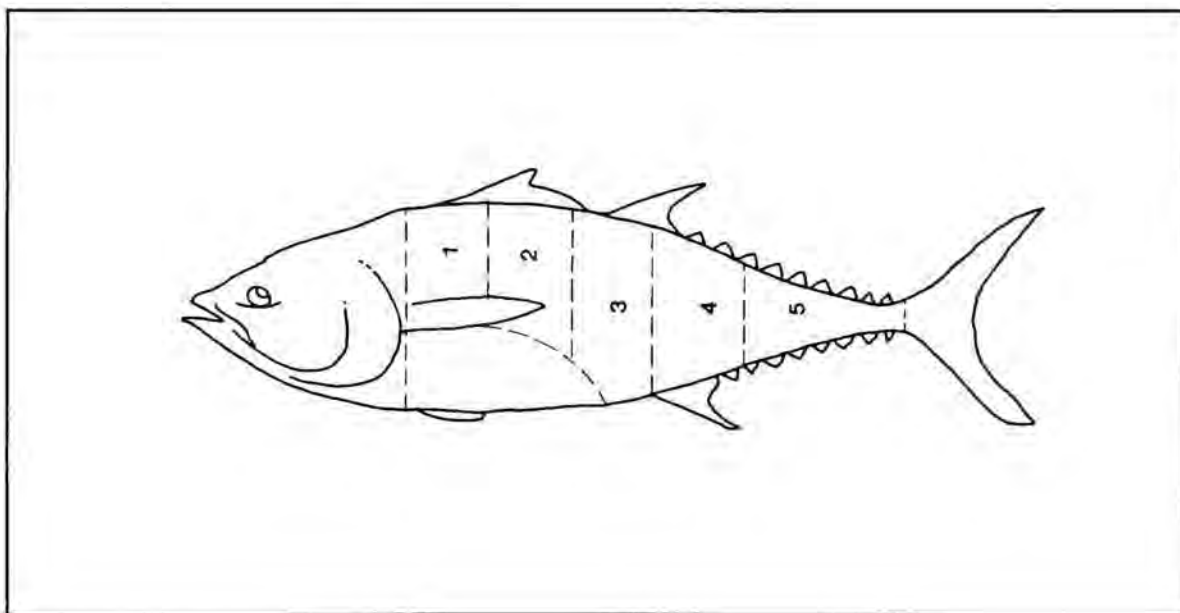
8.2 ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS, OTROS PARÁMETROS QUÍMICOS Y SU RELACION CON EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN EL ATUN

8.2.1 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRA

Este estudio se realizó en colaboración con la Unidad de Higiene e Inspección de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona; la toma de muestras y las determinaciones microbiológicas fueron efectuadas por el personal de dicha unidad. En el momento de la toma de muestra se reservaba una fracción correspondiente a cada punto de muestreo que se congelaba a -20°C y que posteriormente fue trasladada a nuestro laboratorio para la determinación de las aminas biógenas, ATP y derivados y los componentes volátiles DMA y TMA.

Para la realización de este ensayo se partió de un atún de aproximadamente 30Kg de peso, adquirido en Mercabarna y que había sido pescado 4 días antes en Grecia, desde donde fue trasladado en un camión refrigerado cubierto de hielo. El atún se seccionó en 3 zonas anatómicas distintas según se muestra en la ilustración... para estudiar si efectivamente la proximidad de las vísceras ejercía influencia en el desarrollo de microorganismos y la subsiguiente formación de aminas biógenas.

Cada una de estas zonas anatómicas se dividió en tres fracciones que se mantuvieron a 0°C , 8°C y 20°C . La toma de muestras se efectuó cada 12 horas en las muestras mantenidas a 20°C y cada 24 y 72 horas en las mantenidas a 8°C y 0°C . La duración del ensayo a cada una de las temperaturas consideradas se estableció en función de la valoración organoléptica realizada por el personal de la Unidad de Higiene e Inspección de los Alimentos, de modo que se dejaba de tomar muestras en el momento en que estas eran rechazadas organolépticamente.



8.2.2 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS

Los contenidos de aminas biógenas determinados a lo largo del tiempo a las tres temperaturas de estudio y en las tres zonas anatómicas consideradas se muestran en las tablas a

Se observa que en la mayoría de los casos la evolución de los contenidos a lo largo del tiempo y los niveles máximos alcanzados son semejantes en las tres zonas anatómicas estudiadas. Solamente a 0°C la evolución de los contenidos de putrescina y a 8°C la de los contenidos de β -feniletilamina de la muestras de la zona abdominal parecen mantenerse ligeramente por debajo de los contenidos determinados en las demás zonas anatómicas. En ambos casos, sin embargo, los niveles de estas dos aminas biógenas son poco importantes comparados con los alcanzados por otras aminas a esta misma temperatura. Tampoco se observaron diferencias respecto a la evolución de los recuentos de los grupos bacterianos estudiados efectuados por los profesores del Area de Higiene e Inspección de los alimentos.

FRANK y YOSHINAGA (1984) describieron un comportamiento diferencial en cuanto a la formación de histamina en distintas zonas anatómicas de un atún mantenido a 38°C. MIDDLEBROOK y col. (1988) en un estudio efectuada en *Scomberomus maculatus*, pescado perteneciente también a la familia de los escómbridos, no describen diferencias sustanciales en cuanto a los niveles de histamina, putrescina y cadaverina formados en las zonas anterior, media y posterior de este tipo de pescado mantenido a 0°C, 15° C y 35°C.

Dado que no se observan importantes entre las tres zonas anatómicas consideradas, el estudio de la evolución de los contenidos de aminas biógenas a lo largo del tiempo a las tres temperaturas de ensayo se consideraran en adelante los contenidos medios calculados a partir de los valores obtenidos en las tres zonas anatómicas consideradas.

En las tablas se muestran los resultados globales de las aminas biógenas detectadas a lo largo del estudio, expresados como contenidos medios y las desviaciones standard a las tres temperaturas ensayadas.

tabla... Contenidos ($\mu\text{g/g}$) de aminas aromáticas en las distintas zonas anatómicas y a lo largo del tiempo en un atún *Thunnus thynnus* mantenido a 0°C .

DÍAS	TIRAMINA			HISTAMINA			β -FENILETIL.		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	0.42	ND	ND	ND	ND	ND
6	0.60	0.90	0.80	1.20	0.65	0.90	ND	ND	ND
9	0.85	1.40	1.60	9.72	4.20	0.98	ND	ND	ND
12	7.85	4.62	4.75	27.19	25.95	6.22	ND	ND	ND
15	8.80	3.54	4.40	49.07	54.00	1.00	ND	ND	ND
18	9.85	7.40	11.05	995.05	95.20	6.70	ND	ND	ND
21	13.20	10.35	18.10	105.80	102.8	114.50	ND	ND	ND

tabla... Contenidos ($\mu\text{g/g}$) de aminas aromáticas en las distintas zonas anatómicas y a lo largo del tiempo en un atún *Thunnus thynnus* mantenido a 8°C .

DÍAS	TIRAMINA			HISTAMINA			β -FENILETILAMINA		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	ND	ND	ND	ND	1.74	ND	ND	ND
2	2.03	2.05	1.75	10.00	6.05	18.39	ND	ND	ND
3	3.89	3.80	3.42	54.85	27.67	73.68	ND	ND	ND
4	6.15	7.25	7.60	107.65	111.90	91.25	ND	ND	ND
5	6.80	4.30	16.40	105.20	83.68	141.27	ND	ND	ND
6	11.47	15.22	21.64	367.95	337.45	350.95	ND	ND	ND
7	12.59	19.50	15.86	491.85	484.16	540.75	ND	0.70	1.65
8	25.95	28.85	20.22	817.20	1150.20	756.95	ND	1.70	3.05
9	26.15	29.25	42.29	3188.00	4809.50	3288.20	ND	6.25	14.60

tabla... Contenidos ($\mu\text{g/g}$) de aminas aromáticas en las distintas zonas anatómicas y a lo largo del tiempo en un atún *Thunnus thynnus* mantenido a 20°C.

DÍAS	TIRAMINA			HISTAMINA			β -FENIETILAMINA		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.5	ND	ND	ND	0.99	0.65	4.75	ND	ND	ND
1	3.25	2.20	3.00	17.80	16.95	27.20	ND	ND	ND
1.5	4.90	7.95	12.55	1002.18	689.60	1084.20	ND	ND	ND
2	14.80	14.70	16.65	3159.35	3075.55	3075.05	ND	ND	ND
2.5	23.06	11.20	18.30	6369.85	6464.00	6815.45	7.25	5.20	1.45
3	16.60	18.50	16.35	6950.85	6427.00	7230.10	8.75	8.10	1.55
3.5	20.17	29.31	28.49	1002.63	763.95	1183.76	24.25	15.22	3.45

tabla... Contenidos ($\mu\text{g/g}$) diaminas en las distintas zonas anatómicas y a lo largo del tiempo en un atún *Thunnus thynnus* mantenido a 0°C.

DÍAS	PUTRESCINA			CADAVERINA		
	A	B	C	A	B	C
0	0.25	0.40	0.45	0.22	0.30	0.25
3	0.37	0.38	0.32	0.15	0.32	0.28
6	0.32	0.44	0.88	0.70	0.70	1.70
9	1.50	1.10	1.30	5.35	2.45	4.60
12	5.80	3.45	4.20	11.05	14.90	14.20
15	4.50	6.10	3.70	11.62	14.90	18.75
18	3.35	5.85	6.85	16.35	21.66	31.80
21	3.70	6.10	5.75	22.50	31.90	18.968

tabla... Contenidos ($\mu\text{g/g}$) diaminas en las distintas zonas anatómicas y a lo largo del tiempo en un atún *Thunnus thynnus* mantenido a 8°C .

DÍAS	PUTRESCINA			CADAVERINA		
	A	B	C	A	B	C
0	0.25	0.40	0.45	0.20	0.30	0.25
1	0.35	0.45	0.40	0.10	0.30	0.30
2	0.65	0.40	0.80	7.20	6.00	5.60
3	2.10	1.25	1.55	18.65	18.35	21.45
4	3.15	1.30	2.25	23.40	34.10	29.60
5	2.05	1.10	3.80	21.50	22.40	27.60
6	2.65	2.52	5.50	40.00	52.85	46.70
7	3.65	6.05	5.95	45.45	58.00	53.90
8	2.65	2.52	5.50	51.20	59.15	52.10
9	4.70	12.50	16.30	56.05	58.95	53.55

Tabla... Contenidos ($\mu\text{g/g}$) diaminas en las distintas zonas anatómicas y a lo largo del tiempo en un atún *Thunnus thynnus* mantenido a 20°C .

DÍAS	PUTRESCINA			CADAVERINA		
	A	B	C	A	B	C
0	0.25	0.40	0.45	0.20	0.30	0.25
3	0.35	0.20	0.65	0.45	0.20	0.70
6	0.35	0.50	0.35	13.45	12.60	18.10
9	1.15	1.05	1.50	24.76	28.80	36.30
12	2.25	3.15	3.75	48.55	32.75	51.50
15	3.80	3.10	2.90	80.35	65.46	96.72
18	5.30	-	5.95	78.15	101.20	145.85
21	7.45	10.90	4.85	62.50	62.50	68.459

Tabla.... contenidos medios de aminos biógenas considerando las tres zona anatómicas estudiadas en atún mantenido a 0°C, 8°C y 20°C.

Se observa en primer lugar y como era de esperar que en general los niveles de aminas biógenas resultaron superiores en las muestras mantenidas a 20°C que en las mantenidas a 8 y a 0°C respectivamente. Sin embargo las aminas biógenas formadas y la importancia cuantitativa de los niveles de cada una de ellas alcanzados a las tres temperaturas de estudio son semejantes, tal como sucedía en el estudio de almacenamiento y descomposición del boqueron expuesto en el apartado... de esta memoria. Por ello, también en este caso se abordará el análisis y comentarios revisando el comportamiento de cada amina biógena a lo largo del tiempo a las tres temperaturas de estudio.

Las aminas biógenas aromáticas **serotonina y triptamina** no se detectaron ni en la muestra inicial ni a lo largo de todo el estudio en ninguna de las tres temperaturas ensayadas.

Los niveles de **espermina** detectados son muy semejante a lo largo de tiempo y a las tres temperaturas de estudio (10-15 $\mu\text{g/g}$). Podría pensarse en una ligera tendencia a disminuir a lo largo de tiempo, pero solamente se obtiene una recta de regresión significativa entre el contenido de esta amina biógena detectado en la muestra y el tiempo transcurrido desde el inicio del estudio, en el caso de las muestras mantenidas a 0°C ($r=0.9591$, $y=0.x+15.43$, $p=1.64 \times 10^{-6}$). No obstante, no se puede olvidar que aunque el 91.9% de la variabilidad observada en las muestras se podría explicar en este caso por la variable tiempo de almacenamiento, la pendiente de la recta de regresión obtenida es sumamente baja e indicaría que cada día solo predicaré una disminución de 0.32 $\mu\text{g/g}$ de espermidina. Teniendo en cuenta la variabilidad natural que presentan las muestras biológicas y la variabilidad debida al propio método analítico empleado, una disminución con pendiente tan suave solo sería apreciable tras períodos de almacenamiento sumamente largos.

En el caso de la **espermina** también se observa que los niveles resultan similares a las tres temperaturas ensayadas (5-7 $\mu\text{g/g}$) y se mantienen relativamente constantes a lo largo del tiempo. Podría pensarse en un ligero aumento a lo largo del tiempo pero solamente en el caso de las muestras mantenidas a 20°C se obtiene una recta de regresión con significación estadística ($r=0.8769$, $y=0.x+3.66$, $p=0.004$). En este caso el 76.89% de la variabilidad observada podría ser explicada por la variable tiempo de almacenamiento a 20°C. De nuevo, aunque algo superior a la obtenida en el caso de la espermidina, la pendiente de la recta es baja, indica que tras un día de almacenamiento a esta temperatura se observaría una variación inferior a 1 $\mu\text{g/g}$. El echo de que esta tendencia solo resulte clara en las muestras mantenidas a 20°C y el que se verifique a una velocidad baja, unido a la circunstancia de la existencia de variabilidad entre muestras y en el propio método analítico, justifica el que se reste importancia a esta ligera tendencia y se pueda considerar los contenidos de este compuesto se mantienen constantes a lo largo del tiempo de estudio.

EL hecho de que los contenidos de espermidina y espermina, aminas consideradas fisiológicas y que siempre se encuentran en el pescado fresco, sufran solo modificaciones ligeras o no varían a lo largo del tiempo ha sido previamente descrito por otros autores,

concretamente en pescados pertenecientes a la familia de los escómbridos RITCHIE y MACKIE (1980), YAMANAKA y col. (1986b) y YAMANAKA y MATSUMOTO (1989) citan solo pequeñas variaciones a lo largo del tiempo de almacenamiento a distintas temperaturas.

El resto de las aminas biógenas estudiadas, a diferencia de espermina y espermidina presentaron contenido muy bajos en las muestras iniciales, inferiores a $1\mu\text{g/g}$, y en mayor o menor grado presentaron una tendencia a aumentar a lo largo del tiempo. tal como se observa en las figuras. a .

β -Feniletilamina no fue detectada en las muestras iniciales ni a lo largo de todo el período de estudio (21 días) en las muestras mantenidas a 0°C . Tras un período de latencia de unos 6 días en las muestras mantenidas a 8°C y de 2 días en las muestras mantenidas a 20°C se observó una ligera formación de este compuesto. Se alcanzaron $6.95\mu\text{g/g}$ tras 9 días en el primer caso y 17.63 tras 3.5 días en el segundo. Esta amina biógena, no detectada ni en las muestras iniciales ni en el 70 de las muestras de atún fresco correspondientes al estudio de mercado, podría considerarse como un compuesto de formación tardía que aparece tras períodos de almacenamiento prolongados.

Los niveles de **putrescina**, inferiores a $1\mu\text{g/g}$ en las muestras analizadas al inicio del estudio experimentan un ligero aumento a lo largo del tiempo que es más evidente en las muestras mantenidas a 20°C . Así, tras un período de almacenamiento de tres días se detectan niveles de esta amina muy similares a los iniciales en las muestras mantenidas a 0°C , $1.63\mu\text{g/g}$ en las mantenidas a 8°C y $4.55\mu\text{g/g}$ en las mantenidas a 20°C . Para las tres temperaturas de estudio se obtienen rectas de regresión, entre el contenido de putrescina y el tiempo de almacenamiento, que explican gran parte de la variabilidad observada en función del tiempo (87%, 70% y 90% para las muestras mantenidas a 0, 8 y 20°C respectivamente). Aunque a 0 y 8°C , la pendiente de las rectas obtenidas es poco importante (0.29 y 0.31) en las muestras mantenidas a 20°C es ligeramente superior de modo que según el modelo de regresión calculado ($y=1.58x-0.40$) se formarían $1.58\mu\text{g/g}$ por día de almacenamiento a esta temperatura. La putrescina, a diferencia de la β -feniletilamina ya se detecta en las muestras iniciales y su formación se inicia antes en el tiempo aunque siguiendo una pendiente muy suave alcanzándose solamente contenidos cercanos a $6\mu\text{g/g}$ en las muestras mantenidas a 20°C tras 3.5 días de almacenamiento.

Los contenidos de **tiramina**, no detectada en las muestras iniciales, aumentaron considerablemente a las tras temperaturas de estudio, alcanzándose $13.88\mu\text{g/g}$ tras 21 días a 0°C , $32.56\mu\text{g/g}$ tras 9 a 8°C y 25.99 tras 3.5 días a 20°C . A las tres temperaturas de estudio es posible construir una recta de regresión con significación estadística, entre el contenido de esta amina y el tiempo. A 0°C el modelo se ajusta a la expresión $y=0.64x-2.2$ ($r=0.9334$ $p=6.99\times 10^{-4}$), a 8°C $y=3.50x-4.60$ ($r=0.9556$, $p=1.61\times 10^{-5}$) y a 20°C $y=7.23x-2.36$ ($r=0.9602$, $p=1.52\times 10^{-4}$). Se observa que la velocidad de formación resulta claramente superior cuanto mayor es la temperatura de ensayo, llegándose en el caso del las muestras mantenidas a 20°C a una velocidad de $7.23\mu\text{g/g}$ formados por día.

La **cadaverina**, detectada en las muestras iniciales en cantidades semejantes a la putrescina, alcanza transcurrido el mismo período de tiempo contenidos siempre superiores a ésta y a los de tiramina. En las muestras mantenidas a 0°C se alcanzan 24.45 $\mu\text{g/g}$ tras los 21 días que se prolongó el estudio. Es posible el cálculo de un modelo de regresión lineal entre el contenido de esta amina y el tiempo de almacenamiento, que explique la mayor parte de esta variabilidad en función del tiempo transcurrido desde el inicio del estudio ($r=0.9660$, $y=1.25x-3.42$, $p=9.55 \times 10^{-5}$). En las muestras mantenidas a 8°C el perfil de evolución a lo largo del tiempo resulta algo distinto, se observa un claro aumento en las muestras tomadas durante los 5 primeros días, a partir de este momento se aprecia un descenso en la velocidad de formación y los contenidos se mantienen en niveles semejantes hasta el final de estudio en que se detectan 56.18 $\mu\text{g/g}$. A 20 °C este período de estabilización final se ve sustituido por una fase en que el contenido de esta amina disminuye de modo que el contenido medio máximo alcanzado tras tres días 108.4 $\mu\text{g/g}$, descendiendo hasta 64.48 a los 3.5 días. Esta disminución se observa también cuando se considera la evolución en las tres zonas anatómicas consideradas.

La **histamina** resulta la amina biógena de formación mayoritaria a lo largo del almacenamiento descomposición del atún a las tres temperaturas consideradas. Esta amina que no fue detectada al inicio del estudio se acerca a los 100 $\mu\text{g/g}$ al final del período de estudio en las muestras mantenidas a 0°C tras cuatro días de almacenamiento a 8°C mientras que en las muestras mantenidas a 20°C supera esta cifra con creces tras 36 horas de almacenamiento. Como en el caso de la cadaverina se observa en las muestras mantenidas a 20°C una disminución en el contenido de esta amina que pasa de 6950.85 $\mu\text{g/g}$ tras tres días de almacenamiento a 983.44 al final del estudio (3.5 días).

Esta disminución del contenido máximo de histamina también fue observada en las muestras de boquerón mantenidas $20 \pm 1^\circ\text{C}$. SCHULZE y ZIMMERMAN en un estudio efectuado en caballa, pescado perteneciente como el atún a la familia de los escómbridos, describen este hecho y atribuyen este comportamiento a la presencia de microorganismos con actividad histaminolítica que actuarían en avanzados estados de descomposición del pescado.

El contenido de agmatina aumenta durante los 9 primeros días de almacenamiento a 0°C, los 4-5 primeros días en las muestras mantenidas a 8°C y solo durante las 36 primeras horas a 20°C. Inicialmente esta amina no se detecta, se alcanza un punto máximo cercano a las 10 $\mu\text{g/g}$ y luego se observa un descenso hasta niveles similares a los iniciales. YAMANAKA y MATSUMOTO (1989) describen un comportamiento similar en muestras de caballa y paparda, ambas especies de la misma familia que el atún, mantenidas a 10°C, 0°C y -10°C. También se observó un comportamiento similar en el ensayo de almacenamiento descomposición del boqueron (apartado 8.1), donde sin embargo en muestras mantenidas a temperaturas semejantes, los niveles de agmatina máximos se alcanzaron antes y resultaron algo superiores a los del atún.

Figur. 37 Evolución de los contenidos ($\mu\text{g/g}$) de espermina y espermidina en muestras de atún almacenadas a 0°C , 8°C y 20°C .

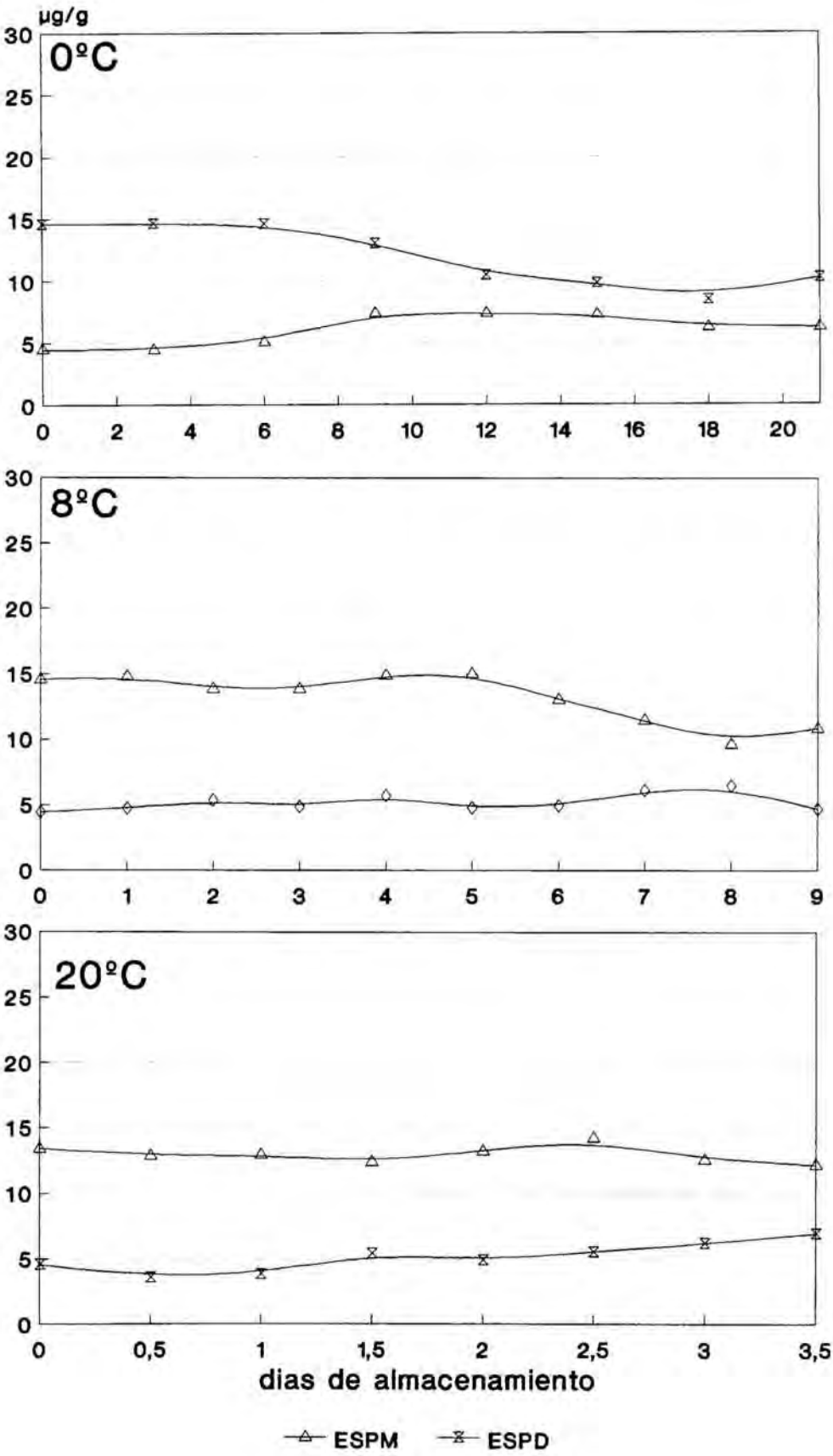


Figura 10 Evolución de los contenidos ($\mu\text{g/g}$) de agmatina y β -feniletilamina en muestras de atún almacenadas a 0°C , 8°C y 20°C .

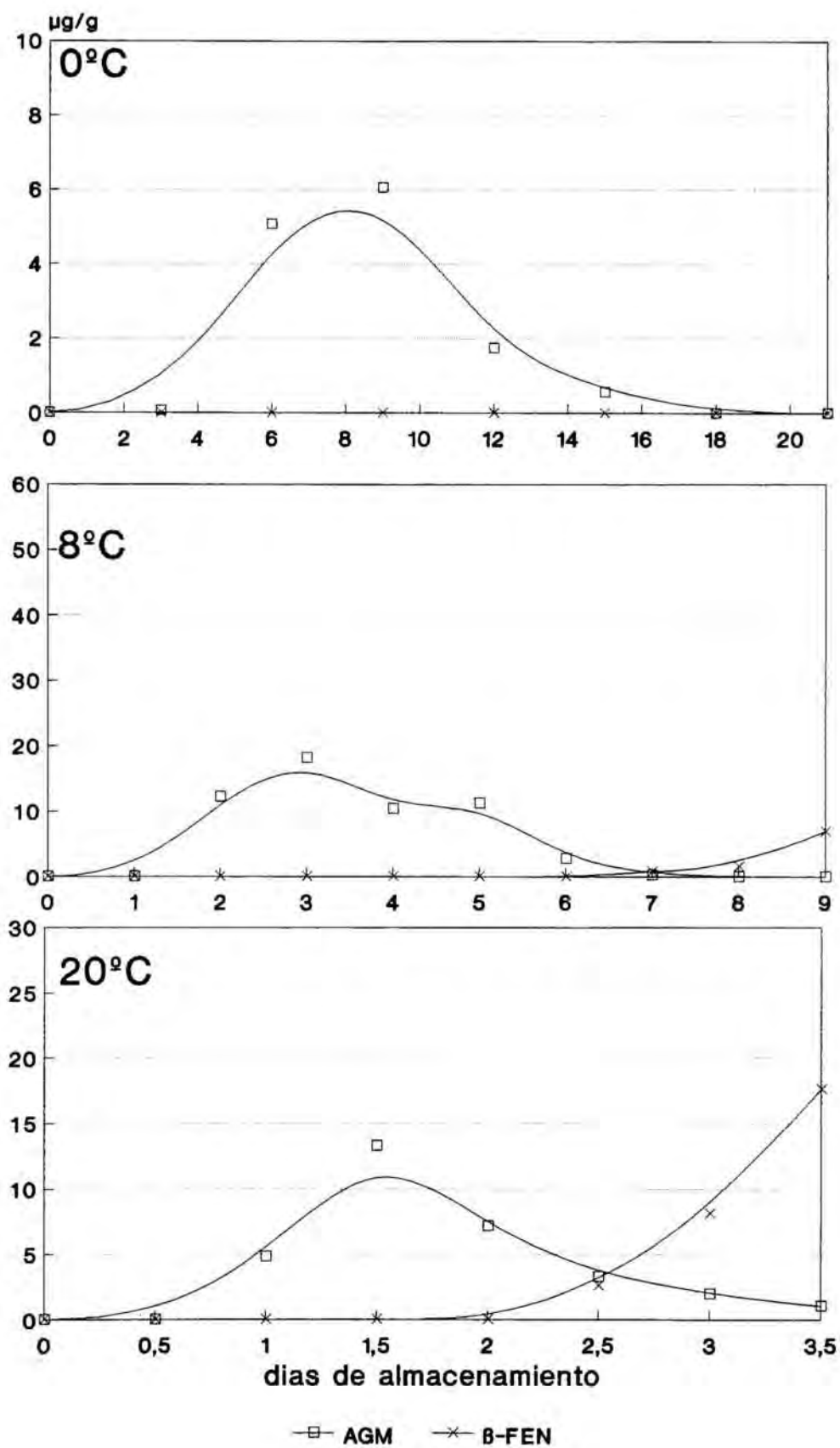


Figura 4) Evolución de los contenidos ($\mu\text{g/g}$) de tiramina, putrescina y cadaverina en muestras de atún almacenadas a 0°C , 8°C y 20°C .

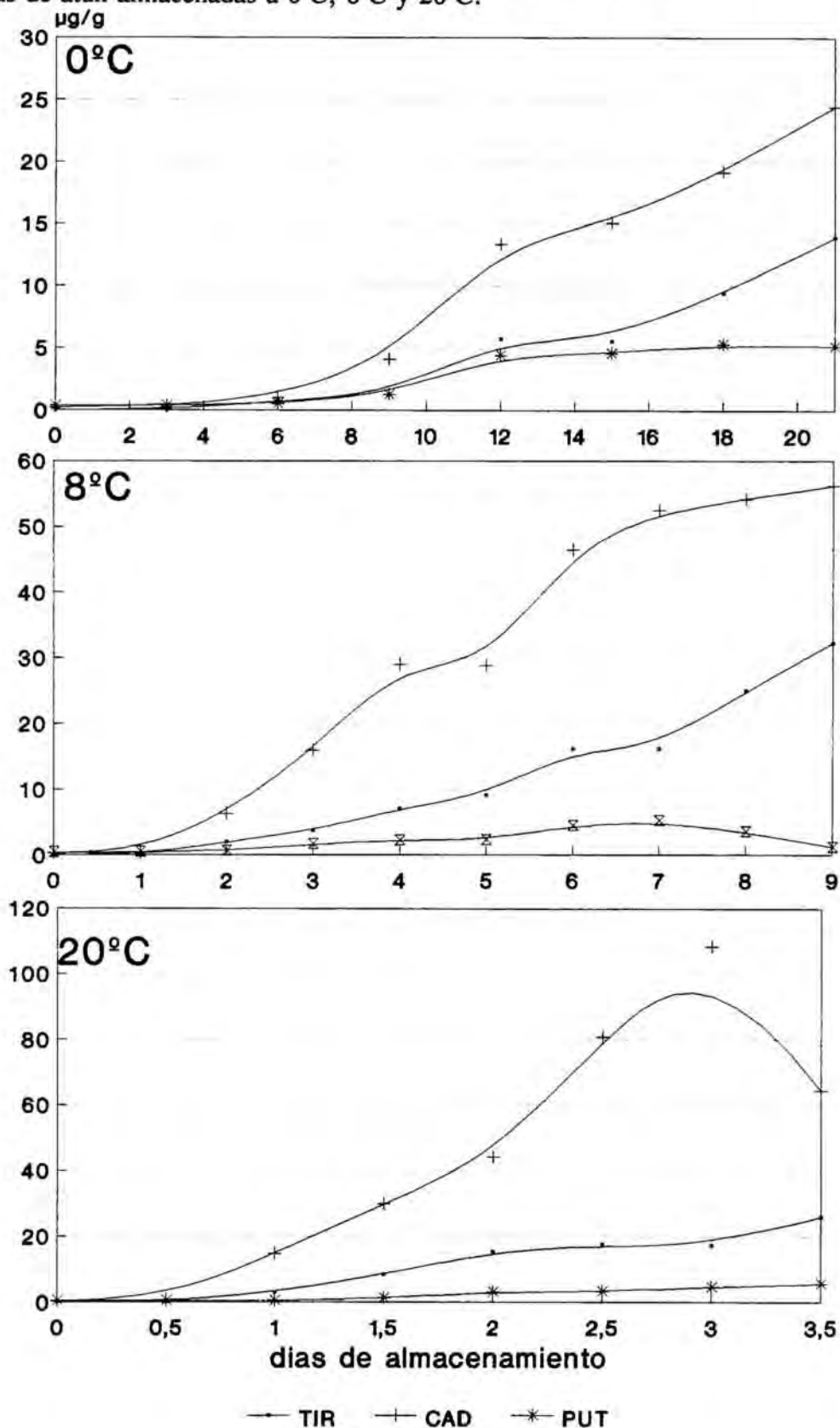
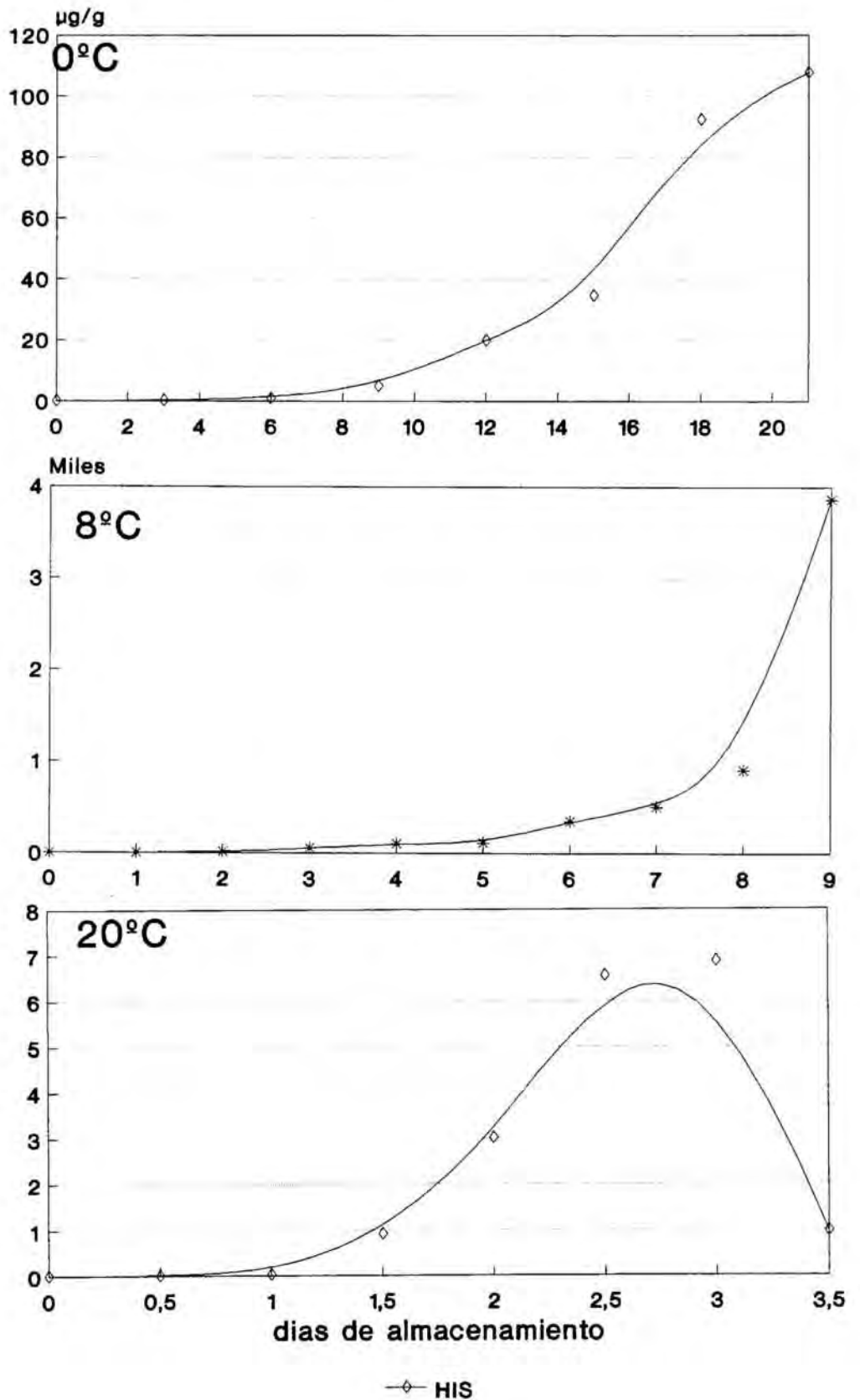


Figura 4. Evolución de los contenidos ($\mu\text{g/g}$) de histamina en muestras de atún almacenadas a 0°C , 8°C y 20°C .



En ensayos efectuados a temperaturas semejantes 8-10°C frente a 8°C y 20±1°C frente a 20°C para el boquerón y el atún respectivamente, transcurridos períodos de tiempo semejantes, se observó que en aquellos casos en que existía una formación de aminas biógenas, los niveles de estas resultaron en general superiores en las muestras de boquerón que en las de atún. Este hecho es fácilmente explicable teniendo en cuenta que generalmente los peces de menor tamaño se deterioran con mayor facilidad.

El comportamiento de las 10 aminas biógenas estudiadas en cuanto a la evolución a lo largo del tiempo de almacenamiento a las distintas temperaturas ensayadas y en cuanto a la importancia relativa de cada una de ellas resulta similar en los ensayos efectuados sobre atún y sobre boquerón.

Así, en ninguno de los dos casos se detecta serotonina y el comportamiento de espermina y espermidina puede considerarse estable a lo largo de todo el período de estudio.

Tanto en el ensayo de almacenamiento/descomposición del boquerón como en el efectuado con atún el contenido de agmatina aumenta durante una primera etapa y disminuye luego hasta alcanzar niveles iguales o inferiores a los que presentaba inicialmente, y este comportamiento se observa a todas las temperaturas ensayadas.

De establecerse un orden creciente en cuanto a la velocidad de formación y en cuanto a la importancia de los niveles de aminas biógenas alcanzados, al comparar las dos especies objeto de estudio solo resultaría distinta la posición de la triptamina, no detectada en el atún y que sin embargo se forma en cantidades algo superiores a las de la β -Feniletilamina en el boquerón. Salvo esta excepción por orden creciente de importancia coincidirían putrescina < tiramina < cadaverina < histamina. Esta clasificación creciente coincide con el comportamiento descrito en otros trabajos en los que también se estudia la evolución de los contenidos de aminas biógenas señalándose a la histamina como la amina biógena de formación mayoritaria, seguida de cadaverina y tiramina y putrescina (RITCHIE y MACKIE, 1980; STARUSZKIEWICZ y BONZ, 1981; NAGAYAMA y col., 1985; YAMANAKA y col., 1986b; MIDDLEBROOKS y col., 1988; YAMANAKA y MATSUMOTO, 1989).

8.2.1 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FORMACION DE AMINAS BIÓGENAS Y EL CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO A LO LARGO DE LA DESCOMPOSICIÓN DEL ATUN

Paralelamente a la determinación de aminas biógenas, los profesores de la Unidad de Higiene e Inspección de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona efectuaron, en cada una de las muestras, recuentos correspondiente a:

- flora mesófila aeróbica total,
- flora psicrotrófica,
- enterobacterias,
- microorganismos de carácter coliformes,
- bacterias formadoras de histamina,
- anaerobios sulfito reductores y ,
- vibrios.

Posteriormente se identificaron los microorganismos aislados y se evaluó su capacidad histidin descarboxilasa.

El comportamiento de la flora estudiada a lo largo del tiempo se reseña brevemente a continuación con el fin de estudiar posteriormente si es posible establecer alguna relación entre los grupos microbianos estudiados y la formación de aminas biógenas.

Como en el caso de las aminas biógenas tampoco a nivel de recuentos microbiológicos fue posible establecer diferencias entre las tres zonas anatómicas estudiadas.

Los recuentos correspondientes a la flora **aerobia mesófila total** a 0°C aumentan hasta el día 15 a partir del cual se estabilizan, contabilizándose al final del estudio 5.60 U.L. A 8°C se observa también un aumento inicial seguido de una estabilización que se sitúa entre los días 3 y 5 alcanzándose 6.63 U.L. A 20°C los recuentos son mayores y se alcanzan 7.94-8.75 U.L. tras 84 horas de estudio.

La flora **aerobia psicrotrófica total** alcanza mayores recuentos en las muestras mantenidas a 0 y 8°C que en las mantenidas a 20°C puesto que esta última temperatura queda ya más lejana de su óptimo de crecimiento. Los recuentos correspondientes a este tipo de flora resultan superiores a los de la flora mesófila se superan las 8 U.L. circunstancia que induce a pensar que el deterioro del atún se debe fundamentalmente a la acción de microorganismos pertenecientes a este grupo puesto que superan en casi 2 U.L. a los microorganismos de carácter mesófilo.

La **enterobacterias** con recuentos inferiores a 1 U.L. en las muestras iniciales aumentan progresivamente a lo largo del tiempo a las tres temperaturas de estudio. A 0°C se alcanzan recuentos de entre 3 y 4 U.L. al final del estudio, mientras que 8°C y 20°C se llega cerca de las 6 U.L.

Los recuentos de **coliformes** se mantienen por debajo de 1 U.L en las muestras mantenidas a 0°C durante todo el tiempo de estudio. A 8°C no aparecen hasta la muestra tomada tras 5 días de almacenamiento, alcanzándose al final del estudio entre 3 y 4 U.L.. A 20°C su presencia se hace evidente transcurridas 24 horas de almacenamiento y a las 84 horas los recuentos se sitúan entre 4 y 5 U.L.

Los microorganismos **anaerobios sulfito reductores** no aparecen ni a 0 ni a 8°C y a 20°C solo lo hacen entre las 48 y 60 horas de almacenamiento con recuentos bajos.

Los microorganismos pertenecientes al género **vibrio** no se aprecian a 0°C. A 8°C aparecen entre la muestra tomada el quinto y el sexto día no superándose las 2 U.L. y a 20°C lo hacen tras 48 horas de almacenamiento llegándose tras 84 horas de estudio a niveles cercanos a las U.L.

La flora **formadora de histamina**, no detectada en las muestras iniciales también aumenta considerablemente a las tres temperaturas de estudio apreciándose su crecimiento a partir de los 2-132 días en las muestras mantenidas a 0°C tras dos días a 8°C y tras las primeras 12 horas a 20°C.

En cuanto a la identidad de las especies bacterianas con capacidad para producir histamina aisladas a lo largo del estudio, cabe destacar que la mayoría resultaron microorganismos gram -, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (91.81% de las cepas aisladas) y agrupadas bajo los géneros *Enterobacter*, *Serratia* y *Proteus*.

Del estudio comparativo de los niveles de aminas biógenas y el crecimiento de microorganismos a lo largo del almacenamiento /descomposición del atún es difícil establecer alguna relación. Sin embargo, la aparición de coliformes tras 24 horas de almacenamiento a 20°C, coincide con el momento en que se hace evidente la formación de histamina, tiramina, agmatina y cadaverina en las muestras mantenidas a esta temperatura. En el caso de la flora formadora de histamina esta relación se hace más evidente de modo que a 0°C, cuando a los 9-12 días se observa un incremento de los recuentos correspondientes a microorganismos de este tipo, aumenta también la formación de histamina. A 8°C se da de nuevo esta coincidencia en el tiempo, situada a las 48 horas de iniciado el estudio, y a 20°C, donde el crecimiento de microorganismos es ya evidente en la muestras tomada a las 12 horas, lo es también la formación de esta amina.

Finalmente para facilitar el estudio de estas relaciones se ha construido la tabla..., en la que se indican los incrementos en el recuento de cada tipo de microorganismos, así como el incremento correspondiente a cada una de las aminas biógenas, observados desde el inicio del estudio hasta el límite de la aceptación organoléptica, establecido cuando la puntuación alcanzada en la valoración por el método cifrado francés toma un valor 3.

El incremento en el contenido de aminas biógenas hasta el momento del límite de aceptación organoléptico resultó en general más alto para la histamina que para el resto de las aminas biógenas estudiadas. La segunda amina en importancia resultó la cadaverina, seguida de putrescina y tiramina. Este comportamiento resulta paralelo al observado a lo largo de todo el ensayo de descomposición del atún a las tres temperaturas de estudio. El hecho de que el límite de aceptación organoléptica no aprecien todavía incrementos en el contenido de triptamina y de β -feniletilamina apoya la hipótesis de que se trata de aminas biógenas de formación tardía que aparecen generalmente en avanzados estados de descomposición. YAMANAKA y MATSUMOTO (1989) tampoco detectan triptamina en muestras de caballas y paparda rechazables desde el punto de vista organoléptico.

El momento en que se alcanza el contenido máximo de agmatina coincide con el límite de aceptación organoléptico en las muestras mantenidas a 8 y 20°C y resulta muy próximo en el tiempo en las mantenidas a 0°C. En el trabajo efectuado por YAMANAKA y MATSUMOTO (1989) esta coincidencia se observa en las muestras mantenidas a 10°C, mientras que en las mantenidas a 5, 1 y -1°C el punto en que se alcanza el contenido máximo de agmatina se va adelantando con respecto al límite de aceptación organoléptica, tal como sucedía en las muestras estudio mantenidas a 0°C.

En cuanto a las relaciones entre el incremento de aminas biógenas y el crecimiento de microorganismos, en la tabla ... se observa que en el límite de aceptación organoléptica:

- los recuentos correspondientes a microorganismos sulfito reductores no han sufrido ningún incremento respecto a las muestras iniciales
- el comportamiento de los vibrios es muy semejante, a 0°C no se observa ningún incremento y a 8°C y 20°C el incremento observado es inferior a 1 U.L.

Dado que las aminas biógenas que experimentan evolución a lo largo del tiempo de almacenamiento ya habían sufrido modificaciones con respecto a sus niveles iniciales en este punto a las tres temperaturas de estudio resulta, difícil asociar su formación con microorganismos pertenecientes a alguno de los grupos anteriores.

En cuanto a la relación entre la flora formadora de histamina y los incrementos de esta amina biógena observados desde el inicio del estudio hasta el momento del límite de aceptación organoléptica, cabe destacar que si bien los incrementos en los recuentos de este tipo de microorganismos son semejantes en las tres temperaturas de estudio (1-2 U.L.), los incrementos en el contenido de histamina son muy superiores en las muestras mantenidas a 20°C (924.32 $\mu\text{g/g}$) que en las mantenidas a 8°C y 0°C (350.78 y 19.92 $\mu\text{g/g}$, respectivamente). Este comportamiento estaría de acuerdo con la afirmación de algunos autores (SMITH, 1980-81) de que la formación de aminas biógenas en pescados, independientemente de otros factores externos, depende de la temperatura de conservación.

Los recuentos de microorganismos de carácter psicrotífico, experimentaron incrementos superiores en las muestras mantenidas a temperaturas inferiores, esta circunstancia es paralela al comportamiento de la putrescina que experimentaba incrementos ligeramente superiores desde el inicio hasta en límite de aceptación organoléptica en las muestras mantenidas a 0°C que en las mantenidas a 8°C y en las mantenidas a 20°C. Aunque esta diferencia no es muy grande cuantitativamente, el hecho de que se observe esta relación inversa considerando las tres temperaturas de estudio podría indicar una cierta relación entre la formación de esta amina y los microorganismos psicrotíficos.

En el caso de tiramina, cadaverina e histamina se observan, en general, mayores incrementos en las muestras mantenidas a temperaturas superiores, donde también resultan mayores los incrementos del recuento total de microorganismos mesófilos y de los pertenecientes a la familia enterobacteriaceae y los de carácter coliforme.

En todo caso aunque se observe cierta relación entre incremento de cadaverina e incremento del recuento de psicrotrofo o entre los incrementos de histamina, cadaverina y tiramina con los recuentos de mesófilos, enterobacterias y coliformes, la información que este hecho nos proporciona es muy limitada, puesto que estos grupos bacterianos resultan muy amplios. El hecho de que se observen relaciones entre la formación de aminas biógenas y grupos bacterianos tan poco específicos, sugiere que el la formación de estos compuestos esté mediada más por el desarrollo y proliferación de la flora normal del deterioro que por la presencia de determinadas especies bacterianas.

tabla... Incremento del contenido de aminos biógenas y de los recuentos de microorganismos en el límite de aceptación organoléptico en las muestras de atún mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C.

	0°C	8°C	20°C
LIMITE ACEPTACION ORGANOLEPTICO	12 días	5 días	36 horas
△ FLORA MESOFILA	2 U.L.	2-3 U.L.	3 U.L.
△ FLORA PSICROTROFA	4 U.L.	3 U.L.	2 U.L.
△ ENTEROBACTERIAS	3 U.L.	4 U.L.	5 U.L.
△ COLIFORMES	< 1 U.L.	< 1 U.L.	3
△ VIBRIOS	-	< 1. U.L.	< 1 U.L.
△ ANAEROBIOS SULFITO REDUCTORES	-	-	-
△ FLORA FORMADORA DE HISTAMINA	1-2 U.L.	1-2 U.L.	1-2 U.L.
△ PUTRESCINA	4.12 µg/g	2 µg/g	0.8 µg/g
△ TIRAMINA	5.75 µg/g	9.16 µg/g	8.46 µg/g
△ CADAVERINA	13.10 µg/g	28.00 µg/g	29.95 µg/g
△ SEROTONINA	-	-	-
△ HISTAMINA	19.92 µg/g	350.78 µg/g	924.32 µg/g
△ AGMATINA	1.75 µg/g	11.25 µg/g	13.31 µg/g
△ β-FENILETILAMINA	-	-	-
△ TRIPTAMINA	-	-	-
△ ESPERMIDINA	-	-	-
△ ESPERMINA	-	-	-

8.2.2 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE ATP Y DERIVADOS

La evolución del ATP y sus productos de degradación a lo largo del proceso de pérdida de frescura del pescado es un reflejo de las modificaciones sufridas debido a la actividad de enzimas del propio pescado.

Los resultados referentes a los contenidos de ATP, ADP, AMP, IMP, Inosina e Hipoxantina a las tres temperaturas de estudio (0°C, 8°C y 20°C) se muestran en las tablas ... a Se observa que tampoco en este caso, como ya sucedía con los contenidos de aminas biógenas y los recuentos microbiológicos, es posible establecer diferencias entre las distintas zonas anatómicas consideradas. Si bien se observa cierta variabilidad no siempre coincide el que los contenidos resulten superiores o inferiores en una determinada zona, sino que dicha variabilidad parece más bien responder a un comportamiento de tipo aleatorio. Por ello, una vez más, se considerará el estudio de la evolución de estos compuestos a lo largo del período de almacenamiento descomposición del atún, a partir de los contenidos medios considerando las tres zonas anatómicas. Los resultados globales se expresan en las tablas ... a ...

El ATP, no se detectó ya en la muestra inicial, ni a lo largo de todo el tiempo de estudio a las tres temperaturas ensayadas. De hecho en 6 de las 10 muestras de atún fresco correspondientes al estudio de mercado tampoco se había detectado este compuesto. Los niveles de ADP y AMP se mantuvieron el todo momento por debajo de $1\mu\text{mol/g}$ tal como sucedía también en las muestras de mercado. El hecho de que los tres metabolitos iniciales en la secuencia de degradación del ATP se encuentren en cantidades muy bajas, puede considerarse normal, puesto que la transformación enzimática desde ATP hasta IMP se verifica de modo muy rápido de modo y muy difícil encontrar valores altos de estos compuestos en pescado sacrificado por métodos tradicionales y no en el laboratorio. Aunque al atún sea un pescado grande, que en principio poseería mayores reservas que el boqueron y una mayor facilidad para regenerar el ATP gastado en el esfuerzo de la captura, no debemos olvidar que el ejemplar objeto de estudio había sido pescado 4 días antes y transportado en un camión cubierto de hielo. Se a descrito la degradación del ATP en pescado almacenado en hielo, en períodos de tiempo inferiores a estos 4 días (TEJADA, 1979; MURRAY y col., 1984; FLETCHER y col., 1988; FLETCHER y STATHAM, 1988).

La evolución de los contenidos de IMP, Inosina e hipoxantina a las tres temperaturas de estudio se muestra de un modo gráfico en la figura. 43

El IMP resultó el metabolito mayoritario en las muestras al inicio del estudio. Se observa que sus niveles descienden a lo largo de período de almacenamiento y este descenso se verifica a mayor velocidad cuanto mayor es la temperatura considerada. Este diferencia se confirma con las pendientes obtenidas en las rectas de regresión calculadas

entre el tiempo de almacenamiento y los niveles de IMP: $y = -0.17x + 3.55$ ($r = -0.9645$, $p = 1.08 \times 10^{-4}$) para las muestras mantenidas a 0°C ; $y = -0.46x + 3.49$ ($r = -0.9446$, $p = 3.83 \times 10^{-4}$) para las mantenidas a 20°C y $y = -1.53x + 4.58$ ($r = -0.8920$, $p = 2.89 \times 10^{-3}$). Estas tres rectas a su vez explican un alto porcentaje de la variabilidad observada en función del tiempo de almacenamiento, de modo que en el estudio a 0°C quedaría explicada un 93% de esta variabilidad, un 89% a 8°C y un 80% a 20°C .

La **Inosina**, metabolito intermedio entre IMP e hipoxantina, aumenta durante cierto tiempo y luego disminuye. Los niveles máximos se alcanzan en las muestras mantenidas a mayor temperatura pero el posterior descenso resulta menos brusco en las muestras mantenidas a 0°C . El atún tradicionalmente ha sido considerado como una especie formadora de Inosina, por ello este metabolito debería acumularse puesto que su transformación en hipoxantina por la actividad enzimática del propio pescado es muy lesta. Este hecho coincide con lo observado en la figura... , si se asume que en la formación de hipoxantina pueden participar también los microorganismos, es lógico que el descenso de los niveles de inosina se verifique más rápidamente en las condiciones en que estos se desarrollen mejor (muestras a 8°C y 20°C frente a las mantenidas a 0°C).

Finalmente se observa en las muestras mantenidas a 20°C los contenidos máximos de IMP se alcanzaban en el límite de aceptación organoléptico. A temperaturas inferiores parece que el rechazo organoléptico se atrasa con respecto a este máximo. Un comportamiento similar se había observado también en el caso de agmatina, amina biogénica cuyos contenidos aumentan durante un determinado tiempo y luego disminuyen en fases más avanzadas de la descomposición del pescado.

Los contenidos de **Hipoxantina**, muy bajos en las muestras iniciales ($0.23 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$), aumentan progresivamente a lo largo del almacenamiento del atún, observándose sin embargo, una cierta tendencia a la estabilización al final del estudio. La recta de regresión calculada entre el tiempo de almacenamiento y los niveles de hipoxantina explica un elevado porcentaje de la variabilidad de las muestras en función del tiempo transcurrido desde el inicio del estudio en las muestras mantenidas a 8 y 20°C . Las rectas responden a las expresiones $y = 0.31x + 0.18$ ($r = 0.9683$, $p = 3.85 \times 10^{-5}$) y $y = 1.07x + 0.15$ ($r = 0.9201$, $p = 1.19 \times 10^{-3}$) para las muestras mantenidas a 8°C y 20°C . Como en el caso del descenso del IMP la pendiente de la recta calculada es mayor a 20°C que a 8°C . En las muestras mantenidas a 0° la recta de regresión solamente explicaría un 40% de la variabilidad observada en función del tiempo de almacenamiento.

En la figura se observa que a medida que disminuyen los contenidos de IMP aumentan los de hipoxantina e inosina. Si se estudia la relación existente entre los contenidos de estos dos compuestos a lo largo del tiempo se observa que tanto a 8°C como a 20°C las correlaciones obtenidas son altas $r = -0.9703$ y $r = -0.9719$, respectivamente. En las muestras mantenidas a 0°C la correlación obtenida, $r = -0.7720$, aunque también significativa resulta algo más baja. Podría pensarse que ello es debido a que a esta temperatura los niveles de Inosina, metabolito intermedio se mantienen altos durante más tiempo $1.64 \mu\text{mol/g}$ tras 21 días de almacenamiento a temperatura ambiente y muy próximos a cero tras 8 días a 8°C y tras 2.5 días a 20°C .

Contenidos medios y desviaciones estándar ($\mu\text{mol/g}$) de ATP y sus productos de degradación a lo largo del proceso de almacenamiento del atún mantenido a 0°C.

DIAS	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
0	ND	0.46 ± 0.12	0.22 ± 0.12	3.65 ± 0.70	3.33 ± 1.10	0.23 ± 0.01
3	ND	0.15 ± 0.04	0.19 ± 0.11	3.43 ± 0.61	3.50 ± 0.39	0.36 ± 0.19
6	ND	0.35 ± 0.30	0.24 ± 0.08	2.29 ± 0.49	3.77 ± 0.67	1.44 ± 0.53
9	ND	0.14 ± 0.15	0.31 ± 0.31	2.07 ± 0.31	4.71 ± 1.66	2.41 ± 0.48
12	ND	0.23 ± 0.15	0.49 ± 0.24	0.81 ± 0.46	3.73 ± 2.26	2.95 ± 0.26
15	ND	0.18 ± 0.08	0.67 ± 0.52	0.96 ± 1.32	3.33 ± 2.26	2.31 ± 0.28
18	ND	0.20 ± 0.14	0.50 ± 0.24	0.52 ± 0.38	2.11 ± 1.24	1.74 ± 0.76
21	ND	0.08 ± 0.04	0.41 ± 0.16	0.32 ± 0.27	2.03 ± 1.64	1.77 ± 0.41

Contenidos medios y desviaciones estándar ($\mu\text{mol/g}$) de ATP y sus productos de degradación a lo largo del proceso de almacenamiento de atún mantenido a 20°C.

DIAS	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
0	ND	0.46 ± 0.18	0.22 ± 0.12	3.65 ± 0.0	3.33 ± 1.10	0.23 ± 0.01
0.5	ND	0.33 ± 0.28	0.13 ± 0.13	5.09 ± 1.37	4.81 ± 1.31	0.32 ± 0.12
1	ND	0.39 ± 0.18	0.18 ± 0.16	4.18 ± 0.95	4.96 ± 0.76	0.61 ± 0.10
1.5	ND	0.23 ± 0.03	0.47 ± 0.35	1.68 ± 1.45	6.95 ± 1.34	2.22 ± 0.42
2	ND	0.13 ± 0.10	0.34 ± 0.17	0.47 ± 0.77	2.71 ± 2.56	2.76 ± 0.37
2.5	ND	0.11 ± 0.03	0.35 ± 0.14	0.01 ± 0.02	0.38 ± 0.39	3.58 ± 1.22
3	ND	0.01 ± 0.02	0.35 ± 0.25	0.01 ± 0.02	0.41 ± 0.34	3.46 ± 1.59
3.5	ND	0.01 ± 0.03	0.07 ± 0.12	ND ± 0.13	0.34 ± 0.42	3.08 ± 0.84

Contenidos medios y desviaciones estándar ($\mu\text{mol/g}$) de ATP y sus productos de degradación a lo largo del proceso de almacenamiento/descomposición del atún mantenido a 8°C.

DIAS	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
0	ND	0.46 ± 0.18	0.22 ± 0.12	3.65 ± 0.70	3.33 ± 1.10	0.23 ± 0.01
1	ND	0.33 ± 0.13	0.16 ± 0.16	3.34 ± 0.47	2.90 ± 0.16	0.35 ± 0.16
2	ND	0.25 ± 0.01	0.15 ± 0.07	2.81 ± 1.11	3.12 ± 0.24	0.59 ± 0.35
3	ND	0.21 ± 0.14	0.16 ± 0.07	2.28 ± 0.81	6.32 ± 2.01	0.90 ± 0.33
4	ND	0.17 ± 0.15	0.26 ± 0.11	1.38 ± 0.25	5.09 ± 0.75	1.96 ± 0.90
5	ND	0.14 ± 0.12	0.23 ± 0.16	0.12 ± 0.17	2.03 ± 0.64	1.98 ± 0.99
6	ND	0.17 ± 0.09	0.11 ± 0.03	0.30 ± 0.52	1.69 ± 0.60	2.12 ± 1.10
7	ND	0.12 ± 0.11	0.11 ± 0.03	0.07 ± 0.13	0.57 ± 0.56	2.49 ± 0.91
8	ND	0.14 ± 0.16	0.11 ± 0.10	0.08 ± 0.12	0.33 ± 0.28	2.48 ± 0.33
9	ND	0.12 ± 0.20	0.13 ± 0.12	0.06 ± 0.10	0.01 ± 0.02	2.84 ± 0.44

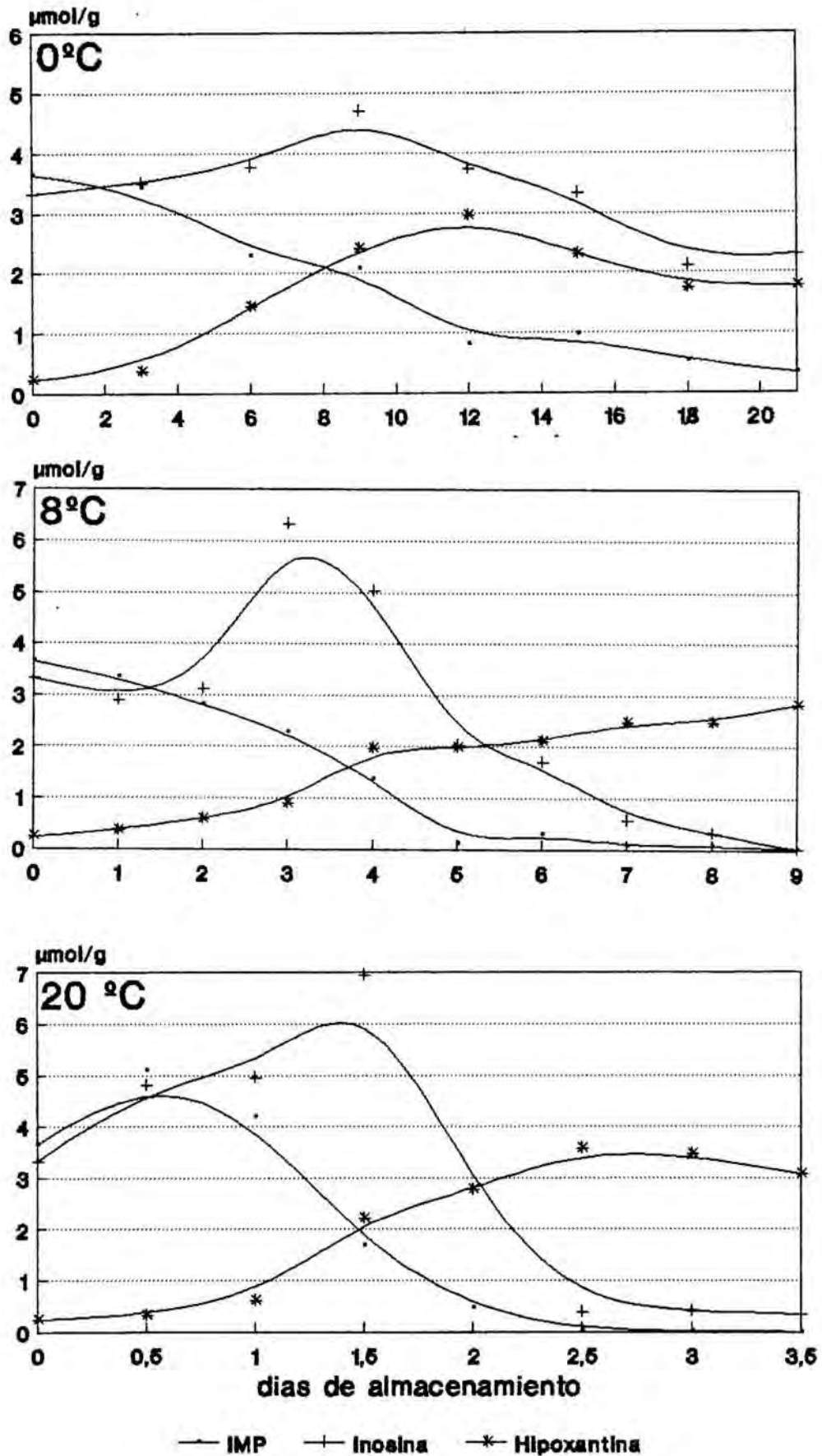
Finalmente, es posible establecer comparaciones entre los perfiles de evolución de los derivados del ATP entre las muestras de atún mantenidas a 8°C y 20°C y las de boquerón mantenidas a 8-10°C y 20 \pm 1°C pertenecientes al ensayo descrito en el apartado 8.1. En las muestras iniciales de boquerón la secuencia degradativa del ATP parecía encontrarse más avanzada. El ATP no se detectó en ninguna de las dos especies, mientras que ADP y AMP, aunque siempre muy bajos presentaban contenidos superiores en el atún. Los niveles de IMP iniciales resultaron similares, pero los niveles de inosina eran superiores en las muestras de atún mientras que la hipoxantina metabolito final de la secuencia era más elevado en el boquerón.

Los contenidos de IMP descienden con mayor velocidad en boquerón, donde a 8-10°C dejan de detectarse tras 3.5 días de almacenamiento. En las muestras de atún mantenidas a 8°C, tras un periodo de almacenamiento de 4 días el atún presentaba todavía en contenido medio de $2.20\mu\text{mol/g}$. A 20°C se repite este comportamiento, se observa que en las muestras de boquerón no se detecta IMP tras 1.5 días de almacenamiento mientras que en el atún tras un almacenamiento similar los niveles se mantienen en un contenido medio de $1.68\mu\text{mol/g}$. Todo ello sugiere que la actividad enzimática desfosforilante del IMP, variable en función de la especie animal (FRASER y col., 1968), es más elevada en el boquerón que en el atún.

En las muestras iniciales de boquerón aparecen mayores cantidades de hipoxantina que en la muestra inicial de atún, 1.10 ± 0.9 frente a $0.23\pm 0.10\mu\text{mol/g}$. Además, transcurridos periodos de tiempo iguales, a temperaturas de almacenamiento similares, se alcanzan contenidos superiores de este compuesto a lo largo de todo el tiempo de estudio en el boquerón. Esta circunstancia sugiere, suponiendo ambas especies formadoras de inosina, que el crecimiento bacteriano que participa en la transformación de inosina a IMP es más rápido en el boquerón como sugerían también los mayores contenidos de aminos biógenos alcanzados en esta tipo de muestras.

Aunque el proceso de pérdida de frescura/deterioro parece ser según los resultados obtenidos más lento en el atún que el boquerón, tampoco en este caso parece adecuado el seguimiento de ATP, AMP e IMP para la evaluación de la frescura del atún destinado a la alimentación y adquirido en los puntos de venta habituales. Podría ser más adecuado centrar el interés en la evolución de los metabolitos finales de la secuencia de degradación, IMP, inosina e hipoxantina.

Figura.43 Evolución de los contenidos ($\mu\text{mol/g}$) de IMP, Inosina e Hipoxantina en muestras de atún mantenidas a 0°C , 8°C y 20°C .



8.2. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE TRIMETILAMINA, DIMETILAMINA y DEL VALOR DEL pH

El valor del pH y los contenidos de los compuestos nitrogenados volátiles dimetilamina y trimetilamina a las tres temperaturas de estudio se muestran en la tabla... .., expresados en μg de Nitrogeno por gramo de muestras. Se observa que como sucedía con el resto de los indicadores químicos estudiados en este trabajo y con los recuentos microbiológicos y la valoración organoléptica efectuada por el personal de la Unidad de Higiene e Inspección de los Alimentos, es difícil atribuir diferencias en el comportamiento a lo largo del tiempo en función de la zona anatómica considerada. Por ello, una vez más se tratarán los resultados de modo global indicándose los valores medios y las desviaciones estandar correspondientes a cada punto de muestreo en la tabla... ..

Los contenidos de **dimetilamina**, cercanos a $10\mu\text{g}$ de N/g de muestra al inicio del estudio no presentan ninguna tendencia evolutiva al menos durante el tiempo que se prolongó el estudio a las tres temperaturas ensayadas. GALLARDO y col. (1984) describen en albacora, especie de pescado próxima al atun, niveles semejantes ($4 - 6.2 \mu\text{g/g}$) en muestras de pescado fresco destinadas a la elaboración de conservas. Excepto en las muestras mantenidas a 0°C , donde el crecimiento microbiano se encuentra poco favorecido, a priori la formación de dimetilamina no debería hacerse evidente, puesto que en la competencia por el precursor se formará mayoritariamente trimetilamina. De hecho no se han encontrado datos en la bibliografía consultada referentes a la formación de dimetilamina en muestras de pescado mantenidas a temperaturas superiores a 0°C .

Los niveles de **trimetilamina** en las muestras iniciales ($11.81 \pm 2.66 \mu\text{g/g}$) resultaron algo inferiores a los descritos por GALLARDO y col. (1984). En la figura .. se representa la evolución del contenido de este compuesto junto con la dimetilamina a las tres temperaturas de estudio.

A las tres temperaturas ensayadas se observa un incremento en los contenidos de TMA a lo largo del tiempo. Transcurridos periodos de tiempo iguales la formación de este compuesto, ligada al desarrollo de microorganismos responsables de la descomposición del pescado pertenecientes al género *Pseudomonas* fundamentalmente, los niveles de trimetilamina alcanzados son mayores en las muestras mantenidas a temperaturas más altas. Así, tras tres días de almacenamiento, los contenidos de este compuesto en las muestras mantenidas a 0°C se mantienen todavía cercanos a los iniciales, a 8°C se alcanzan $23.21 \pm 6.07 \mu\text{g/g}$ y a 20°C los contenidos son muy superiores alcanzándose $343.39 \pm 6.00 \mu\text{g/g}$.

En muestras mantenidas a 0°C se forman pequeñas cantidades de TMA, que tras los 21 que duró el ensayo alcanzaron niveles superiores a los $60\mu\text{g/g}$. En las muestras mantenidas a 8°C , los niveles finales alcanzados superan los $200\mu\text{g/g}$ al final del estudio. Tras tres días de almacenamiento a 20°C se alcanzan niveles de cerca de $300 \mu\text{g/g}$.

En el momento del límite de aceptación organoléptica los niveles de TMA determinados resultaron de 35.60 $\mu\text{g/g}$ en las muestras mantenidas a 0°C, de 74.20 $\mu\text{g/g}$ en las mantenidas a 8°C y de 23.20 en las mantenidas a 20°C. El hecho que para muestras con la misma calificación organoléptica se determinen contenidos inferiores en las mantenidas a 20 °C podría explicarse puesto que esta es la temperatura más lejana a la de óptimo crecimiento de la flora que normalmente se asocia a la formación de TMA. Se trata de microorganismos como *Pseudomonas*, *Alteromonas* o *Vibrios* de carácter psicrotrófico (SHAMSHAD y col. 1990).

La formación de trimetilamina a lo largo del tiempo de almacenamiento se ajusta mejor a un modelo de regresión exponencial que a una recta a las tres temperaturas de estudio ($r=0.9664$, $r=0.9801$ y $r=0.8663$ para 0°C, 8°C y 20°C, respectivamente). Este mismo modelo fue propuesto también por GALLARDO y col. en un ensayo en que se seguía la formación de este compuesto en sardinas mantenidas en temperatura de refrigeración.

El valor del pH aumentó progresivamente a lo largo del tiempo, a las tres temperaturas de ensayo pero la diferencia entre los valores iniciales y finales no supera una unidad por lo que resulta difícil obtener información acerca del estado de conservación solamente en función de este resultado. Un comportamiento se había dado en el ensayo de almacenamiento descomposición del boquerón (apartado 8.1) pero se observa que tanto en considerando las muestras iniciales como las correspondientes periodos de almacenamiento y temperaturas similares los valores de pH alcanzados en el boquerón resultaron siempre más altos.

Contenidos medios y desviaciones estandard de TMA, DMA y pH en muestras de atún almacenado a 0°C

DIAS	DIMETILAMINA	TRIMETILAMINA	pH
0	10.35±0.61	11.80±2.66	5.85±0.10
3	11.16±1.04	10.90±0.87	5.65±0.08
6	11.66±0.28	14.23±3.02	5.75±0.12
8	10.60±1.03	23.97±5.20	5.90±0.04
12	12.60±0.28	35.62±5.52	6.10±0.03
15	11.28±1.12	55.46±6.48	6.10±0.08
18	12.16±0.76	57.8±2.65	6.15±0.10
21	11.00±0.91	61.26±3.55	6.30±0.15

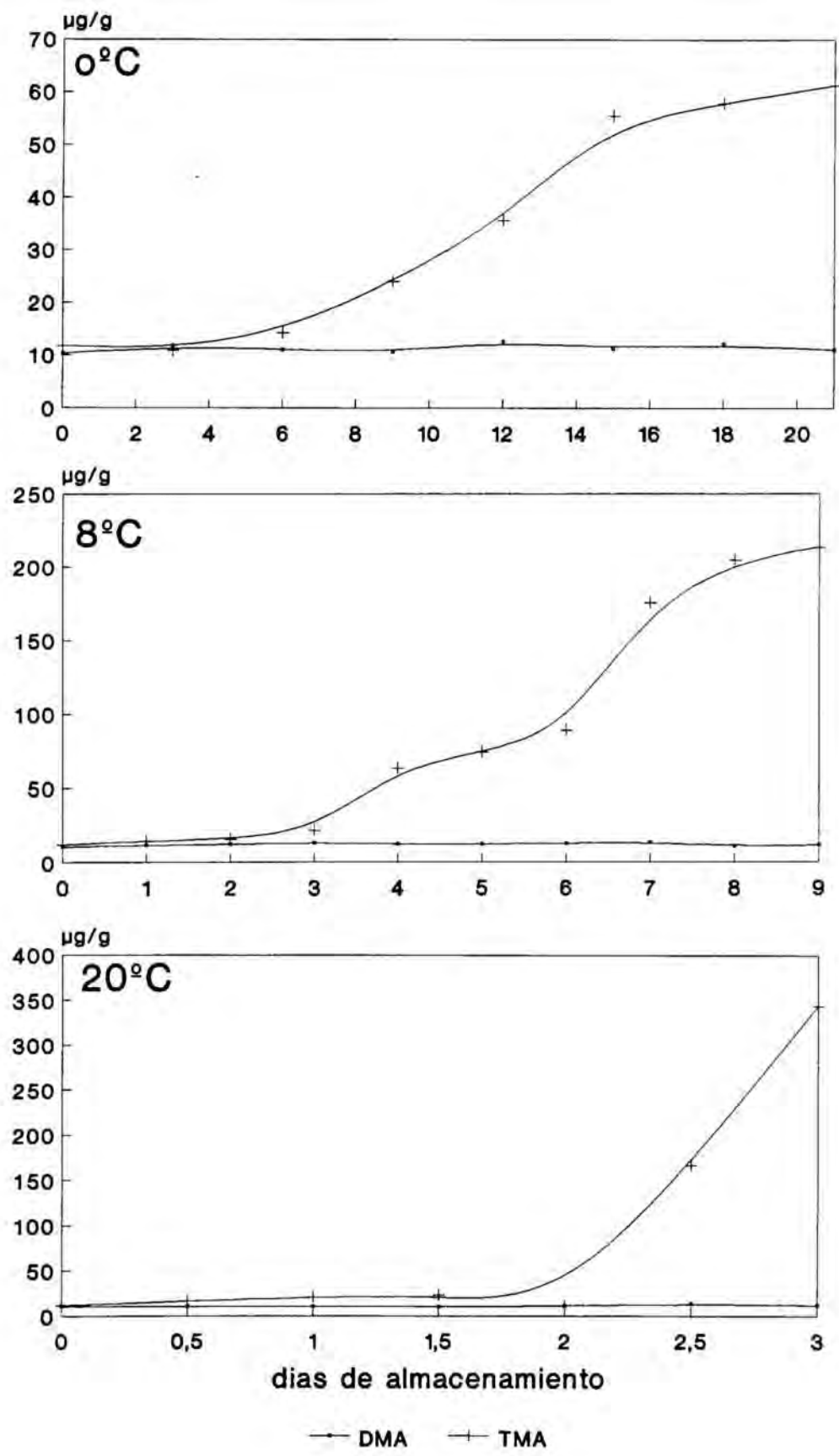
Contenidos medios y desviaciones estandard de TMA, DMA y pH en muestras de atún almacenado a 8°C

DIAS	DIMETILAMINA	TRIMETILAMINA	pH
0	10.35±0.61	11.80±2.66	5.85±0.10
1	11.50±0.61	14.56±4.74	5.91±0.03
	12.06±0.23	15.50±4.15	5.95±0.04
3	13.10±0.17	21.43±8.16	5.98±0.02
4	12.20±1.15	36.23±12.3	6.14±0.08
5	12.23±1.70	74.32±5.38	6.21±0.09
6	12.66±2.63	89.11±3.63	6.26±0.10
7	13.33±1.87	175.25±66.3	6.55±0.10
8	10.78±1.32	204.5±3.93	6.70±0.07
9	11.30±1.04	213.26±32.4	6.65±0.10

Contenidos medios y desviaciones estandard de TMA, DMA y pH en muestras de atún almacenado a 20°C

DIAS	DIMETILAMINA	TRIMETILAMINA	pH
0	10.35±0.61	11.80±2.66	5.85±0.10
0.5	10.44±0.69	16.80±3.19	5.90±0.02
1	10.60±1.73	20.61±4.49	5.95±0.20
1.5	10.13±1.64	23.21±6.07	6.01±0.09
2	10.95±0.5	111.83±29	6.10±0.08
2.5	13.63±0.75	166.27±29.0	6.15±0.03
3	11.63±1.25	343.4±6.00	6.20±0.07

Figura.44 Evolución de los contenidos de DMA y TMA en muestras de atún mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C.



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.

9.1. **DISEÑO DEL ENSAYO Y MUESTRAS ESTUDIADAS.**

Todas las muestras analizadas en este estudio procedían de una misma pieza de atún (*Thunnus thynnus*), de 20 Kg de peso y en óptimo estado de conservación, adquirida en la lonja de mercabarna (Barcelona).

El atún se trasladó en condiciones de refrigeración a los laboratorios de la Unidad de Higiene e Inspección de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), donde se prepararon las distintas muestras correspondientes a este estudio, según el procedimiento descrito por TAYLOR (1985):

- En primer lugar se lavó la superficie del pescado con escobillones de algodón impregnados con una solución de formaldehído al 10% y etanol al 95%.
- Posteriormente, en una campana de flujo laminar, se retiró la piel y el músculo se introdujo en bolsas estériles en las que se trituró. Se completaron hasta un total de 15 bolsas, con unos 450 g de muestra en cada una de ellas.
- Sobre estas muestras estériles se añadió un inóculo de 10^6 microorganismos de cada una de las cepas seleccionadas a 3 bolsas que fueron conservadas a 0 °C, 8 °C y 20 °C, respectivamente. El mismo proceso se siguió con otras bolsas en las que no se inoculó ningún microorganismo y que fueron utilizadas como control de esterilidad.

Las cuatro cepas habían sido seccionadas de entre aquellas aisladas en un estudio previo de alteración de atún, realizado en la Unidad de Higiene e Inspección de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UAB, y habían demostrado poseer actividad aminoácido descarboxilasa. *Plesiomonas shigelloides* y *Serratia marcescens* fueron incluidas en el estudio debido a la novedad que suponía su aislamiento como microorganismos poseedores de esta capacidad. *Proteus morganii* y *Klebsiella oxytoca*, bacterias aisladas frecuentemente a partir de pescados involucrados en brotes de intoxicación histamínica (TAYLOR y col., 1976; CATTANEO y col., 1984 y TIECCO y col., 1984), se seleccionaron dada su potente y reconocida actividad histidín descarboxilasa.

La toma de muestras se efectuó cada 3 horas en las bolsas conservadas a 20 °C, cada 12 horas en las conservadas a 8 °C y cada 24 horas en las mantenidas a 0 °C. En cada punto del muestreo se tomaron 2 porciones de unos 25 g cada, una tras haber homogeneizado su contenido. Una de las porciones, se utilizó en el laboratorio de la Unidad de Higiene e Inspección de los Alimentos y la segunda fue enviada a nuestro laboratorio, donde se efectuaron las determinaciones de aminas biógenas (putrescina, tiramina, cadaverina, serotonina, histamina, agmatina, β -feniletilamina, espermidina, triptamina espermina), ATP y derivados (ADP, AMP, IMP, Inosina e Hipoxantina) y de las aminas volátiles DMA y TMA.

El conjunto de muestras analizadas en este estudio está formado por un total de 5 series, 4 de las cuales se contaminaron con una especie bacteriana determinada y 1 serie adicional no contaminada, que actuó como control.

9.2 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS

Es un hecho generalmente aceptado que las aminas biógenas se forman a partir de la descarboxilación de sus aminoácidos precursores, siendo este efecto atribuible a la actividad bacteriana.

Aunque existen numerosos trabajos sobre la actividad aminoácido-descarboxilasa de la flora bacteriana del pescado (YOSHINAGA y FRANK, 1982; CATTANEO y col., 1984; FRANK y YOSHINAGA, 1984), se trata en la mayoría de los casos, de estudios de tipo cualitativo, encaminados a conocer si una determinada especie bacteriana posee o no esta capacidad.

De ahí la importancia de realizar un estudio controlado de alteración en Pestado contaminado por especies bacterianas seleccionadas, para corroborar si su capacidad aminoácido descarboxilasa, evaluada previamente sobre un medio de cultivo, se pone también de manifiesto cuando estos microorganismos crecen sobre el pescado.

El hecho de disponer, además, de una técnica analítica de gran sensibilidad y exactitud, como es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), permite hacer un estudio, no únicamente cualitativo, sino también cuantitativo, tanto de los contenidos como de la evolución de los niveles de las aminas biógenas formadas.

Se pretende relacionar la evolución de por la población bacteriana sobre el pescado contaminado experimentalmente en el laboratorio con los niveles de aminas detectados, diferenciando las aminas presentes ya en el pescado de forma fisiológica, de aquellas cuya formación es debida a la actividad de microorganismos.

Finalmente se pretende también dilucidar cuál o cuales de las aminas biógenas estudiadas son originadas, y en qué cantidad, por cada una de las especies bacterianas utilizadas en este trabajo y así poder clasificarlas como especies con actividad formadora de aminas biógenas fuerte o débil.

Uno de los factores que en la bibliografía más se ha relacionado con este crecimiento microbiano y, o extensión, con la formación de aminas biógenas, es la temperatura. Algunos autores, como SMITH (1980), incluso han afirmado que, independientemente de otros factores externos, la formación de aminas en pescados depende, fundamentalmente, de su temperatura de conservación. Así, de esta temperatura dependerán, en primer lugar, la flora bacteriana capaz de desarrollarse en el pescado y, posteriormente, los contenidos de aminas biógenas alcanzados.

En este trabajo, se ha considerado también la importancia del factor temperatura, estudiando su influencia sobre la actividad formadora de aminas de todas las especies coleccionadas en este estudio. Se pretende conocer cuál es la temperatura más idónea para el crecimiento de cada microorganismo sobre el atún y observar si esta coincide o no con la de su máxima formación de aminas, comprobando si, en este sentido, existen diferencias entre las 4 especies estudiadas.

9.2.1 EVOLUCION DE LOS NIVELES DE AMINAS BIOGENAS EN LAS MUESTRAS CONTROL.

Como se ha comentado anteriormente, las muestras que reciben el nombre de control corresponden a porciones de músculo de atún, no inoculadas con ningún microorganismo.

Los resultados obtenidos en el conjunto de las muestras pertenecientes a la serie control y mantenidas a las tres temperaturas consideradas, se muestran en la tabla --.

Para facilitar la comprensión de los datos, se ha construido la tabla --, donde se registran los casos de presencia (P) y de formación (F) de las aminas biógenas estudiadas.

Se observa, como era de esperar en un control, que sólo fueron detectadas las aminas biógenas consideradas como fisiológicas (MIETZ y KARMAS, 1977; YAMANAKA y col., 1987) y que no se produjo, en ningún caso, formación de estos compuestos a lo largo del período de estudio.

En el conjunto de las 7 muestras pertenecientes a esta serie control mantenidas a 0°C, no se ha detectado ninguna de las aminas biógenas generalmente relacionadas con la alteración del pescado a lo largo de las 168 horas que duró el estudio. Si bien **putrescina** puede considerarse como perteneciente a este grupo, algunos autores la consideran también como fisiológica si se encuentra a niveles muy bajos (STARUZKIEWICZ y BOND, 1981), como los detectados en todas las muestras de esta serie que resultaron siempre inferiores a 1µ/g.

Tabla... Contenido de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún no contaminado con ningún microorganismo y mantenidas a 0°C , 8°C y 20°C

T	t(h)	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPM
0°C	24	tr ¹	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.25	ND	14.55
	48	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.15	ND	19.80
	72	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.45	ND	18.05
	96	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.90	ND	17.60
	120	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.85	ND	18.15
	144	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.45	ND	16.50
	168	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.60	ND	21.70
8°C	12	tr	ND	tr	ND	ND	ND	ND	5.55	ND	17.65
	24	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.35	ND	13.60
	36	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.75	ND	13.35
	48	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.15	ND	17.40
	60	tr	ND	tr	ND	ND	ND	ND	5.45	ND	14.10
	72	tr	ND	tr	ND	ND	ND	ND	5.80	ND	15.40
20°C	3	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.40	ND	19.65
	6	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.10	ND	20.65
	9	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.85	ND	11.70
	12	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.90	ND	20.25
	15	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.15	ND	24.20

tr = Trazas (niveles inferiores a $1\mu\text{g/g}$)

Espermina y espermidina, también consideradas fisiológicas, se han determinado en niveles que oscilan entre 14.55 y 21.70 ppm y 5.25 y 8.15 ppm, respectivamente. Estas cifras son superiores a las descritas previamente por otros autores en muestras de pescado (MIETZ y KARMAS, 1978; PECHANEK y col., 1980; HERNANDEZ JOVER, 1992), lo que fácilmente puede ser explicado teniendo en cuenta que el atún empleado había sido congelado inmediatamente después de su captura. Resultados similares fueron obtenidos en el ensayo planteado en el apartado 10.2 realizado sobre atún congelado utilizado como materia prima para la elaboración de conservas.

El hecho de que los contenidos de **cadaverina** detectados en algunas muestras se mantengan a nivel de trazas les resta significación, sobretodo si se tiene en cuenta que la presencia de dicha amina sólo se detecta en algunas de las muestras mantenidas 8°C , ello nos induce a pensar que su aparición pudiera estar relacionada con alguna ligera contaminación esporádica por parte de bacterias psicrófilas, microorganismos que, según la bibliografía (OKUZUMI y col., 1981; OKUZUMI y AWANO, 1983), crecen con mayor facilidad a temperaturas próximas a 8°C .

En definitiva, el comportamiento de todas las muestras pertenecientes a la serie control resultó muy semejante. Únicamente se detectó la presencia de **espermina** y **espermidina** en cantidades importantes, junto con contenidos muy inferiores de **putrescina**. Por tanto, puede concluirse que en esta serie no contaminada con ningún microorganismo, apenas hay presencia y no existe ningún tipo de formación de aminas, a excepción de las fisiológicas. Ello nos permitirá, en adelante, atribuir cualquier formación de aminas biógenas en las otras series a la actividad ejercida por la especie bacteriana inoculada.

Tabla... Presencia (P) y formación (F) de aminas biógenas en muestras de atún no contaminadas con ningún microorganismo.

	0°C		8°C		20°C	
	P	F	P	F	P	F
PUT	+	-	+	-	+	-
TIR	-	-	-	-	-	-
CAD	-	-	+	-	-	-
SER	-	-	-	-	-	-
HIS	-	-	-	-	-	-
AGM	-	-	-	-	-	-
β-FEN	-	-	-	-	-	-
ESPD	++	-	++	-	++	-
TRIP	-	-	-	-	-	-
ESPM	++	-	++	-	++	-

- Ausencia + Hasta 5 µg/g ++ Hasta 30 µg/g

9.2.2 EVOLUCION DE LOS NIVELES DE AMINAS BIOGENAS EN MUESTRAS CONTAMINADAS CON MICROORGANISMOS DE LA ESPECIE PLESIOMONAS SHIGELLOIDES.

Los resultados obtenidos en el conjunto de las muestras pertenecientes a esta serie y mantenidas a las tres temperaturas consideradas, se muestran en la tabla -- y la interpretación de resultados con referencia a la formación o no formación de estos compuestos se especifica en la tabla ...

Las aminas biógenas **tiramina**, **serotonina**, **histamina**, **agmatina**, **β-feniletilamina** y **triptamina** no han sido detectadas en de las muestras de atún contaminadas con microorganismos de la especie *Plesiomonas shigelloides*, a ninguna de las tres temperaturas de estudio consideradas.

Las aminas que han sido detectadas en todas las muestras son siempre las mismas, independientemente de la temperatura considerada y coinciden en niveles y en comportamiento con lo observado previamente en la serie control. Así, **putrescina**,

aparece únicamente a nivel de trazas y **espermidina** y **espermina** muestran niveles mas elevados, con contenidos medios de 6.64 ± 0.9 y 17.5 ± 2.0 respectivamente. No se observa, tal como sucedía en las muestras de la serie control y en el ensayo de almacenamiento/descomposición del atún correspondiente al apartado ... ninguna tendencia evolutiva a lo largo del tiempo ni diferencias atribuibles a la temperatura de almacenamiento considerada.

Serotonina y **cadaverina**, aparecen como dos aminas cuya presencia parece estar relacionada con la actividad aminoácido-descarboxilasa de los microorganismos pertenecientes a la especie *Plesiomonas shigelloides*, puesto que no habían sido detectadas en ninguna de las muestras de la serie control. Este hecho podría ser indicativo de que los microorganismos de esta especie presenten una mayor afinidad por los aminoácidos precursores de estas aminas (triptófano y lisina, respectivamente) que por otros que pudieran encontrarse también en el medio.

Sin embargo, ambas aminas no presentan el mismo comportamiento. Así, en el caso de serotonina se detectan contenidos bajos (inferiores en todo momento a los $3 \mu\text{g/g}$), no observándose ningún tipo de tendencia evolutiva ni ninguna diferencia entre las 3 temperaturas estudiadas. En cambio, la cadaverina, que en las muestras iniciales presentaba niveles inferiores a $1 \mu\text{g/g}$, evoluciona a 8°C hasta alcanzar valores cercanos a $12 \mu\text{g/g}$ tras 72 horas de almacenamiento a esta temperatura. En las muestras mantenidas a 20°C también se intuye la tendencia a la formación de este compuesto, aunque en este caso dado que el período de estudio era más corto (15 horas) se alcanzaron solamente $2.65 \mu\text{g/g}$ (tabla...). Por tanto, aunque en este trabajo el incremento más importante en los niveles de cadaverina correspondiera a las muestras mantenidas a 8°C , temperatura próxima a la óptima para el desarrollo de *Plesiomonas shigelloides* por su carácter de microorganismo psicrotrofo, no se puede descartar la formación a 20°C durante períodos de almacenamiento más largos que los de este trabajo.

En las figura⁴⁵ se expresa gráficamente la evolución de serotonina y cadaverina en las muestras contaminadas con *Plesiomonas shigelloides*, frente a las muestras de la serie control a las 3 temperaturas de estudio, pudiéndose observar las diferencias que aparecen en su comportamiento.

En cuanto a la evolución de los microorganismos, estudiada por LOPEZ SABATER (1992) sobre estas mismas muestras, puede decirse que las cepas inoculadas han conseguido asentarse en el músculo del atún, tras un primer período de adaptación al medio en que sus recuentos disminuyeron ligeramente. En cuanto los niveles alcanzados, fueron similares a todas las temperaturas (alrededor de 10^6). Sin embargo, creemos que es un hecho a destacar el que las bacterias inoculadas se mantengan viables y que incluso, en algunos momentos, se haya detectado un ligero crecimiento. Además, niveles de 10^6 u.f.c. no se alcanzaron tampoco durante un proceso de descomposición de atún realizado por este mismo autor, y donde los niveles de aminas biógenas formadas fueron muy elevadas (VECIANA NOGUES, 1993). Estos datos parecen concordar con los de YOSHINAGA y FRANK (1982), que observaron un fuerte crecimiento en la concentración de **histamina** en un listado entre las 18 y 24 horas de incubación, sin que el recuento de microorganismos se modificara sustancialmente.

Tabla... Contenido de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminado con microorganismos de la especie *Plesiomonas shigelloides* y mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C

T	t(h)	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPM
0°C	24	tr ¹	ND	1.50	2.95	ND	ND	ND	7.50	ND	18.25
	48	tr	ND	1.55	3.00	ND	ND	ND	7.60	ND	20.0
	72	tr	ND	1.45	2.90	ND	ND	ND	8.35	ND	16.50
	96	tr	ND	1.65	2.75	ND	ND	ND	7.15	ND	16.35
	120	tr	ND	1.75	2.90	ND	ND	ND	7.40	ND	19.40
	144	tr	ND	1.20	2.50	ND	ND	ND	6.70	ND	18.00
	168	tr	ND	1.05	2.90	ND	ND	ND	6.60	ND	19.10
8°C	12	tr	ND	0.65	2.60	ND	ND	ND	5.60	ND	16.85
	24	tr	ND	0.65	2.85	ND	ND	ND	5.62	ND	19.55
	36	tr	ND	1.40	2.82	ND	ND	ND	6.10	ND	20.75
	48	tr	ND	0.45	2.88	ND	ND	ND	5.50	ND	15.45
	60	tr	ND	3.85	2.20	ND	ND	ND	4.65	ND	12.40
	72	tr	ND	12.40	2.60	ND	ND	ND	5.60	ND	15.75
20°C	3	tr	ND	1.50	2.60	ND	ND	ND	7.15	ND	15.45
	6	tr	ND	1.80	2.80	ND	ND	ND	6.95	ND	17.95
	9	tr	ND	1.35	2.95	ND	ND	ND	6.95	ND	17.05
	12	tr	ND	1.50	2.95	ND	ND	ND	6.75	ND	18.15
	15	tr	ND	2.50	2.95	ND	ND	ND	7.40	ND	18.10

tr= Trazas (niveles inferiores a $1\mu\text{g/g}$)

Tabla... Presencia (P) y formación (F) de aminas biógenas en muestras de atún no contaminadas con microorganismos de la especie *Plesiomonas shigelloides*.

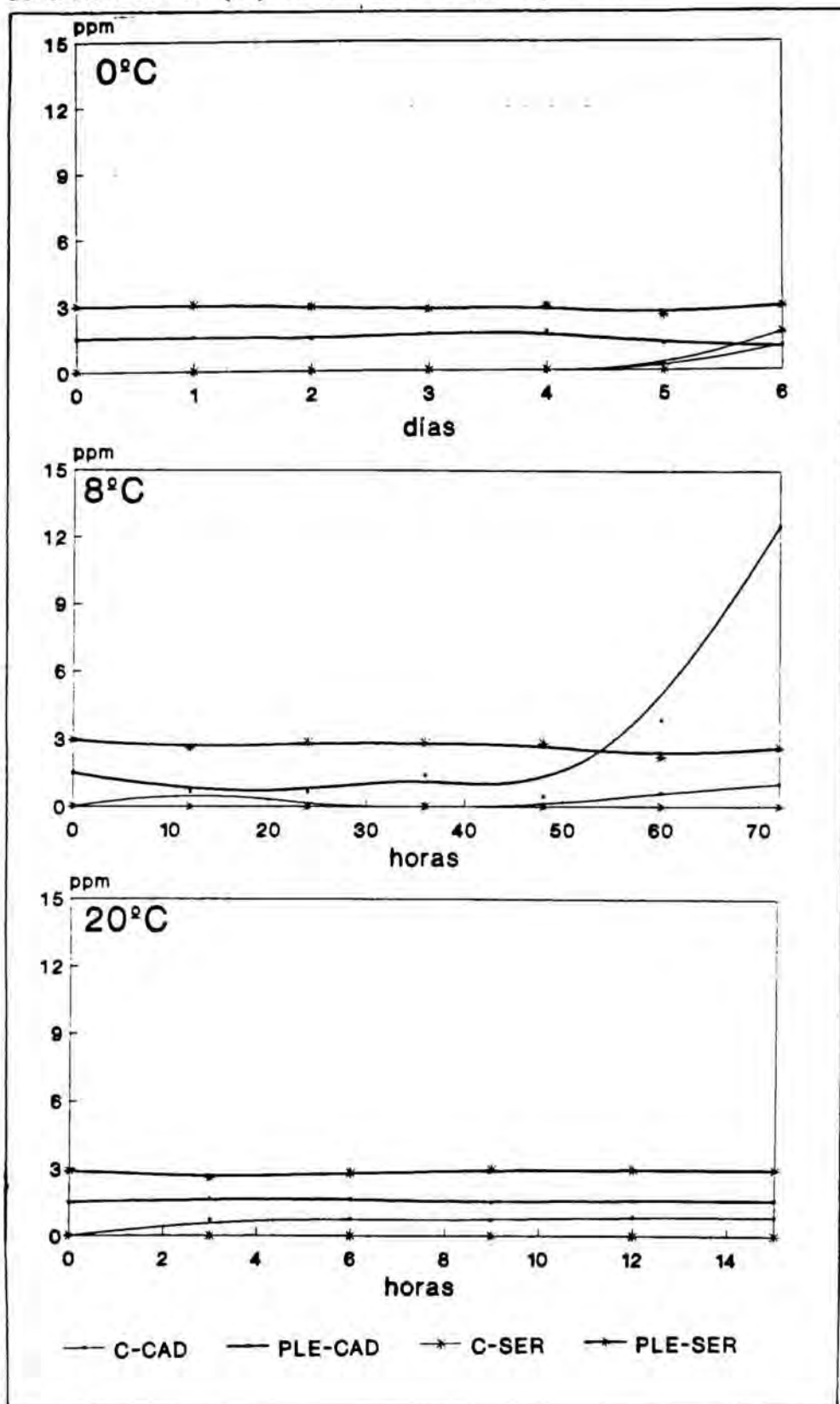
	0°C		8°C		20°C	
	P	F	P	F	P	F
PUT	+	-	+	-	+	-
TIR	-	-	-	-	-	-
CAD	+	-	+	++	+	+
SER	+	-	+	-	+	-
HIS	-	-	-	-	-	-
AGM	-	-	-	-	-	-
β -FEN	-	-	-	-	-	-
ESPD	++	-	++	-	++	-
TRIP	-	-	-	-	-	-
ESPM	++	-	++	-	++	-

- Ausencia

+ Hasta 5 $\mu\text{g/g}$

++ Hasta 30 $\mu\text{g/g}$

figura 45 Evolución de los contenidos de serotonina y cadaverina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminadas con microorganismos de la especie *Plesiomonas shigelloides* () y en muestras de la serie control (---) mantenidas a 0°C, 8°C y 20 °C.



9.2.3 EVOLUCION DE LOS NIVELES DE AMINAS BIOGENAS EN MUESTRAS CONTAMINADAS CON MICROORGANISMOS DE LA ESPECIE *SERRATIA MARCESCENS*.

Los resultados obtenidos en el conjunto de las muestras pertenecientes a esta serie, y mantenidas a las 3 temperatura consideradas, se muestran en la tabla ... y la interpretación de resultados en cuanto a la existencia o no de formación de estos compuestos en la tabla...

Tampoco en este caso como en las muestras contaminadas con *Plesiomonas shigelloides* se detectaron las aminas biógenas **tiramina, histamina, agmatina, β -feniletilamina o triptamina.**

Las aminas que fueron detectadas en todas las muestras coincidían en las tres temperaturas de estudio, presentando un comportamiento muy similar al observado anteriormente en las muestras contaminadas con microorganismos pertenecientes a la especie *Plesiomonas shigelloides*.

Así, **putrescina** apareció únicamente a nivel de tazas y, **espermina y espermidina** mostraban contenidos altos, homogéneos y sin ninguna evolución clara en el tiempo.

Serotonina y cadaverina podrían clasificarse de nuevo, debido a su ausencia en el control, como aminas biógenas de formación específica por parte de la especie *Serratia marcescens*. Así, los niveles de serotonina, son similares a los obtenidos para las muestras de la serie contaminada con *Plesiomomas shigelloides*, no superándose en ningún caso las $3\mu\text{g/g}$. Los niveles de cadaverina presentaban variaciones a lo largo del período de almacenamiento estudiado, alcanzándose valores distintos en función de la temperatura.

En las muestras mantenidas a 0°C los niveles de cadaverina situados en $1.55\mu\text{g/g}$ en la muestra inicial alcanzan $3.65\mu\text{g/g}$ tras 120 horas de almacenamiento y esta tendencia a aumentar se confirma en las muestras siguientes alcanzándose al final del estudio $7.95\mu\text{g/g}$. En las muestras mantenidas a 8°C los niveles de esta amina resultan muy distintos de los iniciales a partir de la muestra correspondiente a 60 horas y en las mantenidas a 20°C el aumento se hace evidente en un período de tiempo más corto (15 horas).

Excepto en las muestras mantenidas a 0°C se observa una coincidencia en el tiempo de inicio de la formación de cadaverina entre las muestras contaminadas por *Plesiomonas Shigelloides* y *Serratia marcescens*, tanto en las series mantenidas a 8 como en las mantenidas a 20°C .

En la figura 46 se expresa gráficamente la evolución de serotonina y cadaverina en las muestras contaminadas con *Serratia marcescens*, frente a las muestras de la serie control a las 3 temperaturas de estudio, pudiéndose observar las diferencias que aparecen en su comportamiento.

En resumen, se puede afirmar que tanto el comportamiento de la serie compuesta por muestras contaminadas con *Plesiomonas shigelloides*, como el de la serie contaminada con *Serratia marcescens*, es similar y paralelo, respecto a los contenidos de todas las aminas biógenas, excepto para la cadaverina, en la que se obtienen niveles más altos para la 2ª serie considerada. En ambos casos, transcurrido períodos de tiempo similares los niveles de cadaverina alcanzados son superiores en las muestras mantenidas a temperaturas superiores, aunque esta diferencia no resultara cuantitativamente muy importante.

La temperatura óptima de crecimiento de ambas especies resulta más próxima a 8 que a 20 oC, al tratarse de dos especies consideradas por muchos autores (OKUZUMI y col., 1981; RAMESH y VENUGOPALAN, 1986 y VAN SPREEKENS, 1986) como psicrófilas o bacterias del grupo N. Sin embargo la temperatura óptima para la formación de aminas no tiene porqué coincidir con la temperatura de máximo crecimiento de la población bacteriana (FRANK, 1985)

Tabla... Contenido de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminado con microorganismos de la especie *Serratia marcescens* y mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C

T	t(h)	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPM
0°C	24	tr ¹	ND	1.55	2.85	ND	ND	ND	8.00	ND	18.55
	48	tr	ND	1.50	2.55	ND	ND	ND	7.80	ND	20.70
	72	tr	ND	1.65	2.45	ND	ND	ND	7.95	ND	19.55
	96	tr	ND	1.60	2.75	ND	ND	ND	7.10	ND	21.75
	120	tr	ND	3.65	2.70	ND	ND	ND	6.85	ND	23.90
	144	tr	ND	5.55	2.75	ND	ND	ND	6.85	ND	19.20
	168	tr	ND	7.95	2.30	ND	ND	ND	5.55	ND	
8°C	12	tr	ND	1.65	2.95	ND	ND	ND	6.20	ND	28.10
	24	tr	ND	1.55	1.80	ND	ND	ND	8.00	ND	23.90
	36	tr	ND	1.85	2.70	ND	ND	ND	8.80	ND	22.30
	48	tr	ND	1.05	2.60	ND	ND	ND	7.80	ND	19.25
	60	tr	ND	8.35	3.15	ND	ND	ND	8.95	ND	26.50
	72	tr	ND	12.75	2.80	ND	ND	ND	7.45	ND	21.20
20°C	3	tr	ND		2.30	ND	ND	ND	4.50	ND	12.25
	6	tr	ND		2.80	ND	ND	ND	7.20	ND	17.58
	9	tr	ND		2.70	ND	ND	ND	8.25	ND	18.30
	12	tr	ND		2.60	ND	ND	ND	7.80	ND	16.70
	15	tr	ND		2.80	ND	ND	ND	7.10	ND	15.85

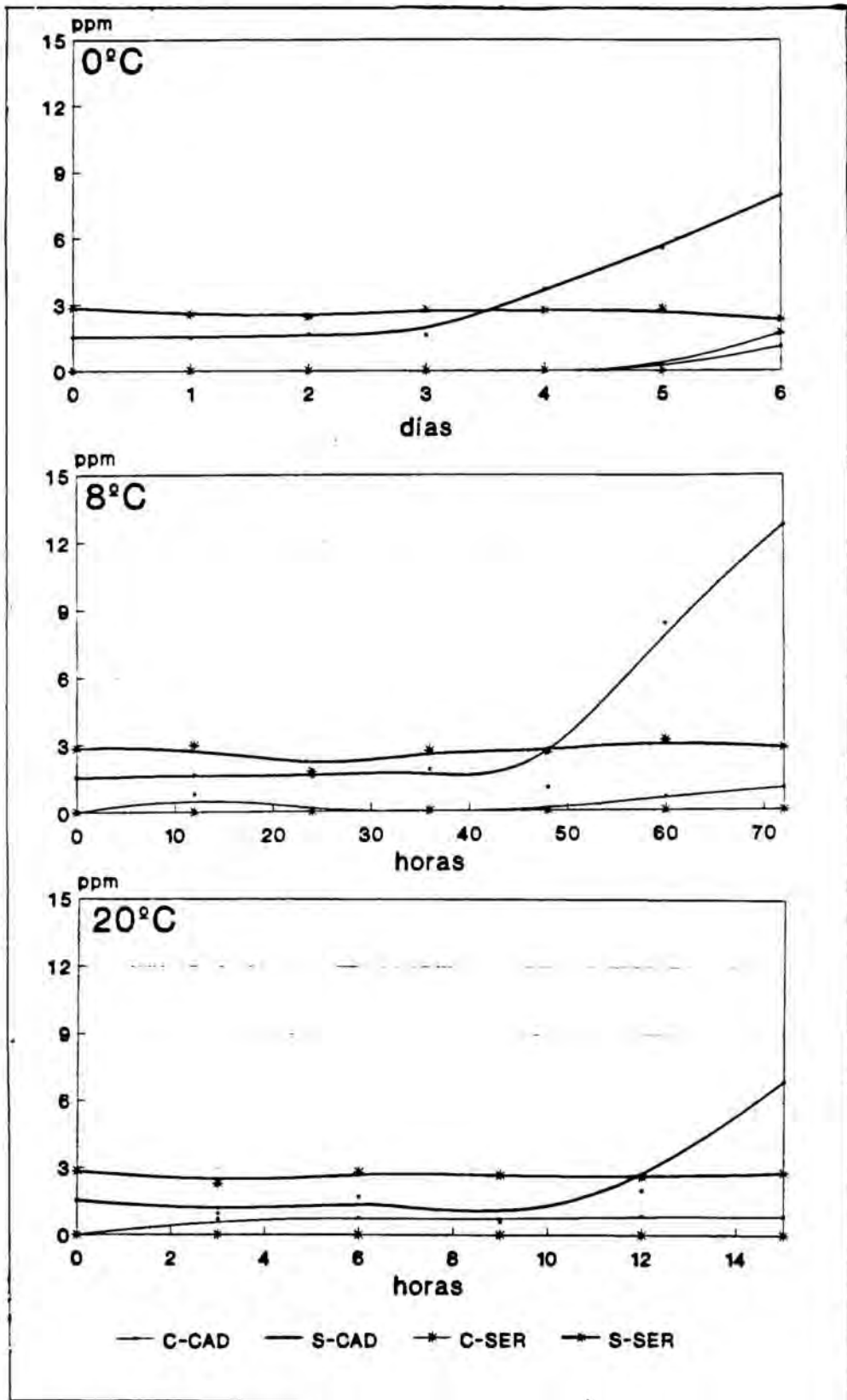
tr= Trazas (niveles inferiores a $1\mu\text{g/g}$)

Tabla... Presencia (P) y formación (F) de aminas biógenas en muestras de atún no contaminadas con microorganismos de la especie *Serratia marcescens*.

	0°C		8°C		20°C	
	P	F	P	F	P	F
PUT	+	-	+	-	+	-
TIR	-	-	-	-	-	-
CAD	+	++	+	++	+	++
SER	+	-	+	-	+	-
HIS	-	-	-	-	-	-
AGM	-	-	-	-	-	-
β -FEN	-	-	-	-	-	-
ESPD	++	-	++	-	++	-
TRIP	-	-	-	-	-	-
ESPM	++	-	++	-	++	-

- Ausencia + Hasta 5 $\mu\text{g/g}$ ++ Hasta 30 $\mu\text{g/g}$

figura 46 Evolución de los contenidos de serotonina y cadaverina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminadas con microorganismos de la especie *Serratia marcescens* (—) y en muestras de la serie control (---) mantenidas a 0°C , 8°C y 20°C .



9.2.4. EVOLUCION DE LOS NIVELES DE AMINAS BIOGENAS EN MUESTRAS CONTAMINADAS CON MICROORGANISMOS DE LA ESPECIE *KLEBSIELLA OXYTOCA*.

Los contenidos de aminas biógenas a las 3 temperaturas consideradas, así como su evolución, expresada en términos de presencia o de formación, se muestran en las tablas ... y ...

En las muestras contaminadas con *Klebsiella oxytoca* se observa una gran variabilidad en cuanto a las aminas biógenas detectadas a cada temperatura. En general, su formación, se hace más evidente a 20°C, manteniéndose el comportamiento citado en la bibliografía, que describe un aumento en los niveles de aminas según se incrementa la temperatura (EITENMILLER y col., 1981).

No se detecta en este caso la presencia ni de **serotonina**, siempre presente en las muestras contaminadas con microorganismos de las especies *Plesiomona shigeloides* y *Serratia marcescens*, ni de **β -feniletilamina**, **triptamina** y **agmatina**.

En todas las muestras, independientemente de la temperatura de estudio y tal como sucedía en las muestras control, **putrescina** se detectó solo a nivel de trazas y **espermina** y **espermidina** en niveles más altos que se mantenían constantes a lo largo de todo el tiempo de estudio.

Tiramina, amina biógena que no había sido detectada en ninguna de las series anteriores, no se detecta en las muestras mantenidas a 0°C más que en una muestra a nivel de trazas. En las muestras mantenidas a 8°C se detectan niveles cercanos a 5 $\mu\text{g/g}$ a partir de las 36 horas de almacenamiento a esta temperatura, mientras que en las muestras mantenidas a 20°C se detectan niveles semejantes ya desde las 3 horas. A pesar de que se detecta tiramina en la mayoría de las muestras mantenidas a 8°C y en todas las mantenidas a 20°C, no se observa la tendencia a aumentar con el tiempo de almacenamiento en ninguno de los dos casos.

Klebsiella oxytoca se ha destacado por dar lugar, preferentemente a **cadaverina** en dos de las tres temperaturas estudiadas y a **histamina** únicamente a 20°C. Aunque los niveles de ambas aminas alcanzados al final del estudio en las muestras mantenidas a 20°C resulten semejantes.

Cadaverina no detectada al inicio del estudio alcanza niveles próximos a 3 $\mu\text{g/g}$ en las muestras mantenidas a 0°C. En las mantenidas a 8°C se contabilizan 6.40 $\mu\text{g/g}$ tras 48 horas de almacenamiento y 11.15 $\mu\text{g/g}$ al final del estudio. Y finalmente se observa una formación importante de esta amina en las muestras mantenidas a 20°C tras 15 horas se alcanzan 67.50 $\mu\text{g/g}$.

SUMNER y TAYLOR (1986) en un extenso trabajo en que estudian la capacidad de descarboxilar ornitina y lisina parte de microorganismos sitúan a *Klebsiella oxytoca* entre los que poseen capacidad para descarboxilar la lisina precursora de cadaverina.

Histamina que como tiramina no había sido detectada en las anteriores series estudiadas, aparece a nivel de trazas en una de las seis muestras mantenidas a 0°C, no se detecta en ningún momento a 8°C, mientras que en las muestras almacenadas a 20°C se observa una clara tendencia el aumento en las muestras correspondientes a 12 y 15 horas de almacenamiento, alcanzándose al final del estudio 49.75 $\mu\text{g/g}$.

Son muy numerosas las referencias bibliográficas que relacionan a *Klebsiella oxytoca* con la capacidad de formar histamina. Así, TIECCO y col. (1984), situaron la temperatura óptima de formación para esta amina en el intervalo situado entre los 15°C y los 25°C, hecho que coincide con los resultados de nuestro trabajo. Además, son muchos los autores (TAYLOR y col., 1979; CATTANEO y col., 1984 y TIECCO y col., 1984) que han relacionado a *Klebsiella oxytoca* con la aparición de brotes de intoxicaciones debidos a la presencia de esta amina.

Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos en este estudio, se aprecia únicamente formación de histamina a temperaturas altas y tras un período largo de almacenamiento. Por el contrario, la formación de cadaverina y tiramina, es más temprana, aunque se alcancen niveles inferiores, incluso a temperaturas más bajas. Este hecho podría indicar una mayor afinidad por los aminoácidos precursores de tiramina y cadaverina (tirosina y lisina, respectivamente) que por otros que puedan encontrarse en el medio. Además, este hecho aporta validez a la utilización de otras aminas, distintas de la histamina para valorar la calidad higiénico-sanitaria del pescado.

En la figura se expone gráficamente la evolución de histamina y cadaverina en las muestras contaminadas con *Klebsiella oxytoca*, frente a las muestras de la serie control a las 3 temperaturas de estudio, pudiéndose observar las diferencias que aparecen en su comportamiento.

Tabla... Contenido de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminado con microorganismos de la especie *Klebsiella oxytoca* y mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C

T	t(h)	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPM
0°C	24	tr ¹	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.95	ND	30.90
	48	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.05	ND	29.40
	72	tr	ND	0.45	ND	ND	ND	ND	6.50	ND	30.05
	96	tr	ND	0.90	ND	ND	ND	ND	5.20	ND	16.75
	120	tr	ND	1.80	ND	tr	ND	ND	5.90	ND	23.20
	144	tr	tr	3.55	ND	ND	ND	ND	5.65	ND	24.70
	168	tr	ND	1.05	ND	ND	ND	ND	5.15	ND	27.10
8°C	12	tr	ND	0.60	ND	ND	ND	ND	10.55	ND	27.15
	24	tr	ND	0.90	ND	ND	ND	ND	9.80	ND	19.90
	36	tr	6.70	0.90	ND	ND	ND	ND	8.60	ND	25.00
	48	tr	4.15	6.40	ND	ND	ND	ND	9.20	ND	22.00
	60	tr	4.80	4.95	ND	ND	ND	ND	8.75	ND	25.00
	72	tr	5.00	11.15	ND	ND	ND	ND	8.30	ND	23.10
	20°C	3	tr	4.25	1.00	ND	ND	ND	ND	10.45	ND
6		tr	3.20	2.45	ND	ND	ND	ND	8.40	ND	23.70
9		tr	3.55	4.35	ND	ND	ND	ND	8.40	ND	23.05
12		tr	3.85	13.80	ND	5.20	ND	ND	8.90	ND	25.30
15		tr	3.85	67.70	ND	49.75	ND	ND	8.15	ND	24.70

tr= Trazas (niveles inferiores a 1 $\mu\text{g/g}$)

Tabla... Presencia (P) y formación (F) de aminas biógenas en muestras de atún no contaminadas con microorganismos de la especie *Klebsiella oxytoca*.

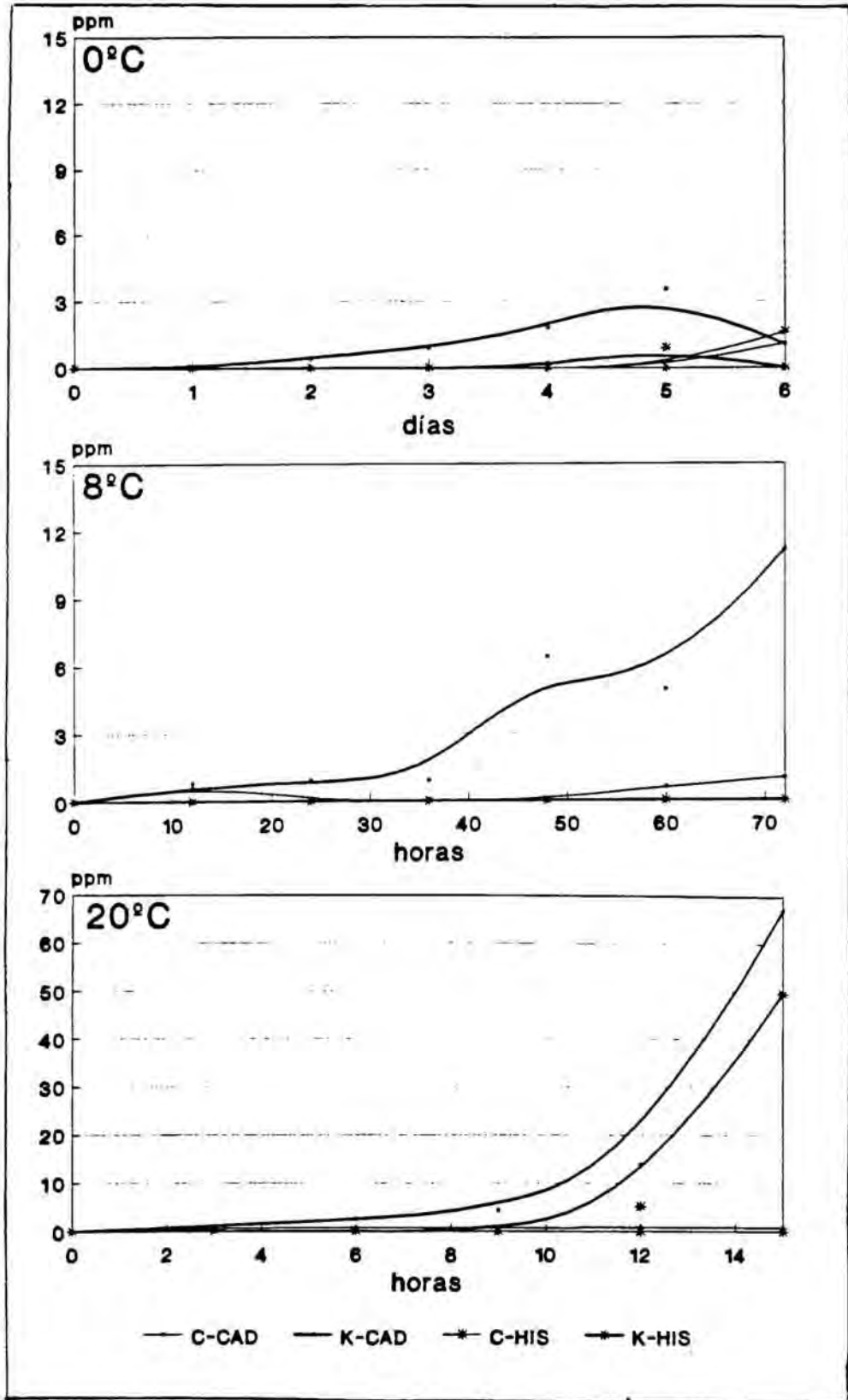
	0°C		8°C		20°C	
	P	F	P	F	P	F
PUT	+	-	+	-	+	-
TIR	+	-	+	+	+	+
CAD	+	+	+	++	+	+++
SER	-	-	-	-	-	-
HIS	-	-	-	-	+	+++
AGM	-	-	-	-	-	-
β -FEN	-	-	-	-	-	-
ESPD	++	-	++	-	++	-
TRIP	-	-	-	-	-	-
ESPM	++	-	++	-	++	-

- Ausencia

+ Hasta 5 $\mu\text{g/g}$

++ Hasta 30 $\mu\text{g/g}$

figura 47. Evolución de los contenidos de serotonina y cadaverina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminadas con microorganismos de la especie *Klebsiella oxytoca* () y en muestras de la serie control (---) mantenidas a 0°C , 8°C y 20°C .



9.2.5 EVOLUCION DE LOS NIVELES EN LAS MUESTRAS CONTAMINADAS CON MICROORGANISMOS DE LA ESPECIE *PROTEUS MORGANII*.

En primer lugar, es importante comentar que los últimos estudios realizados sobre el ADN de esta especie han permitido clasificarla dentro del género *Morganella*. Si se mantiene en este estudio el nombre de *Proteus morganii* es debido a que se ha hallado con este nombre en la bibliografía consultada y es de esta forma que se la reconoce como importante formadora de histamina.

Los contenidos de aminas biógenas a las 3 temperaturas de estudio, así como su evolución, expresada en términos de presencia o de formación, se muestran en las tablas y...

Como en el resto de las series estudiadas, el comportamiento de **putrescina**, **espermina** y **espermidina** es análogo a las tres temperaturas consideradas, siendo detectada la primera de ellas a nivel de trazas y las otras dos en niveles situados entre 18-25 $\mu\text{g/g}$ y 8-9 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Tampoco este caso se detecta ni **serotonina**, siempre presente en las muestras contaminadas con microorganismos de las especies *Plesiomona shigeloides* y *Serratia marcescens*, ni **β -feniletilamina**, **triptamina** y **agmatina**.

Tiramina a pesar de ser detectada en niveles cercanos a 3 $\mu\text{g/g}$ en mayoría de las muestras mantenidas a 0°C, no fue detectada a 8°C y sólo aparecieron trazas en una de las muestras conservadas a 20°C. Por ello podrían ser consideradas como fruto de una contaminación externa y esporádica, probablemente, por parte de bacterias psicrófilas, que son las que mayor capacidad de supervivencia poseen a bajas temperaturas.

Cadaverina, amina biógena cuya presencia se había evidenciado en las muestras contaminadas por el resto de los microorganismos estudiados, sólo se detecta esporádicamente y en niveles muy bajos en las muestras de atún contaminadas con *Proteus morganii*, de hecho este microorganismo no se cita entre los que poseen capacidad para descarboxilar su correspondiente aminoácido precursor, lisina (SUMNER y TAYLOR, 1986).

En las muestra mantenidas a 0°C no se detecta **histamina**. En las mantenidas a 8°C se aprecian niveles cercanos a 3µg/g a partir de las 35 horas de almacenamiento a esta temperatura pero no se observa ninguna tendencia evolutiva a lo largo de todo el tiempo de estudio. Sin embargo, en las muestras mantenidas a 20°C se detectan 2.35 µg/g de histamina tras 9 horas de almacenamiento y se observa una clara tendencia evolutiva hacia un aumento de modo que tras 18 horas de almacenamiento a esta temperatura se contabilizan 735 µg/g de esta amina.

Cabe destacar, principalmente, que los niveles de **histamina** que se llegan a alcanzar, sobretodo a 20°C, son muy elevados, hecho que coincide con lo señalado por la bibliografía en cuanto a la elevada capacidad histidín descarboxilasa de *Proteus morganii*, que es considerada por muchos autores como la especie con mayor capacidad formadora de histamina (YAMANI y col. 1981; CATTANEO, 1984 y REILLY y SANTOS, 1984).

El hecho de que únicamente se hayan formado niveles significativamente altos de histamina, amina que no fue detectada en la serie control, induce a pensar que los microorganismos pertenecientes a la especie *Proteus morganii* podrían presentar una mayor afinidad por el aminoácido precursor de esta amina (histidina), que por otros puedan encontrarse en el medio.

En la figura 48 se expresa gráficamente la evolución de histamina en las muestras contaminadas con *Proteus morganii*, frente a la muestras de la serie control a las 3 temperaturas de estudio, pudiéndose observar las diferencias que aparecen en su comportamiento.

Tabla... Contenido de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminado con microorganismos de la especie *Proteus morgani* y mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C

T	t(h)	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPM
0°C	24	tr ¹	4.75	ND	ND	ND	ND	ND	8.95	ND	22.30
	48	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.40	ND	21.95
	72	tr	4.90	ND	ND	ND	ND	ND	8.40	ND	20.30
	96	tr	3.90	ND	ND	ND	ND	ND	8.80	ND	19.35
	120	tr	3.45	ND	ND	tr	ND	ND	9.10	ND	18.35
	144	tr	3.70	ND	ND	ND	ND	ND	8.10	ND	18.40
	168	tr	3.70	ND	ND	ND	ND	ND	8.50	ND	14.90
8°C	12	tr	ND	0.70	ND	ND	ND	ND	8.15	ND	19.45
	24	tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.40	ND	20.60
	36	tr	ND	ND	3.25	ND	ND	ND	9.05	ND	25.70
	48	tr	ND	ND	1.20	ND	ND	ND	8.15	ND	19.40
	60	tr	ND	ND	2.20	ND	ND	ND	8.55	ND	20.80
	72	tr	ND	ND	3.00	ND	ND	ND	8.80	ND	20.20
20°C	3	ND	tr	ND	ND	ND	ND	ND	9.45	ND	20.80
	6	tr	ND	tr	ND	ND	ND	ND	9.35	ND	22.75
	9	tr	ND	ND	2.35	ND	ND	ND	8.75	ND	22.25
	12	tr	ND	tr	8.50	ND	ND	ND	8.50	ND	20.80
	15	tr	ND	tr	21.35	ND	ND	ND	8.40	ND	19.90
	18	tr	ND	ND	735.00	ND	ND	ND	7.60	ND	18.85

tr = Trazas (niveles inferiores a $1\mu\text{g/g}$).

Tabla... Presencia (P) y formación (F) de aminas biógenas en muestras de atún no contaminadas con microorganismos de la especie *Proteus morgani*.

	0°C		8°C		20°C	
	P	F	P	F	P	F
PUT	+	-	+	-	+	-
TIR	+	-	+	-	+	-
CAD	-	-	-	-	+	-
SER	-	-	-	-	-	-
HIS	-	-	+	+	+	++++
AGM	-	-	-	-	-	-
β -FEN	-	-	-	-	-	-
ESPD	++	-	++	-	++	-
TRIP	-	-	-	-	-	-
ESPM	++	-	++	-	++	-

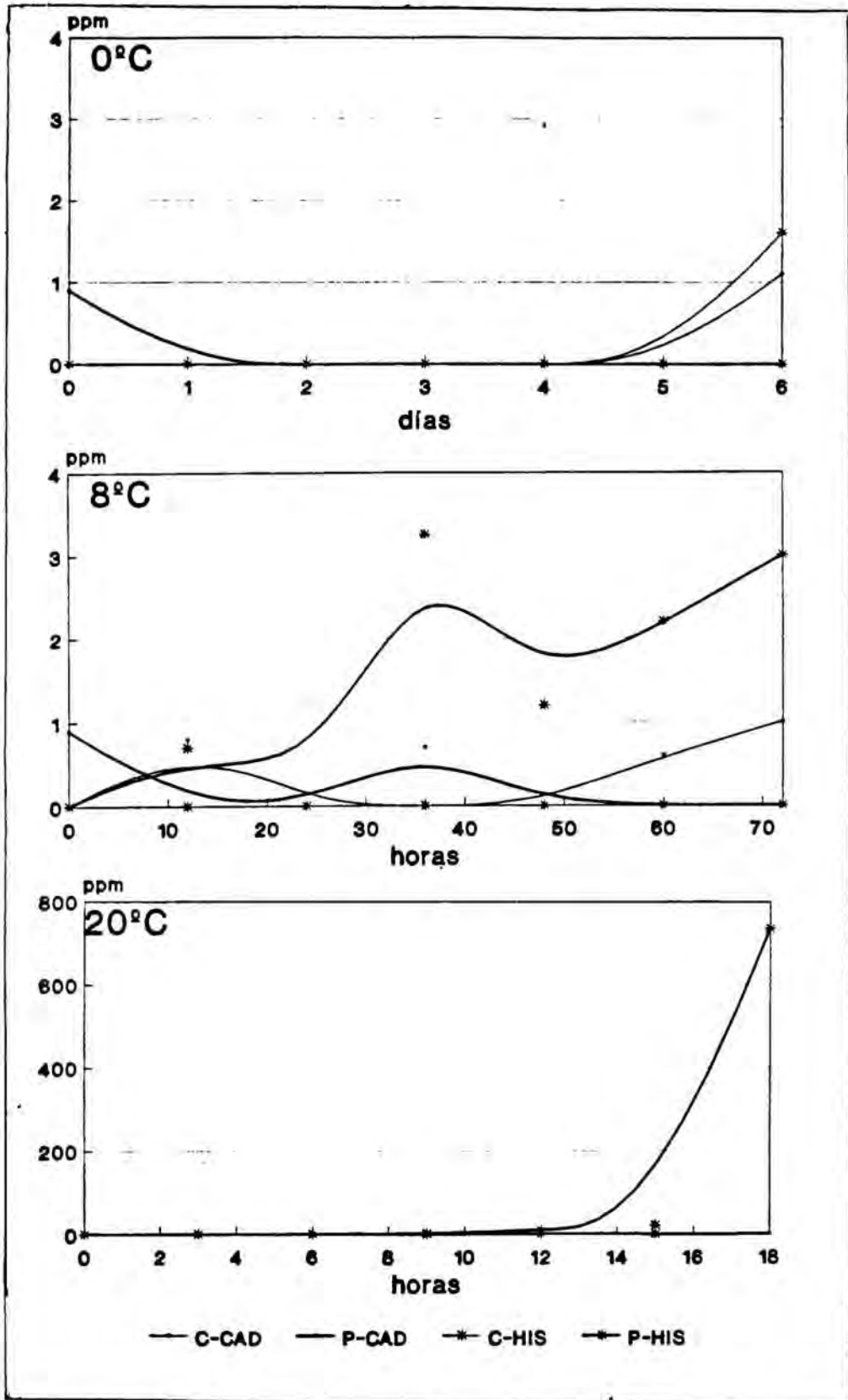
- Ausencia

+ Hasta $5\mu\text{g/g}$

++ Hasta $30\mu\text{g/g}$

++++ más de $700\mu\text{g/g}$

figura 48 Evolución de los contenidos de cadaverina e histamina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminadas con microorganismos de la especie *Proteus morganii* () y en muestras de la serie control (---) mantenidas a 0°C, 8°C y 20 °C.



9.2.6 RESUMEN Y CONSIDERACIONES FINALES SOBRE LA EVOLUCION DE LAS AMINAS BIOGENAS Y DE LOS MICROORGANISMOS CONTAMINANTES.

En general, en todos los casos, se ha observado un comportamiento análogo en cuanto a los contenidos de **putrescina**, detectada a nivel de trazas, y de **espermina** y **espermidina**, que presentan niveles más altos y homogéneos, no sufriendo modificaciones importantes a lo largo del tiempo de estudio.

En las muestras pertenecientes a la serie control (no contaminada con ningún microorganismo), apenas existe presencia y no hay ningún tipo de formación de aminas biógenas distintas a las consideradas como fisiológicas en el pescado, ya comentadas en el párrafo anterior. Por lo tanto, cabe pensar que la detección de otras aminas en las muestras de las restantes series podría ser principalmente atribuible a la actividad enzimática de la especie bacteriana con la que fueron contaminadas.

En las muestras inoculadas con las cuatro especies bacterianas, objeto de este estudio, se podrían establecer dos grupos claramente diferenciados, en función de su comportamiento:

- Muestras contaminadas inicialmente con *Plesiomonas shigelloides* y *Serratia marcescens* (bacterias psicrófilas), en las que no se observa una gran diferencia entre los niveles de aminas formados a 8°C y 20°C, siendo **serotonina** y **cadaverina** las aminas mayoritariamente presentes. Es preciso aclarar que el contenido de serotonina es homogéneo a lo largo del tiempo y a todas las temperaturas en ambas series; mientras que para la cadaverina se observa un aumento de sus niveles únicamente en la serie contaminada con *Plesiomonas shigelloides* a 8°C, manteniéndose constante a las demás temperaturas y, en cambio, en la contaminada con *Serratia marcescens*, su formación es observada tanto a 0°C, como a 8°C como a 20°C.
- Muestras contaminadas con *Proteus morganii* y *Klebsiella oxytoca* (bacterias mesófilas), en las que la mayor formación de aminas se observa a 20°C, siendo **histamina** la amina mayoritariamente formada. En este segundo grupo, debe matizarse que la primera especie parece tener una mayor capacidad histidin Descarboxilasa, por que los niveles de histamina formados son claramente superiores. Sin embargo, *Klebsiella oxytoca* posee también una importante capacidad formadora de otras aminas, como **tiramina** y **cadaverina**. A diferencia de la muestra contaminadas con bacterias psicrófilas, en ninguna muestra se ha detectado **serotonina**.

Con el fin de interpretar mejor los resultados obtenidos, se ha estudiado si existe alguna correlación entre los contenidos de aminas biógenas, para las que se ha observado una evolución, y el tiempo transcurrido desde la inoculación o si, por el contrario, dicha reacción se establece (u.f.c.) contabilizadas en cada muestra.

Los niveles de cada amina, el tiempo transcurrido y el número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) se muestran en las tablas del ANEXO --, donde se especifican también los coeficientes ordinales de Spearman (r_s) y su significación estadística, así como el coeficiente de determinación (R^2), que indica la intensidad de la relación entre dos variables. Del análisis de estos datos se desprende lo siguiente:

En primer lugar, que el crecimiento de los microorganismos no ha sido espectacular en ningún caso sino que, por el contrario, únicamente se ha detectado un ligero aumento en su población en determinadas series y a determinada temperatura, apareciendo dos comportamientos claramente diferenciados:

- las poblaciones pertenecientes a las especies *Plesiomonas shigelloides* y *Serratia marcescens* proliferan con mayor facilidad cuando el almacenamiento del atún contaminado se realiza a la temperatura de 8°C, por ser esta temperatura cercana a la de su máximo crecimiento (son consideradas bacterias psicrófilas).

- las especies *Klebsiella oxytoca* y *Proteus morganii* evolucionan de forma más clara si el almacenamiento de las muestras se realiza a 20°C, ya que su temperatura óptima de crecimiento es más cercana (debe recordarse que estas dos especies pertenecen al grupo de las Enterobacterias y, por tanto, su temperatura de máximo crecimiento se sitúa en 37°C).

En todos los casos, se ha observado que existe una mejor correlación entre los contenidos de aminas biógenas y el tiempo, que si la correlación intenta establecerse respecto a la evolución de las unidades formadoras de colonias.

Como resultado del estudio de las correlaciones existentes entre los contenidos de aminas biógenas y el tiempo destacaremos, como estadísticamente significativas ($p < 0.05$), aquellas en las que, en general, se habían formado cantidades importantes de aminas, y que son las comentadas a continuación:

- (a) En las muestras contaminadas con microorganismo del género *Plesiomonas* no se ha observado ninguna correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las variables estudiadas.

- (b) En las muestras contaminadas con microorganismos del género *Serratia*, la correlación establecida entre los niveles de **cadaverina** y el tiempo a 0°C resultó altamente significativa ($p < 0.01$), de modo que la variación en los contenidos de esta amina quedaría explicada por la variable tiempo.

- (c) En las muestras contaminadas con microorganismos del género *Klebsiella*, resultaron significativas las correlaciones entre la **cadaverina** y el tiempo a 0°C, 8°C y 20°C ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente). En el caso de la **histamina** se obtuvo una significación claramente significativa, ya que se obtuvo un coeficiente de correlación $r_s = 0.9549$ ($p < 0.01$) con un 91.18% de probabilidad de que en efecto las

dos variables (tiempo y formación de histamina) se hallen relacionadas. En cuanto la **tiramina**, también se observó correlación significativa entre sus niveles y el tiempo de almacenamiento a 8°C ($r_s=0.9428$, $p<0.01$, $R^2=88.88\%$).

(d) En las muestras contaminadas con microorganismos del género *Proteus*, aunque se detectaba presencia de **histamina** a las tres temperaturas consideradas, únicamente fue posible establecer una correlación significativa entre la cantidad formada a 20°C y el tiempo transcurrido, con una $r_s=0.8524$ y $p<0.02$.

En general, hay que destacar que fue posible establecer correlaciones estadísticamente significativas entre el tiempo transcurrido y los contenidos de aminas biógenas cuando los niveles de estas últimas fueron elevados. El hecho de que el número de muestras de cada serie fuera relativamente bajo (7-9) obligó al uso de una prueba no paramétrica, mucho más exigente en sus criterios.

En cuanto a las correlaciones planteadas entre los niveles de aminas biógenas y el número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.), aunque en ningún caso resultaron ser significativas (excepto la **histamina** formada por el género *Klebsiella* a 20° C), puede deducirse que, en la mayoría de los casos, los contenidos de aminas se incrementaron de modo importante cuando la población bacteriana alcanzaba niveles cercanos a 10^6 u.f.c., o los superaba. Este hecho es constatable en las muestras contaminadas con microorganismos de los géneros *Plesiomonas* y *Serratia*, que fueron mantenidas a las temperatura de 8°C y 20°C, mientras que en las muestras contaminadas con microorganismos pertenecientes a géneros mesófilos, sólo se observó a 20°C.

9.3 EVOLUCION DE LOS NIVELES DE NUCLEOTIDOS Y DERIVADOS.

Tradicionalmente, la medida de los niveles de ATP y sus derivados viene utilizándose como criterio para conocer el grado de frescura del pescado. Generalmente, se acepta que los enzimas reponsables de la degradación de los nucleótidos son endógenos, por lo que su deterioro se considera más relacionado con la propia auto-lisis del músculo que con la actividad bacteriana (FLETCHER Y STATHAM, 1988-a). Aún así, en estudios posteriores realizados por estos mismos autores (FLETCHER Y STATHAM, 1988- b), se comprueba que los microorganismos juegan un papel importante en la rotura de **Inosina** a **Hipoxantina** por la tanto, es posible afirmar que en pescado con elevada proliferación bacteriana, la rapidez de degradación del ATP y de conversión de unos derivados en otros, puede acentuarse.

De aquí, la importancia de realizar un estudio de contaminación controlada en pescado, analizando todos los metabolitos que se forman a partir del ATP según va progresando su secuencia de degradación y relacionando sus niveles con la evolución de la flora microbiana inoculada.

También se pretende estudiar el comportamiento que los niveles de estos compuestos presentan a las distintas temperaturas de almacenamiento. Es importante tener en cuenta que los enzimas que participan en este proceso de degradación a partir del ATP en el músculo del pescado, comparados con los del músculo de los mamíferos, presentan una mayor actividad a temperaturas bajas y, por contra, una menor estabilidad a altas temperaturas.

En este caso, es necesario recordar que la preparación de las muestras que componen este estudio incluye una etapa de homogeneización del músculo. Hecho a tener en cuenta, debido a que la rotura d las estructuras celulares de este músculo favorece el contacto entre los sustratos y sus enzimas conversores, de manera que se facilita la degradación de los nucleótidos (MURATA y SAKAGUCHI, 1989; GOMEZ y col.,1990).

En las tablas , , , y se expresan los niveles (μ moles/g) de los metabolitos analizados en cada una de las series estudiadas. La información que se resume en ellas puede ser observada gráficamente en las figuras 49, 50, 51, 52, y 53, en las que se representa la evolución sufrida por el IMP, la Hipoxantina y la Inosina. El hecho de representar a estos derivados del ATP y no a otros, es debido a que son éstos los que mayor variación en sus niveles han sufrido durante el tiempo de estudio y los que mejor expresan las diferencias observadas entre las distintas series.

La evolución en los niveles de los distintos nucleótidos y derivados en las muestra de cada una de las cinco series estudiadas puede resumirse de la siguiente manera:

9.1.3 COMPORTAMIENTO DE LA SERIE CONTROL.

La serie control está formada por muestras que no han sido contaminadas con ninguna especie microbiana y, por ello, es utilizada en este estudio como control de esterilidad, es decir, se observa la evolución de los contenidos de los distintos nucleótidos y sus derivados en ella, para conocer los niveles de cada metabolito debidos, únicamente, a procesos endógenos de auto-lisis; y, por comparación, poder conocer las variaciones que en este proceso provoca la contaminación bacteriana.

A las tres temperaturas de estudio (0°C, 8°C y 20°C) se observa un comportamiento similar, no detectándose **ATP** en ninguna muestra. Los niveles de **ATP** y **AMP** fueron también muy bajos, cercanos a los 0.20 $\mu\text{moles/g}$ en el primer caso y a los 0.40 $\mu\text{moles/g}$ en el segundo. Destaca, principalmente, los altos niveles de **IMP** alcanzados, muy superiores a los del resto de metabolitos. Este acúmulo de **IMP** corresponde al esperado para muestras de atún fresco, ya que indica que la secuencia de degradación no ha progresado todavía hacia la formación de nuevos derivados. A lo largo del tiempo de estudio, los niveles de **IMP** experimentaron una ligera disminución, fruto de la actividad 5'-nucleotidasa de los enzimas endógenos del pescado. Aunque el comportamiento fue muy similar a las tres temperaturas de estudio, destaca el que la mayor disminución se observara 0°C. Al respecto, WATANABE y col.(1987) señalan que el intervalo de temperatura situado entre 3°C y -3°C es altamente determinante en la velocidad de actuación de los enzimas implicados en la degradación del **ATP**.

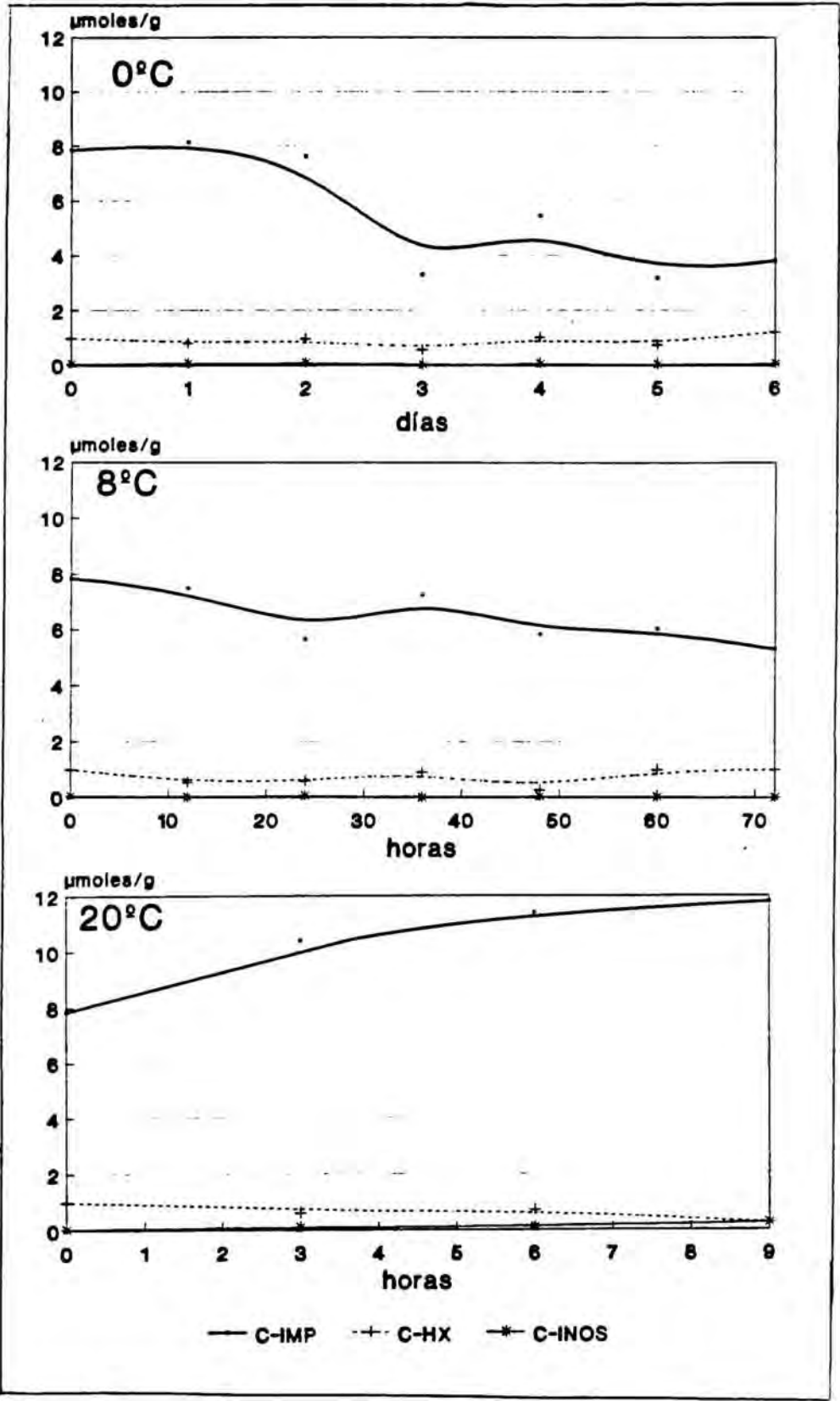
Tanto los niveles de **Hipoxantina** como los de **Inosina** se han mantenido inferiores a los de **IMP** a las tres temperaturas consideradas y durante todo el tiempo de estudio.

Todos los metabolitos analizados presentan niveles muy similares tanto a 0°C, como a 8°C y a 20°C. Sin embargo, a esta última temperatura, se observa una sensible disminución en los contenidos de **ADP**, llegando incluso a no detectarse en dos de las cinco muestras mantenidas a esta temperatura. Este comportamiento puede relacionarse con una pérdida de la frescura y de la calidad del pescado y coincide con el observado por FRASER y col. (1967), en bacalao. En este estudio, se comprobó que el **ATP** prácticamente desaparecía antes del comienzo del "rigor mortis", mientras que en un primer momento se acumulaba **IMP** y, posteriormente, **Inosina**.

Tabla... Contenidos de ATP y sus compuestos de degradación ($\mu\text{mol/g}$) en muestras de atún no contaminado con ningún microorganismo mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C.

T	t(h)	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
0°C	24	ND	0.21	0.51	7.84	0.04	0.99
	48	ND	0.19	0.42	8.14	0.07	0.80
	27	ND	0.24	0.42	7.61	0.08	0.96
	96	ND	0.14	0.44	3.34	0.02	0.56
	120	ND	0.17	ND	5.44	0.05	1.02
	144	ND	0.16	0.45	3.17	0.03	0.75
	168	ND	0.22	0.39	3.82	0.04	1.20
8°C	12	ND	0.19	0.42	7.49	ND	0.53
	24	ND	ND	0.46	5.67	0.06	0.58
	36	ND	0.16	0.51	7.26	ND	0.90
	48	ND	0.15	0.45	5.84	0.03	0.26
	60	ND	0.19	0.39	6.03	ND	0.99
	72	ND	0.19	0.40	5.32	0.02	1.00
20°C	3	ND	0.13	0.48	10.39	0.09	0.60
	6	ND	0.13	0.39	11.40	0.11	0.71
	9	ND	ND	0.96	13.78	0.26	0.26
	12	ND	ND	0.37	-	0.27	0.74
	15	ND	0.12	0.38	-	0.29	2.35

Figura 49. Contenidos de IMP, Inosins e hipoxantina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún no contaminado con ningún microorganismo y mantenidas a las tres temperaturas de estudio.



9.3.2. COMPORTAMIENTO DE LAS SERIES CONTAMINADAS CON MICROORGANISMOS.

En cuanto al comportamiento seguido por las muestras de las cuatro series contaminadas con microorganismos de distintas especies, es diferente al anteriormente descrito, ya que se observa que la vía metabólica de degradación iniciada en el ATP se encuentra más avanzada que en el caso de la serie control.

Así, en todas ellas, no se detectan ni **ADP**, ni **AMP** y se observan cantidades muy bajas tanto de **ATP** como de **IMP**, sin embargo, se observan niveles superiores a las del control tanto de **Inosina** como de **Hipoxantina**, siendo las más elevadas las pertenecientes a este último metabolito.

En cuanto al hecho de que se detecte ATP (aunque en cantidades muy bajas, que nunca superan los $0.06 \mu\text{moles/g}$) y en cambio, no se detecten ni ADP ni AMP podría ser explicado si se tiene en cuenta la formación de este metabolito observada por JONES y MURRAY (1961), que lo consideraron como resultado final de la glucólisis anaerobia.

El descenso del IMP está directamente relacionado con la formación de **Inosina** y **Hipoxantina**. Sin embargo, el comportamiento observado para estos dos últimos metabolitos es paradójico: El atún es una especie tradicionalmente considerada en la bibliografía como de actividad enzimática baja (EHIRA y UCHIYAMA, 1973), por lo que tiende a acumular niveles altos de Inosina, que no consigue transformar en Hipoxantina. Sin embargo, los datos que se han obtenido a partir de las muestras contaminadas con distintos microorganismos estudiadas, indican que, contrariamente a lo que ocurre cuando el pescado no posee una carga bacteriana elevada, los niveles más altos detectados corresponden a Hipoxantina. Este hecho experimental es corroborado por el observado, tal y como ya ha sido comentado anteriormente, por FLETCHER y STATHAM (1988-b), en cuanto al importante papel que juegan los microorganismos en el paso de Inosina a Hipoxantina.

Las cuatro series estudiadas muestran para todos estos nucleótidos y sus derivados un comportamiento similar, alcanzándose también niveles similares en los contenidos de todos los metabolitos. Sin embargo, las diferencias observadas en cuanto a la temperatura en que su degradación se produce a mayor velocidad, nos ha permitido clasificarlas en dos grupos claramente diferenciados:

- Así, un primer grupo estaría formado por las muestras contaminadas con microorganismos pertenecientes a las especies *Plesiomonas shigelloides* y *Serratia marcescens*. En ellas, se mantiene el comportamiento anteriormente

descrito, alcanzándose los niveles más bajos de IMP y los más altos de Hipoxantina en aquellas muestras mantenidas a 8°C. Este hecho es fácilmente explicable si se tiene en cuenta que las dos especies microbianas contaminantes pertenecen al grupo de las bacterias psicrófilas ó bacterias del grupo N (tal y como ya ha sido comentado) y, por tanto, su temperatura óptima de crecimiento se halla más cercana a los 8°C que a las otras dos temperaturas de estudio. Así, una mayor proliferación de

microorganismos queda reflejada en una mayor degradación, facilitándose el paso de Inosina a Hipoxantina.

- Y un segundo grupo quedaría, por tanto, formado por las muestras contaminadas con microorganismos pertenecientes a las especies *Klebsiella oxytoca* y *Proteus morganii*. En este caso, es en las muestras mantenidas a 20°C donde la degradación de la calidad higiénica del pescado se da con mayor rapidez, quedando este hecho reflejado en los bajos niveles de IMP y los elevados contenidos de Hipoxantina detectados. Igual como ocurría en el caso anterior, este comportamiento es debido a la mayor proliferación bacteriana que tiene lugar a esta temperatura, por ser la más cercana de las tres estudiadas a la temperatura de óptimo crecimiento para estos microorganismos (al tratarse de Enterobacterias, su temperatura óptima de crecimiento se sitúa en los 37°C).

FRASER y col. (1967) también observaron que, según aumenta la temperatura de conservación del pescado, el grado de desfosforilación alcanzado para el IMP y la acumulación de Hipoxantina, se vuelven marcadamente más rápidos.

9.3.3 RESUMEN Y CONCLUSIONES FINALES EN CUANTO A LOS CONTENIDOS DE NUCLEOTIDOS Y DERIVADOS.

Lo más destacable en cuanto a los contenidos detectados de nucleótidos y derivados en el conjunto de muestras pertenecientes a las cinco series estudiadas, puede resumirse en los siguientes puntos:

- Comportamiento de las muestras de la serie control (no contaminadas con ningún microorganismo) diferente al de las muestras del resto de series; destacando, principalmente, el hecho de no haber sido detectado **ATP** y, en cambio, sí niveles de **IMP** superiores a los del resto de metabolitos. Esto indica que la secuencia de degradación se encuentra todavía poco avanzada.

No se observa ninguna diferencia en cuanto al comportamiento de las muestras dependiendo de la temperatura de conservación de las mismas.

-En cuanto a las muestras contaminadas con alguna especie bacteriana, se observa, en todas ellas, un comportamiento análogo. Así, destacan los altos niveles de Hipoxantina, formados debido al gran desarrollo bacteriano existente en dichas muestras (capaz de degradar la Inosina a Hipoxantina), los bajos contenidos de **IMP** y **ATP** y los niveles no detectados de **ADP** y **AMP**.

La única diferencia que se establece en estas muestras contaminadas, es su distinto comportamiento según la temperatura a la que han sido conservadas. Así, las muestras que han sido inoculadas con microorganismos de las especies *Plesiomonas shigelloides* y *Serratia marcescens* dan lugar a los mayores niveles de Hipoxantina y los menores niveles de IMP a 8°C, mientras que las inoculadas con las especies *Klebsiella oxytoca* y *Proteus morgani* los forman a 20°C.

En todos los casos, una mayor degradación del músculo del atún está directamente relacionada con un aumento en la población bacteriana, por lo que los niveles de Hipoxantina son siempre más altos, y más bajos los de IMP, cuando la temperatura de conservación de las muestras coincide, ó es cercana, a la temperatura de máximo crecimiento del género bacteriano inoculado.

- Sin embargo, a pesar de estas diferencias en el comportamiento de las muestras contaminadas dependiendo de la temperatura, los niveles de los metabolitos alcanzados en todas ellas, son muy similares entre sí, lo que nos lleva a pensar en una baja especificidad de los enzimas bacterianos que llevan a cabo dichas transformaciones.

A diferencia de lo que ocurría en el caso de las aminas biógenas, la formación de los derivados del ATP tiene lugar a través de un mecanismo no específico, ya que no se detectan diferencias significativas entre las muestras contaminadas con microorganismos pertenecientes a los diferentes géneros bacterianos.

- Y, para finalizar, se observa también que la variación en los niveles de los distintos metabolitos estudiados es menos brusca que en el caso de las aminas biógenas, ya que es resultado de un proceso de auto-lisis, más contínuo que el de formación de aminas, resultado de una proliferación bacteriana, cuyo crecimiento sigue un comportamiento de tipo exponencial.

Tabla... Contenidos de ATP y sus compuestos de degradación ($\mu\text{mol/g}$) en muestras de atún contaminadas con microorganismos de la especie *Plesiononas shigelloides* mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C.

T	t(h)	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
0°C	24	ND	ND	ND	0.31	0.06	0.25
	48	ND	ND	ND	0.31	0.03	0.49
	27	ND	ND	ND	0.27	0.05	0.61
	96	ND	ND	ND	0.24	0.06	0.75
	120	ND	ND	ND	0.21	0.05	0.87
	144	ND	ND	ND	0.21	0.06	0.97
	168	ND	ND	ND	0.24	0.06	1.08
8°C	12	ND	ND	ND	0.29	0.07	0.48
	24	ND	ND	ND	0.26	0.13	0.68
	36	ND	ND	ND	0.27	0.07	0.98
	48	ND	ND	ND	0.26	0.43	0.74
	60	ND	ND	ND	0.26	0.41	0.75
	72	ND	ND	ND	0.28	0.42	0.92
20°C	3	ND	ND	ND	0.19	0.04	0.29
	6	ND	ND	ND	0.20	0.02	0.33
	9	ND	ND	ND	0.18	0.03	0.21
	12	ND	ND	ND	0.17	0.05	0.46
	15	ND	ND	ND	0.17	0.05	0.33

Tabla... Contenidos de ATP y sus compuestos de degradación ($\mu\text{mol/g}$) en muestras de atún contaminadas con microorganismos de la especie *Serratia marcesens*, mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C.

T	t(h)	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
0°C	24	ND	ND	ND	ND	0.25	0.18
	48	ND	ND	ND	ND	0.30	0.55
	27	ND	ND	ND	ND	0.24	0.43
	96	ND	ND	ND	ND	0.29	0.36
	120	ND	ND	ND	ND	0.32	0.96
	144	ND	ND	ND	ND	0.34	1.08
	168	ND	ND	ND	ND	0.36	1.18
8°C	12	ND	ND	ND	ND	0.14	0.58
	24	ND	ND	ND	ND	0.42	0.73
	36	ND	ND	ND	ND	0.42	0.63
	48	ND	ND	ND	ND	0.49	0.99
	60	ND	ND	ND	ND	0.45	1.18
	72	ND	ND	ND	ND	0.53	0.57
20°C	3	ND	ND	ND	ND	0.31	0.20
	6	ND	ND	ND	ND	0.30	0.23
	9	ND	ND	ND	ND	0.30	0.51
	12	ND	ND	ND	ND	0.31	0.58
	15	ND	ND	ND	ND	0.40	0.62

Tabla... Contenidos de ATP y sus compuestos de degradación ($\mu\text{mol/g}$) en muestras de atún contaminadas con microorganismos de la especie *Klebsiella oxytoca*, mantenidas a 0°C , 8°C y 20°C .

T	t(h)	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
0°C	24	ND	ND	ND	ND	0.25	0.33
	48	ND	ND	ND	ND	0.24	0.50
	27	ND	ND	ND	ND	0.22	0.60
	96	ND	ND	ND	ND	0.21	0.41
	120	ND	ND	ND	ND	0.21	0.76
	144	ND	ND	ND	ND	0.19	0.49
	168	ND	ND	ND	ND	0.31	0.89
8°C	12	ND	ND	ND	ND	0.36	0.35
	24	ND	ND	ND	ND	0.41	0.60
	36	ND	ND	ND	ND	0.41	0.68
	48	ND	ND	ND	ND	0.40	0.83
	60	ND	ND	ND	ND	0.37	0.89
	72	ND	ND	ND	ND	0.43	0.93
20°C	3	ND	ND	ND	ND	0.43	1.13
	6	ND	ND	ND	ND	0.43	1.01
	9	ND	ND	ND	ND	0.43	1.10
	12	ND	ND	ND	ND	0.45	1.13
	15	ND	ND	ND	ND	0.45	1.34

Reservar y publicar en la siguiente

Figura.50 Evolucion de los contenidos de IMP, Inosina e Hipoxantina en muestras de atún contaminadas con *Plesiomonas shigelloides* y mantenidas a las tres temperaturas de estudio.

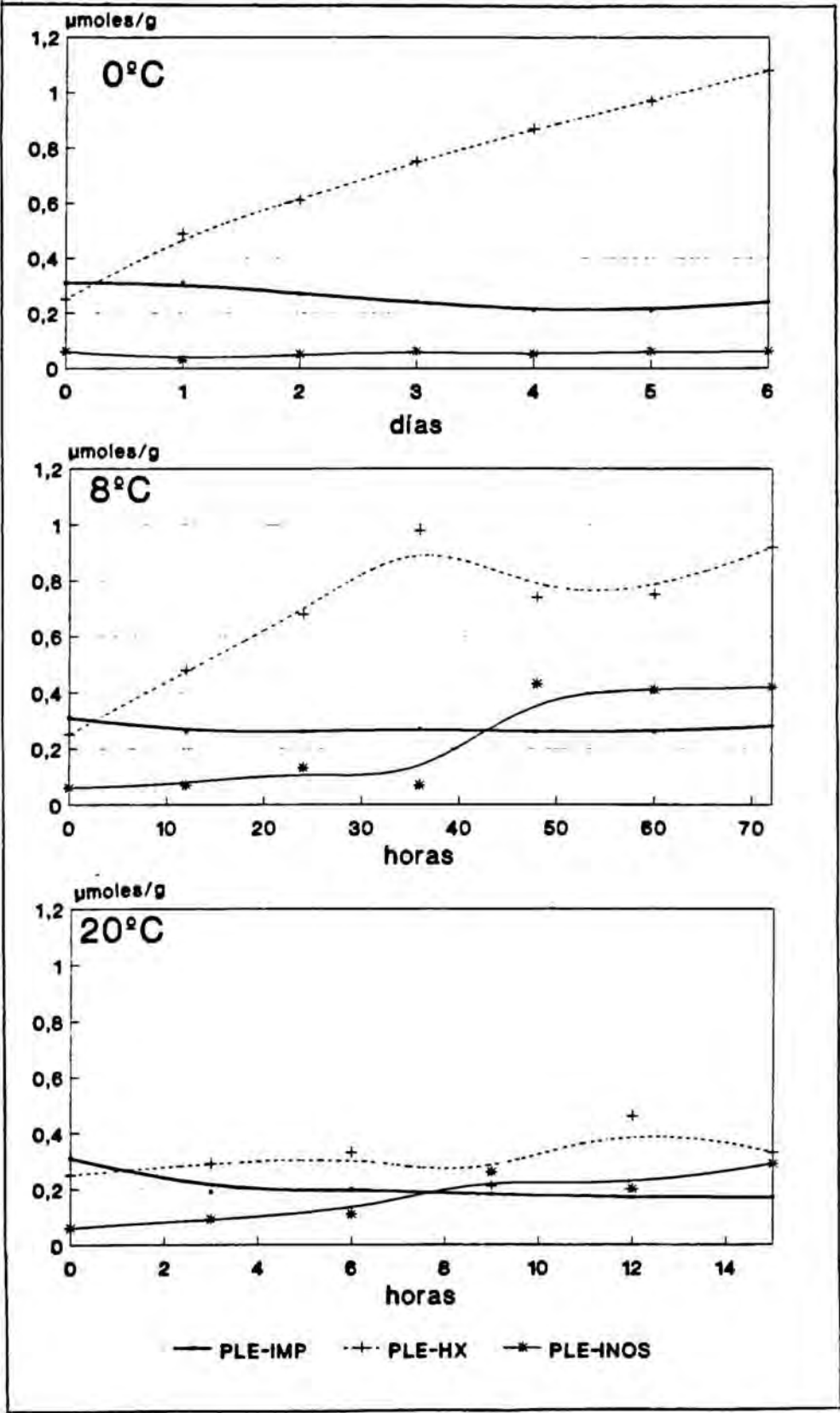


Figura 5 | Evolucion de los contenidos de IMP, Inosina e Hipoxantina en muestras de atún contaminadas con *Serratia marcesens* y mantenidas a las tres temperaturas de estudio.

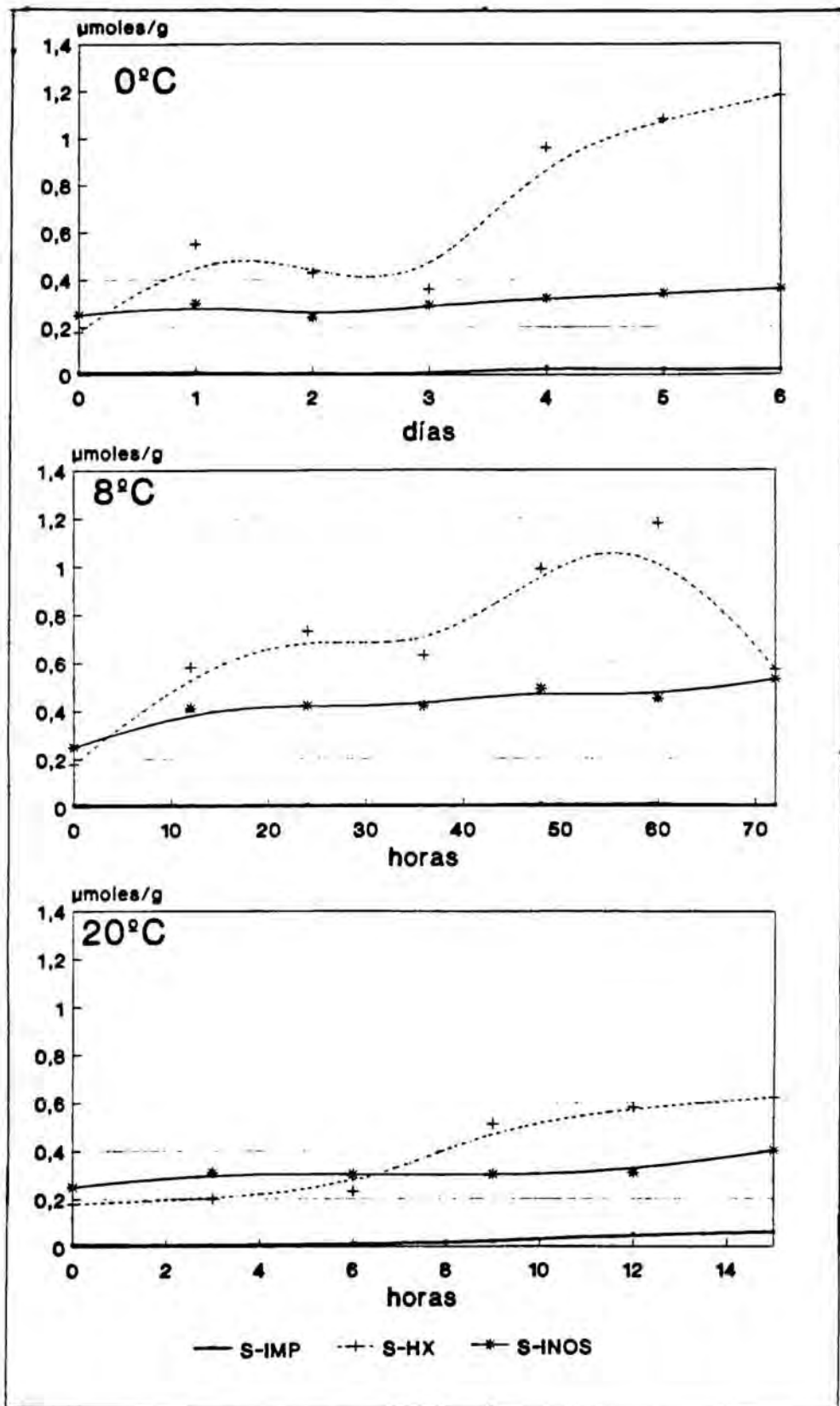


Figura 52 Evolucion de los contenidos de IMP, Inosina e Hipoxantina en muestras de atún contaminadas con *Klebsiella oxitoca* y mantenidas a las tres temperaturas de estudio.

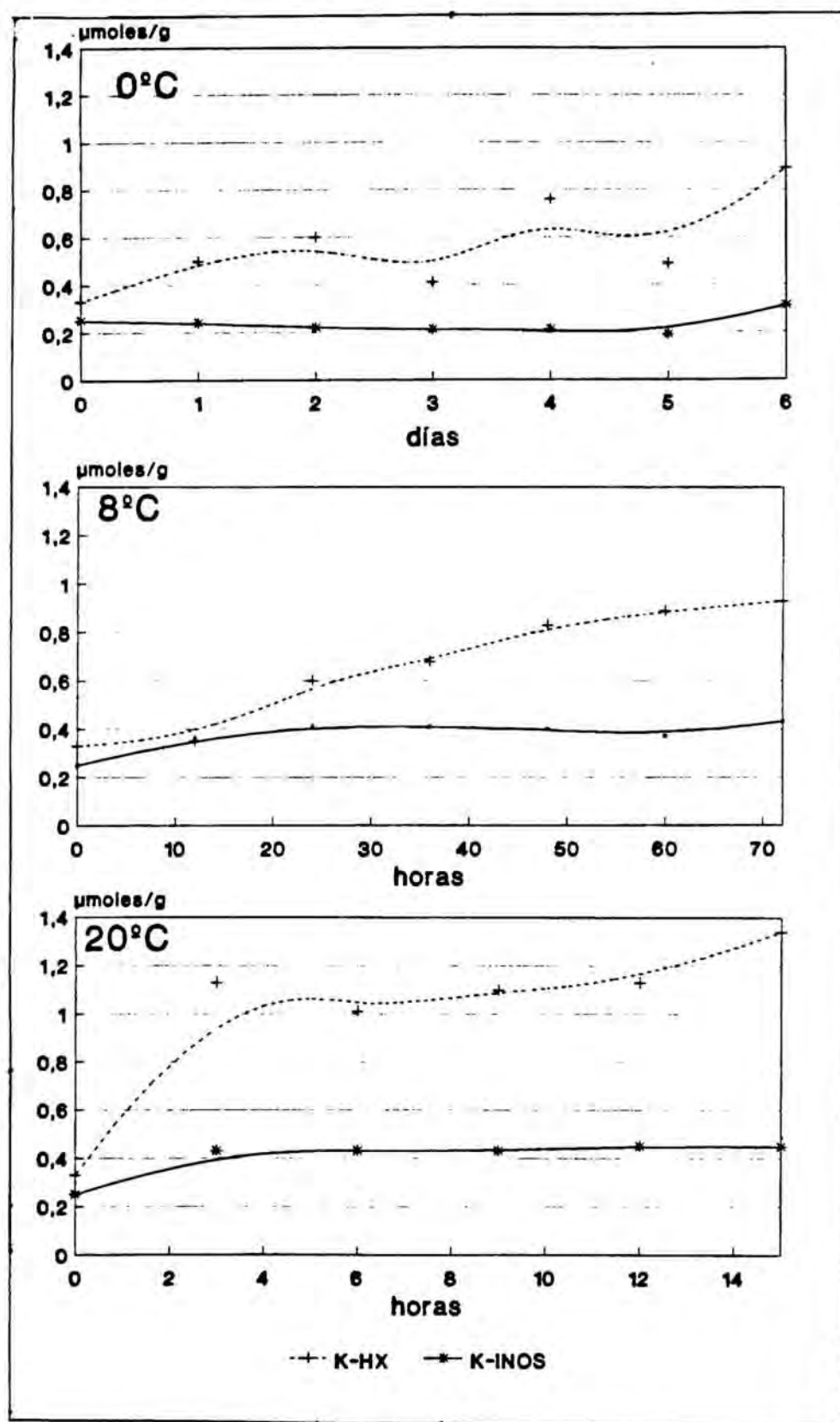
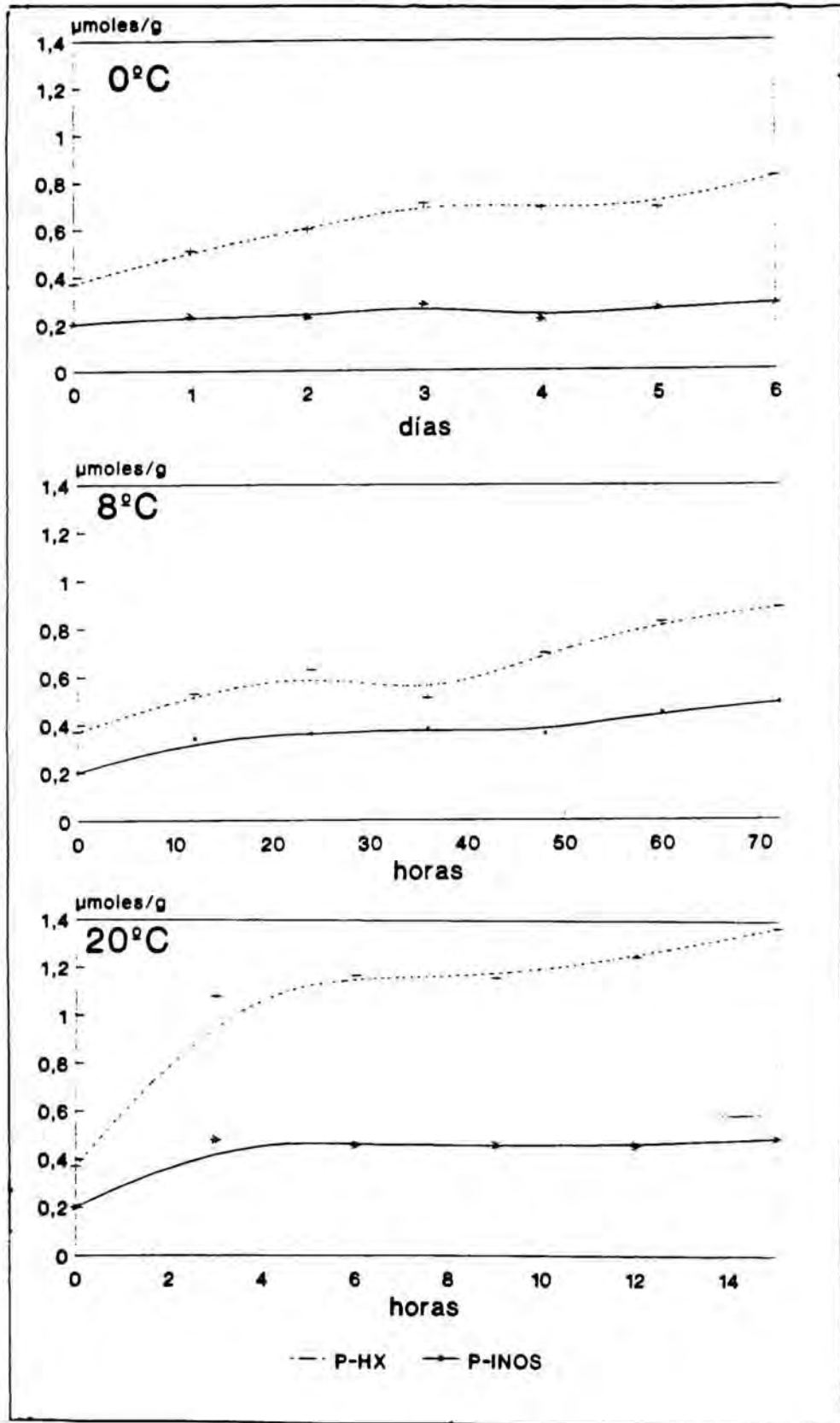


Figura 53 Evolucion de los contenidos de IMP, Inosina e Hipoxantina en muestras de atún contaminadas con *Proteus morganii* y mantenidas a las tres temperaturas de estudio.



9.4 EVOLUCION DE LOS NIVELES DE DMA Y TMA.

La medida de los niveles de compuestos básicos volátiles (MMA, DMA y TMA) fue uno de los primeros parámetros utilizados para conocer el estado de conservación y la calidad del pescado. Sin embargo, una de las principales limitaciones que presentaba su utilización era que, con los métodos analíticos utilizados, no se conseguía establecer una diferenciación entre los tres compuestos y el conjunto quedaba evaluado como el N de bases volátiles totales (N-BVT) (GALLARDO y MONTEMAYOR, 1982).

El hecho de que actualmente se pueda disponer de una técnica de alta sensibilidad y exactitud, como es la cromatografía de gases, nos permite diferenciar a estos tres compuestos volátiles, de modo que puedan ser detectados por separado.

En el caso de MMA, al tratarse de un compuesto que se encuentra en cantidades importantes sólo en el caso de moluscos, y no haber sido detectado en ninguna de las muestras consideradas, se ha incluido en este estudio únicamente con el fin de asegurar que su detección no interfiera con la del resto de aminas volátiles estudiadas.

Los tres compuestos volátiles considerados, se forman a partir del óxido de TMA (OTMA), pero a través de un mecanismo distinto, por lo que la presencia de contenidos elevados de uno u otro compuesto en el pescado adquieren distinta significación:

- La TMA se forma, principalmente, por reducción bacteriana del OTMA, por lo que se trata de un metabolito cuyos contenidos se encuentran directamente relacionados con la cantidad de microorganismos que consiguen desarrollarse sobre el músculo del pescado.
- En cambio, DMA se forma como resultado de la desmetilación del OTMA por vía enzimática. A partir de ella, se formarán, principalmente, MMA y amoníaco.

Los niveles habituales para OTMA se sitúan, en peces marinos, entre los 40 y los 120 mg/Kg, observándose los niveles más altos en el caso de los peces pertenecientes a la Familia de los Gádidos (bacalao,...).

De los contenidos de OTMA que inicialmente posea el músculo del pescado y de la capacidad de la flora bacteriana contaminante para realizar estas transformaciones,

dependerán, por tanto, los niveles de TMA alcanzados en el músculo del pescado. Y, también de estos niveles iniciales de OTMA y de la actividad enzimática del propio músculo, los niveles de DMA que lleguen a formarse.

Los niveles de DMA y TMA hallados en todas las series estudiadas pueden ser observados en las tablas , , , y .

9.4.1 COMPORTAMIENTO DE LA SERIE CONTROL.

En las muestras pertenecientes a la serie control, se obtienen, tal y como era de esperar, niveles bajos de TMA. Este hecho se justifica en base a que TMA tiene un mecanismo de formación primordialmente bacteriano y las muestras pertenecientes a esta serie no han sido contaminadas con ningún microorganismo, para poder ser utilizadas como control de esterilidad.

Los contenidos que se han detectado de esta amina volátil no superan, en ningún caso, los 4 mg/100g establecidos para el atún por GALLARDO y col. (1984) como límite de calidad para pescado fresco. En base a este criterio, se puede considerar que todas las muestras pertenecientes a la serie control se encuentran en óptimas condiciones en cuanto a su calidad higiénico-sanitaria.

En cuanto a **DMA**, los niveles obtenidos son inferiores a los detectados para TMA, lo que nos hace pensar que el pescado utilizado pueda tratarse de una especie con baja capacidad enzimática para llevar a cabo la reacción de desmetilación a partir del OTMA, necesaria para la formación de este compuesto. En la bibliografía consultada no se ha hallado ninguna referencia a este respecto, pero sí se han hallado referencias en cuanto a que el atún no se está considerado como una especie con altos niveles iniciales de OTMA, por lo que podría ser esta la causa de los bajos niveles de DMA detectados, independientemente de la alta ó baja capacidad enzimática que posea el atún para llevar a cabo esta reacción.

Tampoco en el caso de DMA se supera el límite establecido para el atún por GALLARDO y col. (1984), situado, para este compuesto, en 150 mg/100g.

Para ambos metabolitos, el comportamiento observado es análogo a las tres temperaturas.

9.4.2. COMPORTAMIENTO DE LAS SERIES CONTAMINADAS CON MICROORGANISMOS.

Se han agrupado en un mismo apartado todas las muestras que han sido contaminadas con los cuatro microorganismos objeto de este estudio, debido a que en todas ellas se ha observado un comportamiento análogo.

Así, tal y como era de esperar, todas las muestras presentan niveles de DMA semejantes entre sí y similares también a los obtenidos para las muestras pertenecientes a la serie control. Este hecho, tal y como ya ha sido comentado, podría ser atribuible, tanto a la baja actividad enzimática del músculo del atún, como a los bajos niveles iniciales de OTMA que presenta esta especie.

En cuanto a la TMA, al ser su formación resultado de la actividad bacteriana, capaz de producir la reducción del OTMA, se han podido apreciar ciertas diferencias en su comportamiento según la especie bacteriana contaminante. Así, tal y como ya ocurría en el caso de otros parámetros también utilizados para evaluar la calidad del pescado, el conjunto de series estudiadas, presentan dos comportamientos claramente diferenciados, que nos permiten clasificarlas en los siguientes grupos:

- Un primer grupo formado por las muestras contaminadas con microorganismos de las especies *Plesiomonas shigelloides* y *Serratia marcescens*, en las que se observa un mayor formación de TMA a la temperatura de almacenamiento de 8°C (como ya se ha comentado, se trata de bacterias psicrófilas).
- Y un segundo grupo formado por las muestras contaminadas con microorganismos de las especies *Klebsiella oxytoca* y *Proteus morganii*, en las que los niveles más altos de TMA se detectan cuando la conservación se realiza a 20°C.

En la figura 54 se ha representado gráficamente este comportamiento. Considerando el total de TMA formado a las tres temperaturas por cada microorganismo, se ha calculado el porcentaje correspondiente a cada una de ellas. Sin embargo, en todas las series estudiadas, los contenidos de TMA son muy semejantes a los obtenidos en la serie control, pero el hecho de que se trate en todos los casos de niveles tan bajos dificulta la obtención de conclusiones significativas, hecho experimental que podría justificarse atendiendo a la posibilidad de que las especies estudiadas no desarrollaran una actividad enzimática específica para el OTMA, pero no se ha encontrado bibliografía al respecto, por tratarse de un tema poco

estudiado.

Además, aunque existen numerosos estudios que relacionan la formación de TMA con el deterioro de la flora bacteriana (GALLARDO y MONTEMAYOR, 1982), al contrario de lo que sucede en el caso de los microorganismos formadores de aminas biógenas, existen pocos estudios en que se relacione capacidad con algún tipo de bacteria, a excepción de las pertenecientes al género *Pseudomonas*. Por ello, podríamos por tanto pensar que las cuatro especies bacterianas estudiadas podrían no poseer una alta capacidad para transformar el OTMA en TMA.

tabla ... Contenidos de DMA y TMA ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún no contaminado con ningún microorganismo mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C

T ^a	t(h)	DIMETILAMINA	TRIMETILAMINA
0°C	24	1.20	1.85
	48	1.20	5.05
	72	2.10	6.45
	96	1.20	4.15
	120	1.65	5.20
	144	1.20	2.55
	168	2.50	6.10
8°C	12	0.30	1.10
	24	0.30	1.10
	36	ND	1.10
	48	ND	1.10
	60	0.30	0.95
	72	ND	3.25
	20°C	3	ND
6		0.30	2.55
9		ND	1.10
12		0.75	3.95
15		0.30	0.25

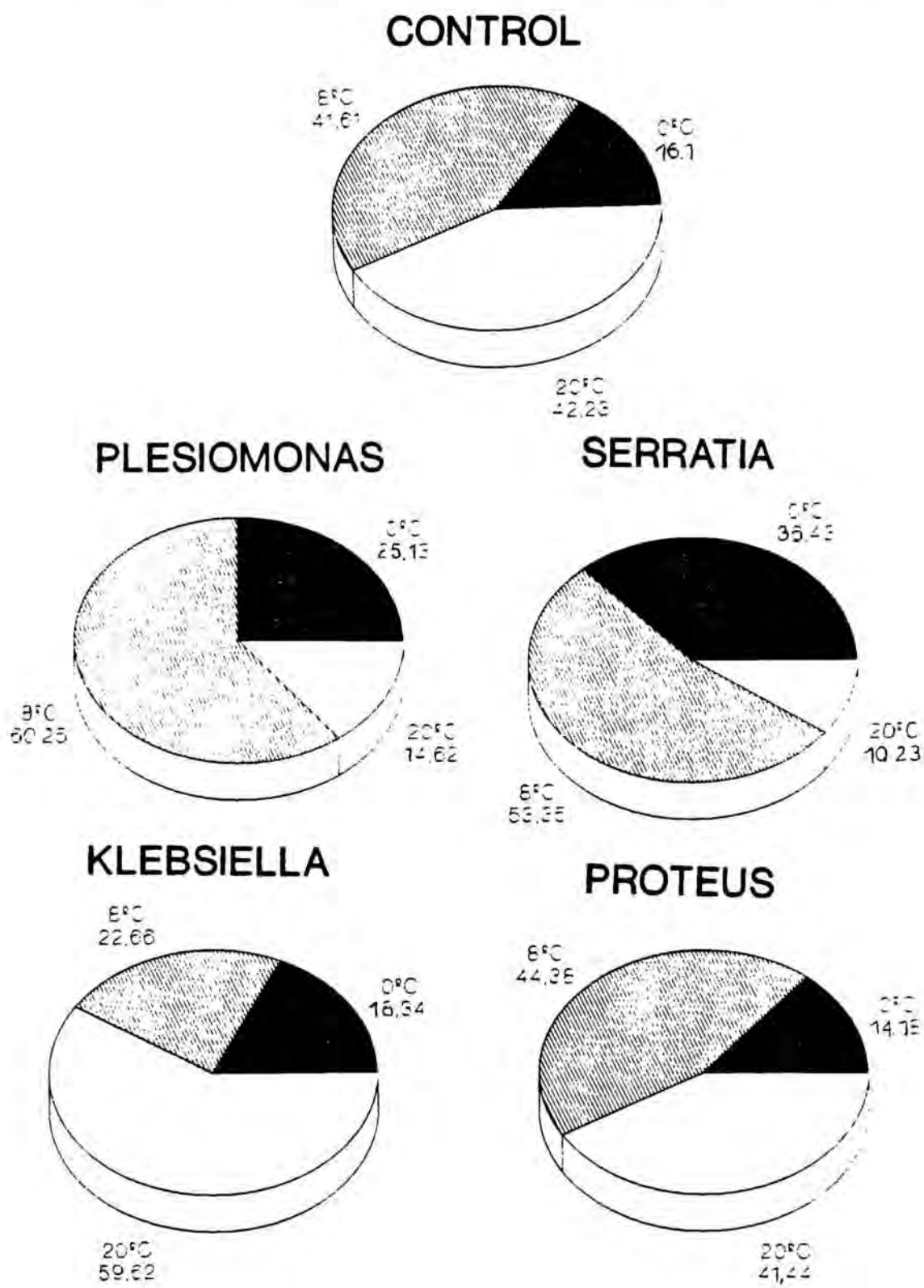
tabla ... Contenidos de DMA y TMA ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminadas microorganismos de las especies *Plesiomonas shigelloides* y *Serratia marcesens* mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C

T ^a	t(h)	PLESIOMONAS		SERRATIA	
		DMA	TMA	DMA	TMA
0°C	24	ND	0.55	ND	0.25
	48	ND	0.60	0.30	3.45
	72	1.20	1.10	0.75	3.25
	96	ND	0.75	1.65	4.85
	120	ND	0.60	1.20	5.05
	144	ND	0.75	0.75	4.70
	168	ND	0.95	2.10	5.20
8°C	12	ND	1.10	0.75	4.85
	24	ND	3.10	1.20	4.70
	36	0.75	2.20	0.75	5.75
	48	ND	ND	ND	7.20
	60	0.30	1.50	2.10	10.20
	72	2.10	4.85	2.10	6.65
20°C	3	ND	0.75	ND	0.40
	6	ND	0.95	ND	1.10
	9	ND	1.10	ND	1.30
	12	ND	0.75	0.75	3.45
	15	ND	0.40	0.35	1.20

tabla ... Contenidos de DMA y TMA ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún contaminadas microorganismos de las especies *Klebsiella oxytoca* y *Proteus morganii* mantenidas a 0°C, 8°C y 20°C

		KLERSIELLA		PROTEUS	
T ^a	t(h)	DMA	TMA	DMA	TMA
0°C	24	0.75	3.80		
	48	0.30	1.85		
	72	ND	0.75		
	96	0.75	1.30		
	120	0.30	1.10		
	144	0.30	0.95		
	168	ND	1.30		
8°C	12	ND	4.70		
	24	0.30	1.85		
	36	ND	2.20		
	48	ND	2.55		
	60	0.75	2.35		
	72	0.30	2.55		
20°C	3	5.20	12.15		
	6	2.05	6.45		
	9	1.65	5.40		
	12	0.55	5.95		
	15	1.65	5.60		

Figura 54. Porcentajes de TMA formados en las muestras de la serie control y en las contaminadas con microorganismos a las tres temperaturas de estudio.



10. **ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE DERIVADOS DE PESCADO.**

10.1 **AMINAS BIOGENAS EN EL PROCESO DE ELABORACION DE CONSERVAS DE ATUN**

Con el fin de estudiar si el proceso de elaboración influía en algún modo en los contenidos de aminas biógenas, o bien, si por el contrario la presencia de estos compuestos en el producto final es debida únicamente a las características de la materia prima empleada, se determinó el contenido de aminas biogénas a lo largo de las distintas etapas que constituyen dicho proceso.

Concretamente se estudiaron 12 procesos reales de fabricación de conservas de atún elaboradas por una Industria gallega líder del mercado. La toma de muestras especificada en la figura 55 fue llevada a cabo por miembros del Area de Tecnología de Productos Pesqueros de la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela. Las muestras eran congeladas y enviadas por transporte aéreo a Barcelona, donde eran divididas en dos fracciones una destinada a los estudios microbiológicos efectuados por el personal del Area de Higiene e Inspección de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria (UAB) y otra que era enviada a nuestro laboratorio.

La legislación española permite la comercializar bajo la denominación de conservas de atún aquellas elaboradas a partir de las siguientes especies de pescado:

- *Thunnus Thynnus*
- *Katsuwonus pelamis* o *Euthymus pelamis* (listado)
- *Thunnus Atlanticus* o *Germo albacares* (yellowfin)
- *Germo alalunga*

De los 12 lotes estudiados 10 pertenecían a la especie *Thunnus albacares* y 2 a la especie *Katsowonus pelamis*. Estos atunes provenían del Pacífico y de las Seichelles y habían sido pescados en pequeñas embarcaciones con artes de cerco y congelados en salmuera refrigerada (-11°C a -14°C). Desde estos barcos se trasladaban a barcos cargueros mayores donde en bodega se mantenían en un intervalo de temperaturas de -22 a -30°C hasta su llegada a la industria elaboradora (21-28 días).

A continuación se reseña brevemente el proceso de elaboración de las conservas de atún en la industria que proporciono las muestras y en la figura... donde se esquematiza dicho proceso se señalan los puntos de muestreo mediante un asterisco.

El atún procedente directamente de la **bodega** del barco o de un almacén frigorífico se descongela a temperatura ambiente.

La siguiente etapa de elaboración consiste en el **corte** (eviscerado y lavado): esta fase es imprescindible para eliminar cualquier material extraño y restos de sangre que puedan desmerecer el aspecto y el sabor del producto acabado. Al mismo tiempo en este proceso se preparan piezas de tamaño similar para la cocción, asegurándose así un tratamiento más homogéneo.

Seguidamente se efectúa una **cocción**, realizada al vapor a una temperatura de 90-100°C durante 1.5 horas.

El atún, una vez cocido es **empacado** mecánicamente de forma compacta tras ser raspado y limpiado manualmente para eliminar las espinas y los restos de piel, posteriormente se le añade el líquido de cobertura y se cierra el envase.

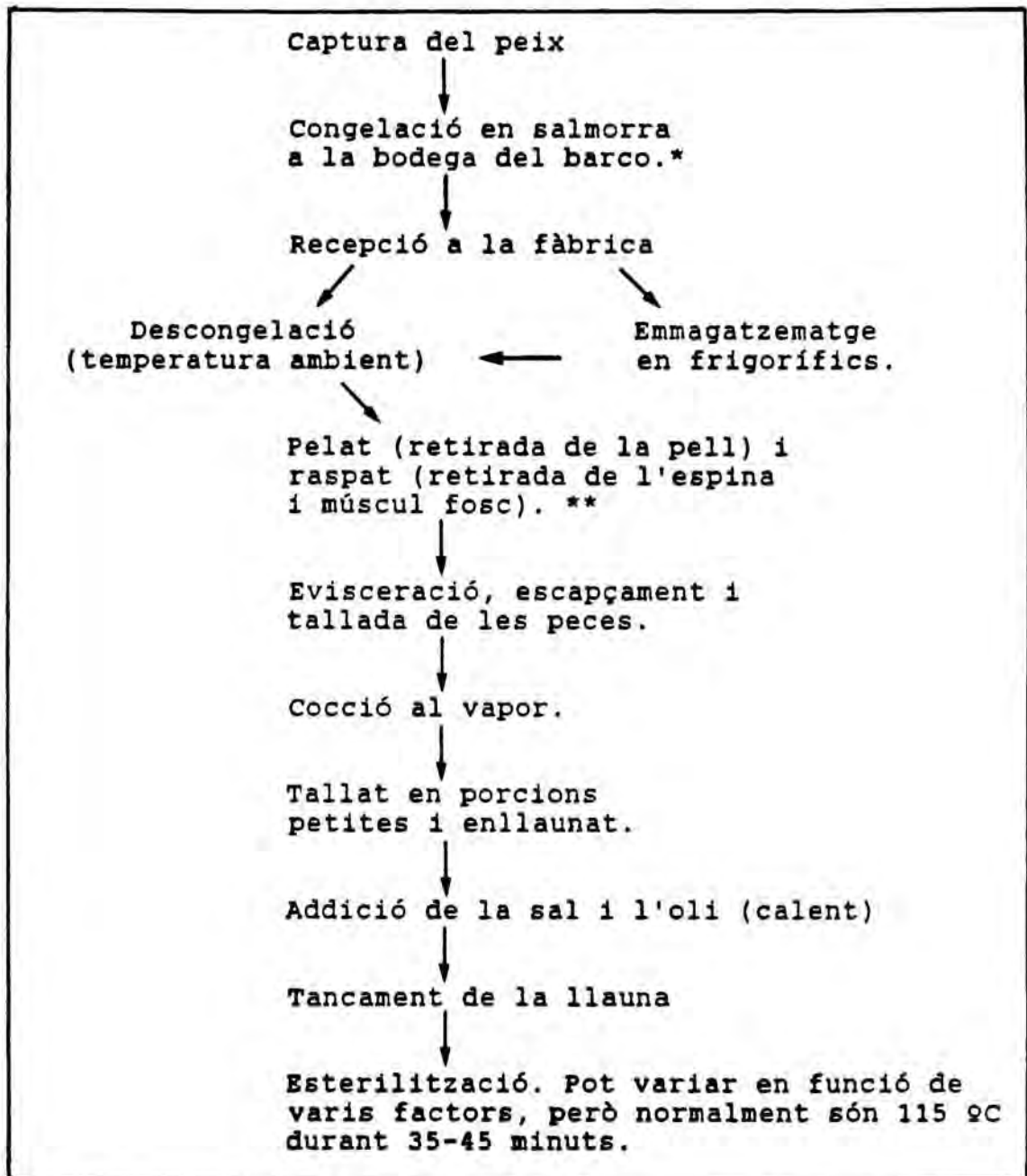
Finalmente los envases se **esterilizan** aplicando temperaturas de 115°C durante períodos de tiempo comprendidos entre 60 y 90 minutos. El objetivo de esta etapa es la inactivación de enzimas y una esterilidad comercial para conseguir un producto final estable esterilizado. El tratamiento térmico finaliza con un enfriamiento con agua fría a presión que se introduce en el autoclave para evitar que el producto sufra una sobrecocción. A la salida del autoclave los envases se dejan al aire para terminar su enfriamiento y el calor residual, aproximadamente 37.5°C seca la superficie exterior.

Las muestras tomadas correspondían:

- A- bodega del carguero
- B- después del corte y antes de la cocción
- C- tras la cocción al vapor
- D- después de empacar y antes de la adición del líquido de cobertura
- E- producto final

En las todas las muestras de este estudio se determinaron los contenidos de aminos biogénas; en 4 de los 12 procesos estudiados se determinaron los contenidos de ATP y derivados puesto que el metabolito final de esta secuencia degradativa es de carácter termoestable y ha sido descrito su uso como posible indicador del estado de la materia prima en productos en conserva.

Figura 55 Proceso de elaboración del atún.



10.1.1 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS EN LAS DISTINTAS ETAPAS DE ELABORACION DE CONSERVAS DE ATUN.

Los contenidos de aminas biógenas en las muestras perteneciente a los 12 procesos estudiados se especifican en las tablas

Se observa en primer lugar que los contenidos de aminas biógenas, excepto los de espermina y espermidina resultaron muy bajos, inferiores a $5\mu\text{g/g}$. Este comportamiento se observa tanto a nivel de la muestras inicial correspondiente a la materia prima como a lo largo del resto de las etapas consideradas.

Triptamina y β -feniletilamina solo fueron detectadas en un porcentaje de muestras muy bajo 11.6 y 3.3% respectivamente. La presencia de estas aminas biogenas en atún fresco adquirido en el mercado también resultó baja y tanto en los ensayos de almacenamiento/descomposición del atún como del boquerón estos compuestos no alcanzaban niveles altos hasta transcurridos períodos de almacenamiento sumamente largos.

A modo de resumen y para facilitar la exposicion de resultados, en la tabla... se indican los contenidos medios de los 12 procesos estudiados y sus desviaciones standard, correspondientes a cada amina biógena y para cada etapa de elaboración. Se han excluido de esta tabla triptamina y β -feniletilamina puesto que como ya se ha comentado anteriormente fueron detectadas solo en un porcentaje de muestras muy bajo.

tabla... Aminas biógenas a la largo del proceso de elaboración de conservas de atún.

ETAPA	PUT	TIR	CAD	SER
Bodega	0.29 ± 0.51	0.32 ± 0.67	0.25 ± 0.45	1.30 ± 1.44
Corte	0.22 ± 0.28	0.08 ± 0.18	0.17 ± 0.31	2.08 ± 2.06
Cocción	0.27 ± 0.39	0.24 ± 0.63	0.33 ± 0.64	2.32 ± 2.35
Empaque	0.13 ± 0.20	0.17 ± 0.35	0.19 ± 0.32	2.05 ± 2.42
Conserva	0.32 ± 0.57	0.15 ± 0.24	0.21 ± 0.29	0.80 ± 1.41
ETAPA	HIS	AGM	ESPD	ESPM
Bodega	0.32 ± 0.62	0.94 ± 0.77	5.10 ± 1.79	14.25 ± 5.91
Corte	0.55 ± 1.44	0.17 ± 0.44	4.31 ± 1.34	14.91 ± 5.55
Cocción	0.40 ± 0.65	0.15 ± 0.36	3.46 ± 1.21	11.89 ± 3.34
Empaque	0.54 ± 0.90	0.32 ± 0.53	3.51 ± 1.72	12.89 ± 3.65
Conserva	0.63 ± 0.83	0.40 ± 0.80	2.82 ± 1.59	8.32 ± 2.67

Tabla... Aminas biógenas $\mu\text{g/ml}$ en diferentes etapas de elaboración de conservas de atún

LOTE	ETAPA	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
1	A	0.20	0.50	NQ	0.40	0.75	ND	NQ	3.95	ND	9.90
	B	0.15	0.25	ND	1.45	0.40	ND	ND	2.45	ND	8.25
	C	0.25	0.30	ND	3.90	ND	ND	ND	2.14	ND	11.95
	D	0.10	0.90	ND	ND	1.95	1.35	3.35	0.45	NQ	5.60
	E	0.20	0.50	ND	ND	0.75	ND	ND	0.90	0.20	5.60
2	A	1.20	2.40	1.40	2.90	1.30	2.45	ND	5.10	ND	13.25
	B	0.40	3.00	0.60	1.50	0.50	ND	ND	6.20	ND	27.90
	C	1.40	2.55	2.20	3.80	1.65	1.25	1.25	3.90	ND	20.05
	D	0.35	1.15	0.95	2.60	0.60	ND	ND	1.75	ND	11.50
	E	0.50	2.35	0.20	0.10	0.30	2.15	2.15	4.90	ND	9.90
3	A	ND	0.90	ND	ND	1.80	1.00	ND	5.45	ND	15.05
	B	ND	1.25	ND	2.20	ND	ND	ND	3.10	ND	16.35
	C	ND	0.50	ND	1.70	ND	0.30	ND	5.45	ND	13.35
	D	ND	1.60	ND	7.05	ND	1.30	ND	5.30	ND	18.65
	E	ND	0.90	0.20	0.65	0.75	ND	ND	6.15	ND	13.20
4	A	ND	0.20	ND	3.65	ND	1.30	ND	4.65	ND	19.95
	B	ND	0.40	ND	3.60	ND	1.50	ND	5.50	ND	20.10
	C	0.15	0.80	0.20	1.65	0.60	0.25	ND	3.30	ND	14.50
	D	ND	ND	ND	3.00	0.15	ND	ND	6.85	ND	19.00
	E	ND	ND	0.20	3.90	0.35	ND	ND	2.60	ND	11.15

Tabla... Aminas biógenas $\mu\text{g/ml}$ el diferentes etapas de elaboración de conservas de atún (II)

LOTE	ETAPA	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
5	A	ND	0.15	ND	1.15	ND	ND	ND	3.65	ND	8.60
	B	ND	ND	ND	5.20	ND	ND	ND	3.60	ND	12.13
	C	ND	ND	ND	7.60	ND	ND	ND	3.10	ND	11.50
	D	ND	ND	ND	5.20	ND	ND	ND	4.00	ND	13.75
	E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.60	ND	6.90
6	A	ND	0.20	ND	0.60	ND	0.25	ND	8.50	ND	25.70
	B	ND	ND	ND	5.50	ND	0.55	ND	2.60	ND	16.75
	C	ND	ND	ND	3.60	ND	ND	ND	2.80	ND	14.30
	D	ND	ND	ND	4.50	ND	ND	ND	3.70	ND	15.00
	E	ND	ND	ND	1.65	ND	ND	ND	2.20	ND	3.40
7	A	ND	0.40	ND	2.60	ND	ND	ND	7.75	ND	22.70
	B	ND	ND	ND	4.25	ND	ND	ND	5.60	ND	14.90
	C	ND	0.45	ND	4.25	ND	ND	ND	4.70	ND	11.40
	D	ND	0.25	ND	1.10	ND	0.50	ND	2.60	ND	11.80
	E	ND	ND	ND	3.40	ND	ND	ND	1.60	ND	8.50
8	A	ND	0.30	0.20	0.90	ND	ND	ND	5.05	ND	10.50
	B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.85	ND	6.50
	C	0.30	ND	0.20	ND	ND	ND	ND	5.45	ND	10.00
	D	ND	ND	0.30	1.25	ND	ND	ND	4.75	ND	11.10
	E	ND	0.75	ND	ND	2.20	ND	ND	4.05	ND	8.30

Tabla... Aminas biógenas $\mu\text{g/ml}$ el diferentes etapas de elaboración de conservas de atún (III).

LOTE	ETAPA	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
9	A	ND	ND	ND	3.50	ND	ND	ND	4.75	ND	15.10
	B	0.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.75	ND	15.90
	C	ND	ND	ND	ND	1.60	ND	ND	3.10	ND	8.50
	D	ND	ND	ND	ND	2.65	ND	ND	3.70	ND	14.00
	E	ND	ND	0.50	ND	2.30	ND	ND	2.90	ND	10.50
10	A	1.50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.65	0.10	12.11
	B	0.80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.60	1.32	15.35
	C	0.55	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.60	2.78	9.30
	D	0.60	ND	ND	ND	1.00	ND	ND	2.05	0.60	9.80
	E	1.95	ND	0.85	ND	1.10	1.97	ND	1.15	2.14	7.45
11	A	0.30	ND	0.75	ND	ND	ND	ND	2.25	ND	5.60
	B	0.45	ND	0.65	ND	ND	ND	ND	4.30	ND	13.50
	C	0.30	ND	0.75	ND	ND	ND	ND	1.65	ND	7.90
	D	0.30	ND	0.60	ND	ND	ND	ND	2.75	ND	12.55
	E	0.75	ND	ND	ND	1.00	ND	ND	1.55	ND	6.05
12	A	0.35	ND	0.70	ND	ND	0.90	ND	3.60	ND	12.64
	B	0.65	ND	0.80	1.30	1.30	ND	ND	5.20	ND	11.33
	C	0.45	ND	0.70	1.40	1.00	ND	ND	3.65	ND	9.95
	D	0.30	ND	0.50	ND	1.20	0.80	ND	4.15	ND	11.95
	E	0.45	ND	0.65	ND	ND	0.75	ND	2.25	ND	ND

Se detectó **serotonina** en la mayoría de las muestras en concentraciones comprendidas entre 0.4 y 7.7 $\mu\text{g/g}$. Aunque estos niveles resulten altos comparados con los del resto de las aminas biógenas, sin embargo nada hace pensar que esta presencia se pueda atribuir su presencia al proceso de elaboración puesto que se detecta en la mayoría de las muestras iniciales. El análisis de la varianza, aplicado tras comprobar los supuestos de homogeneidad de las variancias, no demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($F_{\text{exp}}=1.22$ $p=0.3123$) entre los contenidos medios de esta amina biogenas en las 5 etapas de elaboración estudiadas.

Los contenidos de **putrescina, cadaverina, histamina y tiramina** resultaron siempre muy bajos, inferiores a 3 $\mu\text{g/g}$. Con contenidos tan bajos y dada la variabilidad natural que presentan las muestras biológicas, tampoco en este caso es posible establecer diferencias entre los contenidos medios el las distintas etapas de elaboración consideradas.

Agmatina, amina que también ha sido relacionada con el deterioro del pescado presenta niveles inferiores a 3 $\mu\text{g/g}$ y un comportamiento homogéneo a lo largo de todo el proceso de elaboración. Niveles bajos de este compuesto se dan tanto en pescado fresco como en avanzados estados de descomposición tal como describen YAMANAKA y MATSUMOTO (1989) y se comprueba en los apartados 8.1 y 8.2 de esta memoria. El hecho de que el resto de las aminas biógenas indicadoras del deterioro solo presenten contenidos muy bajos indica que nos encontramos ante muestras de pescado fresco.

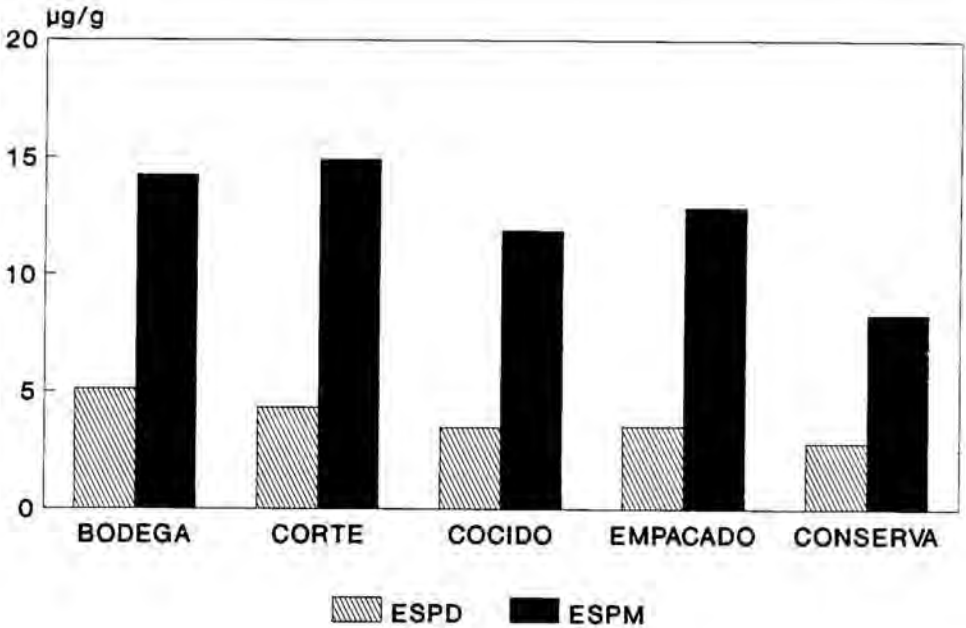
Espermina y espermidina resultaron las aminas biogenas mayoritarias. Los niveles detectados resultaron del mismo orden que los citados por otros autores en conservas de atún (tabla...). Se observa de nuevo que en general los contenidos de espermina resultaron superiores a los de espermidina tal con sucedía en las muestras de mercado y como describen MIETZ y KARMAS (1977), FERNANDEZ-SALGUERO y MACKIE (1987) y YEN y col.(1991).

Los contenidos medios y las desviaciones estandar correspondientes a estas dos aminas en las distintas etapas del proceso de elaboración se muestran en el figura.. En ella se puede observar que ambos compuestos parecen presentar una cierta tendencia a la disminución a lo largo del proceso de elaboración pero las diferencias solo resultaron significativas entre los contenidos medios del producto final y los del resto de las etapas consideradas en conjunto ($F_{\text{Exp}}=3.03$ $p=0.03$ para la espermidina y $F_{\text{Exp}}=0.917$ $p=0.41$ para la espermina). Ello sugiere cierta inestabilidad térmica de estos dos compuestos. RAGENES (1988) en un estudio de termoestabilidad de aminas biógenas en que no se incluía la espermina, observó que el calor afectaba, aunque de modo muy ligero a los contenidos de espermidina.

Aunque PAN y JAMES (1985) describen que podría darse formación de histamina en las etapas de elaboración que conllevan tiempos de espera largos o manipulación, no se ha observado este efecto, ni en los contenidos de histamina ni en los de otras aminas

indicadoras del deterioro que se mantuvieron siempre en niveles muy bajos. Parece difícil por tanto atribuir los elevados contenidos de aminas biógenas descritos por algunos autores en conservas de atún (LERKE y BELL, 1976; MIETZ y KARMAS, 1977; WORTEBERG y col., 1981) al proceso de elaboración efectuado en condiciones normales. Habría que pensar en el uso de materias primas inadecuadas o en procesos de elaboración poco esmerados. El hecho de que también se describan contenidos bajos de aminas biógenas en conservas de este tipo indica que su presencia no es inherente el proceso de elaboración.

Figura 56. Contenidos medios de espermina y espermidina ($\mu\text{g/g}$) en las distintas etapas de elaboración de las conservas de atún.



10.1.2

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE AMINAS BIOGENAS Y EL CRECIMIENTO MICROBIANO Y LA EVALUACION ORGANOLEPTICA A LO LARGO DEL PROCESO DE ELABORACION DEL ATUN.

El personal del Area de Higiene e Inspección de Alimentos de la Facultad de Veterinaria (UAB) efectuó el recuento de microorganismos mesófilos, psicrotróficos, enterobacterias, coliformes, vibrios, anaerobios sulfito-reductores y flora formadora de histamina, en todas las muestras correspondientes a este estudio.

Los resultados obtenidos en cuanto al recuento de microorganismos coinciden con el comportamiento observado a lo largo del proceso respecto al contenido de aminas biógenas. Estas no experimentaban ningún aumento que pudiera atribuirse a una proliferación de flora bacteriana con capacidad para formar estos compuestos.

Del estudio microbiológico se deduce en primer lugar que los recuentos en la materia prima empleadas resultaron en general bajos. Así los contenidos medios iniciales se situaban en 3 U.L. para la flora mesófila total, en 3.12 U.L. en el caso de los psicrotrofos, 1.26 U.L. en las enterobacterias y 0.74 U.L. para los coliformes. Estos recuentos bajos comparados con los habituales en pescado fresco (VAN SPREEKENS, 1986) son justificables considerando que el atún había sido congelado en alta mar este proceso conlleva una considerable reducción de la carga bacteriana.

En la tabla... se indican los contenidos medios correspondiente a los recuentos de cada uno de los grupos de microorganismos aislados en todas las etapas lo largo del proceso de elaboración. No se efectuaron recuentos microbiológicos correspondientes al producto final puesto que obviamente el proceso de esterilización debe conducir a la obtención de un producto estéril.

Tabla... Contenidos medios (U.L.) correspondientes a los recuentos de microorganismos a la largo del proceso de elaboración de las conservas de atún.

ETAPA	MESOFILOS	PSICROTROFOS	ENTER. ⁽¹⁾	COLIF. ⁽²⁾
A	3.00±1.40	3.12±1.70	1.26±1.90	0.79±1.52
B	2.77±1.20	3.09±1.20	1.11±1.79	0.55±1.61
C	3.62±1.35	3.72±1.51	1.71±1.81	0.95±1.41
D	4.52±1.34	4.65±1.18	2.03±1.89	1.59±1.78

1 Enterobacterias

2 Coliformes

No se detectó la presencia de microorganismos pertenecientes al género vibrio ni de sulfito reductores. La flora contabilizada como flora formadora de histamina solo apareció en tres de las muestras de la etapa D, correspondiente al momento del empaque y antes de la adición del líquido de cobertura.

Los recuentos de microorganismos resultan bajos a lo largo de todas la etapas de estudio, como resultaban en la materia prima. Además se observa que en ningún momento se alcanzan niveles semejantes a los del ensayo de almacenamiento descomposición del atún donde efectivamente se verificó una formación de aminas biogenas. En dicho ensayo en el momento en que podríamos considerar que los niveles de histamina han sufrido un incremento, los recuentos de microorganismos resultan muy superiores. Así en las muestras mantenidas a 0°C, tras 9-12 días de almacenamiento el contenido de histamina, no detectada en la muestra inicial se situaba entre 4.9 y 19.9 µg/g y los recuentos de microorganismos alcanzaba aproximadamente 6 U.L. para los mesófilos, 8 U.L. los psicrotrofos, 3 U.L. enterobacterias, 0.5 U.L coliformes y 1.5 la flora formadora de histamina. Esta hecho se repite si al considerar la muestras mantenidas en refrigeración y a temperatura ambiente, donde los recuentos microbianos en el momento en que es posible suponer un aumento en el contenido de histamina, 2 días y 24 horas respectivamente, son todavía superiores.

El personal del Area de Tecnología de Productos Pesqueros de la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela efectuó también la **valoración organoléptica** de las muestras correspondientes a la materia prima y al producto final obtenido en cada uno de los lotes estudiados mediante la aplicación del criterio de Karlsruhe que permite la valoración de ambos tipos de producto.

Los resultados de este estudio demostraban que las muestras de producto acabado quedaban incluídas dentro de la misma categoría que su correspondiente materia prima y en todos los casos la calificación obtenida era alta. Del total de lotes estudiados cuatro correspondían a la categoría o clase II (Bueno) y el resto a la clase III (Excelente).

El hecho de que los niveles de aminas biógenas determinados en este estudio resultaran bajos coincide con la buena clasificación organoléptica obtenida por las muestras correspondientes al producto final obtenido. SIMS y col (1992) describen la existencia de una elevada correlación entre contenidos altos de cadaverina e histamina en conservas de atún y el rechazo organoléptico por parte de personal entrenado.

WILLIAMS (1954) y KIM y BJELDANES (1979) en estudios en los que se elaboraban conservas de pescado a partir de materia prima con mala puntuación organoléptica obtenían productos con contenidos mas elevados de aminas biógenas indicadores del deterioro que los obtenidos empleando materia prima óptima.

La valoración organoléptica esta en consonancia con los observado desde el punto de vista del contenido de amina biogenas y los recuentos microbiologicos en las muestras de este estudio. Desde estos tres puntos de vista puede concluirse que la materia prima empleada resultó de una calidad adecuada y que el proceso de elaboración de las conserva no conlleva obligadamente a la aparición de contenidos elevados de aminas biogenas como algunos de los que han sido descritos para este tipo de productos.

10.1.3 EVOLUCION DE ATP Y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACION DURANTE EL PROCESO DE ELABORACION DE CONSERVAS DE ATUN.

MARTIN y col, (1978), TOKUNAGA y col.(1982) y IIDA y col. (1982) consideran que los metabolitos finales de la secuencia degradativa del ATP son estables a las temperaturas de esterilización y sugieren su determinación para evaluar la calidad de conservas de pescado, asumiendo que los niveles de estos compuestos en el producto final podrían ser indicadores de la frescura del pescado empleada como materia prima.

Contrariamente SHIRAI y col. (1987) y THOMPSON y col. (1979), señalan un ligero descenso del IMP (20%) y un ligero aumento de inosina e hipoxantina como consecuencia del tratamiento térmico.

Con el fin de comprobar si los niveles de estos compuestos podrían ser utilizados como indicadores de la calidad de la materia prima empleada en las conservas de atún, se determinó su contenido a lo largo de 9 procesos de elaboración reales de productos de este tipo.

Los puntos de toma de muestra seleccionados, bodega (A), corte (B), cocción (C), empaçado (D) y conserva (E), coinciden con los señalados en la figura ... del apartado 10.1. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas... y....

Los contenidos de **ATP**, **ADP** y **AMP** resultaron muy bajos en todas las muestras analizadas, inferiores a $0.6\mu\text{mol/g}$. La determinación de estos tres compuestos en cantidades muy bajas ya en la muestra inicial puede considerarse en cierto modo normal, puesto que contenidos mayores solo se han descrito en peces sacrificados en el laboratorio mediante métodos no estresantes. Llama la atención sin embargo el que se detecte ATP, no detectado en ninguna de las muestras de atún adquiridas en el mercado ni en el atún empleado en el ensayo de almacenamiento descomposición descrito en el apartado 8. El hecho de que esta materia prima fuera congelada inmediatamente después de la captura, transportada en barco carguero a una temperatura muy baja (-22 a -30°) y que no fuera descongelado hasta en momento de su empleo, explicaría el que la secuencia degradativa del ATP se encontrara atrasada con respecto a las restantes muestras de atún.

En la tabla .. se expresan los contenidos medios de ATP, ADP y AMP a lo largo de las distintas etapas de elaboración. Se observa que inicialmente los niveles medios de estos tres compuestos son semejantes, mientras que tras la cocción no se detecta en ningún caso ni ATP ni ADP y los niveles de AMP parecen ligeramente superiores. MURATA y SAKAGUCHI citan que el ATP y el ADP son lábiles en comparación con el AMP, puesto que se descomponen con facilidad cuando hierven el agua destilada. Por ello puede pensarse que el calor aplicado en la etapa de cocción al vapor a 90°C es suficiente para que desaparezcan ambos compuestos.

Tabla... ATP y sus compuestos de degradación ($\mu\text{mol/g}$) en diferentes etapas de elaboración de conservas de atún

LOTE	ETAPA	ATP	ADP	AMP	IMP	INOSINA	Hx
1	A	0.15	ND	0.05	4.75	4.00	0.40
	B	0.20	ND	0.05	4.50	2.70	0.60
	C	ND	ND	ND	5.90	1.50	0.40
	D	ND	ND	0.10	4.45	3.45	1.00
	E	ND	ND	0.30	3.10	1.60	1.00
2	A	0.30	ND	0.05	-	4.50	0.40
	B	0.20	0.10	0.05	3.10	4.45	0.50
	C	ND	ND	0.15	2.10	4.70	0.70
	D	ND	ND	0.15	4.40	3.30	0.40
	E	ND	ND	0.20	2.30	4.40	0.40
3	A	0.10	ND	0.05	4.20	3.85	0.70
	B	0.10	0.10	0.15	5.00	2.55	1.35
	C	ND	ND	0.80	4.44	-	0.65
	D	ND	ND	0.50	4.50	2.50	0.95
	E	ND	ND	0.20	-	3.95	0.85
4	A	0.30	0.20	0.10	5.55	3.10	0.35
	B	0.25	0.20	0.10	5.50	3.10	0.70
	C	ND	ND	ND	2.25	2.90	1.20
	D	ND	ND	0.20	3.80	3.80	0.40
	E	ND	ND	0.15	2.85	-	1.60

Tabla... ATP y sus compuestos de degradación ($\mu\text{mol/g}$) en diferentes etapas de elaboración de conservas de atún

LOTE	ETAPA	ATP	ADP	AMP	IMP	INOSINA	Hx
5	A	0.05	0.15	0.10	4.60	1.05	0.35
	B	0.05	0.10	0.05	2.60	1.35	0.70
	C	ND	ND	0.10	3.30	1.10	1.20
	D	ND	ND	0.30	4.90	1.75	0.40
	E	ND	ND	0.40	2.90	-	1.60
6	A	0.15	0.25	0.20	4.80	3.50	0.60
	B	0.20	0.35	0.10	3.95	2.70	0.40
	C	ND	ND	0.30	5.10	2.10	1.40
	D	ND	ND	0.20	4.75	2.70	0.60
	E	ND	ND	0.35	3.20	2.30	0.70
7	A	0.05	0.01	0.20	4.50	4.05	0.50
	B	ND	0.15	0.15	3.80	3.05	0.70
	C	ND	ND	0.60	6.50	2.50	0.75
	D	ND	ND	0.40	6.60	2.15	-
	E	ND	ND	0.70	6.00	4.55	1.30
8	A	0.10	0.25	0.40	3.90	5.14	1.60
	B	ND	0.40	0.30	4.90	4.61	1.50
	C	ND	ND	0.45	3.10	2.90	-
	D	ND	ND	0.40	2.25	4.50	0.90
	E	ND	ND	0.45	2.75	3.00	1.60

Tabla... Contenidos medios y desviaciones estandard de ATP y sus compuestos de degradación a lo largo del proceso de elaboración de conservas de atún.

ETAPA	ATP	ADP	AMP
Bodega	0.14±0.09	0.11±0.11	0.14±0.11
Corte	0.12±0.09	0.17±0.13	0.13±0.09
Cocción	ND	ND	0.33±0.29
Empaque	ND	ND	0.28±0.13
Conserva	ND	ND	0.35±0.17
ETAPA	IMP	Inosina	Hipoxantina
Bodega	4.65±0.50	3.35±1.25	0.80±0.45
Corte	4.40±0.90	2.70±0.98	1.25±0.85
Cocción	4.35±1.50	2.10±0.70	1.05±0.60
Empaque	4.45±1.20	2.95±0.90	1.30±1.00
Conserva	3.10±1.20	2.75±1.15	1.35±0.50

Los niveles de **IMP** se encuentran en la mayoría de las muestras entre 3 y 5 $\mu\text{mol/g}$, de modo que resulta el metabolito mayoritario tal como sucede en la mayoría de las muestras de pescado fresco sacrificado en la captura (JONES y MURRAY, 1962, MURRAY y col., 1984).

Los niveles de IMP iniciales son semejantes a los determinados en el resto de las etapas de elaboración estudiadas, aunque tras la esterilización parece apreciarse una cierta disminución debido a una destrucción térmica de este compuesto. Teniendo en cuenta la variabilidad obtenida en el contenido de IMP de muestras tomadas en la misma etapa de elaboración resulta muy difícil atribuir la disminución observada al proceso de esterilización. Sin embargo, GILL y col. (1987) en un estudio encaminado a conocer la estabilidad de este tipo de compuestos calcula una recuperación del 75% en conservas de pescado para el IMP añadido a la materia prima. Ello sugiere que si bien este compuesto no se descompone totalmente sus contenidos si que podrían verse en cierto modo afectados por su inestabilidad térmica.

Los niveles de **inosina** determinados en las muestras de este estudio resultaron muy variables entre 1.5 y 4.5 $\mu\text{mol/g}$. De los seis analitos que constituyen la secuencia degradativa del ATP este fue también el que presentó una mayor diferencia entre lotes. Los niveles en la materia prima se detectaron niveles de este compuesto superiores a los obtenidos en las muestras de atún fresco adquiridas en el mercado (apartado 11) circunstancia que coincide con el hecho de que en estas muestras también se habían detectado mayores contenidos de hipoxantina, el siguiente metabolito en la secuencia degradativa.

Debido a la amplia variabilidad observada en las muestras es difícil atribuir modificaciones en el contenido de este compuesto al proceso de elaboración de las conservas, y aunque GILL y col. señalan para la inosina un porcentaje de recuperación de solo el 60%, inferior al del IMP, los contenidos medios en las distintas etapas de elaboración de los 9 procesos estudiados resultan semejantes.

Los contenidos de **hipoxantina** se sitúan en el intervalo entre 0.5 y 1.5 $\mu\text{mol/g}$ en la mayoría de las muestras. Sólo unas pocas se sitúan cerca del límite por encima de los cuáles la muestra podría presentar cierto gusto amargo (JONES, 1961; GALLARDO, 1978 y GREENE y BERNATT-BRINE, 1990). La valoración organoléptica tanto de la materia prima como del producto acabado resultó satisfactoria, puesto que en ambos casos el contenido de IMP resultaba todavía elevado y la presencia de 5'-mononucleótidos es difícil notar el sabor amargo puesto que estos compuestos ejercen un efecto supresor.

La media de los contenidos de hipoxantina son semejantes a lo largo de todas las etapas de elaboración. Aunque podría pensarse en un ligero aumento tras la esterilización dada la variabilidad existente entre las muestras podemos considerar que se mantiene constante.

La estabilidad térmica de este compuesto es la base por la que algunos autores proponen su uso como indicador de la calidad de la materia prima en conservas. La principal limitación de su uso en la evaluación de conservas de atún es que las especies que constituyen su materia prima se encuentran entre las catalogadas como formadoras de inosina (EHIRA y UCHIYAMA, 1973) y los de hipoxantina se mantendrían bajos hasta que no se hiciera evidente una importante proliferación bacteriana.

En la figura 57 se muestra de modo gráfico la evolución de los contenidos medios de los tres metabolitos mayoritarios, IMP, inosina e hipoxantina a lo largo del proceso de elaboración de las conservas de atún.

En definitiva podemos considerar que el proceso de elaboración de conservas de atún no conlleva modificaciones importantes en los últimos metabolitos de la secuencia degradativa del ATP por lo que su determinación podría ser útil para la evaluación de la calidad de la materia prima empleada.

De entre los distintos índices de calidad en los que participan el ATP y sus productos de degradación se han elegido aquellos en que se concede mayor importancia a los últimos metabolitos de la secuencia al cociente $\text{IMP}/(\text{IMP} + \text{Ino} + \text{Hx})$ propuesto por GILL y col. (1987) y la relación Ino/Hx (GREENE y BERNATT-BRINE, 1990), y se ha calculado su valor para todas las muestras de este estudio. Además se ha calculado a efectos de establecer una comparación de idoneidad el índice K que tiene en cuenta el valor de todos los metabolitos de la secuencia. los resultados de este estudio se indican en la tabla...

Se observa que mediante el uso del índice K solo el 27.4% de las muestras resultarían aptas para el consumo humano aceptando el límite del 40% que indican WATANABE y col (1987) y ninguna muestra ni siquiera las correspondientes a la materia prima podría clasificarse como de pescado muy fresco ($K < 20\%$).

Mediante el cálculo de los otros dos índices propuestos la totalidad de las muestras de este estudio resultarían aceptables puesto que para ello los valores obtenidos deben superar la cifra de 0.15 en el caso del cociente $IMP/IMP+Ino+Hx$ y el valor 1 en la relación Ino/Hx .

Tanto los recuentos microbiológicos como los contenidos de aminos biógenos indicadores de deterioro resultaron bajos en todas las muestras de este estudio y la valoración organoléptica efectuada en las muestras iniciales y finales de cada proceso de elaboración catalogaba las muestras como excelentes en la mayoría de los casos. El hecho de que se llegue a conclusiones semejantes mediante índices basados solamente en los últimos metabolitos de la secuencia degradativa del ATP y con el uso del índice K se rechacen la mayoría de las muestras pone de manifiesto una vez más la poca idoneidad de este criterio que si bien es capaz de reflejar cambios previos a la colonización bacteriana resulta demasiado exigente en la evaluación de pescado sacrificado en la captura.

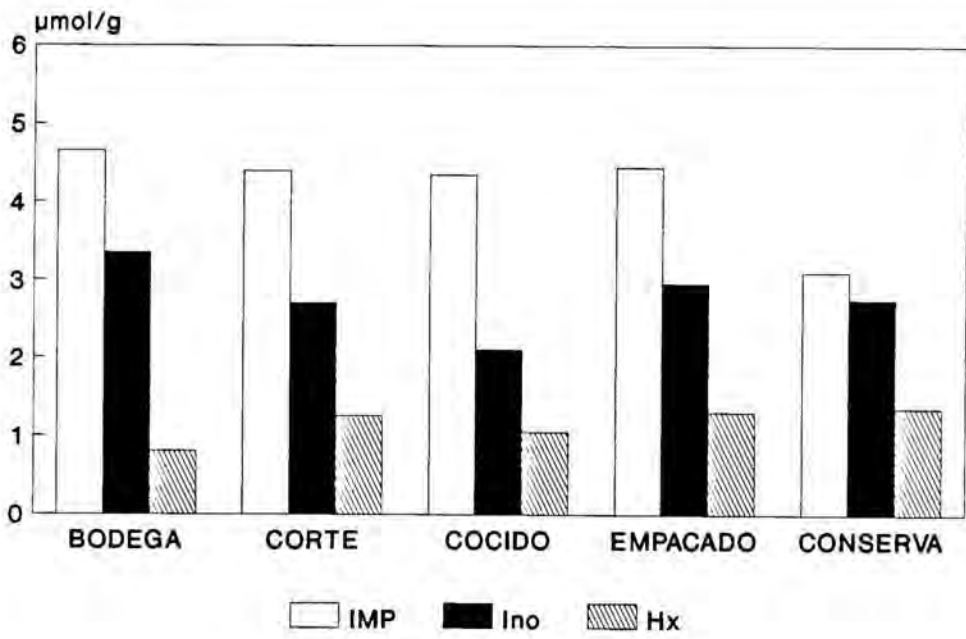
Tabla... Valores del índice K%, del cociente $IMP/IMP+Ino+Hx$ y de la relación en las muestras a lo largo de las distintas etapas de elaboración del atún y en los 9 lotes estudiados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	8
K < 40	46.90	-	51.00	42.40	22.00	43.10	49.20	59.06	36.40
	41.20	58.80	42.70	42.80	41.80	40.00	46.20	52.40	-
	24.40	70.82	27.80	64.10	39.60	39.10	31.10	-	40.90
	44.00	45.00	40.70	58.07	29.20	58.60	-	67.20	45.30
	42.90	65.90	-	-	-	46.50	27.70	58.90	54.20
Q ⁽¹⁾ > 0.15	0.52	-	0.48	0.55	0.76	0.55	0.49	0.36	0.61
	0.57	0.38	0.56	0.55	0.56	0.56	0.50	0.44	-
	0.75	0.27	0.68	0.35	0.59	0.59	0.67	-	0.55
	0.49	0.54	0.56	0.40	0.69	0.59	-	0.30	0.52
	1.80	0.32	-	-	-	0.52	0.50	0.37	0.42
R ⁽²⁾ ≥ 1	9.95	-	5.40	2.15	3.00	5.95	7.70	3.27	2.20
	4.42	9.80	1.90	2.26	1.95	7.58	4.48	3.01	-
	3.63	6.41	2.07	2.62	0.94	1.54	3.41	-	3.40
	3.20	8.04	2.63	2.21	4.65	4.82	-	5.03	2.07
	1.61	11.05	-	-	-	3.39	3.50	1.88	1.28

1 cociente $IMP/IMP+Ino+Hx$

2 relación Ino/Hx

Figura 57. Evolución de los contenidos de IMP, Inosina e Hipoxantina a lo largo del proceso de elaboración de conservas de atún.



10.2. AMINAS BIOGENAS DURANTE LA ELABORACIÓN DE SEMICONSERVAS DE ANCHOA

10.2.1 DISEÑO DEL ENSAYO Y TOMA DE MUESTRAS

En semiconservas de pescado, tradicionalmente se han venido describiendo contenidos de aminas biógenas superiores a los de pescado fresco y en conserva. Incluso los niveles máximos de histamina permitidos en este tipo de productos, tanto por la reglamentación de la CEE (DIRECTIVA DEL CONSEJO, 91/493/CEE) y la correspondiente reglamentación española (REAL DECRETO 1437/92) son el doble de los permitidos para el pescado fresco y el resto de los derivados de pescado.

El proceso de elaboración de semiconservas de anchoa, carece de tratamiento térmico, y conlleva una larga etapa de maduración en presencia de ClNa en la que la materia prima sufre una serie de modificaciones que conducen a un producto final de características muy distintas a las del pescado fresco. Con el fin de dilucidar si la presencia de contenidos elevados de aminas biógenas es un fenómeno inherente su peculiar proceso de elaboración, se ha planteado el estudio de la evolución de los contenidos de estos compuestos químicos a lo largo de la misma.

La elaboración de salazones de anchoa, frecuente en los países del área mediterránea, presenta características en función de la zona geográfica en que se preparan. En este trabajo, concretamente se ha estudiado el proceso de elaboración de las anchoas acogidas bajo la Denominación Genérica de Calidad "Anxova de l'Escala" (DEPARTAMENT D'AGRICULTURA RAMADERIA I PESCA, 1987).

Las anchoas acogidas bajo la citada Denominación genérica de Calidad se definen como: anchoas elaboradas en salmuera, de la especie *Engraulis encrasicolus*", debidamente presentadas y maduradas en el ámbito territorial del municipio de la Escala (Gerona).

La legislación al respecto indica que en la elaboración de este producto debe emplearse como materia prima:

- anchoas frescas de clase Extra y A definidas según el Real Decreto 1521/84 de 1 de Agosto por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria de Establecimientos y Productos de la Pesca i Acuicultura destinados al consumo humano.
- sal común,
- y, opcionalmente, hierbas aromáticas y otros condimentos y especias.

Además se especifica la prohibición de utilizar cualquier tipo de aditivo y en sus artículos 8, 9 y 10 reseña brevemente las condiciones básicas a seguir en la elaboración y envasado.

Los boquerones pescados generalmente en la costa mediterránea (bahía de Rosas), en el período de tiempo comprendido entre Mayo y Octubre, se capturan durante la noche o las madrugadas en embarcaciones pequeñas y son transportados a la industria elaboradora en camiones y cubiertos de hielo. A su llegada a la planta se les añade sal en seco, que además de tener cierto efecto conservante facilitará la posterior manipulación.

El boqueron es descabezado y eviscerado manualmente de modo que queden en el restos de ciegos pilóricos, donde existe una elevada actividad proteolítica. Posteriormente se colocan en salmuera, dispuestos en capas y en recipientes adecuados en los que se verificará el proceso de maduración.

El tiempo de maduración dependerá de las condiciones estacionales, temperaturas superiores requieren tiempos de maduración más cortos, pero este período de tiempo no deberá ser en ningún caso inferior a dos meses. El período de maduración se da por finalizado cuando la textura el sabor y el olor evaluados por un panel de catadores expertos se consideran adecuados.

El producto final se envasa en recipientes adecuados, de vidrio para la venta al detall y de plástico para la venta al mayor y se comercializa bajo dos presentaciones:

- 1 Anchoas salmueradas
- 2 Anchoas limpias en aceite.

En la primera presentación se retiran del recipiente de maduración y se envasan en salmuera limpia. La segunda presentación requiere una mayor manipulación, tras la maduración se limpian y a partir de ellas se preparan filetes que se envasan en aceite, generalmente de oliva, cuyas características respecto al grado de acidez deben especificarse en la etiqueta.

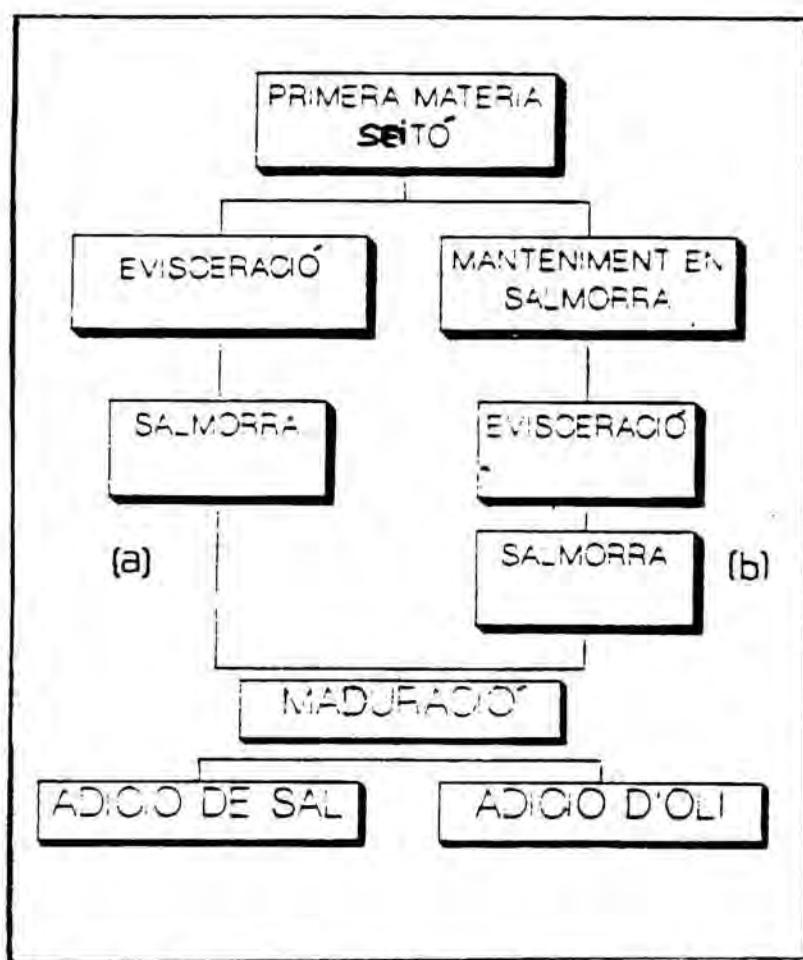
En este trabajo se estudiaron 17 lotes de fabricación de "Anxova de l'Escala" elaborados en las campañas 1988-89 y 1989-90 por una industria de la Escala.

La toma de muestras se efectuó entre 1 y 2 horas, contabilizadas desde el momento de la llegada del pescado a la factoría (materia prima) y posteriormente con una frecuencia aproximada de 2 semanas a lo largo de todo el tiempo que duraba la maduración. En cada punto de muestreo se tomaban de 10-12 individuos para obtener muestras representativas y homogéneas. Las muestras fueron trasladadas a muestra laboratorio en en hielo en un recipiente isoterma.

Los profesores de la Unidad de Higiene e Inspección de Alimentos de la Facultad de Veterinaria (UAB) realizaron el seguimiento microbiológico y en nuestro laboratorio se determinaron los contenidos de aminos biógenas en los 17 lotes estudiados y el contenido de ATP y sus compuestos de degradación en 4 de ellos.

Cuando la llegada de materia prima a la planta de elaboración es masiva y se prevee que la rapidez del proceso de evisceración efectuado manualmente no será suficiente los boquerones frescos se introducen directamente en grandes recipientes de salmuera y se evisceran y trasladan a recipientes de maduración más pequeños, posteriormente cuando se dispone de personal para ello. De este modo la primera parte de la maduración puede efectuarse en algunos casos en presencia de las vísceras. Ello nos ha permitido diferenciar dos vías de elaboración tal como se indica en la figura .. La vía A que corresponde a las anchoas evisceradas a la llegada a planta y la vía B correspondiente a las evisceradas tras determinado tiempo de permanencia en salmuera.

Figura 58 Proceso de elaboración de la "Anxova de l'Escala".



10.2.2 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINA BIOGENAS A LO LARGO DEL PROCESO DE ELABORACION DE LA "ANXOVA DE L'ESCALA"

Los resultados obtenidos en este estudio, presentados por lotes de estudio, se muestran en las tablas...donde se indica las semanas de maduración y el contenido de aminas biógenas determinado en cada muestra. Las muestras señaladas con 0 semanas de maduración corresponden a la materia prima, son por tanto muestras de boquerón fresco.

Se observa en primer lugar, una amplia variabilidad en cuanto al contenido de aminas biógenas en las muestras de boquerón empleadas como materia prima.

En el boquerón, especie de pequeño tamaño y elevada actividad proteolítica intestinal, el proceso de pérdida de frescura se verifica de forma muy rápida, de este modo especímenes pertenecientes a la misma captura pueden aparecer más o menos deteriorados en función del estrés sufrido en ella o debido a las condiciones de descarga y transporte.

En las muestras correspondientes al periodo de maduración se observa también una amplia variabilidad de resultados, tanto en muestras pertenecientes al mismo lote, tomadas a tiempos de maduración distintos, como en muestras de distinto lote y tiempo de maduración semejante (tablas...). Estas variaciones pueden explicarse con facilidad debido a las diferencias en cuanto al estado de conservación que puede presentar de la materia prima y teniendo en cuenta, que dadas las especiales características de elaboración artesanal de este tipo de productos, en las muestras tomadas durante la etapa de maduración, se puede asegurar su pertenencia a un mismo lote pero no posible garantizar que la maduración en salmuera se hubiera efectuado en el mismo recipiente. Ambos hechos contribuirían a explicar la dispersión obtenida en los resultados.

En la tabla... se muestran los contenidos de aminas biógenas en muestras de boquerón fresco, empleado como materia prima.

En estas muestras los niveles de aminas biógenas indicadoras de deterioro resultan algo superiores a los determinados las muestras de boquerón fresco correspondientes al estudio de mercado (apartado 12), aunque en ningún caso se llega a niveles semejantes a los que corresponderían al pescado deteriorado. Podríamos suponer que el hecho de que el pescado se mantenga a temperatura ambiente en la planta elaboradora a la espera de la evisceración manual, en una época del año en la que se alcanzan temperaturas altas, podría ser la causa de la elevación de los contenidos de aminas biógenas con respecto a las muestras adquiridas en el mercado donde en condiciones normales no debe de haberse interrumpido la cadena de frío.

Tabla... Contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) durante la maduración de anchoas elaboradas por la vía A (temporada 1989-90)

LOTE	SEMANAS	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
1A	0	2.35	11.95	4.20	1.10	1.00	4.95	ND	6.60	ND	5.85
	2	1.75	2.00	2.90	0.75	0.55	5.65	ND	2.70	ND	2.45
	6	2.10	7.25	3.65	1.95	1.70	7.05	ND	5.40	ND	2.50
	8	1.25	5.35	1.30	1.45	ND	4.25	ND	4.60	ND	3.15
	10	1.25	4.10	3.40	ND	ND	10.30	ND	5.85	ND	3.35
	12	2.65	8.40	4.80	0.45	1.85	13.45	ND	8.45	ND	5.20
	14	2.25	5.60	5.60	1.35	2.00	14.85	ND	7.20	ND	5.05
	16	6.25	7.90	7.90	ND	1.30	14.05	ND	4.95	ND	3.20
2A	0	5.70	12.20	8.95	0.55	3.00	19.65	0.30	10.55	ND	7.20
	2	1.40	3.10	2.05	0.60	0.65	3.40	ND	1.75	ND	2.45
	6	3.40	10.40	6.00	1.00	1.60	12.75	0.50	3.85	ND	1.75
	10	4.85	8.90	6.50	ND	1.46	14.80	1.10	4.90	ND	1.90
	12	6.30	12.15	12.95	1.40	1.95	23.85	0.90	7.95	ND	4.20
	14	7.60	12.15	12.65	0.70	1.50	26.35	1.05	8.45	ND	5.20
	16	5.60	12.65	12.20	0.75	1.70	22.35	ND	6.35	ND	4.55
	18	4.50	10.10	14.45	1.20	3.05	20.50	ND	4.20	ND	5.40

Tabla... Contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) durante la maduración de anchoas elaboradas por la vía A (temporada 1989-90)

LOTE	SEMANAS	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
3A	0	0.40	7.70	0.45	1.20	0.40	4.55	ND	4.65	ND	6.85
	2	0.45	11.60	0.65	2.25	2.20	10.70	0.70	4.50	1.10	3.00
	4	5.05	13.55	0.95	2.60	0.60	14.60	0.90	2.00	0.30	0.45
	6	5.75	11.45	1.05	2.65	2.60	15.05	0.50	0.65	ND	5.55
	8	3.90	13.55	1.35	2.50	0.55	16.65	0.65	0.55	ND	3.30
	12	8.00	25.05	1.50	2.55	2.50	20.55	0.70	5.80	0.50	4.30
	14	8.25	17.70	1.50	1.55	1.50	19.50	1.05	2.50	ND	4.10
	16	3.00	14.30	1.30	1.70	1.70	14.80	0.85	2.30	ND	2.40
4A	0	4.00	0.80	5.75	2.25	3.50	35.00	ND	12.65	ND	5.75
	4	11.20	19.85	12.30	5.50	5.50	22.80	ND	11.15	ND	3.80
	6	7.00	21.85	18.70	4.95	4.90	22.55	2.05	9.05	ND	3.08
	8	9.10	30.25	28.10	3.55	3.50	33.20	14.75	10.55	ND	0.55
	10	9.30	25.40	28.60	2.95	2.90	26.50	1.80	10.70	ND	4.20
	12	7.40	29.20	23.60	0.95	ND	28.50	1.05	9.20	ND	5.65
	14	6.50	21.00	25.60	2.80	2.80	27.40	1.65	7.40	ND	4.25

Tabla... Contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) durante la maduración de anchoas elaboradas por la vía B (temporada 1989-90)

LOTE	SEMANAS	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
3B	0	4.25	14.20	-	2.20	1.15	-	0.30	8.40	0.90	4.90
	2	5.70	5.55	15.75	1.25	3.25	22.05	0.60	7.50	0.80	5.60
	4	6.10	4.65	11.50	1.45	1.00	17.50	ND	8.20	ND	5.30
	8	10.60	9.75	27.65	1.10	4.25	26.85	ND	7.80	ND	5.70
	10	11.60	18.70	29.70	0.80	4.35	28.90	ND	10.15	ND	5.05
	12	5.90	14.50	14.50	2.55	3.60	19.40	ND	7.60	ND	4.50
	14	7.90	18.00	16.70	1.90	4.20	20.65	ND	7.65	ND	5.30
	16	3.30	14.35	6.25	1.70	2.55	12.30	ND	6.55	ND	5.65
4B	0	4.75	9.35	4.65	ND	ND	3.40	ND	7.25	0.35	4.90
	4	7.05	17.50	6.05	1.25	1.90	12.80	ND	6.55	ND	6.70
	6	6.10	13.50	5.60	ND	1.40	15.45	0.20	8.45	ND	6.05
	8	6.90	18.95	6.55	0.55	1.65	15.75	0.55	10.25	ND	4.80
	10	7.75	15.75	7.25	ND	1.50	16.40	0.70	11.85	ND	4.95
	12	8.40	21.95	10.05	0.45	2.20	21.65	0.60	13.65	ND	8.30
	14	5.10	12.80	5.20	ND	1.90	13.95	ND	9.15	ND	6.40
	16	8.20	17.45	8.15	1.90	ND	17.45	ND	11.05	ND	9.00

Tabla... Contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) durante la maduración de anchoas elaboradas por la vía B (temporada 1989-90)

LOTE	SEMANAS	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
1B	0	0.40	7.70	0.45	1.20	0.45	4.55	ND	4.65	ND	6.85
	2	0.40	32.90	2.10	1.30	1.70	4.55	ND	4.05	ND	4.75
	4	2.10	32.60	40.90	1.25	7.70	39.90	1.90	4.60	ND	2.00
	6	2.05	16.65	33.25	1.00	2.80	36.05	0.75	8.85	ND	0.60
	8	1.45	13.50	14.20	0.80	1.35	37.70	0.95	9.55	ND	0.40
	12	3.20	30.50	39.90	1.80	3.80	38.05	1.15	8.45	ND	5.90
	14	3.00	11.70	36.40	1.25	2.00	35.35	0.75	6.70	ND	2.60
	16	3.40	11.50	14.25	0.70	2.75	13.25	0.20	0.90	ND	2.40
2B	0	6.10	7.00	2.85	ND	1.10	24.75	ND	10.70	ND	6.15
	4	7.35	3.30	11.00	1.15	4.20	21.35	ND	3.00	ND	0.90
	6	4.40	14.50	13.90	2.20	4.10	18.10	ND	10.50	ND	7.80
	8	7.40	21.70	14.60	2.15	4.40	19.80	ND	12.35	ND	5.05
	10	4.70	15.60	14.60	2.20	3.55	19.05	ND	11.20	ND	6.60
	12	5.85	11.50	20.70	1.90	2.90	15.75	ND	10.20	ND	7.20
	14	2.95	15.90	14.90	1.90	1.00	21.95	ND	10.05	ND	4.40
	16	3.25	26.90	10.35	0.80	2.80	13.45	ND	6.30	ND	2.75
3B	0	8.50	20.05	4.80	2.25	0.90	22.10	2.40	6.70	1.05	7.10
	2	8.50	22.60	13.15	3.50	1.70	18.95	1.90	7.60	0.20	6.60
	4	6.55	31.55	12.40	2.95	2.20	17.15	2.65	7.60	1.00	3.70
	6	5.55	22.70	11.65	2.00	2.00	15.15	2.65	6.60	0.95	3.35
	10	7.75	13.00	8.15	1.75	1.80	14.95	0.35	5.90	1.10	1.90
	12	2.65	9.70	8.25	1.65	1.30	12.10	0.55	4.85	0.80	4.55
	14	3.40	15.50	12.10	1.65	4.80	18.00	3.70	10.20	0.70	3.85
	16	6.80	35.00	16.95	1.15	7.30	18.60	2.20	12.10	0.65	7.50
18	2.80	10.40	6.35	1.40	1.50	11.70	0.60	3.80	0.30	2.20	

Tabla... Contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) durante la maduración de anchoas elaboradas por la vía A (temporada 1988-89)

LOTE	SEMANAS	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN	
1A	4	2.35	9.90	0.45	ND	1.50	3.25	0.70	8.30	0.20	2.20	
	6	1.75	15.75	16.65	ND	1.15	2305	ND	7.95	ND	3.15	
	8	2.10	14.15	17.50	ND	0.95	26.05	ND	10.95	ND	5.55	
	10	2.40	12.05	8.75	0.90	1.00	16.35	ND	7.05	ND	6.60	
	12	3.30	14.25	53.58	4.50	1.20	40.85	ND	6.25	ND	2.30	
	16	4.50	24.10	51.10	3.25	1.05	35.25	ND	5.25	ND	4.25	
	18	5.00	18.25	57.40	4.15	1.00	48.35	5.87	9.20	ND	5.60	
	0	1.50	1.70	ND	ND	0.50	0.65	ND	3.35	ND	2.40	
2A	2	2.30	11.60	3.45	ND	2.85	7.40	0.20	2.45	ND	2.55	
	4	2.50	11.70	5.75	1.05	1.75	8.55	0.70	2.55	ND	3.65	
	6	3.20	8.90	7.15	ND	1.20	9.55	ND	1.30	ND	2.80	
	8	1.80	14.45	10.50	ND	0.65	14.00	1.00	3.35	ND	3.20	
	10	2.25	12.50	7.85	0.95	2.35	14.90	1.20	5.55	ND	5.35	
	12	2.30	7.40	13.25	3.80	2.45	5.60	1.10	1.30	ND	1.25	
	16	3.60	11.85	6.45	1.50	3.10	9.20	0.50	4.00	ND	4.40	
	18	4.00	12.40	2.85	ND	2.25	8.10	0.90	2.30	ND	3.30	
	20	3.85	10.90	3.30	ND	3.60	7.35	ND	2.80	ND	2.75	
	22	4.50	11.15	2.70	ND	3.15	6.10	0.65	2.60	ND	2.20	
	3A	0	3.80	4.55	10.95	ND	1.40	14.05	ND	1.35	ND	2.20
		2	4.00	12.40	9.05	ND	1.40	9.40	0.20	0.80	ND	1.55
4		5.00	8.10	7.80	ND	1.30	11.10	ND	0.80	ND	1.85	
6		5.50	10.95	9.10	ND	1.25	11.55	0.85	ND	ND	1.75	
10		6.00	9.20	9.50	1.10	1.50	11.50	0.70	0.85	ND	1.05	
12		2.30	9.10	6.65	ND	1.10	10.85	0.75	0.90	ND	0.95	
16		3.40	9.30	11.05	1.55	1.50	14.35	0.85	ND	ND	2.35	
18		5.00	7.15	10.10	3.15	3.75	16.55	0.65	ND	ND	1.55	
20		5.50	7.85	10.55	1.05	3.65	14.90	0.95	ND	ND	1.40	
22		4.80	12.95	58.95	ND	13.45	62.30	0.80	ND	ND	1.30	

Tabla... Contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) durante la maduración de anchoas elaboradas por la vía B (temporada 1988-89)

LOTE	SEMANAS	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN	
1B	4	4.50	7.20	9.25	ND	5.25	10.25	ND	4.35	ND	5.25	
	6	8.10	6.20	11.05	ND	6.20	16.40	ND	5.25	ND	6.50	
	8	12.00	11.05	20.35	ND	11.05	53.70	0.20	9.25	ND	6.77	
	10	14.25	11.30	53.90	ND	11.25	52.50	ND	7.40	ND	7.00	
	12	6.80	9.95	65.35	ND	9.94	16.30	ND	8.10	ND	6.60	
	0	3.00	1.70	ND	ND	0.50	0.65	ND	3.35	ND	2.40	
2B	2	2.00	12.65	8.25	2.65	2.80	11.40	0.20	2.15	ND	1.55	
	4	5.20	17.75	7.30	2.00	2.55	13.25	0.70	4.05	ND	3.15	
	6	8.50	16.25	6.65	1.95	2.80	14.45	ND	4.10	ND	2.25	
	8	10.20	17.15	8.20	ND	2.60	15.95	1.00	4.60	ND	0.95	
	10	8.10	25.70	10.05	1.90	3.40	16.75	1.25	3.75	ND	0.90	
	12	10.50	20.10	7.15	3.50	3.05	14.15	1.10	4.00	ND	1.05	
	16	12.25	10.25	9.90	ND	3.20	16.05	0.50	2.25	ND	0.95	
	18	12.50	11.75	11.35	2.75	3.70	17.80	0.90	4.05	ND	2.35	
	20	10.22	13.52	4.05	2.65	4.95	8.22	ND	1.25	ND	0.85	
	22	10.50	15.25	6.50	1.85	5.00	12.25	0.65	2.25	ND	2.00	
	3B	0	2.50	4.50	10.95	ND	1.40	14.06	ND	1.35	ND	2.20
		2	2.70	21.30	28.60	ND	6.40	29.55	0.15	2.85	ND	5.55
4		3.80	15.25	31.05	ND	9.10	32.50	ND	2.35	ND	6.45	
6		8.50	15.60	27.75	ND	4.10	32.30	0.85	2.50	ND	1.95	
10		6.55	21.10	36.45	ND	8.35	36.40	0.70	2.55	ND	2.55	
12		7.25	17.75	31.45	ND	14.00	34.40	0.75	2.40	ND	2.85	
16		8.00	14.95	27.90	ND	16.35	30.85	0.85	2.90	ND	3.35	
18		7.85	12.80	23.45	ND	19.40	24.60	0.60	1.25	ND	1.20	
20		12.25	22.70	36.20	ND	13.05	31.30	0.95	3.25	ND	2.20	
22		10.25	20.52	30.20	ND	16.15	37.25	0.80	2.35	ND	2.80	

Tabla... Contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) durante la maduración de anchoas elaboradas por la vía B (temporada 1988-89)

LOTE	SEMANAS	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
4B	2	2.60	7.85	13.65	0.75	1.45	18.85	ND	3.05	ND	2.30
	4	5.50	33.95	56.50	ND	13.50	52.302	0.50	3.10	ND	0.80
	6	8.25	42.45	54.05	1.15	13.05	55.75	3.15	4.25	ND	1.60
	8	7.50	32.45	45.10	3.52	8.20	34.30	0.85	3.10	ND	1.20
	10	7.25	40.70	50.20	ND	15.95	34.30	1.30	3.50	ND	1.05
	14	6.80	40.70	53.15	2.75	17.10	41.70	1.50	4.40	ND	2.50
	18	8.00	43.20	57.20	ND	18.90	46.70	1.45	5.10	ND	2.00
	20	9.10	45.30	54.95	2.45	17.40	46.70	1.50	4.35	ND	1.85
	22	10.50	44.75	55.80	1.30	18.50	52.85	2.40	5.50	ND	2.30
	5B	2	3.30	23.70	23.90	ND	3.90	15.15	0.35	2.95	ND
4		5.50	16.15	16.65	1.70	4.95	18.60	0.75	4.95	ND	4.90
6		6.20	17.60	26.30	ND	6.75	30.20	7.20	4.20	ND	ND
8		4.85	18.85	26.75	1.70	2.45	30.25	2.05	ND	ND	ND
10		7.25	9.85	26.05	ND	5.20	14.75	ND	ND	ND	ND
12		7.30	20.70	22.85	ND	3.65	27.65	ND	5.10	ND	3.35
14		8.30	15.15	20.60	ND	5.60	24.75	7.45	0.85	2.70	2.90
18		9.10	22.10	27.35	3.50	6.40	30.35	1.60	2.35	ND	3.25
20		6.25	20.25	26.90	ND	6.05	32.55	8.55	2.55	1.85	4.85
22		6.50	11.10	33.60	2.95	6.25	40.30	9.20	2.00	ND	3.05

Tabla.. contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) en muestras de boqueron empleado como materia prima en la elaboracion de la "Anxoxa de l'Escala" (n=13).

Nº	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESP M
1	2.35	11.95	4.20	1.10	1.00	4.95	ND	6.60	ND	5.85
2	5.70	12.20	8.95	0.55	3.00	19.65	0.30	10.55	ND	7.20
3	0.40	7.70	0.45	1.20	0.40	4.55	ND	4.65	ND	6.85
4	4.00	0.80	5.75	2.25	3.50	35.00	ND	12.65	ND	5.75
5	1.50	1.70	ND	ND	0.50	0.65	ND	3.35	ND	2.40
6	3.80	4.55	10.95	ND	1.40	10.05	ND	1.35	ND	2.2
7	0.40	7.70	0.45	1.20	0.45	4.55	ND	4.65	ND	6.85
8	6.10	7.00	2.85	ND	1.10	24.75	ND	10.70	ND	6.45
9	8.50	20.05	4.80	2.25	0.90	22.10	2.40	6.70	1.05	7.1
10	4.25	14.20	8.25	2.20	1.15	10.20	0.30	8.40	0.90	4.90
11	4.75	9.35	4.65	ND	ND	3.40	ND	7.25	0.35	4.90
12	3.00	1.70	ND	ND	0.50	0.65	ND	3.35	ND	2.40
13	2.50	4.50	10.95	ND	1.40	14.05	ND	1.35	ND	2.20
X	3.93	7.95	4.78	0.82	0.78	12.90	0.23	6.27	-	4.98
DE	2.32	5.64	4.18	0.90	0.48	11.09	0.66	3.74	-	2.08

En la figura 54 se muestran de modo gráfico los resultados obtenidos en las muestras tomadas a distintos tiempos durante la etapa de maduración para todas las aminas estudiadas excepto para aquellas que se detectaron en cantidades muy bajas, o no se detectaron en la mayoría de las muestras (β -feniletilamina y triptamina). Y en la tabla... se indican los contenidos medios de aminas biógenas determinados en muestras correspondiente a periodos de tiempo iguales y pertenecientes a los distintos lotes estudiados.

Figura 51 Evolución de los contenidos medios de putrescina, tiramina y cadaverina ($\mu\text{g/g}$) a lo largo de la elaboración de la "Anxova de l'Escala"

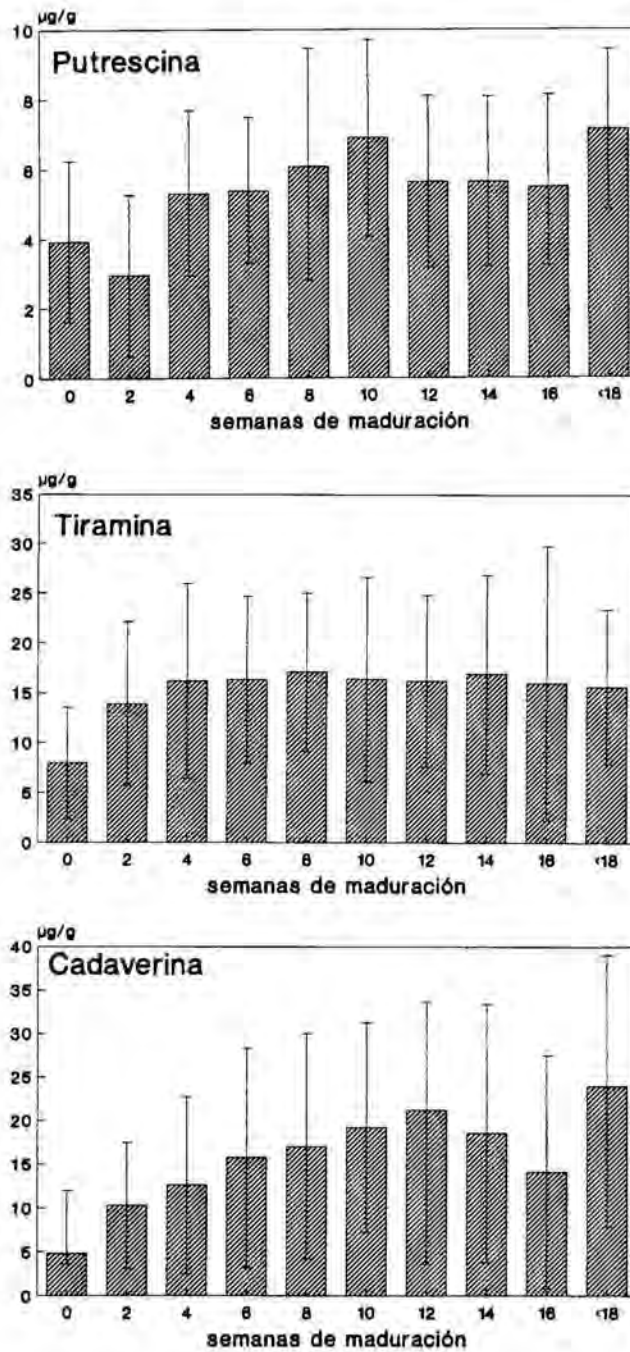


Figura 6. Evolución de los contenidos medios de serotonina, histamina y agmatina ($\mu\text{g/g}$) a lo largo de la elaboración de la "Anxova de l'Escala"

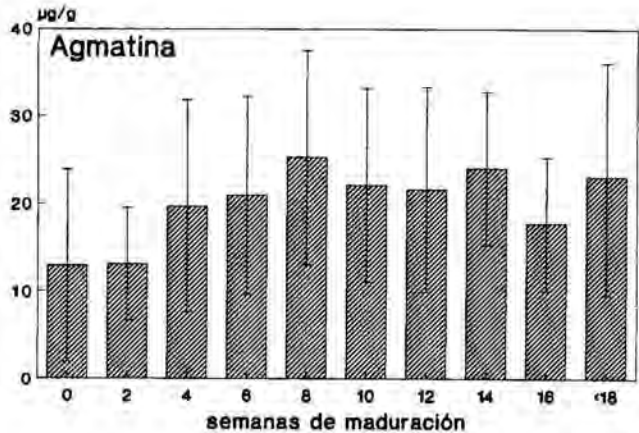
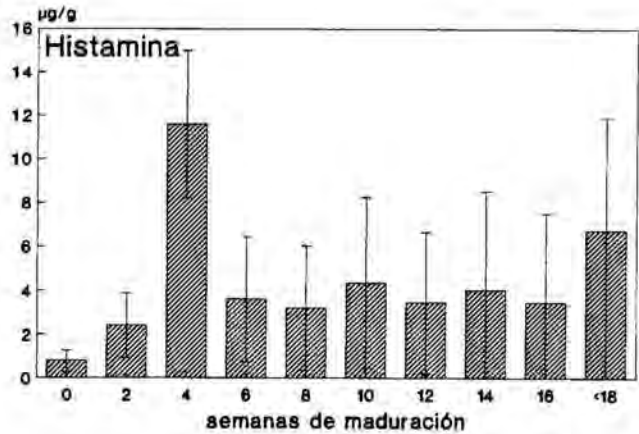
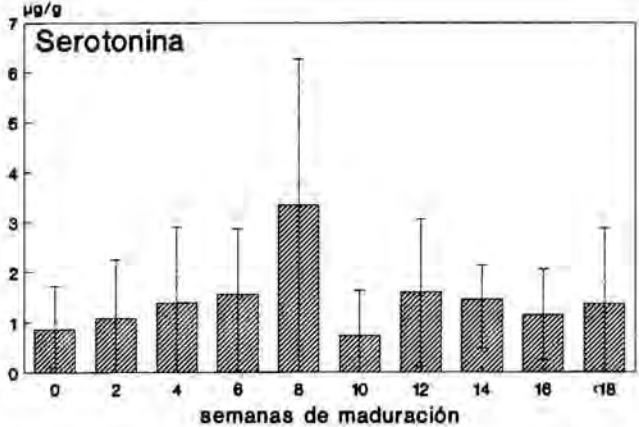


Figura 4. Evolución de los contenidos medios de β -feniletilamina, espermina y espermidina ($\mu\text{g/g}$) a lo largo de la elaboración de la "Anxova de l'Escala"

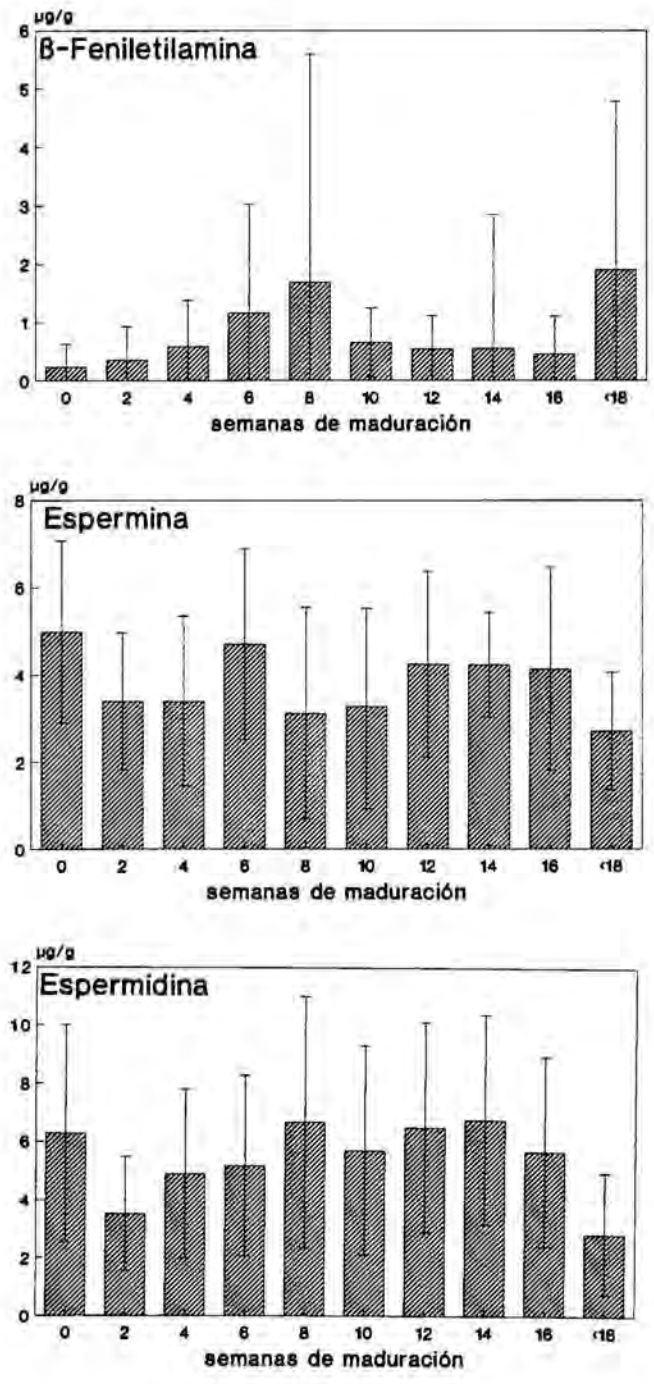


Tabla... Contenidos medios de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) a lo largo del periodo de maduración (semanas) de las "Anxoves de l'Escala".

TIEMPO	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPM
2 (n=12)	2.95 ± 2.23	13.90 ± 8.20	10.29 ± 4.18	1.08 ± 1.17	2.40 ± 1.48	13.08 ± 6.43	0.35 ± 0.54	3.25 ± 1.96	0.17 ± 0.38	3.39 ± 1.57
4 (n=15)	5.31 ± 2.38	16.2 ± 9.80	12.67 ± 10.2	1.39 ± 1.51	11.60 ± 3.40	19.72 ± 12.0	0.58 ± 0.80	4.90 ± 2.90	0.10 ± 0.07	3.40 ± 1.95
6 (n=16)	5.39 ± 2.11	16.31 ± 8.41	15.78 ± 12.6	1.35 ± 1.52	3.60 ± 3.6	20.96 ± 11.3	1.16 ± 1.87	5.18 ± 3.10	ND	4.70 ± 2.19
8 (n=13)	6.08 ± 3.33	17.07 ± 7.91	17.08 ± 12.1	3.34 ± 2.89	3.20 ± 2.86	25.26 ± 12.2	1.69 ± 3.91	6.68 ± 4.31	ND	3.12 ± 2.42
10 (n=15)	6.91 ± 5.63	16.39 ± 10.2	19.23 ± 11.9	0.73 ± 0.90	4.35 ± 3.91	22.09 ± 11.0	0.65 ± 0.60	5.71 ± 3.60	ND	3.27 ± 2.31
12 (n=16)	5.63 ± 2.47	16.20 ± 8.63	21.34 ± 19.1	1.59 ± 1.47	3.46 ± 3.21	21.60 ± 11.6	0.54 ± 0.47	6.51 ± 3.42	ND	4.25 ± 2.13
14 (n=11)	5.64 ± 2.47	16.92 ± 9.98	18.58 ± 14.7	1.44 ± 0.97	4.03 ± 4.50	24.04 ± 8.75	0.55 ± 2.30	6.77 ± 3.60	0.30 ± 0.8	4.23 ± 1.24
16 (n=13)	5.50 ± 2.64	16.00 ± 13.7	14.13 ± 13.3	1.15 ± 0.91	3.48 ± 4.05	17.87 ± 7.83	0.45 ± 0.65	5.68 ± 3.26	0.05 ± 0.18	4.13 ± 2.33
18-22 (n=18)	7.14 ± 2.29	15.63 ± 7.75	23.92 ± 16.0	1.36 ± 1.51	6.76 ± 5.11	23.04 ± 13.4	1.90 ± 2.88	2.85 ± 2.10	0.11 ± 0.04	2.71 ± 1.35

Del análisis de la tabla anterior puede deducirse que a pesar de la amplia variabilidad observada, los contenidos de aminas biógenas se mantienen relativamente estables, y muy semejantes a los contenidos medios determinados en la materia prima, a lo largo del periodo de maduración independientemente del tiempo transcurrido desde el inicio de esta etapa. Esta circunstancia se confirma cuando al comparar los contenidos medios de aminas biógenas correspondientes al boqueron fresco y a cada tiempo de maduración, no es posible demostrar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los casos. Para ello se ha empleado un análisis de la varianza no paramétrico (KRUSKAL-WALLIS) puesto que no en todos los casos se cumplían los supuestos de normalidad de las poblaciones y homogeneidad de la varianza, exigidos para aplicar un análisis de la varianza paramétrico. Para cada amina biógena se han estudiado la existencia de diferencias entre grupos, incluyendo las muestras correspondiente a la materia prima (10 grupos) o no considerandola. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla donde se indican los valores de H_{exp} obtenidos y su significación.

Tabla...Comparación estadística de los niveles de aminas biógenas a lo largo del proceso de elaboración de la "Anxova de l'Escala", incluyendo las muestras correspondiente a la materia prima (I) y excluyéndolas (II).

	I (GL=9)		II (GL=8)	
	H _{Exp}	p	H _{Exp}	p
PUTRESCINA	21.81	9.49x10 ⁻³ *	16.33	0.0378*
TIRAMINA	15.31	0.0826	1.87	0.9847
CADAVERINA	19.47	0.0215*	6.52	0.5883
SEROTONINA	4.75	0.8560	6.52	0.8995
HISTAMINA	26.94	1.43x10 ⁻³ *	11.74	0.1632
AGMATINA	18.52	0.0296*	12.21	0.1419
β-FENILETILAMINA	12.34	0.1946	5.65	0.6862
ESPERMIDINA	22.76	6.75x10 ⁻³ *	21.65	5.59x10 ⁻³ *
ESPERMINA	14.73	0.0985	9.50	0.3012

* Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$

No se ha efectuado la comparación de los niveles de **triptamina** entre la materia prima y muestras correspondientes a distintos periodos de maduración puesto que esta amina biógena solamente fue detectada en un 12.6% de las muestras analizadas alcanzándose en una de ellas un contenido de 2.7 µg/g, pero siendo inferior a 1µg/g en el resto de las muestras en que se detecto.

En los niveles de **Putrescina**, amina biógena presente en la materia prima con un contenido de 3.93 ± 2.32 µg/g, se observan diferencias estadísticamente significativas tanto si se consideran las muestras iniciales como si no. Sin embargo, se comprueba que estas diferencias no son significativas cuando solo se consideran las muestras tomadas durante la maduración correspondientes a periodos de tiempo superiores a 4 semanas ($H_{Exp}=6.58$, $GL=7$, $p=0.4731$).

En el caso de **Histamina** y **Agmatina** se observa un comportamiento similar, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos medios de muestras maduras durante periodos de tiempo distintos pero si se observan cuando en el análisis se incluyen las muestras correspondientes a la materia prima.

La **espermidina** presenta según los resultados del estudio un comportamiento atípico. Las diferencias observadas tanto en el análisis I como en el II vienen motivadas por las muestras correspondientes a un periodo de maduración de entre 18 y 22 semanas y que cuando se excluyen no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de materia prima y los demás grupos correspondientes a tiempos de maduración de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, y 16 semanas ($H^{Exp}=10.60$, $GL=8$, $p=0.2217$).

En el resto de las aminas biógenas estudiadas, **tiramina**, **cadaverina**, **serotonina**, **β -feniletilamina** y **espermina**, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras correspondientes a la materia prima y las tomadas a lo largo del proceso de maduración.

Los resultados de este estudio indican que en general los contenidos de aminas biógenas se mantienen estables a lo largo de la maduración de las anchoas. Si bien podría darse una ligera variación en el contenido de putrescina en la primera fase de este periodo sin embargo, los niveles alcanzados se estabilizan de la 4ª semana, cuando la flora causante del deterioro ha sido prácticamente neutralizada por el efecto bacteriostático del ClNa.

Tras comprobar que prácticamente no existían diferencias en los contenidos de aminas biógenas a lo largo del proceso de elaboración de la "Anxova de l'Escala" y puesto que conocíamos si las muestras pertenecientes a este estudio habían sido elaboradas por la vía A o por la vía alternativa B (Fig.), se planteó si parte de la variabilidad observada entre muestras elaboradas durante el mismo tiempo podría ser atribuible a la vía de elaboración empleada.

En la figura 62 se muestran en forma de nube de puntos los contenidos de aminas biógenas determinados en las muestras pertenecientes a los 17 lotes estudiados a lo largo del tiempo de maduración (con excepción de triptamina que sólo se detectó en un porcentaje muy bajo de muestras). Puede apreciarse, a pesar de la variabilidad anteriormente comentada, que en las muestras elaboradas por la vía B se observa cierta tendencia a presentar contenidos mayores de las aminas biógenas relacionadas con el deterioro. Para evaluar la magnitud de esta tendencia se compararon los contenidos medios de cada amina biógena, correspondientes a cada una de las dos vías de elaboración. Estos contenidos medios (excluidas las muestras correspondientes a las 2 semanas de maduración en el caso de la putrescina y las correspondientes a 18-22 en el caso de la espermidina) y la significación estadística de su diferencia de muestras en la tabla...

Tabla...Contenidos medios de aminas biogenas a lo largo de anchoas elaboradas por la vía A o B

	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β-FEN	ESPD	ESPM
AX ±DE	4.31 ±2.37	12.86 ±6.28	11.32 ±13.12	1.44 ±1.46	1.86 ±1.16	16.35 ±9.56	0.92 ±2.15	4.60 ±3.32	3.42 ±1.66
BX ±DE	6.61 ±2.95	18.27 ±8.87	21.17 15.10	1.15 ±1.08	5.52 ±4.66	24.04 ±18.95	1.05 1.84	5.73 ±3.32	3.69 ±3.25
Z	4.68	3.79	3.82	1.29	5.52	3.89	0.36	1.89	0.74
p	7.0x10 ⁻⁶	2.2x10 ⁻⁴	2.0x10 ⁻⁴	0.19	2.2x10 ⁻⁷	1.5x10 ⁻⁴	0.71	0.06	0.45

Se observa que para las aminas biogenas **espermina** y **espermidina**, consideradas fisiologicas, no se aprecian diferencias estadisticamente significativas en cuanto a su contenido en muestras de anchoa maduradas por la vía A o B ($p=0.45$ para espermina y $p=0.06$ para espermidina). Tampoco es posible establecer diferencias en el caso de la **serotonina** ($p=0.19$) ni para la **β-feniletilamina** ($p=0.71$). Sin embargo, para el resto de las aminas biogenas se confirma que los contenidos medios en la via de alaboración A resultan inferiores a los de la via B con una significación siempre inferior a 0.001

Debe destacarse el hecho de que a pesar de que en ningún caso se alcanzan contenidos de aminas biógenas cercanos a los del pescado no apto para el consumo humano, se observa que el contenido de algunas aminas biógenas es superior en las anchoas elaboradas por la vía alternativa B. El hecho de que no se observen diferencias en espermina, esperdina y serotonina, aminas biogenas cuyos contenidos no se modificaban en el periodo de almacenamiento, descomposición del boquerón (apartado 8.1), ni en el caso de la β-fenilatilamina que sólo se modificaba tras periodos de almacenamiento muy largos, pero que si se observen diferencias en el resto de las aminas que aumentaban de modo condiderable en este proceso, induce a pensar que en las anchoas eledoradas por la via B el efecto estabilizador en cuanto a la formación de las aminas biógenas que presenta la salazón seria un poco menos eficaz y las aminas biogenas que se puedan formar en la fase inicial permanecen luego a lo largo de la maduración y en el producto final. Estas diferencias podrian ser explicadas teniendo en cuenta que puesto que el boquerón es una especie con elevada actividad proteolítica intestinal (FILSILGER y col., 1984; MARTINEZ y GILBERT, 1988) el iniciar la maduración en presencia de las visceras podria acelerarse la proteolisis de modo que la disposición de presursores fuera mayor y los microorganismos responsables del deterioro, todavía no neutralizados por el efecto de la sal, podrian formar aminas biógenas con mayor facilidad.

STEDE y STOECKMER (1981) citan que es necesario prestar mayor atención respecto al contenido de aminas biógenas en aquellos salazones elaborados sin eliminar las vísceras como los arenques pequeños salados y conocidos con el nombre de espadines

Figura63 Contenidos de serotonina, histamina y agmatina en muestras correspondientes a la etapa de maduración, elaboradas por la vía A (o) y por la vía B (x).

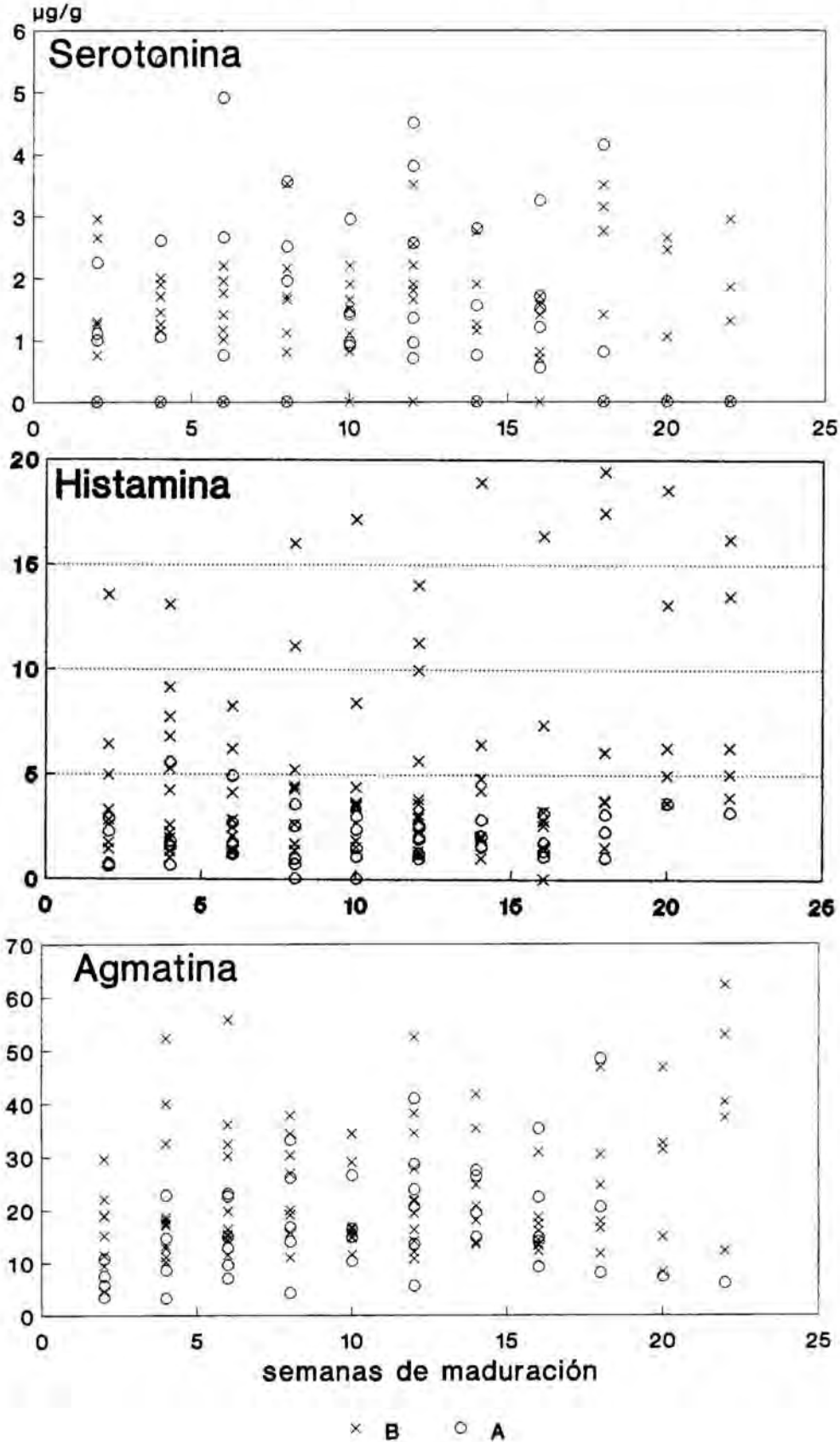
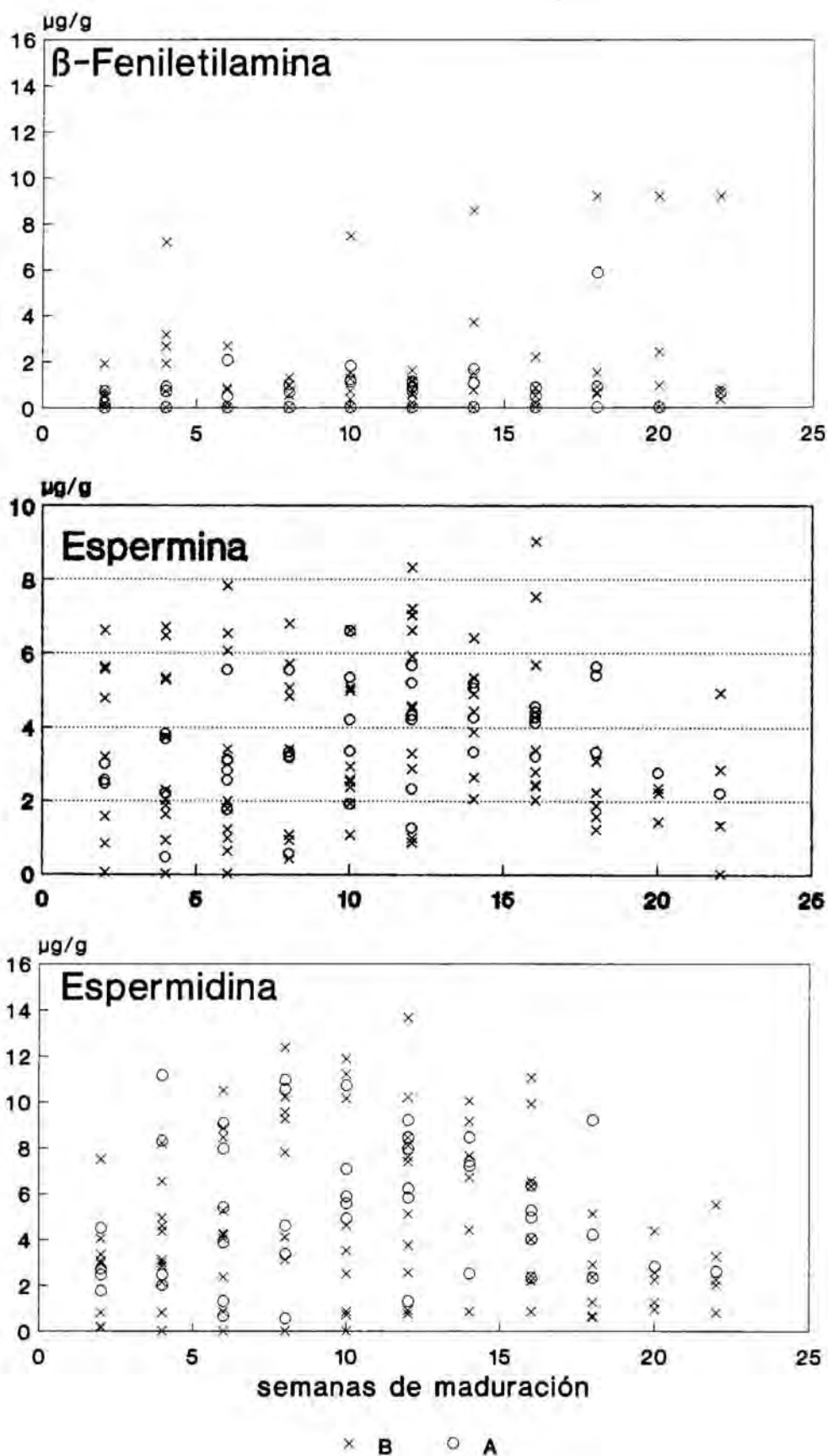


Figura 64 Contenidos de β -feniletilamina, espermina y espermidina en muestras correspondientes a la etapa de maduración, elaboradas por la vía A (o) y por la vía B (x)



10.2.3 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS Y LOS RECUEENTOS MICROBIOLOGICOS A LO LARGO DE LA ELABORACION DE LA "ANXOVA DE L'ESCALA"

En las muestras pertenecientes a los 9 lotes de anchoas de la Escala elaboradas en la temporada 1989-1990 los profesores de Unidad de higiene e Inspección de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria (UAB) efectuaron los recuentos microbiologicos correspondientes a:

- Flora mesófila aerobia total
- Flora psicrotrofa total
- microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.
- Flora coliforme fecal
- Flora esporulada anaerobia sulfito-reductora

Posteriormente se aislaron e identificaron los microorganismos constituyente de esta flora y se evaluó su capacidad para producir histamina.

En la tabla ... se indican los recuentos de microorganismos correspondientes a las muestras de materia prima y los recuentos medios correspondientes a las muestras tomadas durante la etapa de maduración en los lotes elaborados por la vía A o por la alternativa B.

Tabla ... recuentos de microorganismos en la materia prima y en muestras tomadas en la etapa de maduración de anchoas de la escala.

	MATERIA PRIMA	MADURACION A	MADURACION B
MESOFILOS	3.71±0.82	2.23±0.27	2.32±0.51
PSICROTROFOS	4.55±0.88	2.30±0.40	2.53±0.45
ENTEROBACTERIAS	2.71±1.27	***	***
COLIFORMES	2.36±0.98	***	***
SULFITO-REDUCTORES	0.51±0.97	0.33±0.27	0.26±0.37

*** Enterobacterias y coliformes solo se detectaron en algunas muestras y en niveles, que salvo excepciones resultaban inferiores a 0.5 U.L.

En la tabla. se aprecia que el perfil de la flora bacteriana correspondiente a las muestras de materia prima (boquerón fresco) dominan los microorganismos psicotróficos sobre los mesófilos. A los perteneciente al la familia *Enterobacteriaceae* y los coliformes fecales corresponden recuentos medios de 2.71 U.L. y 2.36 U.L. , respectivamente. Teniendo en cuenta que estos microorganismos no se consideran componentes de la flora habitual del pescado y que resultan muy sensibles a las condiciones ambientales del medio acuático marino, su presencia podría implicar contaminaciones post-captura (RODRIGUEZ-JEREZ, 1991).

Aunque las características microbiológicas del pescado fresco quedan aún por especificar en la legislación española reciente (REAL DECRETO 1437/92), si se toman como referencia las cifras sugeridas por PASCUAL ANDERSON (1990), los recuentos de microorganismos obtenidos en estas muestras quedarían cerca del límite. Así, las 4.55 U.L. correspondientes al recuento de microorganismos psicotrofos son muy semejantes al límite de 5 U.L. propuesto por el citado autor para pescado fresco o refrigerado.

Comparando la materia prima empleada en la elaboración del boquerón con la empleada en la elaboración de conservas de atún (apartado 10.1) se observa que los recuentos microbiológicos resultan superiores en el caso del boqueron. Esta circunstancia es fácilmente explicable puesto que el boqueron, especie de menor tamaño, se deteriora con mayor facilidad y además las condiciones de conservación desde el momento de la captura hasta la toma de muestras fueren más favorables para el desarrollo de microorganismos. Recordemos que el atún era congelado en alta mar y este proceso contribuye a la reducción de la flora bacteriana.

La no baja calidad microbiología de las muestras de boquerón empleadas como materia prima en la elaboración de anchoas podría justificar el hecho de que los contenidos de aminos biógenas determinados en estas muestras resultaran algo elevados para muestras de pescado fresco.

Los recuentos microbiológicos correspondientes a las muestras tomadas durante la maduración diferían estadísticamente de los correspondientes a las muestras de materia prima, pudiendo apreciarse una disminución de los recuentos, atribuible al efecto de la salmuera. Los microorganismos pertenecientes a la familia de las enterobacterias y los coliformes fecales parecen resultar especialmente sensible a las condiciones de maduración ya que su presencia en las muestras tomadas durante esta etapa resulta despreciable.

En las muestras correspondientes a períodos de maduración de distinta duración, no se observaban diferencias en cuanto a los recuentos de microorganismos; tras el descenso atribuible al efecto del ClNa se mantenían constantes. Esta circunstancia estaría en consonancia con la evolución de los contenidos de aminos biógenas anteriormente comentada, donde si bien se partía de contenidos altos (aunque dentro del intervalo de valores descritos en la bibliografía para pescado fresco) y se podía observar en aminos biógenas como histamina, putrescina, cadaverina o agmatina, un cierto incremento entre los niveles contabilizados en materia prima y en las muestras en salmuera; estas cifras se mantenían estables a lo largo de todo el período de maduración hasta el envasado final.

En cuanto a la identidad de los microorganismos aislados durante la etapa de maduración, la especie más frecuentemente aislada resultó *Clostridium spp.* con un total de 52 cepas (24.64% del total), seguida de *Proteus morganii* con 46 cepas (21.81%), *Enterobacter cloacae* 34 cepas (16.11%) y *Klebsiella oxitoca* con 20 cepas (9.48%). El resto de las cepas aisladas no superaron en ningún caso el 5% del total.

Mientras que las cepas pertenecientes al género *Clostridium* no presentaron capacidad de formar histamina, sí la presentaron todas las cepas de *P. morganii* el 50% de las cepas de *Enterobacter cloacae* y todas las pertenecientes a la especie *Klebsiella oxitoca*.

Podría pensarse en la existencia del riesgo de formación de esta amina durante el proceso de maduración (durante esta etapa se aislaron e identificaron microorganismos con capacidad formadora de esta amina) cuando el control ejercido por el efecto del cloruro sódico sobre el crecimiento de microorganismos no resulta eficaz. Sin embargo, la formación de aminas biogénas no tiene porque ser inherente en el proceso de elaboración de las anchoas ya que en ninguno de los procesos de elaboración estudiados, donde en todos los casos se observa el efecto reductor que le cloruro sódico ejerce sobre la carga microbiana, se observó una formación importante ni de histamina ni de otras aminas biógenas.

10.2.4 EVOLUCION DEL ATP Y SUS COMPUESTOS DE DEGRADACION A LO LARGO DEL PROCESO DE ELABORACION DE LA "ANXOVA DE L'ESCALA".

En el proceso de elaboración de las anchoas se verifican una serie de transformaciones bioquímicas que implican modificaciones en la fracción nitrogenada soluble del pescado, por ello y como complemento al estudio de la evolución de los contenidos de aminas biógenas y de los recuentos microbiológicos se determinó en contenido de los derivados del ATP en muestras de boquerón empleado como materia prima y en 4 de los lotes de elaboración de anchoas de la escala.

En la tabla ... se indican los resultados obtenidos en las 8 muestras correspondiente a la materia prima.

El ATP no fue detectado en ninguna muestras y los contenidos de ADP y AMP resultaron siempre muy bajos, inferiores a $1 \mu\text{g/g}$. Aunque esta circunstancia podría en cierto modo considerarse normal, puesto que no es frecuente obtener valores altos de estos tres metabolitos en muestras de pescado sacrificadas en la captura, si resultan inusualmente bajos los niveles de IMP 0.84 ± 0.90 , metabolito que generalmente resulta mayoritario en el pescado fresco.

La inosina resultó el metabolito mayoritario, circunstancia acorde con el carácter de especie formadora de Inosina que se puede atribuir al boquerón. Los contenidos de Hx no superan a los de Inosina por lo que con el cálculo de la relación Ino/Hx se encuentran valores siempre superiores a 1 de modo que todas las muestras resultarían aceptables según este criterio.

Si se calcula el cociente $\text{IMP}/(\text{IMP}+\text{Ino}+\text{Hx})$ más de la mitad de las muestras resultarían aceptables mientras que con el cálculo del índice K deberían rechazarse todas.

Por tanto puede observarse como, también desde el punto de vistas de los contenidos de los metabolitos del ATP se clasificaría a las muestras empleadas como materia prima, de "no muy frescas", tal como sucedía tras el análisis de los resultados obtenidos respecto al contenido de aminas biógenas y de los recuentos microbiológicos. Esta valoración negativa se ve acentuada cuando se emplean índices basados en la secuencia de degradación del ATP, que como el índice K tienen en cuenta también los metabolitos iniciales de la secuencia, de nuevo se repite la no coincidencia de los resultados obtenidos con este tipo de criterios y los basados en el contenido de aminas biógenas y los recuentos microbiológicos.

La comparación de los contenidos de IMP, inosina e hipoxantina en estas muestras con los contenidos de estos tres metabolitos en las muestras de atún congelado empleado como materia prima en la elaboración de conservas, ponen de manifiesto el estado más avanzado de la secuencia degradativa del ATP en que se encuentran las muestras de boquerón.

Los contenidos de ATP y sus compuestos de degradación obtenidos en las muestras pertenecientes a los 4 lotes objeto de estudio se muestran en las tablas.. donde se especifica también el tiempo de maduración, las muestras con tiempo igual a 0 corresponden al boquerón fresco.

En las ... anteriores se observa que al igual como sucedía en las muestras correspondientes a la materia prima el metabolito mayoritario continua siendo la inosina. Muy al contrario de lo que sucedía en el ensayo de almacenamiento/ descomposición del boquerón donde se veía favorecido el crecimiento de microorganismos responsables del deterioro del pescado y se verificaba una rápida transformación de este metabolito en hipoxantina atribuible a la actividad bacteriana. En las muestras correspondientes a la maduración el efecto bacteriostático del ClNa parece traducirse en el mantenimiento de la Inosina como metabolito mayoritario ya que en condiciones desfavorables para el crecimiento de microorganismos su transformación en hipoxantina resulta muy lenta debido a la baja actividad enzimática capaz de catalizar esta transformación que poseen las especies, que como el boquerón, se consideran formadores de inosina.

En la tabla... se indican los contenidos medios de los tres metabolitos mayoritarios y sus desviaciones estandar en los grupos correspondientes a muestras maduras periodos de tiempo distintos y se representan en la figura

Al igual que en el estudio de los contenidos de aminas biogenas, aunque en este caso se dispusiera de un numero de muestras inferior, se planteó un análisis de la varianza no paramétrico (KRUKALL-WALLIS) para determinar si existian diferencias estadisticamente significativas entre los contenidos medios de muestras de materia prima y muestras pertenecientes a grupos correspondientes distintos tiempos de maduración. Este estudio se ha efectuado con los datos correspondientes a los tres metabolitos mayoritarios, IMP, inosina e hipoxantina. Y los datos obtenidos se muestran en la tabla... donde se indentifica como ensayo I la comparacion efectuada considerando el grupo de muestras pertenecientes a la materia prima y como ensayo II efectuada excluyéndolas.

Tabla.. Contenido de ATP y de sus compuestos de degradación ($\mu\text{Mol/g}$) durante la maduración de "Anxova de l'Escala" elaborados por la vía A (temporada 1989-90).

LOTE	SEMANAS	ATP	ADP	AMP	IMP	Hx	Ino
1A	0	ND	0.20	0.10	0.15	2.05	3.30
	2	ND	0.10	0.10	0.10	1.20	2.95
	6	ND	ND	0.10	0.10	0.80	3.20
	8	ND	ND	ND	-	0.95	1.75
	10	ND	0.20	0.15	0.20	2.80	-
	12	ND	0.15	0.10	0.10	2.10	5.00
	14	ND	0.10	0.10	0.15	1.95	2.60
	16	ND	0.10	0.10	0.10	2.00	2.85
2A	0	ND	0.05	0.10	0.25	1.50	-
	2	ND	ND	0.05	0.05	0.55	3.55
	6	ND	0.15	0.20	0.10	1.65	3.10
	10	ND	ND	0.05	0.10	0.55	4.10
	12	ND	0.30	0.10	0.20	2.75	4.15
	14	ND	ND	0.10	0.15	1.40	4.15
	16	ND	0.10	0.05	0.10	2.00	2.65
	18	ND	ND	0.05	0.05	0.55	-

Tabla.. Contenido de ATP y de sus compuestos de degradación ($\mu\text{Mol/g}$) durante la maduración de "Anxova de l'Escala" elaborados por la vía B (temporada 1989-90).

LOTE	SEMANAS	ATP	ADP	AMP	IMP	Hx	Ino
1B	0	ND	0.05	0.20	2.35	1.80	3.40
	2	ND	0.10	0.15	0.15	1.65	3.40
	4	ND	0.05	0.15	0.15	1.30	3.50
	8	ND	0.15	0.15	0.10	2.00	2.92
	10	ND	0.15	0.15	0.10	2.50	3.40
	12	ND	0.10	0.20	0.20	4.45	-
	14	ND	0.10	0.05	0.15	3.60	-
	16	ND	0.10	0.10	0.10	2.30	3.20
2B	0	ND	0.01	0.05	1.40	1.00	-
	4	ND	0.05	0.10	0.05	1.60	-
	6	ND	0.15	0.15	0.15	2.15	2.75
	8	ND	ND	0.30	0.10	1.20	3.15
	10	ND	0.05	0.30	0.05	1.95	2.95
	12	ND	ND	0.30	0.15	1.55	4.10
	14	ND	0.30	0.30	0.20	2.90	4.45
	16	ND	0.20	0.30	0.15	3.00	4.15

Tabla... Contenidos medios de IMP, inosina e hipoxantina ($\mu\text{g/g}$) a lo largo de la maduración de la "Anxova de l'Escala"

TIEMPO -	2	4	6	8	10	12	14	16-18
IMP	0.10 ± 0.05 (n=3)	0.10 ± 0.07 (n=2)	0.12 ± 0.03 (n=3)	0.10 ± 0.01 (n=2)	0.11 ± 0.06 (n=4)	0.16 ± 0.05 (n=4)	0.16 ± 0.02 (n=4)	0.11 ± 0.02 (n=4)
INO	1.13 ± 0.55 (n=3)	1.45 ± 0.21 (n=2)	1.53 ± 0.68 (n=3)	1.38 ± 0.55 (n=3)	0.99 ± 0.99 (n=4)	2.71 ± 1.25 (n=4)	2.58 ± 1.05 (n=4)	2.32 ± 0.45 (n=4)
HX	3.30 ± 0.31 (n=3)	3.50 - (n=1)	3.01 ± 0.23 (n=3)	2.60 ± 0.74 (n=3)	3.41 ± 0.67 (n=3)	4.41 ± 0.50 (n=3)	3.73 ± 0.99 (n=3)	3.21 ± 0.66 (n=4)

Tabla.. Comparación estadística de los niveles de IMP, inosina e hipoxantina a lo largo del proceso de elaboración de la "Anxova de l'Escala", incluyendo las muestras correspondientes a la materia prima (I), y excluyéndolas (II)

	I (GL=8)		II (GL=7)	
	H_{Exp}	p	H^{Exp}	p
IMP	15.52	0.052	7.58	0.3710
INOSINA	12.94	0.073	6.62	0.0392
HIPOXANTINA	10.88	0.208		

Se observa que en ningún caso aparecen diferencias estadísticamente significativas (p siempre resulta superior a 0.05) en los contenidos de estos tres compuestos, ni entre las muestras pertenecientes a periodos de maduración de distinta duración (II), ni cuando se incluyen en la comparación las muestras correspondientes a la materia prima (I). Podemos por lo tanto considerar que los contenidos de estos tres compuestos mayoritarios se mantienen estables durante el proceso de elaboración de las anchoas, podrían por lo tanto ser útiles como indicadores de la calidad de la materia prima empleada en este proceso.

CHIOU y KONOSU, (1988), CHIOU y col., (1989) y Oh y col., (1989) citan que el contenido total de de ATP y derivados de la materia prima, aunque sufra modificaciones en su perfil de composición, se mantiene constante a lo largo de aquellos procesos de elaboración que como el de la elaboración de las anchoas no implican tratamiento térmico. Para ello se calculó el valor correspondiente a la suma total de nucleótidos en las muestras de boquerón fresco y de las muestras correspondientes a cada tiempo de maduración. Tras aplicar un análisis de la varianza no paramétrico, se comprobó que efectivamente tampoco en este caso aparecían diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos medios de las sumas de nucleótidos correspondientes a cada una de estos grupos ($H_{Exp}=7.30$, $GL=7$, $P=0.3975$).

Figura.65 Contenidos medios de IMP, Inosina e Hipoxantina durante la elaboración de la "Anxova de l'Escala".

11. **EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS A LO LARGO DEL PERIODO DE VIDA COMERCIAL DE LA "ANXOVA DE L'ESCALA".**

El producto final obtenido en el proceso de elaboración de las anchoas por su carácter se semiconserva presenta una durabilidad limitada. A diferencia de las conservas, se trata de un producto que en ningún momento es sometido a tratamiento térmico que garantice su esterilidad y la inactivación de enzimas. Las transformaciones bioquímicas que continúan en el producto acabado justifican la modificación de las características organolépticas a lo largo del tiempo que culminan tras períodos de almacenamiento muy prolongados en un producto desagradable y totalmente licuado. De hecho como para todas las semiconservas se establece una fecha de consumo preferente que es de 6 meses para las anchoas limpias en aceite y de un año para las salmueradas y además se recomienda su almacenamiento en condiciones de refrigeración.

Puesto que en el proceso de elaboración de las anchoas no se observaba una formación importante de aminas biógenas, dado su carácter de semiconserva, se estudió el perfil de evolución en el producto final, con el fin de dilucidar si durante su período de vida comercial se formaban cantidades importantes de estos compuestos.

En un ensayo previo realizado en nuestro laboratorio se observó la formación de tiramina en muestras de anchoas limpias en aceite mantenidas durante 8 meses a temperatura ambiente (VECIANA-NOGUES y col, 1988). KARNOPP y col. (1988) también describen la formación de importantes cantidades de aminas biógenas, histamina concretamente, durante el almacenamiento de anchoas a 20°C. En ambos ensayos el mantenimiento de las muestras en condiciones de refrigeración fue suficiente para evitar la formación de estos compuestos.

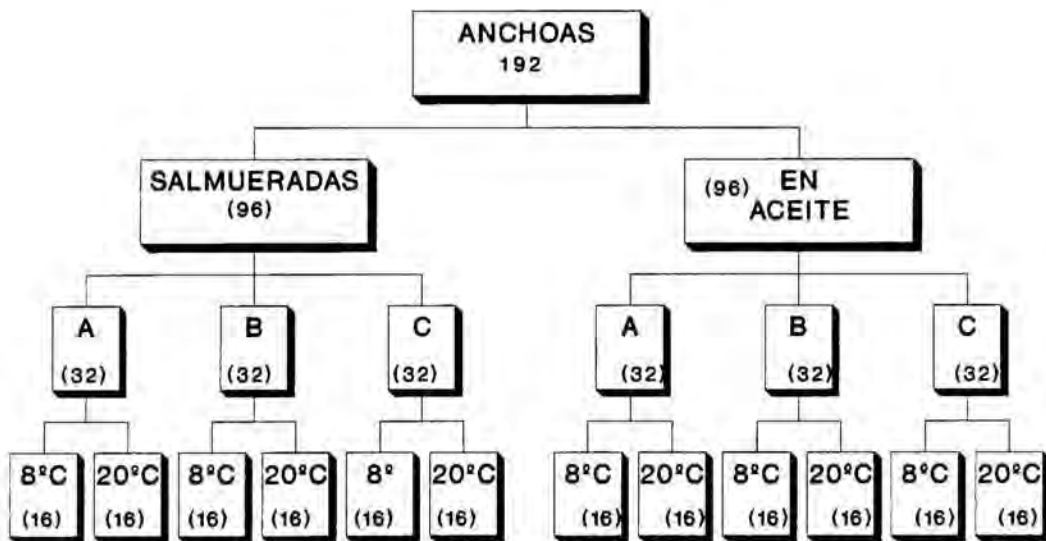
En este trabajo se planteó el estudio de la evolución de los contenidos de las 10 aminas biógenas que permitía resolver nuestro método analítico en muestras de "Anxova de la Escala" perteneciente a las dos presentaciones comerciales establecidas: anchoas salmueradas y anchoas limpias en aceite.

Para cada presentación se adquirieron 32 muestras pertenecientes al mismo lote de fabricación en cada uno de los tres productores mayoritarios de los 6 acogidos bajo la Denominación Genérica de Calidad.

Una vez en el laboratorio los botes se repartieron en dos grupos uno que se mantuvo a 8°C y otro a 20°C, durante un periodo de tiempo de 8 meses en el caso de las muestras correspondientes a la presentación en aceite y de 14 meses en las salmueradas. Tras en análisis inicial de las muestras de las tres marcas en sus dos presentaciones se efectuaron análisis bimensuales hasta el final del periodo de estudio. En cada punto de muestreo se abrían dos botes de anchoa elegidos al azar de entre los pertenecientes a cada lote de estudio, se mezclaban y de procedía a la determinación del contenido en aminos biógenos.

En la figura ... se muestras de un modo gráfico la organización del muestreo de este ensayo de durabilidad. Se indican las características de cada grupo de muestras así como la temperatura a que se mantuvieron en el laboratorio. La cifra entre paréntesis se refiere al número de muestras que constituían cada grupo de estudio.

Figura 66. Muestras objeto de estudio en el ensayo de durabilidad de "Anxoves de l'Escala" pertenecientes a las marcas comerciales A, B y B.



11.2 EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS A LO LARGO DEL PERIODO DE VIDA COMERCIAL DE ANCHOAS SALMUERADAS

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en las tablas... a ..., donde se presenten los contenidos de cada amina biógenas en las anchoas de las tres marcas comerciales analizadas a cada una de las temperaturas de ensayo.

Dada la amplia variabilidad de contenidos observada en las muestras de anchoa (apartado 10.2) solamente se ha considerado que existe una formación de aminas biógenas durante la etapa de almacenamiento, en aquellos casos en que las variaciones observadas a lo largo de este periodo resultaban superiores a las de la materia prima y de las muestras de tomadas durante la etapa de maduración, y cuando los que los niveles alcanzados superaban a los establecidos para la citadas muestras.

En la tabla ... se indica de modo semicuantitativo los casos en que se ha considerado que existe formación de aminas biógenas. Se puede observar que en todas las muestras mantenidas a temperatura en refrigeración, tal como se indica en el envase del producto, no se ha aprecia formación importante de aminas biógenas en ninguna de las tres marcas comerciales estudiadas a lo largo de todo el periodo de estudio, que superó en tres meses la fecha de consumo preferente.

Tabla.. formación de aminas biogenas en muestras de anchoas envasadas en sal y mantenidas a 8°C y 20°C durante 18 meses.

	8°C			20°C		
	A	B	C	A	B	C
PUT	-	-	-	-	-	-
TIR	-	-	-	-	-	-
CAD	-	-	-	-	-	-
SER	-	-	-	-	-	-
HIS	-	+	-	-	+++	-
AGM	-	-	-	-	-	-
β-FEN	-	-	-	-	++	-
ESPD	-	-	-	-	-	-
TRIP	-	-	-	-	++++	-
INA	-	-	-	-	-	-

- no formación + hasta 50µg/g ++ hasta 100µg/g ++++ 500-1000µg/g

tabla...Contenidos Cadaverina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	11.60	11.60	13.25	13.25	25.25	25.25
2	18.65	13.80	17.30	22.85	29.15	32.40
4	25.05	11.35	20.65	23.25	20.35	10.45
6	26.10	28.40	18.90	20.30	21.30	8.95
8	18.10	19.15	20.00	22.05	30.50	8.20
10	20.80	24.45	15.20	13.55	18.58	12.75
12	27.00	20.05	26.60	23.65	29.75	28.60
14	30.30	20.75	25.25	24.12	27.65	20.95

tabla...Contenidos Tiramina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	15.45	15.45	14.55	14.55	27.25	27.25
2	6.60	21.10	15.40	16.20	30.80	24.85
4	9.20	14.20	14.00	16.90	21.85	22.95
6	10.75	29.70	20.60	24.45	15.65	21.95
8	13.40	24.25	14.00	16.85	18.30	20.20
10	9.05	28.10	12.30	18.58	15.95	18.90
12	9.05	25.49	19.00	18.75	14.65	32.45
14	9015	24.50	20.25	25.27	16.55	25.54

tabla...Contenidos Putrescina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	4.65	4.65	2.10	2.10	6.75	6.75
2	7.20	6.55	2.75	4.95	8.80	4.35
4	9.20	4.20	4.25	5.15	5.70	1.25
6	8.80	9.40	3.80	5.05	6.95	2.15
8	6.10	7.60	4.25	6.20	9.75	2.60
10	6.15	8.90	2.95	6.20	6.55	3.95
12	10.15	8.00	6.05	6.75	8.95	6.80
14	9.85	7.65	5.25	6.70	8.45	6.75

tabla...Contenidos Serotonina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	0.15	0.15	0.10	0.10	0.20	0.20
2	0.20	0.35	ND	4.85	0.30	0.70
4	0.10	0.10	ND	1.95	0.10	1.15
6	ND	ND	0.25	1.95	ND	1.00
8	0.30	0.15	ND	0.75	0.40	1.20
10	0.35	0.10	ND	0.95	0.45	0.50
12	0.10	ND	0.60	2.10	0.40	0.70
14	0.10	0.140	0.25	0.30	2.50	0.65

tabla...Contenidos Histamina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	ND	ND	1.35	1.35	0.85	0.85
2	3.10	0.15	3.55	1.35	1.85	1.05
4	1.45	0.40	2.90	2.30	1.25	0.95
6	1.15	2.95	0.75	3.15	1.70	1.65
8	0.50	0.45	2.65	19.50	0.55	3.30
10	1.20	0.70	2.85	29.85	2.35	1.80
12	1.20	0.55	4.40	198.25	3.35	3.20
14	1.30	0.15	3.25	360.60	3.00	2.65

tabla...Contenidos Agmatina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	20.85	20.85	21.90	21.90	32.60	32.60
2	28.75	25.54	28.70	31.55	38.00	23.90
4	26.75	22.75	31.30	32.85	28.55	17.05
6	32.30	28.80	26.20	25.20	26.70	15.85
8	27.30	31.15	33.30	41.95	39.72	14.75
10	27.00	30.00	26.75	35.35	26.00	18.76
12	38.85	32.45	37.70	43.85	36.85	16.10
14	41.85	27.00	32.55	46.05	36.15	15.89

tabla...Contenidos β -feniletilamina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	0.70	ND	ND	0.70	ND
4	ND	ND	ND	0.15	0.15	ND
6	ND	0.45	ND	ND	1.10	ND
8	ND	ND	ND	3.05	0.10	ND
10	ND	0.45	ND	5.35	ND	ND
12	ND	ND	0.30	14.10	ND	0.55
14	0.65	0.35	ND	24.70	0.30	0.60

tabla...Contenidos Triptamina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	0.50	ND	0.90	ND
4	ND	ND	0.30	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	3.60	ND	ND
8	ND	ND	0.35	48.85	ND	ND
10	ND	ND	0.75	137.70	0.55	ND
12	ND	ND	0.50	481.20	0.10	ND
14	ND	ND	ND	634.50	ND	ND

tabla...Contenidos Espermidina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	1.59	1.59	0.70	0.70	0.95	0.95
2	1.50	1.55	3.00	1.7.	3.00	1.22
4	1.25	1.25	4.77	3.20	1.30	1.50
6	1.45	1.55	1.75	1.80	1.65	1.75
8	1.45	1.35	4.00	3.80	1.10	1.97
10	1.12	1.33	2.95	4.20	1.20	1.05
12	1.75	1.91	4.10	4.45	1.70	1.95
14	1.75	1.54	4.00	4.65	1.47	1.95

tabla...Contenidos Espermina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en sal, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	7.50	7.50	8.55	8.55	8.95	8.95
2	8.00	9.60	9.85	9.15	8.45	6.10
4	9.40	8.70	10.60	9.40	8.20	7.40
6	9.15	5.20	7.85	9.50	8.20	7.15
8	10.30	8.15	10.35	10.00	8.60	7.30
10	8.25	7.65	8.95	9.60	9.15	7.55
12	8.90	7.75	11.15	8.90	9.20	8.55
14	8.70	7.50	9.85	9.50	8.20	8.35

Espermina y espermidina, aminas consideradas fisiológicas que siempre se detectan en pescado fresco y no parecen sufrir modificaciones importantes durante el deterioro del pescado, tampoco varían a lo largo del almacenamiento de las semiconservas de anchoas ni en las muestras mantenidas a 8°C ni en las mantenidas a 20°C.

Los contenidos de **putrescina, tiramina, y cadaverina** se mantuvieron semejantes en todo momento a los detectados anteriormente durante la etapa de maduración de las anchoas.

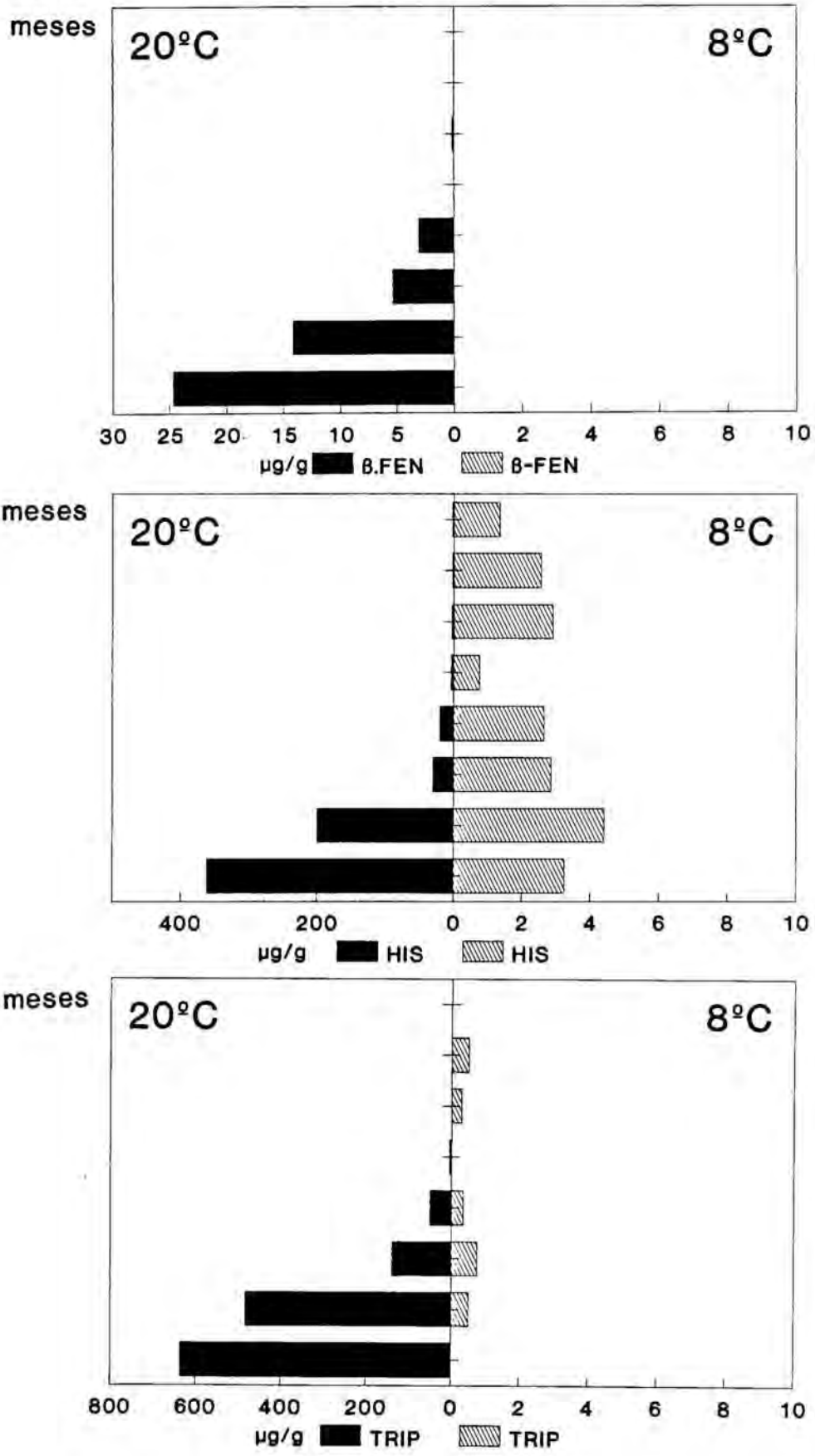
Los contenidos de **histamina, serotonina, β-feniletilamina y triptamina** fueron muy bajos en todas las muestras de este estudio mantenidas en condiciones de refrigeración no superando en ningún caso la cifra de 5 μg/g. Sin embargo, las muestras mantenidas a 20°C, una de las tres marcas comerciales estudiadas presentó un comportamiento diferencial respecto a las demás y en ella se observó un importante incremento en los contenidos de histamina, β-feniletilamina y triptamina a lo largo de los 14 meses que duró el estudio. En la figura... se muestra de modo gráfico la evolución de estas tres aminas.

La β-feniletilamina no detectada en las muestras de esta marca al inicio del estudio se detecta a partir de la muestra tomada tras 8 meses de almacenamiento en las muestras mantenidas a 20°C. Aunque la cifra detectada en este momento resulte baja (3.05 μg/g) resulta indicativa del inicio de una formación puesto que en las muestras siguientes se confirma la tendencia a aumentar en los contenidos de este compuesto, alcanzándose al final del estudio 24.70 μg/g. Cantidad muy superior a la detectada tanto en muestras de boquerón fresco como en muestras tomadas a lo largo de la maduración de las anchoas donde en ningún caso se superaban los 5 μg/g.

El contenido de Histamina que inicialmente se situaba en 1.35 μg/g presenta tras 8 meses de almacenamiento a 20°C un considerable aumento contabilizándose 19.50 μg/g. Al final del estudio se alcanzan 360.0 μg/g. en las muestras mantenidas a 8°C. El aumento en los contenidos de esta amina se ajusta al modelo de regresión lineal correspondiente a una curva de tipo exponencial $y = e^{(Bx+A)}$ ($A = -0.49$, $B = 0.4172$, $r = 0.9693$, $p = 7.05 \times 10^{-7}$) con el que sería posible explicar el 93.95% de la variabilidad observada en función del tiempo de almacenamiento.

La triptamina resulta en estas muestras la amina de formación mayoritaria aunque al igual que en el caso de histamina y β-feniletilamina este comportamiento solo se aprecia en las muestras mantenidas a 20°C. Esta amina biógena no fue detectada en las muestras al inicio del estudio y en la figura ... puede observarse como incrementa a partir del 8º mes, cuando se determinan 48.85 μg/g y se alcanzan al final del estudio 634.50 μg/g. También en este caso resulta satisfactoria la elección del modelo de regresión exponencial ($A = -5.34$, $B = 1.68$, $r = 0.9491$, $p = 3.15 \times 10^{-5}$) con el que sería posible explicar en función del tiempo de almacenamiento un 90.1% de la variación observada.

Figura 67 Evolución de los contenidos de β -feniletilamina, histamina y triptamina en muestras de anchoas envasadas en sal de la marca comercial B.



En el límite de la vida comercial de este producto (12 meses) se contabilizaron 14 $\mu\text{g/g}$ de β -feniletilamina, 198 $\mu\text{g/g}$ de histamina y 481.20 $\mu\text{g/g}$ de triptamina. A la vista de estos resultados se podría calificarse este producto como peligroso desde el punto de vista de los riesgos toxicológicos asociados a su consumo. El contenido en Histamina resultaría tóxico según el criterio de la mayoría de los autores (tabla...). Debería además prestarse especial atención en aquellos pacientes tratados con medicamentos IMAO puesto que β -Feniletilamina y triptamina también se metabolizan por esta vía enzimática como la tiramina y dadas las cifras de estos dos compuestos alcanzadas por las anchoas en el límite de su durabilidad, sería fácil tras la ingestión de este producto superar los 6 mg propuestos como cifra límite por PONTO y col. (1977).

En la figura... se observa que para las tres aminas coincide en el tiempo el momento en que se hace evidente su aumento (8 meses) y por orden de importancia en función de los contenidos alcanzados se situarían de menor a mayor β -feniletilamina, histamina y triptamina. Este orden no coincide con el observado en el ensayo de almacenamiento descomposición del boquerón donde la histamina resultaba la amina formada mayoritariamente, seguida de cadaverina, tiramina y putrescina y donde solo se apreciaba el aumento de β -feniletilamina y triptamina tras períodos de almacenamiento muy largos. Estas diferencias son fáciles de comprender puesto que la flora bacteriana dominante en cada un de estos dos casos es distinta. KARNOPP (1988) en un estudio sobre la evolución de la flora bacteriana a lo largo del proceso de maduración de las anchoas observa como progresivamente disminuye la flora responsable del deterioro del pescado (bacterias entéricas) y se va estableciendo un dominio de la flora halófila perteneciente predominando en ella los microorganismos del género lactobacillus.

En referencia al ensayo de durabilidad de anchoas de la escala en su presentación salmuerada podríamos concluir que si bien en las muestras mantenidas en condiciones de refrigeración no se observan incrementos en el contenido de aminas biógenas si puede darse formación de estos compuestos cuando este tipo de productos se almacenan a temperaturas superiores alcanzándose niveles que podrían resultar peligrosos desde el punto de vista toxicológico.

11.2. ANCHOAS LIMPIAS EN ACEITE

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en las tablas ... a ..., donde se presentan los contenidos de cada amina biógena determinados en anchoas limpias en aceite pertenecientes a las tres marcas comerciales objeto de estudio a cada una de las dos temperaturas de ensayo.

Siguiendo el mismo criterio que en el apartado anterior referente a las anchoas envasadas en sal, en relación con la formación de aminas biógenas se ha construido la tabla... donde se indica el comportamiento de los niveles de aminas biógenas de un modo semicuantitativo.

Tabla.... Formación de aminas biógenas en muestras de anchoas limpias y envasadas en aceite y mantenidas a 8° y 20°C.

	8°C			20°C		
	A	B	C	A	B	C
PUT	-	-	-	-	-	-
TIR	++++	-	-	++++ +	-	+++
CAD	-	-	-	-	-	-
SER	-	-	-	-	-	-
HIS	++++ +	-	+	++++	++++	++++ +
AGM	-	-	-	-	-	-
β-FEN	+++	-	-	+++	-	-
ESPD	-	-	-	-	-	-
TRIP	++++	+	++	+++	+++	++
ESPM	-	-	-	--	-	-

- no formación

+ hasta 50 µg/g

++ hasta 100 µg/g

+++ 100-500 µg/g

++++ 500-1000 µg/g

+++++ > de 1000 µg/g

tabla...Contenidos de putrescina en muestras de "anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	<u>7.65</u>	7.65	2.35	2.35	5.25	5.25
1	<u>2.80</u>	5.60	3.40	5.75	8.55	8.50
2	<u>10.28</u>	10.60	2.25	5.50	6.35	5.70
3	<u>10.45</u>	10.15	2.60	8.35	6.20	9.20
4	<u>10.85</u>	9.95	4.55	12.90	6.75	12.00
5	<u>8.70</u>	8.40	4.60	8.25	7.15	17.95
7	<u>9.35</u>	8.25	4.20	7.05	7.45	24.60
9	<u>9.35</u>	8.95	6.60	9.40	7.40	15.75

tabla...Contenidos tiramina en muestras de "Anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	21.60	21.60	15.95	15.95	24.65	24.65
1	28.35	478.50	19.75	42.90	35.53	62.80
2	37.20	1988.10	38.30	34.35	25.40	90.40
3	34.60	2195.50	36.50	39.50	22.75	92.40
4	43.55	2634.15	38.60	36.30	20.30	85.85
5	545.80	3226.40	37.50	29.15	30.85	80.35
7	995.00	3225.10	37.50	31.90	32.25	72.70
9	1647.90	3023.50	34.70	23.30	27.75	60.70

tabla...Contenido de cadaverina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	38.30	38.30	15.15	15.15	27.60	27.60
1	29.95	43.05	23.25	35.10	25.82	29.60
2	34.90	41.10	19.70	30.25	21.70	34.40
3	34.00	45.90	20.60	32.25	22.05	37.90
4	38.30	47.75	22.43	28.90	23.75	34.50
5	30.95	46.45	16.95	25.15	25.30	31.95
7	32.50	48.10	20.80	28.50	26.95	32.95
9	35.20	49.75	18.55	26.95	26.80	29.55

tabla...Contenidos serotonina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	ND	0.10	0.20	ND	ND
2	ND	ND	ND	0.25	ND	ND
3	ND	ND	0.50	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	0.30	ND	ND

tabla...Contenidos histamina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	12.60	12.60	13.90	13.90	3.10	3.10
1	15.22	64.95	5.88	23.30	21.65	18.31
2	12.40	56.75	3.60	11.30	19.75	813.30
3	13.70	97.10	3.80	48.95	20.60	1918.45
4	13.35	122.30	2.55	82.60	19.75	2004.85
5	23.25	257.20	2.24	200.90	18.45	2517.15
7	352.20	250.50	5.20	657.30	19.25	3012.15
9	753.65	443.70	5.95	1153.90	20.25	2612.35

tabla...Contenidos agmatina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	45.35	45.35	24.10	24.10	34.20	34.20
1	36.70	60.30	33.60	37.90	33.50	42.15
2	47.35	47.05	26.70	37.05	30.30	49.15
3	43.95	49.20	26.50	34.60	30.80	47.90
4	51.85	70.10	29.50	26.70	27.30	27.50
5	52.10	48.55	27.45	20.24	36.05	26.25
7	56.50	52.15	25.95	1.89	40.39	11.80
9	56.50	65.60	26.88	0.80	42.60	2.65

tabla...Contenidos β -Feniletilamina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	2.05	2.05	0.25	0.25	1.75	1.75
1	1.20	15.15	0.75	2.75	0.45	1.20
2	1.05	10.00	1.35	0.50	1.10	1.50
3	0.90	10.20	0.85	1.05	1.00	6.75
4	1.55	33.05	0.50	1.20	0.75	3.65
5	22.90	141.30	0.50	0.55	1.30	4.55
7	43.40	163.65	0.75	1.35	1.55	4.85
9	92.55	306.61	2.70	3.40	2.25	5.85

tabla...Contenidos Triptamina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	1.15	1.15	ND	ND	0.85	0.85
1	3.90	159.95	10.20	ND	0.75	0.95
2	0.25	695.45	16.10	0.50	1.60	22.30
3	1.55	786.35	13.26	2.00	0.75	25.75
4	24.90	706.80	9.65	10.13	0.60	47.72
5	671.85	692.05	9.20	17.80	0.45	48.30
7	1156.50	669.32	9.35	34.40	16.35	42.30
9	1284.50	607.95	13.07	100.20	190.90	94.952

tabla...Contenidos Espermidina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	2.35	2.35	1.10	1.10	2.25	2.25
1	1.70	1.65	1.05	6.05	2.15	1.95
2	1.45	2.06	1.20	5.85	0.55	2.45
3	1.55	2.10	1.30	4.55	0.50	1.60
4	2.00	1.35	1.25	5.65	0.45	2.35
5	1.00	1.65	1.50	4.15	0.85	2.50
7	1.00	1.65	1.25	5.25	1.05	5.17
9	1.40	1.80	1.60	0.50	1.15	2.65

tabla...Contenidos Espermina ($\mu\text{g/g}$) en muestras de "Anxova de l'Escala" en aceite, pertenecientes a distintas marcas comerciales, mantenidas a temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (8°C).

MESES	A		B		C	
	8°C	20°C	8°C	20°C	8°C	20°C
0	7.90	7.90	7.70	7.70	7.55	7.55
1	9.85	7.80	8.60	9.95	7.70	8.40
2	9.80	13.60	9.35	10.15	8.05	9.05
3	8.75	13.65	9.60	10.30	7.95	8.00
4	11.90	13.60	9.10	9.80	7.75	9.30
5	12.25	12.80	6.90	13.80	7.40	7.90
7	8.55	13.10	8.20	13.55	7.70	7.90
9	7.25	12.25	9.35	13.55	8.05	8.00

En la tabla ... se observa que en general, la formación de aminas biógenas, se hace más evidente en las muestras envasadas en aceite que en las envasadas en salmuera, donde solamente se hacía evidente la formación de estos compuestos en una de las tres marcas estudiadas y nunca cuando las muestras se almacenaban en las condiciones adecuadas (8°C como recomienda el fabricante).

Serotonina se detectó ocasionalmente en algunas muestras y los niveles detectados fueron siempre inferiores a 1 µg/g.

Espermina y espermidina, aminas fisiológicas, se detectaron en todas las muestras y tampoco en este caso se observa ninguna evolución en sus contenidos a lo largo del tiempo de almacenamiento como sucedía tanto durante el proceso de obtención de las anchoas como durante el proceso de descomposición de la materia prima.

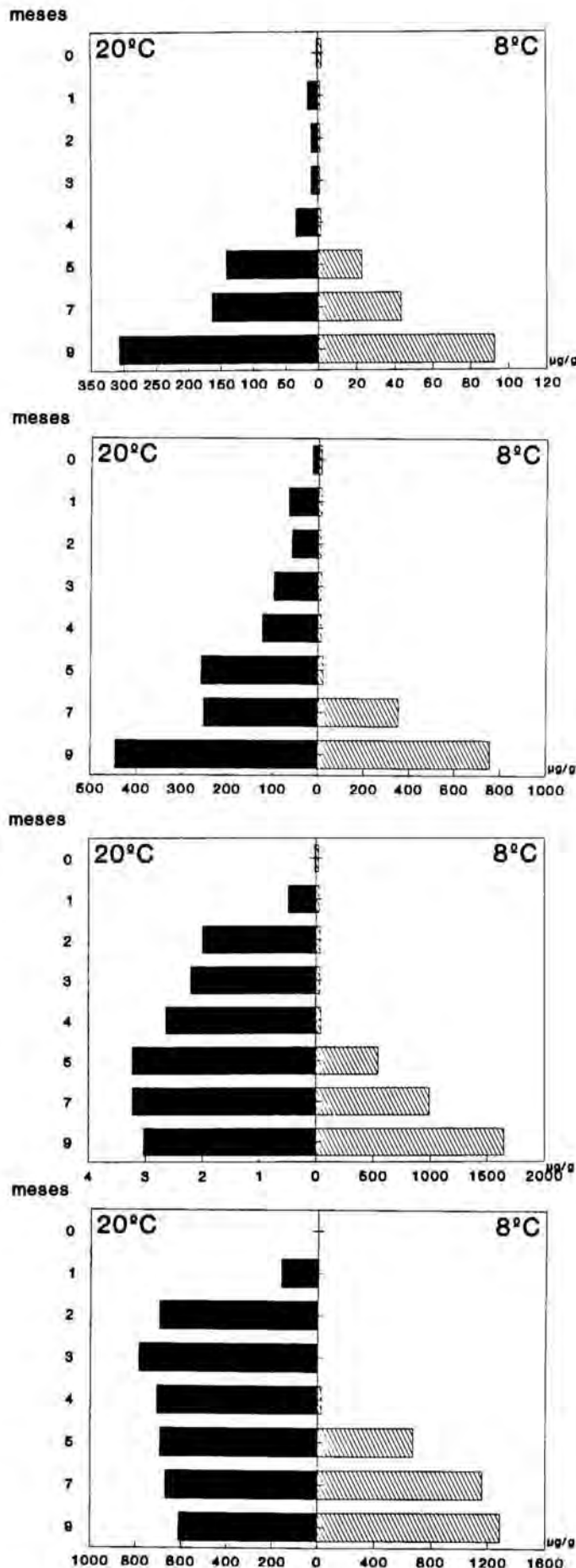
Los niveles de **putrescina y cadaverina** resultaron muy similares en todas las muestras analizadas y semejantes a los ya detectados durante la etapa de maduración, previa a la obtención del producto final. Teniendo en cuenta la variabilidad de contenidos observada en este tipo de productos no es posible atribuir al almacenamiento del producto acabado la formación de cualquiera de los dos compuestos anteriores.

En las muestras mantenidas a 8°C los niveles de agmatina se mantuvieron relativamente constantes, observándose diferencias inferiores a 10µg/g entre las muestras iniciales y finales. En las muestra mantenidas a 20°C el comportamiento de esta amina, en dos de las tres marcas comerciales objeto de estudio, resultó similar al observado durante el estudio de almacenamiento/ descomposición del boquerón (apartado 8.1). Puede apreciarse (tabla...) como tras un ligero aumento respecto a los niveles iniciales de esta amina su contenido desciende, comportamiento que se hace más evidente a partir de la muestra almacenada durante 7 meses.

El resto de las aminas biógenas se formaron en mayor o menor grado en una o varias de las marcas comerciales estudiadas. Los niveles alcanzados y las aminas formadas fueron distintos en cada caso por lo que se comentaran los resultados obtenidos en cada una de tres marcas por separado.

La marca comercial A resultó la más inestable desde el punto de vista de la formación de aminas biógenas. Resultó evidente el aumento del contenido de β-feniletilamina, triptamina, histamina y tiramina tanto en las muestras mantenidas a 8°C como en las mantenidas a 20°C. En la figura . se muestra de modo gráfico la evolución de los contenidos de estas cuatro aminas biógenas considerando ambas temperaturas de estudio. Y a continuación se destacan aspectos referentes al comportamiento observado en la evolución de estos compuestos por orden creciente de magnitud de los niveles formados durante el período de almacenamiento objeto de estudio (9 meses).

Figura 48 Evolución de los contenidos de β -feniletilamina, triptamina, histamina y tiramina en muestras de la marca comercial A, envasadas en aceite.



Los niveles de **β -feniletilamina** situados inicialmente en $2.05 \mu\text{g/g}$ se mantienen relativamente estables durante los cuatro primeros meses en las muestras mantenidas a 8°C (figura...). En la muestra correspondiente a 5 meses se alcanzan $22.9 \mu\text{g/g}$ y el contenido aumenta ajustándose a una curva exponencial ($r=0.8770$, $p=4.2 \times 10^{-3}$, $A=-0.81$, $B=0.99$) hasta $92.55 \mu\text{g/g}$ contabilizados en la última muestra. En las muestras mantenidas a 20°C ya en la determinación correspondiente al mes 1 se observa un notable incremento respecto al contenido inicial ($15.15 \mu\text{g/g}$) y en este caso la evolución de los contenidos a lo largo del tiempo de almacenamiento se ajusta también a un modelo de curva de tipo exponencial ($r=0.9345$, $p=6.88 \times 10^{-4}$, $A=1.35$, $B=0.53$) con la que es posible explicar el 87.3% de la variabilidad observada en el contenido de β -feniletilamina en función de la variable tiempo de almacenamiento.

El contenido de **histamina** situado en $12.60 \mu\text{g/g}$ en la muestra inicial se mantiene relativamente estable, en las muestras mantenidas a 8°C pero se alcanzan $735 \mu\text{g/g}$ al final del estudio. En las muestras mantenidas a 20°C tras un mes de almacenamiento se contabiliza una cantidad de esta amina aproximadamente 5 veces superior a la inicial y la tendencia al aumento se mantiene en los puntos de muestreo posteriores. La evolución de los niveles de histamina se ajusta al modelo exponencial en las muestras mantenidas a 8°C ($r=0.8866$, $p=4.21 \times 10^{-3}$, $A=1.67$, $B=0.48$) y a una de tipo multiplicativo ($r=0.9561$, $p=2.04 \times 10^{-4}$, $A=4.04$, $B=0.74$) en las muestras mantenidas a 20°C , puesto que con este modelo se reflejan mejor los aumentos observados casi al inicio del estudio.

El contenido **Triptamina** inicialmente cercano a $1 \mu\text{g/g}$ se mantiene relativamente estable durante los tres primeros meses de almacenamiento a 8°C . En la muestra correspondiente a 4 meses de almacenamiento se detectan $24.90 \mu\text{g/g}$, y antes de que expire el plazo marcado por su fecha de consumo preferente se contabilizan $671.85 \mu\text{g/g}$. La evolución de los contenidos de esta amina responde a un modelo de regresión exponencial como sucedía en el caso de la β -feniletilamina y la histamina ($r=0.8770$, $p=1.33 \times 10^{-3}$, $A=-0.81$, $B=0.99$). En las muestras mantenidas a 20°C el contenido en la muestra correspondiente a un mes de almacenamiento ya resulta muy distinta del valor inicial ($159.95 \mu\text{g/g}$) y la tendencia a aumentar se mantiene hasta transcurridos 2-3 meses de almacenamiento a partir de este momento se observa una estabilización. Este tipo de evolución se ajusta a una curva de regresión de tipo multiplicativo ($r=0.9123$, $p=9.24 \times 10^{-4}$, $A=4.63$, $B=1.59$) que refleja mejor que el modelo correspondiente a una recta o el modelo exponencial la formación precoz de esta amina y la fase de estabilización observada a partir del 4 mes de almacenamiento.

Puede llamar la atención el que los niveles máximos de histamina y de triptamina se alcancen en las muestras mantenidas a 8°C pero cabe destacar sin embargo, que en ambos casos esto solo sucede en las dos muestras finales mientras que el contenido es superior en las muestras mantenidas a 20°C en los 5 puntos de muestreo anteriores.

Tiramina fue la amina biógena que presentó mayor formación tanto en las muestras mantenidas a 8°C como a 20°C. El comportamiento a lo largo del tiempo es semejante al observado en las tres aminas biógenas comentadas anteriormente aunque en este caso se alcancen niveles muy superiores. En las muestras mantenidas a 8°C también se aprecia como para los compuestos anteriores que en la evolución del contenido de esta amina parece existir una fase inicial de latencia en que los niveles se mantienen semejantes a los iniciales (hasta 3-4). A partir de este momento el contenido en tiramina aumenta hasta que en la muestra tomada al final del estudio se alcanzan 1647.90 $\mu\text{g/g}$. Este perfil de evolución se ajusta como para el resto de las aminas biógenas en las muestras almacenadas a 8°C a un modelo de regresión exponencial ($r=0.9335$, $p=6.97 \times 10^{-8}$, $A=2.59$, $B=0.55$). En las muestras mantenidas a 20°C el contenido de tiramina en las muestras correspondiente a un mes de almacenamiento se alcanzan 478.50 $\mu\text{g/g}$ legándoos a contenidos máximos cercanos a 3000 $\mu\text{g/g}$. También en este el ajuste óptimo de entre los ensayos resulta el correspondiente a una curva de tipo multiplicativo ($r=0.9702$, $p=6.10 \times 10^{-8}$, $A=6.10$, $B=1.16$).

La bondad de los ajustes exponenciales y multiplicativos en la formación de aminas biógenas durante el período de almacenamiento corresponde con el comportamiento observado anteriormente en el ensayo de almacenamiento/ descomposición del boquerón y del atún (apartado 8), donde se observaba que en general la formación de aminas biógenas se ajustaba a una curva de tipo exponencial en casos de formación moderada y a curvas de tipo multiplicativo cuando se alcanzaban niveles superiores.

Cabe destacar que se observó un comportamiento similar en las cuatro aminas biógenas formadas respecto al momento en que los niveles detectados resultaban apreciablemente distintos de los iniciales (fig...). En las muestras mantenidas a 8°C este efecto se evidenciaba a partir del 3-4^o mes de almacenamiento y en las muestras mantenidas a 20°C se hacía ya evidente tras un mes de almacenamiento.

Los niveles de aminas biógenas alcanzados en estas muestras dentro de su período de validez comercial resultaron muy superiores a los que se podrían considerar carentes de riesgo.

En el almacenamiento a 20°C si bien el contenido en histamina (64.95 $\mu\text{g/g}$) no superaría todavía los límites impuestos por la legislación española y comunitaria sí podría aceptar a personas especialmente sensibilizadas (ARNOLD y BROWN, 1978). A mismo tiempo el contenido de tiramina (478.59 $\mu\text{g/g}$) y de triptamina (159 $\mu\text{g/g}$) resultaría especialmente peligroso en pacientes sometidos a tratamiento con medicamentos de tipo IMAO. No habría que descartar tampoco el riesgo de aparición de migrañas ya que debido a la alta concentración de tiramina en las muestras sería fácil superar la ingestión oral de los 100-125 que experimentalmente se ha comprobado que desencadenan en pacientes migrañosos (HANINGTONG y COL., 1971; FORSYTHE y REDMOND, 1974). En las muestras almacenadas durante tiempos más largos puesto que se observa un incremento de estas aminas biógenas, los riesgos anteriormente comentados se multiplicarían.

La protección en cuanto a la formación de aminas biógenas que representaba el mantener el producto en condiciones de refrigeración en las muestras envasadas en salmuera (apartado 11.1) no resultó suficiente en este caso. Aunque se consigue atrasar en el tiempo el incremento de estos compuestos los niveles de aminas biógenas alcanzados a los 5 meses, antes de agotar el período de vida comercial del producto, resultan ya alarmantes (545 $\mu\text{g/g}$ de tiramina, 671 $\mu\text{g/g}$ de triptamina, 22 $\mu\text{g/g}$ de β -feniletilamina y 23.25 de histamina).

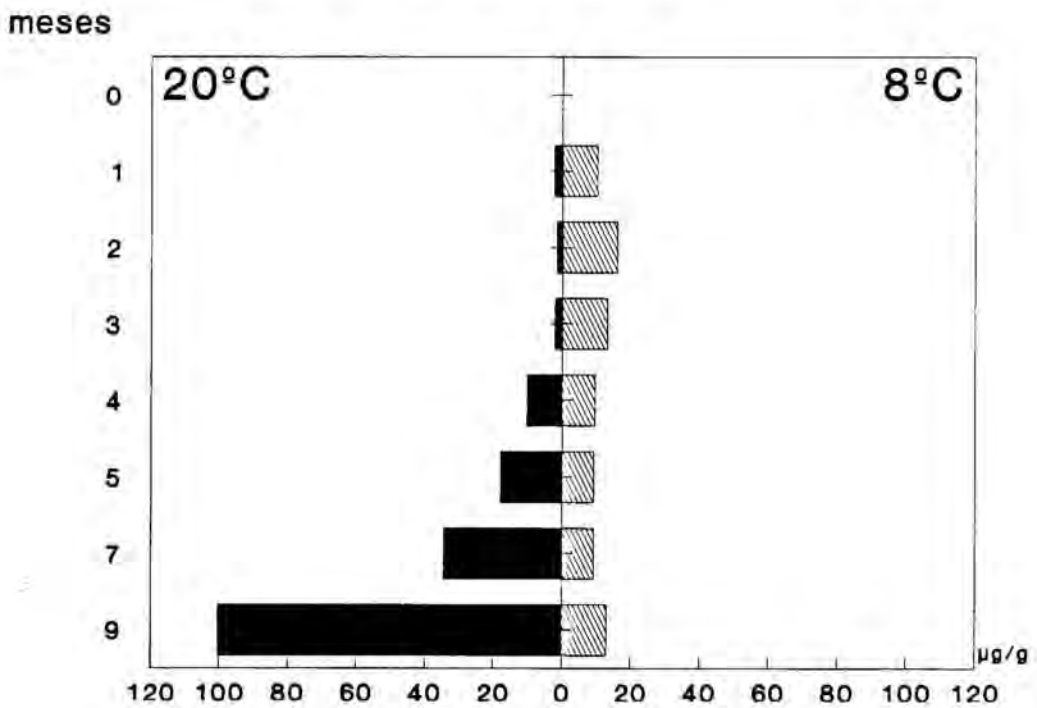
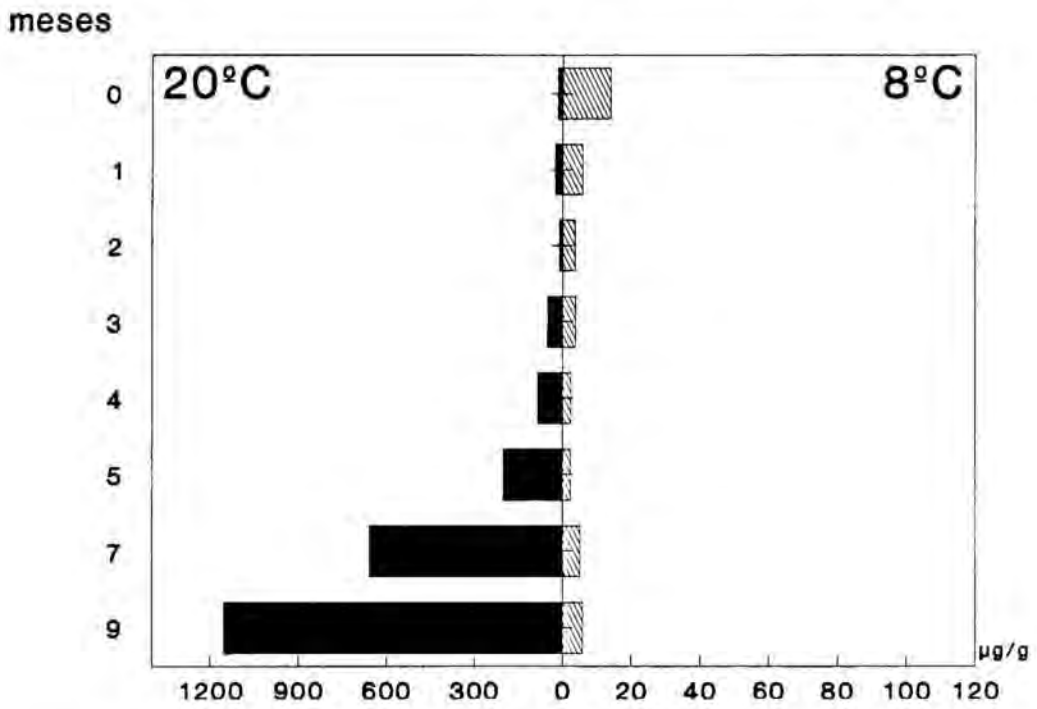
En las muestras correspondientes a la marca comercial B la formación de aminas biógenas resultó mucho menos importante. De hecho podemos considerar que en las muestras almacenadas en condiciones adecuadas (8°C) los contenidos de aminas biógenas (con excepción de triptamina) se mantuvieron niveles semejantes a los largo del período de almacenamiento a los de las muestras iniciales.

No se evidenció en ningún caso formación ni de tiramina ni de β -feniletilamina ni en las muestras mantenidas a 8°C ni en las mantenidas a 20°C .

En las muestras mantenidas a 8°C la **triptamina**, no detectada en las muestras iniciales, alcanza 10.20 $\mu\text{g/g}$ tras un mes de almacenamiento a esta temperatura pero en muestras correspondientes a períodos de almacenamiento más largos no continua la tendencia a incrementar. En las muestras mantenidas a 20°C sin embargo, los contenidos de esta amina aumentan hasta alcanzarse 100.20 $\mu\text{g/g}$ al final del estudio. Nuevamente la formación de aminas en las muestras almacenadas a 20°C se corresponde con un modelo de ajuste exponencial ($r=0.9389$, $p=7.90 \times 10^{-4}$, $A=-3.48$, $B=1.05$) con el que es posible explicar e 88.15 % de la variabilidad observada en función del tiempo de almacenamiento a esta temperatura.

La **Histamina** resultó la amina de formación mayoritaria en las muestras correspondientes a este lote de estudio. En las muestras mantenidas a 8°C aunque los niveles de la muestra inicial resultan como en el caso de la triptamina inferiores el resto, se mantienen bajos a lo largo de todo el período de estudio no superándose en ningún momento los niveles ya detectados en muestras correspondientes a anchoas en maduración antes de ser envasadas (apartado 10.2). En las muestras mantenidas a 20°C , el contenido inicial de 3.10 $\mu\text{g/g}$ se acerca a los 1000 $\mu\text{g/g}$ tras 2 meses de almacenamiento a esta temperatura. En muestras correspondientes a períodos de almacenamiento mayores se supera con creces esta cifra observándose al final del período de estudio una cierta estabilización entre 2500 y 3000 $\mu\text{g/g}$. El mejor modelo de ajuste de entre los ensayados resultó la curva de tipo exponencial ($r=0.9676$, $p=1.28^{-5}$, $A=2.26$, $B=0.55$).

Figura 69 Evolución de los contenidos de histamina y triptamina en muestras de anchoas envasadas en aceite de la marca comercial B.



En las muestras pertenecientes a este lote de estudio el almacenamiento a 8°C resultó eficaz para evitar la formación de aminas biógenas que se hacía evidente de forma ligera en el caso de la triptamina y de forma muy importante en el caso de la histamina cuando las muestras eran almacenadas a 20°C. En las muestras almacenadas a esta temperatura incorrecta, tras 5 meses de almacenamiento, antes de que expirara el período de validez comercial de este producto, se contabilizaron 200.90 µg/g, cifra que la mayoría de los autores consideran tóxica (tabla parte bibliogra.). En las muestras correspondientes a 7 y 9 meses de almacenamiento los 657.30 y 1153.90 µg/g alcanzados superan con creces la cantidad de histamina permitida en este tipo de productos por la legislación española y comunitaria (400 µg/g en pescados sometidos a maduración enzimática en salmuera).

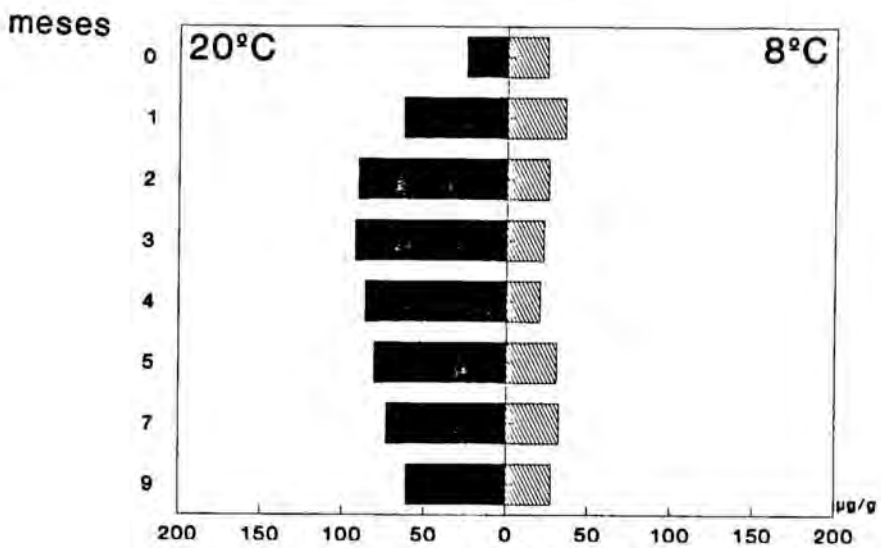
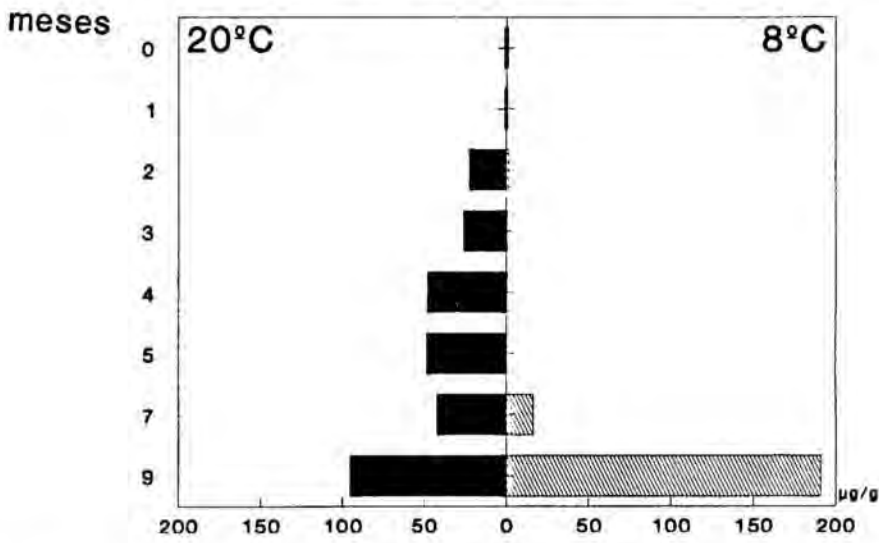
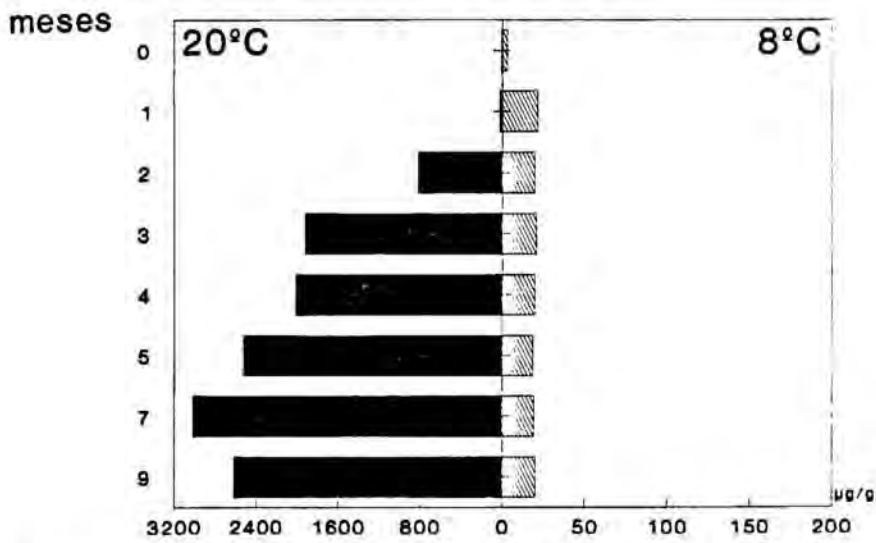
En las muestras del lote de estudio correspondiente a la marca comercial C, la magnitud de la formación de aminas biógenas resulto intermedia entre la de las muestras de la marca A y la de las de la marca B. La evolución de las contenidos de las tres aminas biógenas que presentaron contenidos superiores a los de las muestras iniciales, triptamina, tiramina e histamina, se muestran en la figura 70.

Los contenidos de **tiramina** en las muestras almacenadas a 8°C se mantuvieron semejantes a los de la muestra inicial 24.65 µg/g, obteniéndose una media de 27.42 a lo largo de todo el período de estudio. En las muestras mantenidas a 20°C se alcanzaron contenidos entre 3 y 3 veces superiores a los iniciales. En este caso, sin embargo, el mejor ajuste de regresión de entre los tres ensayos, el correspondiente a una curva de tipo multiplicativo ($r=0.7988$, $p=0.01$, $A=4$, $B=0.23$) atribuiría al azar el 38% de la variabilidad observada y sólo permitiría atribuir al tiempo de almacenamiento un 62% de la misma.

El contenido de **triptamina** inferior a 1µg/g en las muestras iniciales se mantuvo en las muestras almacenadas a 8°C en niveles semejantes durante los primeros 5 meses. En la muestra correspondiente a 7 meses de almacenamiento se alcanzan 16.35 µg/g y 190.90 µg/g al final del estudio. La evolución de los contenidos sugiere un ajuste de tipo exponencial ($r=0.7884$, $p=0.02$, $a=-1.33$, $b=0.55$) que si bien resulta estadísticamente correcto, en este caso solamente explicaría algo mas de la mitad (61.10%) de la variabilidad observada en función del tiempo de almacenamiento. Esta aparente falta de ajuste con respecto al resto de casos estudiados se comprende debido a que el aumento en el contenido de esta amina se verificó solamente en las dos últimos puntos de los 8 que constitúan el estudio.

En las muestras mantenidas a 20°C tras 2 meses de almacenamiento se alcanzan 22.30 µg/g y en las muestras siguientes se mantiene la tendencia a aumentar alcanzándose al final del estudio 94.95 µg/g. La evolución de los contenidos de triptamina se ajusta, como en del resto de los casos en que se aprecia una formación moderada a una curva de tipo exponencial ($r=0.8175$, $p=0.01$, $A=0.85$, $B=0.49$).

Figura 70 Evolución de los contenidos de histamina, triptamina y tiramina en muestras de anchoas envasadas en aceite de la marca comercial C.



Nuevamente como en las muestras de anchoas en aceite perteneciente a la marca comercial B y las envasadas salmuera de la marca A (apartado 11.1) la amina biógena de formación mayoritaria resulto la **Histamina**.

En las muestras mantenidas a 8°C se observa que a pesar de que los contenidos determinados a lo largo de los nueve meses de almacenamiento son superiores a las 3.10 $\mu\text{g/g}$ de la muestra inicial se mantienen desde el primer mes de almacenamiento hasta el final del período de estudio (19.81 ± 1.10). Niveles del orden de 20 $\mu\text{g/g}$ se habían detectado con anterioridad en algunas de las muestras tomadas durante la etapa de maduración por lo que resultaría aventurado en este caso suponer que se aparición fuera atribuible al almacenamiento del producto acabado.

En las muestras mantenidas a 20°C sí se observa, sin embargo, la clara evolución de los contenidos de aminas biógenas ya desde la muestra tomada tras un mes de almacenamiento, alcanzándose en etapas más avanzadas del estudio entre 2500 y 3000 $\mu\text{g/g}$ de esta amina. Como en todos los casos de formación masiva de aminas biogenas se observa una estabilización en el período final, comportamiento que se ajusta a un modelo de regresión de tipo curva multiplicativa ($r=0.9405$, $p=6.02^{-4}$, $A=4.77$, $B=1.72$).

Las muestras de anchoas envasadas en aceite pertenecientes a la marca comercial C almacenadas a 20°C deberían rechazarse por su elevado contenido de histamina a partir del tercer mes de almacenamiento.

Como en las muestras de anchoas en aceite de la marca comercial B, el almacenamiento en condiciones de refrigeración parece suficiente para prevenir la formación de aminas biógenas durante los seis meses de vida comercial de este producto aunque a la vista de los resultados obtenidos podría pensarse que en períodos de almacenamiento más largos si podrían formarse cantidades importantes de estos compuestos.

11.3 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELAS DE AMINAS BIOGENAS Y LOS RECUEENTOS DE MICROORGANISMOS A LO LARGO DEL PERIODO DE VIDA COMERCIAL DE LA "ANXOVA DE L'ESCALA"

Paralelamente a la determinación de los contenidos de aminas biógenas en las muestras de anchoas envasadas en aceite y en sal y mantenidas a 8° y 20°C, los profesores de la Unidad de Higiene e Inspección de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria (UAB) efectuaron los recuentos correspondientes a microorganismos mesófilos, a flora psicrotrofica, enterobacterias, microorganismos coliformes totales y microorganismos anaerobios sulfito reductores, que posteriormente se aislaron e identificaron evaluándose su capacidad formadora de histamina.

En las muestras de anchoas envasadas en sal los microorganismos mesófilos presentaban un contenido medio de 1.93 U.L, concentración semejante a la determinada la final de la etapa de maduración y muy inferior a la del recuento medio en las muestras de boquerón fresco empleado como materia prima.

Los microorganismos de carácter psicrotrofos contabilizados en la muestra inicial, correspondiente a producto recién envasado se situaba en 3.06 U.L, pero disminuía a lo largo del tiempo de modo que al final del periodo de vida comercial había descendido hasta 1.34 ± 0.27 U.L.

Las enterobacterias, familia a la que pertenecen los microorganismos con mayor capacidad formadora de histamina sólo se detectaban en la muestras inicial y los microorganismos coliformes fecales en ningún momento del estudio ni siquiera en las muestras mantenidas a la temperatura superior de las dos ensayadas. Como ya se observó en el apartado... estos microorganismos parecen especialmente sensibles al efecto de la salazón.

Los microorganismos anaerobios sulfito reductores que también aparecían en la etapa de maduración se detectaron tanto en las muestras iniciales como durante todo el periodo de estudio pero siempre en cantidades inferiores a 1 U.L.

Para todos los grupos de microorganismos estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del periodo de almacenamiento estudiado en ninguna de las dos temperaturas ensayadas en las muestras de anchoas en sal a excepción de los psicrotrofos que como se ha comentado anteriormente descendían en aproximadamente 1.5 U.L.

En las muestras pertenecientes a la presentación limpias en aceite los recuentos medios de todos los grupos de microorganismos estudiados resultaron superiores a los correspondientes a las muestras envasadas en sal. Al igual que en estas últimas tampoco en este caso fue posible establecer diferencias entre muestras almacenadas durante períodos de tiempo distintos.

Se observa además una de las tres marcas comerciales estudiadas (A) presentaba recuentos estadísticamente superiores a los de las otras dos marcas en todos los grupos de microorganismos estudiados excepto en el caso de la flora anaerobia sulfito reductora. Esta misma marca también resultó aquella en que se dio una formación mas importante de aminas biógenas (apartado 11.2).

Aunque coincide que en general la formación de aminas biógenas se hizo más evidente en aquellas muestras que presentaban recuentos mas altos los niveles de los mismos, inferiores a 4-5 U.L no justificarían los elevados contenidos de aminas biógenas alcanzados en algunas de las muestras de anchoas envasadas en aceite. De hecho estos recuentos resultan muy inferiores a los del pescado fresco empleado como materia prima en su elaboración y a los correspondientes a muestras con niveles semejantes de aminas biógenas que sólo se alcanzaban en avanzados estados de deterioro del pescado. Así, por ejemplo en el ensayo de almacenamiento/descomposición del atún, cuando se alcanzaban cerca de 400 $\mu\text{g/g}$ de histamina como los alcanzados en las muestras envasadas en aceite de la marca comercial A mantenidas a 20°C, el recuento de microorganismos aerobios mesófilos en el atún mantenido a esta misma temperatura se situaban cerca de las 7U.L, los de psicrotrofos en una cifra similar, las enterobacterias entre 4-5 U.L y los coliformes cerca de 1 U.L, niveles nunca alcanzados en las muestras correspondientes al estudio de durabilidad de las anchoas.

Además las diferencia entre los niveles de aminas biógenas formadas en las muestras mantenidas a 8 y 20°C no se ve reflejada en distintos recuentos de microorganismos que resultan en ambos casos muy similares.

Debido a los intensos procesos de proteolisis que se dan durante la maduración del boquerón (CHEFTEL, 1965) y que no cesan cuando este se envasa en su presentación definitiva, conducen a una mayor disposición de aminoácidos precursores libres. A igualdad de proliferación bacteriana la facilidad de producir aminas podría ser más elevada en productos que como las anchoas han sufrido una lisis de proteínas como las anchoas.

Además podría pensarse en actividad enzimática remanente liberada por plasmólisis tras la muerte de los microorganismos que podría continuar actuando, en ausencia de tratamiento térmico que la inactive cuando estos ya no son viables. De hecho la producción de histamina, y de otras aminas biógenas probablemente, no depende tan solo de la multiplicación bacteriana sino también de la actividad de sus enzimas descarboxilativos (FERNANDEZ-SALGUERO y MACKIE, 1979; EITENMILLER y De SOUZA, 1984; FRANK, 1985).

12.1 CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS EN PESCADOS

Los niveles de aminas biógenas descritos en la bibliografía para pescados y derivados (tabla ... a ...) abarcan un intervalo muy amplio en función del tipo de producto considerado y el país de origen, sin olvidar que en la mayoría de los casos la determinación cuantitativa no se ha efectuado con el mismo método analítico, por lo que a la hora de comparar resultados este podría ser un factor más de distorsión.

Con el fin de determinar cual es la magnitud de los niveles de aminas biógenas en el pescado disponible en nuestro mercado se ha planteado su estudio muestras de conservas de atún y de semiconservas de anchoa, ambas de amplio consumo en nuestro país, y el pescado fresco empleado como materia prima en la elaboración de estos dos derivados.

12.1.1 AMINAS BIOGENAS EN MUESTRAS DE PESCADO FRESCO

Se determinó el contenido de las 10 aminas biógenas objeto de estudio en 30 muestras de pescado fresco, 20 de atún y 10 de boquerón. Todas las muestras fueron adquiridas a primera hora de la mañana en distintos mercados barceloneses y trasladadas al laboratorio en un recipiente isoterma y cubiertas de hielo.

Los contenidos de aminas biógenas determinado en las muestras de atún se indican en la tabla., y los correspondientes a las muestras de boquerón en la tabla...

Los contenidos de aminas biógenas en atún fresco presentaron una gran variabilidad entre muestras. La variabilidad expresada en términos de coeficiente de variación resultaba siempre siempre superior al 100%, excepto para **espermina y espermidina**, aminas consideradas fisiológicas y que fueron detectadas en todas las muestras y para la **serotonina**, destacando el caso de putrescina que alcanzaba un 280% de variabilidad.

En la figura 71 se muestran de modo gráfico los contenidos medios de aminas biógenas en muestras de atún fresco así como la desviación estándar correspondiente a cada caso.

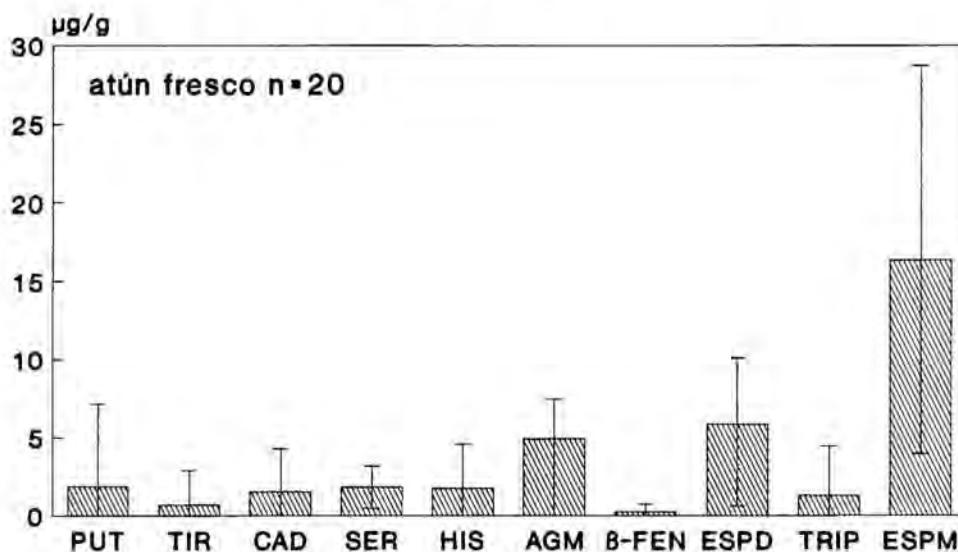
Espermidina y espermidina resultaron las aminas biógenas detectadas en cantidades superiores ($5.84 \pm 4.23 \mu\text{g/g}$ y $17.52 \pm 12.45 \mu\text{g/g}$, respectivamente).

Agmatina fue detectada en el 85% de las muestras con un contenido medio de $4.61 \mu\text{g/g}$, pero las cifras detectadas comprendían un intervalo muy amplio desde ND en un 15% de las muestras estudiadas hasta niveles superiores a $17 \mu\text{g/g}$ en dos muestras.

tabla... Contenido de aminos biógenas en muestras de atún fresco adquirido en distintos mercados de Barcelona.

Muestra	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPM
1	0.50	0.35	0.30	0.65	0.30	0.50	0.70	1.85	1.20	1.20
2	0.25	0.20	0.30	0.55	ND	0.45	0.20	1.55	0.10	1.05
3	0.13	ND	1.30	2.30	ND	1.90	ND	1.20	ND	3.10
4	0.60	0.85	1.65	3.50	3.85	1.90	ND	2.80	5.85	7.30
5	0.30	0.20	0.75	3.40	9.50	1.60	0.30	3.40	ND	8.85
6	4.85	1.20	7.90	0.85	0.90	13.60	0.35	6.70	ND	9.40
7	0.30	ND	0.15	0.70	1.35	1.40	0.20	3.40	ND	2.10
8	ND	ND	ND	ND	ND	0.10	ND	5.05	ND	11.70
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.45	ND	11.60
10	0.70	0.30	ND	0.30	ND	ND	ND	6.80	ND	14.05
11	0.90	10.65	5.20	1.65	2.20	4.70	ND	6.95	ND	17.70
12	1.45	ND	ND	2.05	ND	17.45	1.70	9.95	ND	28.38
13	ND	ND	0.65	2.95	ND	17.75	ND	9.70	ND	27.55
14	2.33	ND	ND	3.10	ND	46	ND	11.70	ND	30.93
15	ND	ND	1.70	3.20	ND	4.25	ND	11.25	ND	31.48
16	ND	ND	9.53	3.65	6.95	2.65	ND	6.85	ND	26.30
17	ND	ND	ND	ND	0.55	ND	ND	11.20	ND	32.10
18	1.70	ND	1.70	2.85	ND	8.50	ND	11.20	ND	25.2
19	ND	ND	3.15	3.35	0.53	0.55	ND	7.88	ND	23.73
20	ND	ND	1.85	3.65	6.30	0.65	ND	11.20	ND	37.03
X \pm DE	1.81 \pm 5.51	0.69 \pm 2.49	1.28 \pm 2.42	1.95 \pm 1.36	1.84 \pm 2.98	4.61 \pm 5.56	0.22 \pm 0.44	5.84 \pm 4.23	1.45 \pm 3.29	17.5 \pm 12.4

Figura 7 | Contenidos medios ($\mu\text{g/g}$) de aminas biógenas en muestras de atún fresco adquiridas en distintos mercados de Barcelona.



Putrescina, cadaverina, tiramina, e histamina, aminas biógenas relacionadas con el deterioro y cuya formación había sido claramente observada en el ensayo de almacenamiento descomposición del atún (apartado 8.2), no se detectaron en todas las muestras estudiadas y en la mayoría de los casos los niveles de estos compuestos resultaron inferiores a $1\mu\text{g/g}$. Solamente en algunas muestras se detectaron niveles superiores ocasionalmente y no se observó coincidencia entre muestras con contenidos altos de una u otra amina. De hecho al estudiar si existía alguna relación entre los contenidos de estas aminas biógenas, en ningún caso se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. Es decir que no siempre niveles altos de una amina biógena corresponden con niveles altos de las demás, caso de una relación positiva ni siempre niveles altos de uno de estos compuestos corresponden con niveles bajos de los demás, caso de una correlación negativa.

Las aminas biógenas **triptamina** y **β -feniletilamina**, aminas biógenas que podrían considerarse indicadores la descomposición del pescado de carácter tardío, se detectaron en un pequeño porcentaje de las muestras estudiadas (15 y 30%, respectivamente). Los niveles correspondientes a estos dos compuestos resultaron muy bajos ($< 2\mu\text{g/g}$), salvo la muestras n^o4 a la que correspondían $5.85\mu\text{g/g}$ de triptamina.

Los contenidos de aminas biógenas obtenidos en las muestras de este estudio resultaban del mismo orden que los de histamina descritos por DEL PRETE (1979) para atún fresco y los descritos por INGLES y col. (1985) en cuanto a histamina, tiramina, β -feniletilamina putrescina y cadaverina.

Todas las muestras analizadas estaban destinadas al consumo humano y si bien en este caso no se efectuó una exhaustiva valoración de sus caracteres organolépticos, nada inducía a pensar que no se tratara de pescado calificable como fresco. Esta circunstancia coincide con los bajos niveles de aminas biógenas indicadoras de deterioro que en general fueron detectadas. Los niveles de histamina por ejemplo, resultan muy bajos comparados con el límite de 200 $\mu\text{g/g}$ establecido por la legislación española en el Real Decreto 1437/92 para pescados pertenecientes a las familias de los escómbridos y clupeidos, ya el contenido más alto detectado en muestra número 5 se situaba solamente en 9.5 $\mu\text{g/g}$.

Por ello, además del contenido en histamina, cuyo valor límite resulta muy alejado del que normalmente aparece en pescado fresco y parece estar fijado más en la cercanía de su límite toxicológico que para evaluar el incipiente deterioro del pescado por parte de microorganismos, se han considerado otros criterios (apartado 5.5). Como el límite de 10 $\mu\text{g/g}$ propuesto por YAMANAKA (1989) o los 5 $\mu\text{g/g}$ de esta misma aminas propuestos por STARUSZKIEWITCZ y BOND (1981). Se ha calculado también el valor correspondiente al índice propuesto por MIETZ y KARMAS (1977) que tiene en cuenta más de una amina biógena y que según la expresión siguiente no debe superar el valor de 1 para considerar el pescado fresco:

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

Finalmente a la vista de los resultados obtenidos en el apartado... en cuanto a la formación de aminas biógenas durante el proceso de almacenamiento descomposición del atún se ha calculado el valor correspondiente al numerador de la expresión propuesta por MIETZ y KARMAS (PUT+CAD+HIS), se ha considerado la suma total de los valores correspondientes a las 10 aminas biógenas estudiadas y finalmente la suma de las 6 aminas biógenas formadas en la descomposición del atún a excepción de la agmatina por su temprano descenso (PUT+TIR+CAD+HIS+TRIP+ β -FEN). En la tabla ... se muestran los valores obtenidos tras el cálculo de las relaciones anteriores.

En función del contenido en cadaverina todas las muestras serían aceptables considerando el máximo propuesto por YAMANAKA (1989) mientras que considerando el criterio más exigente de STARUSZKIEWITZ y BONDZ (1981) habría que rechazar las muestras 6 y 16 por su contenido en esta amina de 7.90 y 9.35 $\mu\text{g/g}$.

Según el valor obtenido en el índice propuesto por MIETZ y KARMAS (1977) todas las muestras se clasificarán en la categoría I correspondiente a pescado fresco para valores de este índice inferiores a 1. De las 2 muestras peor calificadas por su contenido en cadaverina sólo una presenta un valor próximo a 1 (0.8) número 6. Sin embargo, la que presentaba mayor contenido en cadaverina alcanzaba un índice mucho menor (0.48). La no coincidencia de los criterios de MIETZ y KARMAS y STARUSZKIEWITZ y BOND,

se pone de manifiesto una vez más al comparar las muestras 5 y 6, con igual calificación según los primeros, pero que sin embargo presentan un contenido en cadaverina muy distinto. Se observa que ello es debido a los distintos niveles de espermina y espermidina que son más altos en la muestra 6 donde también es superior el valor alcanzado por la suma HIS+PUT+CAD.

Considerando la suma total de aminas biógenas los valores más altos alcanzados no corresponden siempre a las muestras donde el contenido en aminas biógenas indicadoras de deterioro es mayor. Presentan gran influencia los contenidos de espermina y de espermidina puesto que en las muestras de pescado fresco son las aminas biógenas mayoritarias y dado que sus contenidos parecen no modificarse a lo largo del proceso de deterioro del atún (apartado 8.2) podría ser indicado no considerarlas. Los elevados niveles con respecto a las demás aminas biógenas estudiadas dificultan la apreciación de diferencias entre muestras, atribuibles a la aparición de aminas biógenas cuyo origen es la descarboxilación bacteriana. Así por ejemplo la muestra en que la suma total de aminas biógenas alcanza el mayor valor ($60.98 \mu\text{g/g}$), número 12 presentaba solamente $3.45 \mu\text{g/g}$ de aminas indicadoras de deterioro.

Considerando el cálculo de PUT+CAD+TIR+CAD+ β -FEN+TRIP, suma de todas las aminas cuyo contenido aumentaba a lo largo del proceso de descomposición del atún a excepción de la agmatina, las cinco muestras peor calificadas (4,5,6,11 y 16) coincidirían en 4 casos con las 5 peor clasificadas por su contenido en cadaverina y con las 5 peor clasificadas según el criterio de MIETZ y KARMAS. La ventaja frente a este último es que parece permitir establecer diferencias entre muestras que según el criterio anterior resultarían muy semejantes. Estas diferencias se acentuarán a medida que avance el deterioro del pescado puesto que se forman cantidades importantes de tiramina y de β -feniletilamina y triptamina más tarde, aminas no consideradas en ningún momento en la expresión propuesta por MIETZ y KARMAS. Será necesario efectuar estudios más completos encaminados a conocer la relación entre el contenido de las 6 aminas biógenas propuestas y la calificación organoléptica del atún para así poder establecer unas cifras orientativas que permitieran la clasificación del pescado en categorías a semejanza de los que ocurre con los valores del índice de MIETZ y KARMAS. El número de muestras analizadas en este trabajo resulta insuficiente para ello pero permite, junto con el estudio del proceso de almacenamiento descomposición del atún (apartado 8.2) avanzar la posible idoneidad de la utilización de este cálculo en su evaluación química en función del contenido en aminas biógenas.

Tabla... calificación de las muestras de atún fresco adquiridas en el mercado de Barcelona según distintos criterios basados en el contenido de aminas biógenas.

MUESTRA	CADAVERINA ($\mu\text{g/g}$)	PUT+CAD+HIS 1+ESPD+ESPM	PUT+CAD+HIS	SUMA TOTAL	PUT+TIR+CAD+ HIS+ β -FEN+TRIP
1	0.30	0.27	1.10	7.55	3.35
2	0.30	0.15	0.55	4.65	1.05
3	1.30	0.27	1.43	9.93	1.43
4	1.65	0.55	6.10	28.30	12.80
5	0.75	0.80	10.55	28.30	11.05
6	7.90	0.80	13.65	45.75	15.20
7	0.15	0.28	1.80	9.60	2.00
8	ND	0.00	0.00	16.85	0.00
9	ND	0.00	0.00	15.05	0.00
10	ND	0.03	0.70	22.15	1
11	5.20	0.32	8.30	49.95	18.95
12	ND	0.04	1.45	60.98	3.15
13	0.65	0.02	0.65	58.6	0.65
14	ND	0.05	2.33	52.68	2.33
15	1.70	0.04	1.70	51.90	1.70
16	9.53	0.48	15.48	55.93	16.48
17	ND	0.01	0.55	43.85	0.55
18	1.70	0.09	3.40	51.15	3.40
19	3.15	0.11	3.68	39.30	3.68
20	1.85	0.13	6.45	58.98	6.45

Los contenidos de aminas biógenas en muestras de boqueron fresco adquirido en el mercado de Barcelona se muestran en la tabla

Aunque el número de muestras es en este caso inferior y los valores obtenidos pueden resultar menos significativos, se observa que y también en este caso **espermina** y **espermidina** resultan las aminas biógenas mayoritarias.

En ninguna muestra se detecta ni **triptamina** ni **β -feniletilamina**, aminas biógenas que podrían considerarse indicadores de descomposición tardía también el boquerón (apartado 8.1).

Agmatina es la amina biógena que presenta mayor variabilidad de contenidos desde ND hasta $9.75 \mu\text{g/g}$.

Serotonina y **tiramina** se detectan solo en 2 de las muestras estudiadas e **histamina** en una de ellas. Los contenidos de estas tres aminas biógenas fueron siempre muy bajos no superándose en los $3 \mu\text{g/g}$.

Tabla... Contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) en muestras de boquerón fresco adquirido en distintos mercados de Barcelona.

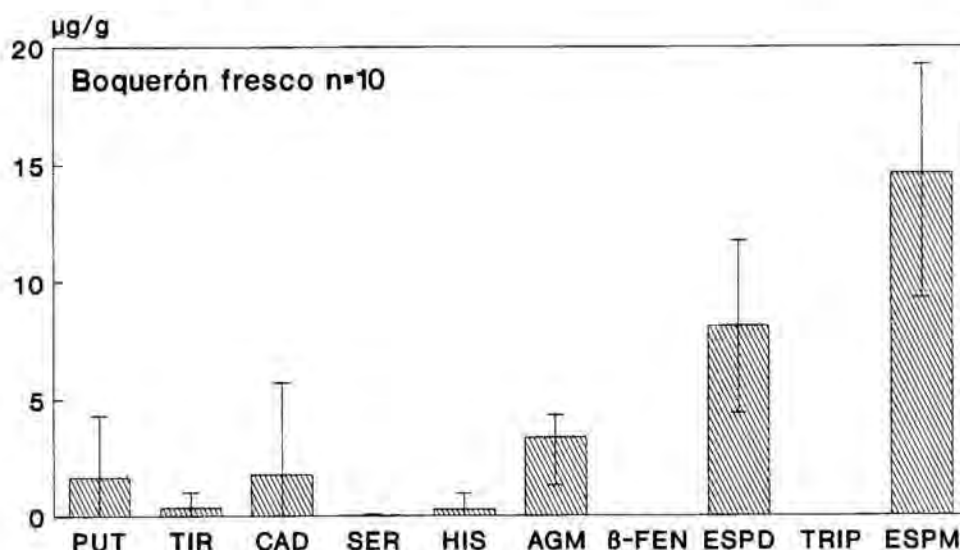
MUESTRA	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
1	4.25	1.15	1.70	0.10	0.30	9.75	ND	10.94	ND	11.95
2	4.90	2.25	12.60	0.10	ND	ND	ND	6.20	ND	9.30
3	0.85	ND	0.40	ND	ND	1.20	ND	8.45	ND	14.72
4	0.50	ND	0.15	ND	ND	2.70	ND	11.90	ND	15.40
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.20	ND	10.87
6	0.55	ND	0.10	ND	ND	0.40	ND	5.30	ND	6.95
7	0.50	ND	0.10	ND	ND	0.80	ND	6.25	ND	10.00
8	1.95	ND	0.35	ND	ND	6.10	ND	5.65	ND	7.20
9	1.30	ND	0.85	ND	ND	6.30	ND	4.00	ND	7.36
10	1.90	ND	1.60	ND	ND	6.25	ND	6.30	ND	12.16
X \pm DE	1.65 \pm 1.66	0.34 \pm 0.76	1.78 \pm 3.84	0.02 \pm 0.04	0.25 \pm 0.70	3.35 \pm 1.95	ND	8.11 \pm 3.61	Nd	14.59 \pm 4.65

Cadaverina y putrescina detectada en la mayoría de las muestras presentaron contenidos inferiores a $2\mu\text{g/g}$ excepto en la muestra n^o 2 a la que correspondía un contenido anormalmente alto de $12.6\mu\text{g/g}$ de cadaverina y las muestras 1 y 2 con un contenido de putrescina de ente 4 y $5\mu\text{g/g}$

Los contenidos de aminas biógenas indicadoras del deterioro resultaron en las muestras de boquerón, sensiblemente inferiores a los de las muestras de atún. Aunque el boquerón es un pescado de pequeño tamaño que se deteriora con mayor facilidad, el hecho de que se adquiriera entero podría haber contribuido a que la esterilidad inicial del músculo se mantuviera durante más tiempo que en el atún adquirido en rodajas. PAN y JAMES (1985) citan respecto a la evisceración y manipulación del pescado que si no se efectúa con las debidas precauciones puede conducir a una mayor formación de aminas biógenas. BENAIGES y BENAIGES (1990) observa este mismo comportamiento en un ensayo de almacenamiento descomposición de sardinas, evisceradas y sin eviscerar.

En la figura 72 se muestran los contenidos de aminas biógenas en boquerón fresco expresados en forma de medias y su correspondiente desviación standard y en ella se observa, que a pesar de la variabilidad entre muestras, las aminas biógenas mayoritarias son como en el caso del atún, espermina, espermidina y agmatina.

Figura 72 contenidos de aminas biogénicas ($\mu\text{g/g}$) en muestras de boquerón fresco adquirido en el mercado de Barcelona.



Como en el caso de las muestras de atún fresco también para las de boquerón se ha construido la tabla de criterios de aceptación en función del contenido de aminas biogénicas (tabla....)

Tabla... Calificación de las muestras de boquerón fresco adquiridas en el mercado de Barcelona según distintos criterios basados en el contenido de aminas biogénicas.

MUESTRA	CADAVERINA ($\mu\text{g/g}$)	$\frac{\text{PUT}+\text{CAD}+\text{HIS}}{1+\text{ESPD}+\text{ESPM}}$	PUT+CAD+HIS	SUMA TOTAL	$\text{PUT}+\text{TIR}+\text{CAD}+\text{HIS}+\beta\text{-FEN}+\text{TRIP}$
1	1.70	0.24	6.25	40.10	7.40
2	12.60	0.35	19.75	47.60	22.0
3	0.40	0.04	1.25	25.62	1.25
4	0.15	0.02	0.65	30.65	0.65
5	ND	0.00	0.00	17.07	0.00
6	0.10	0.04	0.65	13.30	0.65
7	0.10	0.03	0.60	17.65	0.60
8	0.35	0.06	2.30	41.25	2.30
9	0.85	0.06	2.15	29.81	2.15
10	1.60	0.06	3.50	38.21	3.05

En este caso también se observa una discrepancia entre los criterios de STARUSZKIEWICZ y BOND y de MIETZ y KARMAS. La muestra número 2, claramente rechazable por su contenido en cadaverina presenta un valor del índice de MIETZ y KARMAS todavía muy alejado de uno (0.35) y muy similar al correspondiente a la muestras número 1 (0.24) que solo contenía 1.7 $\mu\text{g/g}$ de esta amina.

Considerando solamente el denominador del índice de MIETZ y KARMAS se acentúan las diferencias entre estas dos muestra ya apuntadas por su distinto contenido en cadaverina. Como en el caso del atún, de nuevo se aprecia la idoneidad de la SUMA

PUT+TIR+CAD+HIS+ β -FEN+TRIP, que coincide en calificar las muestras 1 y 2 como las peores desde el punto de vista del contenido en aminas biógenas y marca diferencias apreciables entre ambas muestras puesto que tiene en cuenta también el contenido de tiramina, β -feniletilamina y triptamina (aunque en estas muestras las dos últimas no hayan sido detectadas en ningún caso).

La suma total como el índice de MIETZ y KARMAS, pero aún en mayor grado, esta influenciada por los niveles de espermina y espermidina, aminas cuyo contenido se mantiene relativamente constante a lo largo del proceso de deterioro del boquerón (apartado 8.1) y puesto que en pescado fresco resultan los componentes mayoritarios se de la paradoja de las muestras 1 y 8 presenten en ambos casos valores cercanos a 40 y en la segunda de ellas no se detecte ninguna de las aminas biógenas que se forman durante el deterioro del pescado a excepción de la agmatina.

Aunque posiblemente la evaluación del pescado fresco en función del contenido en aminas biógenas resulte demasiado compleja frente a la evaluación organoléptica cuya eficacia a sido ampliamente demostrada a lo largo de la historia se ha planteado el estudio de estos compuestos en pescado fresco debido a la posibilidad de utilizarlos como indicadores de la calidad de la materia prima empleada en la elaboración de derivados de pescado. Desde esta perspectiva, es necesario conocer los niveles de aminas biógenas en pescado fresco y la validez de los distintos criterios propuestos al respecto.

12.2.1 AMINAS BIOGENAS EN DERIVADOS DE PESCADO

Se determino el contenido de aminas biógenas en 38 muestras de conservas de atún y de 30 muestras de semiconservas de anchoa también en aceite, en ambos casos las muestras pertenecían a marcas distintas comercializadas en nuestro país y fueron adquiridas en distintos puntos de la geografía española.

El contenido de aminas biógenas en muestras de conservas de atún se indica en la tabla (I y II). Dado que se comprobó que en el proceso de obtención de estos productos no existía formación de aminas biógenas y que la aplicación de tratamientos térmicos solo afectaba al contenido de espermina y espermidina, el contenido de aminas biógenas indicadoras de deterioro podría ser indicativo del estado higiénico sanitario de la materia prima empleada en la elaboración de este tipo de productos.

En la tabla... se observa que los contenidos de aminas biógenas son semejantes a los de las muestras de atún fresco salvo en el caso de la muestra número 3 con un contenido inusualmente alto de cadaverina (12 $\mu\text{g/g}$), histamina (40.50 $\mu\text{g/g}$), β -

feniletilamina (4.30 $\mu\text{g/g}$) y triptamina (6.90 $\mu\text{g/g}$) y las muestras 4 y 5 que presentan también contenidos elevados de β -feniletilamina y triptamina pero no tan importantes del resto de las aminas biógenas indicadoras de deterioro. Al final de la tabla se indica el contenido medio de cada amina biógena y su desviación estándar.

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

MUESTRA	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AMG	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
1	0.65	2.00	4.50	2.85	13.95	1.10	1.00	5.60	3.45	23.25
2	ND	ND	0.20	7.70	0.40	ND	1.30	8.30	4.10	35.20
3	1.80	ND	12.00	ND	40.50	10.40	4.30	4.80	6.90	28.80
4	ND	1.10	ND	3.80	ND	ND	1.15	8.50	10.10	16.50
5	0.20	3.00	0.90	2.40	2.60	9.30	7.30	19.50	12.90	16.80
6	0.10	1.35	0.20	8.40	1.30	2.30	0.15	4.05	0.55	18.00
7	0.50	1.90	1.20	1.50	3.00	2.00	0.70	5.50	1.60	16.80
8	ND	ND	1.20	2.70	ND	ND	ND	2.42	ND	13.65
9	2.20	ND	1.60	2.85	0.40	ND	ND	3.40	ND	13.50
10	1.95	ND	1.20	2.55	0.20	ND	ND	3.45	ND	14.35
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.95	ND	9.55
12	ND	ND	0.90	ND	ND	ND	ND	4.85	ND	15.15
13	ND	ND	ND	ND	ND	5.45	ND	4.00	ND	11.10
14	ND	ND	0.55	2.30	3.10	ND	ND	2.05	ND	7.70
15	ND	ND	ND	ND	ND	0.85	ND	3.30	ND	9.50
16	ND	ND	1.30	2.50	1.05	0.80	ND	3.30	ND	10.95
17	ND	ND	0.90	ND	5.10	1.20	ND	3.20	ND	12.05
18	1.55	ND	1.60	2.70	0.45	ND	ND	2.50	ND	10.70
19	1.50	ND	1.45	ND	1.00	0.20	ND	2.70	ND	9.85

Tabla... Contenidos de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) en conservas de atún en aceite (II).

MUESTRA	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEN	ESPD	TRIP	ESPN
20	1.75	1.00	0.85	1.75	0.55	ND	ND	3.55	ND	11.15
21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.85	ND	3.95
22	ND	ND	0.25	ND	2.72	ND	ND	1.80	ND	4.95
23	ND	ND	0.45	ND	ND	ND	ND	2.60	ND	6.75
24	0.50	ND	1.25	ND	ND	0.80	ND	4.25	ND	12.60
25	0.95	0.95	0.70	ND	0.85	1.85	ND	4.70	ND	12.40
26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.40	ND	10.45
27	ND	ND	ND	ND	0.85	ND	ND	2.80	ND	7.70
28	0.25	ND	ND	ND	0.15	ND	ND	3.50	ND	5.90
29	1.40	1.20	2.05	ND	1.85	1.00	1.15	6.55	ND	17.25
30	ND	ND	0.10	ND	0.25	ND	ND	2.70	ND	6.50
31	0.40	ND	ND	ND	0.20	ND	ND	7.50	ND	8.85
32	ND	1.05	0.40	ND	0.30	ND	ND	1.50	ND	3.95
33	0.45	ND	1.95	ND	0.15	ND	ND	6.00	ND	10.30
34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.40	ND	10.55
35	0.80	ND	0.95	1.50	1.85	1.20	ND	4.55	ND	7.75
36	0.40	ND	0.20	1.50	1.00	ND	ND	2.30	ND	6.30
37	0.50	ND	0.85	ND	1.00	1.25	ND	4.40	0.85	14.95
38	0.80	ND	ND	ND	1.45	0.95	0.65	2.85	ND	2.239
X \pm DE	0.68 \pm 1.75	0.35 \pm 7.21	1.00 \pm 2.03	1.14 \pm 1.73	2.22 \pm 6.8	0.98 \pm 2.35	0.46 \pm 1.37	4.12 \pm 1.90	1.06 \pm 2.87	11.80 \pm 6.68

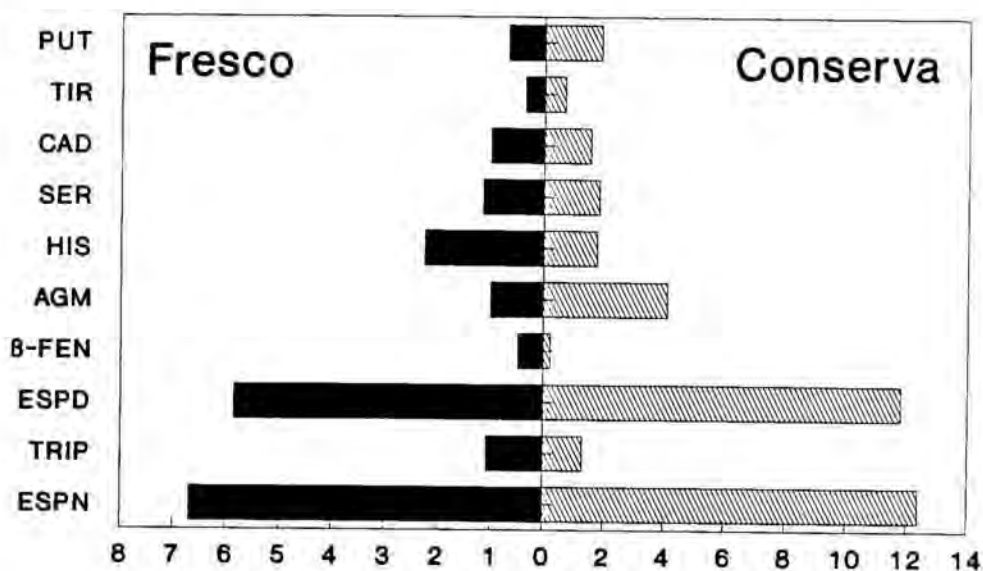
Tabla ... comparación estadística de los niveles medios de aminas biógenas en muestras de atun fresco y de conservas de atún, mediante la prueba no paramétrica de las W WILCOXON para grupos independientes.

	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEM	ESPD	TRIP	ESPM
Z	0.998	0.409	0.057	2.552	-0.393	3.697	0.687	1.268	0.245	0.941
P	0.159	0.3413	0.477	5.3×10^{-3}	0.347	1.1×10^{-4}	0.246	0.102	0.403	0.173

En la comparación estadística de los niveles medios de aminas biógenas en muestras de atún fresco y conservas de atún en aceite, efectuada mediante la prueba no paramétrica de la W de WILCOXON dado que no se cumplían las supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de poblaciones, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos tipos de productos respecto al contenido en serotonina y el de agmatina (tabla...). Serotonina, si bien se detectaba en muchas de las muestras estudiadas, siempre lo era en cantidades muy bajas. Además resulta difícil relacionarla con el deterioro del pescado puesto que su contenido no experimentaba ninguna evolución a lo largo de este proceso. Agmatina si resultó claramente relacionada con el deterioro de atún pero el hecho de que sus niveles descendieran precozmente impide adjudicar a niveles bajos de esta amina pescado fresco si no son también bajos los contenidos del resto de las aminas biógenas que se forman durante el deterioro. Considerando las 6 aminas biógenas propuestas como indicadores del deterioro a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo (apartado...), histamina, cadaverina, tiramina, putrescina, β -feniletilamina y triptamina los niveles de estos compuestos detectados en conservas de atún resultarían equivalentes a los de pescado fresco.

En la figura 73 se muestra de modo gráfico los contenidos medios de aminas biógenas en ambos tipos de productos. Puede observarse como en los dos casos, espermina y espermidina resultan las aminas biógenas mayoritarias y el contenido en aminas biógenas indicadoras del deterioro es muy bajo. Podríamos concluir con ello que la materia prima empleada en la elaboración de estas conservas salvo la correspondiente a la muestra número 4 resultaba correcta.

Figura 73 Contenidos medios de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) en muestras de atún fresco de conservas de atún en aceite.



En la tabla ... se indican los contenidos de aminas biógenas en las 30 muestras de anchoas en aceite analizadas. Se observa en primer lugar, que en la mayoría de los casos se determinan contenidos mayores de aminas indicadoras del deterioro que en el boquerón fresco o en las conservas de atún, dejando espermina y espermidina de resultar las aminas biógenas de carácter mayoritario.

La presencia de contenidos elevados de aminas biógenas podría en principio ser atribuible a múltiples causas en las semiconservas de anchoas:

- empleo de materia prima inadecuada
- proceso de elaboración incorrecto, puesto que cuando este se verifica en las condiciones adecuadas la salazón impide la proliferación bacteriana y la formación de cantidades importantes de estos compuestos durante la larga etapa de maduración (apartado 10.2)
- Almacenamiento en condiciones inadecuadas (apartado 11)

Se observa que en las semiconservas de anchoa en aceite analizadas la amina biógena que alcanza niveles más altos es la tiramina, amina cuya formación cuando se daba también resultaba mayoritaria en el ensayo de durabilidad de este tipo de productos planteado en el apartado 11.

Por el contenido en tiramina, al que habría que sumar los contenidos del resto de las aminas aromáticas metabolizadas por el sistema MAO, con el consumo de anchoas de varias de las muestras analizadas sería fácil ingerir los 6 mg máximos marcados por PONTO y col (1977) para enfermos sometidos a tratamientos con IMAO. El contenido en histamina, si bien no alcanza los niveles máximos marcados por la legislación que permiten el doble en productos que como las anchoas se elaboran en salazón, alcanza en muchos casos niveles de más del doble de los detectados en boquerón fresco donde esta amina solo se detectó en 2 de las 10 muestras analizadas.

En la figura 74 Se muestran los contenidos medios de aminas biógenas en muestras de boquerón fresco y en muestras de anchoas. se observa que todas las aminas biógenas excepto espermina y espermidina presentaban contenidos superiores en las semiconservas de anchoa diferencias que resultaron en todos los casos, puesto que ya eran evidentes a simple vista, estadísticamente significativas tras comparar las medias mediante la W de WILCOXON (Tabla...).

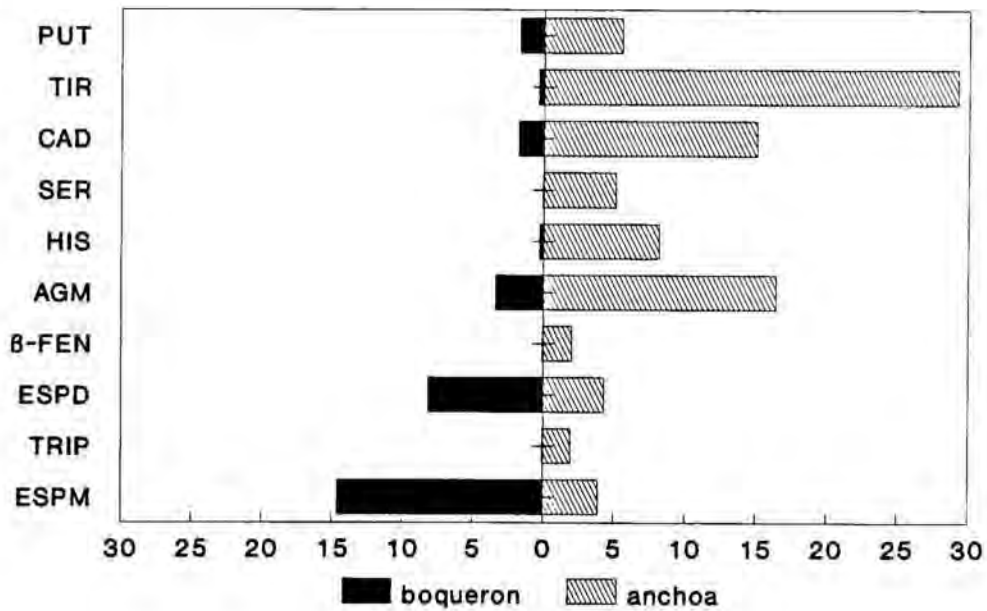
En definitiva, salvo excepciones los niveles de aminas biógenas indicadoras del deterioro en muestras de pescado fresco resultaron bajos. En las muestras de conservas de atún en aceite resultaron semejantes a las del pescado fresco mientras que en semiconservas de anchoa resultaron claramente superiores.

En un estudio previo efectuado en nuestro laboratorio niveles de aminas biógenas, concretamente de histamina y de tiramina, también resultaban superiores en semiconservas de anchoa que en conservas de pescado (VECIANA -NOGUES y col, 1988).

Tabla comparación estadística de los niveles medios de aminas biógenas en muestras de atun fresco y muestras de conservas de atún en aceite, mediante la prueba no paramétrica de las W WILCOXON para grupos independientes.

	PUT	TIR	CAD	SER	HIS	AGM	β -FEM	ESPD	TRIP	ESPM
Z	3.18	4.65	3.49	4.50	4.38	3.51	3.58	3.3	2.16	4.51
p	10^{-3}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	0.03	10^{-6}

Figura 74 contenido medio de aminas biógenas en boquerón fresco y en semiconservas de anchoa.



12.2. CONTENIDOS DE ATP y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACION

Finalmente como complemento al estudio de las características de las muestras de pescado fresco, que en general presentaron contenidos de aminas biógenas muy bajos, se determinó el contenido de ATP y sus productos de degradación en 10 muestras de atún fresco adquirido en distintos mercados de Barceloa y en 10 muestras de boquerón fresco. Las variaciones entre las proporciones de ATP y sus metabolitos reflejan cambios en el pescado que se verifican antes de la proliferación bacteriana (responsable de la formación de aminas biógenas) y son debidos fundamentalmente a la acción autolítica de los enzimas del propio pescado.

En la tabla ... se indican los contenidos de ATP y derivados correspondientes a las muestras de atún.

Los niveles de ATP, ADP y AMP resultaron siempre muy bajos y el IMP aparece como metabolito mayoritario casi todas las muestras con un valor medio de $4.46 \mu\text{mol/g}$. la acumulación de este metabolito coincide con los resultados obtenidos por JONES y MURRAY (1962) en bacalao, los correspondientes al estudio de GILL y col. (1984) también en atún y los obtenidos por SHIRAI y col (1987) en salmón. De echo el IMP resulta siempre el metabolito mayoritario de los compuestos fosforilados en las muestras de pescado salvo en aquellos casos en que es sacrificado por métodos no estresantes en el laboratorio y analizado inmediatamente después (tabla 8).

Los niveles de inosina alcanzados superan a los de hipoxantina, esta circunstancia es fácilmente explicable considerando en carácter de formador de inosina tradicionalmente asignado al atún (EHIRA y UCHIYAMA, 1973). En este tipo de pescado la actividad enzimática capaz de transformar la inosina en hipoxantina es muy débil por lo que antes de la proliferación bacteria es difícil que se alcancen niveles altos de este compuesto.

El contenido en ATP y derivados de estas muestras donde domina el IMP y se la hipoxantina no supera a la Inosina reflejando la existencia de una poco importante colonización del músculo por parte de las bacterias está en consonancia con bajos niveles de aminas biógenas detectados en muestras de atún fresco.

Tabla... Contenidos de ATP y derivados en muestras de atún fresco

	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
1	ND	0.22	0.07	2.83	2.63	3.52
2	0.19	0.21	0.13	4.32	2.77	0.08
3	ND	0.15	0.09	4.42	3.05	ND
4	0.13	0.17	0.11	5.83	2.39	ND
5	0.10	0.20	0.18	5.75	1.66	2.54
6	0.06	0.09	0.11	3.28	2.29	0.83
7	ND	0.18	0.13	2.47	3.74	0.55
8	ND	0.13	0.17	5.86	3.37	2.14
9	ND	0.07	0.21	2.45	1.77	5.42
10	ND	0.05	0.16	6.71	0.90	ND

Los contenidos de ATP y sus metabolitos en las muestras de boquerón fresco resultaron muy semejantes a los de las muestras de atún y se indican en la tabla

Los contenidos de ATP, ADP y AMP, resultaron como en las muestras correspondientes al atún fresco y también en este caso en IMP parece comportarse como metabolito mayoritario.

Aunque el boquerón es un pescados de menor tamaño al que se le ha atribuido una elevada actividad enzimática (MARTINEZ y GILBERT, 1988) y se deteriora con facilidad tampoco desde el punto de vista del contenido en ATP y derivados como sucedía con el contenido en aminas biógenas las muestras de boquerón adquiridas en el mercado podrían considerarse como menos fresca que las de atún.

Esta mayor facilidad de deterioro de boqueron se había puesto de manifiesto tanto en el estudio de almacenamiento descomposición de este pescado, donde transcurridos períodos de tiempo semejantes se alcanzaban niveles de aminas biógenas y de hipoxantina superiores a los alcanzados en el ensayo efectuado con atún, como tras el estudio del contenido de estos compuestos en la materia prima empleada en la elaboración de anchoas y conservas de atún que resultaba menos fresca en el primer caso.

Tabla... Contenidos de ATP y derivados ($\mu\text{g/g}$) en muestras de boquerón fresco

	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
1	ND	0.20	0.50	2.50	2.65	1.55
2	ND	0.18	0.25	4.42	0.91	0.08
3	ND	0.25	0.33	5.10	3.10	2.80
4	ND	0.30	0.10	4.20	1.22	2.10
5	ND	ND	0.25	5.10	1.22	0.85
6	ND	0.35	0.16	4.70	2.30	0.90
7	ND	0.10	0.07	3.22	3.37	0.50
8	0.02	0.15	0.13	2.85	3.29	1.80
9	ND	0.20	0.09	2.80	3.05	4.22
10	0.10	ND	0.21	4.90	3.75	0.10

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. DETERMINACION DE AMINAS BIOGENAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

- Se ha desarrollado un método cromatográfico para la determinación de **histamina, tiramina, serotonina, β -feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina, agmatina, espermina y espermidina** en pescado fresco y derivados
- La separación de los analitos se consigue mediante una columna de fase reversa (C₁₈) y empleando la técnica de la supresión iónica mediante la aplicación de un gradiente con fases móviles constituidas por tampón acetato incorporando octanosulfonato sódico y acetonitrilo.
- Se proponen dos gradientes distintos de elución cromatográfica. Con el primero se consigue la separación de los 10 analitos en menos de una hora. El segundo, indicado para matrices más complejas como las constituidas por productos que como las semiconservas de anchoa han sufrido procesos de proteolisis y presentan mayores interferencias, resuelve satisfactoriamente los analitos en aproximadamente 70 minutos.
- Tras la separación cromatográfica de los pares iónicos formados por los analitos y ácido octanosulfónico. Se efectúa una derivatización post-columna con ortoftalaldehido- β mercaptoetanol. La detección se realiza por lectura de la intensidad de fluorescencia de los derivados amina-OPT formados.
- La preparación de la muestra consta solamente de la obtención de un extracto ácido a partir del pescado y su filtración (0,45 μ) para ser inyectado en el cromatógrafo.
- La validez del método se ha estudiado en términos de **linealidad, precisión, exactitud, y límite de detección** resultando adecuada en todos los casos.

2. DETERMINACION DE ATP Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

- Se han desarrollado dos métodos para la determinación de **ATP, ADP, AMP, IMP, Inosina e Hipoxantina**.

Metodo I

Se basa en el descrito por RYDER y col (1984) y comprende la separación de los analitos en una columna de fase reversa (C_{18}) empleando una fase móvil constituida por tampón fosfato (pH=7) y metanol. La detección se realiza por absorción al UV a 254 nm.

Esté metodo resulta adecuado para la determinación de ATP y sus compuestos de degradación en pescado fresco y en derivados que no hayan sido sometidos a tratamiento térmico.

Metodo II

Comprende la separación de los analitos en una columna de fase reversa (C_{18}) empleando la técnica de supresión iónica con una fase móvil constituida por tampón fosfato (pH=7) que incorpora un reactivo de carácter básico, sulfato de tetrabutilamonio y metanol. La detección se realiza por absorción al UV a 254 nm.

Esté metodo resulta adecuado para la determinación de ATP y sus compuestos de degradación en pescado fresco y en derivados hayan sido o no sometidos a tratamiento térmico.

La **preparación de la muestras** coincide en ambos casos y consta solo de la obtención de un extracto ácido, su neutralización y posterior filtración.

- La validez del método se ha estudiado en términos de **linealidad, precisión, exactitud, y limite de detección** resultando adecuada en todos los casos y muy semejante en los dos métodos propuestos.
- Se comprobó la estabilidad de los patrones de ATP, ADP, AMP, IMP, inosina e Hipoxantina en diversos medios y temperaturas de almacenamiento.

a) Soluciones patrón: El tampón fosfato a pH neutro (7 y 7.8) resultó el medio en que los analitos fueron más estables a temperatura de refrigeración (durante 50 días), en comparación con el resto de medios ensayados (HCl, HClO₄ y H₂O).

b) Extractos perclóricos de las muestras: Se comprobó que estos extractos resultaban estables mantenidos en congelación durante un período de 26 semanas, por el contrario la concentración de los analitos se modificaba cuando los extractos eran mantenidos en refrigeración.

c) Muestras trituradas y homogeneizadas: La concentración de ATP y derivados se mantuvo constante durante las 28 semanas que se prolongó el estudio en muestras mantenidas en congelación.

3. DETERMINACION DE TRIMETILAMINA Y DIMETILAMINA EN MUESTRAS DE PESCADO Y DERIVADOS.

- Se ha desarrollado un método para la determinación de **trimetilamina** y **dimetilamina** por cromatografía de gases, con una columna de relleno (Carbopack B 60/80 ,4% Carbowax 20, 0.8% KOH) de 2 metros de longitud, empleando Helio como gas portador y un detector de ionización de llama (FID).
- La preparación de la muestra consta de la obtención del extracto ácido su alcalinización y posterior extracción con un disolvente orgánico.
- La validez del método se ha estudiado en términos de **linealidad**, **precisión**, **exactitud**, y **límite de detección** resultando adecuada para ambos analitos.

4. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS Y OTROS PARÁMETROS QUÍMICOS DURANTE EL PROCESO DE ALMACENAMIENTO/ DETERIORO DEL BOQUERON

- 4.1 El comportamiento de las aminas biógenas resultó muy semejante a las dos temperaturas de estudio ensayadas, 8°C y 20°C, aunque obviamente, transcurridos períodos de tiempo semejantes los niveles de aminas biógenas alcanzados resultaban superiores en el segundo caso.

- **Serotonina, espermina, y espermidina** no presentaron ninguna clara tendencia evolutiva a lo largo del tiempo de almacenamiento manteniéndose sus niveles muy semejantes a los determinados en las muestras iniciales.

- **Histamina**, resultó la amina biógena de formación mayoritaria, seguida en orden de importancia, en función de los niveles alcanzados por, **Cadaverina, tiramina y putrescina**

- **Agmatina**, presentó un comportamiento singular que aumentó de forma importante durante la primera fase de deterioro del pescado, alcanzando niveles semejantes a los de histamina, pero luego disminuyó bruscamente mientras los niveles resto de aminas biógenas se mantenían aún elevados.

- **β -feniletilamina y triptamina** se forman en cantidades mucho menores y atrasadas en el tiempo con respecto al resto de las aminas biógenas.

En el caso de las aminas biógenas, en cuyos contenidos se observa una clara tendencia a aumentar con el tiempo de almacenamiento, su evolución se ajusta a un modelo de regresión de tipo curva exponencial, en caso de formación moderada y a una curva de tipo multiplicativo que refleja una fase de estabilización final cuando se alcanzan niveles muy elevados.

4.2 Como en el caso aminas biógenas, la evolución de los contenidos de **ATP** y sus productos de degradación hasta convertir en mayoritarios los últimos de la secuencia degradativa, resultó muy semejante a las dos temperaturas de estudio ensayadas, 8°C y 20°C, aunque obviamente, estos cambios se verifican a mayor velocidad en el segundo caso:

- Los contenidos de **ATP, ADP, y AMP** resultaron muy bajos incluso en las muestras iniciales por lo que no fue posible estudiar su evolución durante el almacenamiento.

- **IMP** resultó el metabolito mayoritario en las muestras iniciales y su contenido descendió a lo largo del tiempo de estudio.

- El contenido en **hipoxantina** aumentó de forma gradual durante todo el tiempo de estudio.

- Los niveles de **Inosina**, metabolito intermedio entre **IMP** e hipoxantina, aumentaron durante la primera fase del deterioro y disminuyeron al final. Este comportamiento es atribuible a que a partir de un determinado momento la formación de inosina a partir de **IMP** por parte de enzimas del

propio pescado es superada por su transformación en hipoxantina paso en el que también puede intervenir la actividad enzimática de los microorganismos.

- 4.3 No se observa formación de **dimetilamina** a lo largo de todo el período de estudio, ni en las muestras almacenadas a 8°C ni en las almacenadas a 20±1°C. Se aprecia, sin embargo, la formación de **trimetilamina** que alcanza transcurridos períodos de tiempo semejantes, niveles más elevados en las muestras mantenidas a 20±1°C, en las que al final del estudio, como ocurría en el caso de las aminas biógenas formadas en mayor cantidad, se observa un cierto efecto de saturación.

5. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS Y OTROS PARÁMETROS QUÍMICOS DURANTE EL PROCESO DE ALMACENAMIENTO/ DETERIORO DEL ATÚN. RELACIÓN CON LOS MICROORGANISMOS Y LA VALORACIÓN ORGANOLEPTICA

- 5.1 No se observaron diferencias apreciables entre las tres zonas anatómicas del atún consideradas, en ninguno de los parámetros estudiados.

- 5.2 El comportamiento de las aminas biógenas resultó muy semejante a las tres temperaturas de estudio ensayadas, 0°C, 8°C y 20°C, aunque obviamente, transcurridos períodos de tiempo semejantes los niveles de aminas biógenas alcanzados resultaban superiores en el último caso.

- **Serotonina, espermina, y espermidina** no presentaron ninguna clara tendencia evolutiva a lo largo del tiempo de almacenamiento manteniéndose sus niveles muy semejantes a los determinados en las muestras iniciales.

- **Histamina**, resultó de nuevo como en el caso del boquerón, la amina biógena de formación mayoritaria, seguida en orden de importancia, por la magnitud de los niveles alcanzados por **Cadaverina, tiramina y putrescina**

- **Agmatina** presentó también en este caso un comportamiento singular ya que aumentó de forma importante durante la primera fase de deterioro del pescado, alcanzando niveles semejantes a los de histamina, pero luego disminuyó bruscamente, mientras que los niveles de aminas del resto de aminas biógenas se mantenían todavía elevados.

- **B-feniletilamina y triptamina** se formaron en cantidades mucho menores y atrasadas en el tiempo con respecto al resto de las aminas biógenas.

- En las aminas biógenas, en cuyos contenidos se observa una clara tendencia a aumentar con el tiempo de almacenamiento, esta evolución se ajusta a un modelo de regresión de tipo curva exponencial en caso de formación moderada y a una curva de tipo multiplicativo que refleja una fase de estabilización final cuando se alcanzan niveles muy elevados.

- Con la excepción de la coincidencia entre el incremento de la flora contabilizada como flora formadora de histamina y la aparición de este compuesto en cantidades superiores a las de la muestra inicial a las tres temperaturas de estudio, no fue posible establecer ninguna relación clara entre un determinado tipo de microorganismos, y la formación de cada una de las aminas biógenas, sino que todo parece indicar, que la formación de estos compuestos es debida a la acción conjunta del total de la flora causante del deterioro del pescado que prolifera con mayor facilidad cuando mayor es la temperatura de almacenamiento.

- La valoración organoléptica verificó el carácter de aminas de formación tardía asignado a la β .feniletilamina y triptamina, puesto que en muestras al límite del rechazo se detectaban todavía en cantidades muy bajas.

- En las muestras mantenidas a 8 y 20°C el nivel máximo alcanzado por la agmatina, antes de su pronunciado descenso, coincide en el tiempo con el límite de aceptación organoléptica mientras que en muestras mantenidas a 0°C el rechazo organoléptico aparece retrasado con respecto a este máximo. El que el descenso de la agmatina se produzca cerca del límite de aceptación organoléptica o incluso antes, imposibilita su utilidad como indicador químico para evaluar el estado higiénico sanitario del pescado. Un indicador de este tipo debe resolver las dudas que presente el examen organoléptico que generalmente se dan en muestras que se encuentran en el límite de aceptación y en este límite el contenido de agmatina formada durante el proceso de deterioro del pescado podría haber empezado a descender.

5.3 Como en el caso de las aminas biógenas la evolución, de los contenidos de ATP y sus productos de degradación hasta convertir en mayoritarios los últimos de la secuencia degradativa, resultó muy semejante a las dos temperaturas de estudio ensayadas, 0°C, 8°C y 20°C, aunque obviamente, estos cambios se verifican a mayor velocidad en el segundo caso.

- Los contenidos de **ATP**, **ADP**, y **AMP** resultaron muy bajos incluso en las muestras iniciales, por lo que no fue posible estudiar su evolución durante el almacenamiento.

- **IMP** resulto el metabolito mayoritario en las muestras iniciales y su contenido descendió a lo largo del tiempo de estudio.

- El contenido en **hipoxantina** aumenta de forma gradual durante todo el tiempo de estudio.

- Los niveles de **Inosina**, metabolito intermedio entre IMP e hipoxantina, aumentaron durante la primera fase del deterioro y disminuyeron al final. Este comportamiento es atribuible a que, a partir de un determinado momento, la formación de inosina a partir de IMP por parte de enzimas del propio pescado es superada por su transformación en hipoxantina, paso en el que también puede intervenir la actividad enzimática de los microorganismos.

5.4 No se observa formación de **dimetilamina** a lo largo de todo el período de estudio, ni en las muestras almacenadas a 0°C ni en las almacenadas a 8 y 20°C. Se aprecia sin embargo la formación de **trimetilamina** que alcanza transcurridos períodos de tiempo semejantes niveles más elevados en las muestras mantenidas a 20°C.

6. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS Y OTROS PARÁMETROS QUÍMICOS EN MUESTRAS DE ATÚN MANTENIDAS A 0°C, 8°C Y 20°C Y CONTAMINADO EXPERIMENTALMENTE CON CEPAS SELECCIONADAS

6.1 En las muestras control (músculo de atún obtenido en condiciones de esterilidad y no contaminado con ningún microorganismo) únicamente se detectaron niveles importantes de las **aminas biógenas** consideradas como fisiológicas, presentando un comportamiento análogo en las tres temperaturas ensayadas.

- Tanto en las series de muestras contaminadas con *Plesiomonas shigelloides* como con *Serratia marcescens* se detectaron principalmente **serotonina** y **cadaverina**. En el contenido de la primera no se observaba evolución a lo largo del tiempo mientras que ello sí sucedía en el caso de la cadaverina, que se formaba en las muestras mantenidas a 8 y 20°C no alcanzándose niveles muy distintos en ambas temperaturas aunque el crecimiento bacteriano fue mayor a 8 °C.

- En las muestras contaminadas con *Klebsiella oxytoca* se observó la formación de tiramina cadaverina e histamina y *Proteus morgani* se reveló como el principal formador de histamina de las cuatro especies estudiadas, pero sin dar origen a ninguna otra amina. En ambos casos se observa una mayor formación de aminas biógenas y un mayor crecimiento bacteriano a 20°C.

- En todas las series de muestras estudiadas se observó una mejor correlación entre los niveles de aminas biógenas respecto al tiempo de almacenamiento que respecto a la evolución de los niveles de la población bacteriana.

6.2 Respecto a los niveles de **ATP y derivados** destaca el comportamiento de la serie control, que resultó distinto del resto de las series. En estas muestras el IMP fue el metabolito mayoritario y sus niveles solo se modificaron sensiblemente a lo largo del período de estudio.

- En todas las series contaminadas con microorganismos se observó un comportamiento similar, niveles de IMP inferiores a los de la serie control y presencia de hipoxantina (no detectada en la serie control).

- Se observaron diferencias en cuanto a la temperatura. Así las series contaminadas con *Plesiomonas shigelloides* y *Serratia marcescens*, dieron lugar con mayor rapidez a la conversión de ATP en sus derivados a 8°C, mientras que las contaminadas con *Klebsiella oxytoca* y *Proteus morgani* lo hicieron a 20°C.

- En las muestras de la serie control se obtuvieron niveles de **TMA** bajos y niveles de **DMA** aún inferiores y los contenidos de ambas sustancias se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo a las tres temperaturas de estudio.

- En ninguna de las series contaminadas con microorganismos se observó formación de DMA, tal como sucedía en el control. En ningún caso se apreció una formación importante de TMA, que aunque es de origen bacteriano no se ha relacionado tradicionalmente con ninguna de las cuatro especies bacterianas estudiadas. Si se observó sin embargo cierta diferenciación entre especies. Así, las series contaminadas con *Plesiomonas shigelloides* y *Serratia marcescens*, presentaban niveles más altos de esta amina a 8°C y las contaminadas con *Klebsiella oxytoca* y *Proteus morgani* en las que estos se presentaban a 20°C.

6. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS Y OTROS PARÁMETROS QUÍMICOS DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CONSERVAS DE ATÚN. RELACIÓN CON LOS MICROORGANISMOS Y LA VALORACIÓN ORGANOLEPTICA

6.1 Durante todas las etapas que abarca el proceso de elaboración del atún no se aprecia formación de **aminas biógenas**, por lo que contenidos altos de estos compuestos en el producto final deberán atribuirse al empleo de materia prima no óptima.

- Todas las aminas biógenas estudiadas resultan termoestables, de modo que sus contenidos no varían significativamente tras las etapas que conllevan la aplicación de calor a excepción de **espermina** y **espermidina** que descienden tras la esterilización.

- Los contenidos de aminas biógenas indicadoras del deterioro resultaron muy bajos tanto en muestras correspondientes a la materia prima como a lo largo de todo el proceso de elaboración y en el producto final. También desde el punto de vista de la calificación organoléptica y con los recuentos microbiológicos se obtienen resultados semejantes que coinciden en calificar todas las muestras como de óptima calidad.

6.2 Los niveles de ATP y derivados fueron muy bajos en todas las muestras, resultado el **IMP** el metabolito mayoritario seguido de inosina e hipoxantina.

- Se comprobó la termoestabilidad de hipoxantina, metabolito que como las aminas biógenas ha sido propuesto como indicador de calidad de la materia prima en conservas de pescado.

- Del cálculo de los diversos índices propuestos, basados en la determinación de ATP y derivados, se deduce la idoneidad de aquellos que conceden mayor importancia a los últimos metabolitos de la secuencia, como la relación Ino/Hx o el cociente $IMP/IMP + Ino + Hx$ frente al índice K. Según los resultados obtenidos en el cálculo del índice K, deberían rechazarse todas las muestras que resultaban de excelente calidad considerando la calificación organoléptica, los niveles de aminas biógenas, y los recuentos microbiológicos de la materia prima y en todos los pasos de elaboración hasta antes de la esterilización final .

7. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS Y OTROS PARÁMETROS QUÍMICOS DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA "ANXOVA DE L'ESCALA". RELACIÓN CON LA EVOLUCION DE LA FLORA A LO LARGO DE ESTE PROCESO.

- 7.1 Durante el proceso de elaboración de las anchoas de la escala no se forman cantidades importantes de **aminas biógenas**. Podría pensarse solamente en una pequeña formación residual en el inicio de la fase de maduración, cuando el efecto bacteriostático que la salmuera ejerce sobre la flora responsable del deterioro del pescado no es todavía completo.
- 7.2 Desde el punto de vista de los **recuentos microbiológicos**, tan solo se encuentran diferencias entre muestras de materia prima, boquerón fresco, y el resto, hecho que indica que las modificaciones que sufre la flora por efecto del salmuera se verifican de modo rápido en el período de tiempo comprendido entre los primeros 15 días de maduración.
- 7.3 Se observa una gran variabilidad en el contenido de aminas biógenas entre muestras correspondientes a períodos de maduración equivalentes y parte de esta podría ser atribuible a la vía de elaboración empleada. Así se observan contenidos de aminas biógenas indicadoras del deterioro superiores en aquellos caso en los que el boquerón no se eviscera inmediatamente a la llegada a la planta de modo que la primera parte de la fase de maduración se realiza en presencia de las vísceras.
- 7.4 En el estudio de los derivados de ATP, nuevamente **ATP, ADP, y AMP** se detectaron en cantidades muy bajas, resultando en este caso **inosina e hipoxantina** los metabolitos mayoritarios. Tampoco se observa una clara evolución de estos compuestos a lo largo del tiempo de maduración.

8. EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIOGENAS Y OTROS PARÁMETROS QUÍMICOS DURANTE EL PERÍODO DE VIDA COMERCIAL DE LA "ANXOVA DE L'ESCALA". RELACIÓN CON LA EVOLUCION DE LA FLORA MICROBIANA DURANTE ESTE PERÍODO DE TIEMPO.

- 8.1 De las dos presentaciones de "Anxova de l'Escala" disponibles en el mercado, la presentación limpias en aceite resulta mas inestable desde el punto de vista de la formación de aminas biógenas que las denominadas salmueradas.

- El almacenamiento a temperaturas de refrigeración retrasa la aparición de cantidades importantes aminas biógenas pero no evita su formación si el almacenamiento se prolonga durante períodos de tiempo largos.

- Los niveles de aminas biógenas alcanzados en algunas muestras antes de que finalice su período de validez comercial podrían dar lugar a problemas de tipo toxicológico, para paciente tratados con IMAO o especialmente sensibilizados. Este es el caso de los niveles de histamina, β -feniletilamina y triptamina alcanzados en una de las marcas de anchoas salmueradas objeto de estudio almacenadas a 20°C.

8.2 En las anchoas de la presentación limpias en aceite, además de las tres aminas biógenas anteriores, se verifica la formación de tiramina y los niveles alcanzados para estos compuestos, en muestras mantenidas a 20°C podrían, suponer un riesgo para la población general. De hecho en más de un caso se superan las 2000 $\mu\text{g/g}$ de histamina máximos marcadas por el Real Decreto 1437/92 para este tipo de productos.

8.3 Si bien se observa que la mayor formación de aminas biógenas se da en aquellos casos en que se obtenían recuentos bacterianos superiores, la magnitud de estos no parece resultar suficiente para justificar los altos niveles de aminas biógenas. En la maduración y durante el periodo almacenamiento del producto final se verifican intensos procesos de proteolisis que conducen disponibilidad de precursores mayor que en otros derivados de pescado. Además el hecho de que no exista ningún tratamiento térmico de estabilización permite que los enzimas bacterianos liderados a la muerte de estos pueden seguir actuando incluso en ausencia de los mismos.

9. CONTENIDOS DE AMINAS BIÓGENAS Y DE ATP Y SUS METABOLITOS EN PESCADO FRESCO Y EN DERIVADOS.

9.1 En las muestras de pescado fresco (atún y boquerón) resultaron mayoritarias las aminas biógenas **espermina** y **espermidina**, consideradas fisiológicas.

- A la vista de las contradicciones obtenidas al calificar las muestras por su contenido en aminas biógenas aplicando los criterios de MIETZ y KARMAS (1977) y STARUZKIEWICZ y BOND (1981) se propone utilizar en la valoración, los niveles de histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, β -feniletilamina y triptamina, aminas cuyo aumento se había verificado de modo progresivo tanto durante el proceso de almacenamiento del boquerón como del atún. Para establecer unos límites, sin embargo, serían necesarios estudios más amplios acompañados de las correspondientes evaluaciones organolépticas.

- Los contenidos de aminos en conservas de atún resultaron muy semejantes a los del atún fresco, sin embargo en semiconservas de anchoa los niveles de todas las aminos biógenas indicadoras de deterioro resultaron estadísticamente más altas que en el boquerón.

9.2 Los contenidos de **ATP**, **ADP** y **AMP** resultaron muy bajos en las muestras de atún y de boquerón fresco. Esta circunstancia puede considerarse normal en pescado que mueren en la captura. Solamente es posible detectar niveles altos de estos tres compuestos en aquellos especímenes sacrificados en el laboratorio por métodos no estresantes.

- **IMP** resultó, tanto en atún como en boquerón el metabolito mayoritario seguido de **Inosina** e **hipoxantina**. El dominio de los contenidos de inosina sobre los de hipoxantina verifica la creencia general del carácter de formadores de inosina asignado a estas dos especies de pescado.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ABABOUC, L.; AFILAL, M.E.; BENABDELJELILI, H.; BUSTA, F.F. (1991a). "Qualitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice". Internat. J. Food Sci. Technol., 26: 297-306.
- ABABOUC, L.; AFILAL, M.E.; RHAFIRI, S.; BUSTA, F.F. (1991b). "Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25°C)". Food Microbiol., 8: 127-136.
- AGUSTSSOM, I.; STRØM, A. R. (1981). "Biosynthesis and turnover of trimethylamine oxide in teleost cod, *Gadus morhua*". J. Biol. Chem., 256: 8045-8049
- AKSNES, A. (1988). "Location of enzymes responsible for autolysis in bulk-stored capelin (*Mallotus villosus*)". J. Sci. Food Agric., 44: 263-271.
- AKSNES, A.; BREKKEN, B. (1988). "Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin". J. Sci. Food Agric., 45: 53-60.
- AKSNES, A. (1989). "Effect of proteinase inhibitors from potato on the quality of stored herring". J. Sci. Food Agric., 49: 225-234.
- ALLISON, C; McFARLANE, G.T. (1989). "Influence of pH, nutrient availability, and growth rate amine production by *Bacteriodes fragilis* and *Clostridium perfringens*". Appl. Environ. Microbiol., 55: 2894-2898.
- ALMANDROS, M.E.; GIANNINA, D.H.; CIARLO, A.S.; BOERI, R.L.(1986). "Formaldehyde as an interference of the 2-thiobarbituric acid test". J. Sci. Food Agric., 37: 54-58.
- ANDERSON, F.S.; MURPHY, R.C. (1976). "Isocratic separation of some purine nucleotide, nucleoside, and base metabolites from biological extracts by High-Performance liquid chromatography". J. Chrom., 121:251-262.
- ANONIMO. (1984). " Elección de un antidepresivo". Inf. Ter. Segur. Soc., Diciembre: 240-243.
- ANTONACOPOULOS, N. (1960). "Verbesserte Apparatur zur quantitativen destillation wasserdampf-flüchtiger stoffe". Z. Lebensmittel Untersuch. u. Forsch., 103: 113-116.
- ARAI, K. (1966). "Nucleotides in marine invertebrate muscle". Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 32: 174-179.
- ARNEDO, A.; BELLIDO, J.; CRIADO, J.; PÉREZ, R.; GONZALEZ, L.; SAFONT, L.; MONFORT, G.; CALVO, A. (1989). "Intoxicación alimentaria por escómbrido (atún) en un comedor colectivo de empresa". Medicina Clínica, 93: 641-644.
- ARNOLD, S.H.; BROW, W.D. (1978). "Histamine (?) toxicity from fish products". Advances in Food Research, 24: 113-154.
- ARNOLD, S.H.; PRICE, R.J.; BROW, W.D. (1980). " Histamine formation by bacteria isolated from skipjack tuna, *Katsuwomis pelamis*." Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 46: 991-995.
- BABBIT, J.K.; CRAWFORD, D.L.; LAW, D.K. (1977). " Effect of handling and processing on discoloration of albacore tuna". J Food Sci., 42: 557-559.
- BABBITT, J.K.; KOURY, B.; GRONINGER, H.; SPINELLI, J. (1984). "Observation on reprocessing frozen Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*)". J Food Sci., 49: 323-326.

- BABBITT, J.K.; REPPOND, K.D.; HARDY, A. (1987) "Frozen storage stability on modified pollock *Theragra chalcogramma* blocks containing 15% or 30% minced pollock". J Food Sci., 52: 1191-1193 y 1211.
- BAGER, F.; PETERSEN, G.V. (1983). "The relative precision of different methods of measuring pH in carcass muscles". Nord. Vet. Med., 35: 86-91
- BANWART, J.G. Microbiologia basica de los alimentos. Ed. Anthropus, barcelona.
- BALDINI, V.L.S. (1982). "Aminas biogenas e deterioração do pescado". Bol. ITAL, Campinas, 19: 398-402.
- BALDRATI, G.; FORNARI, M.B.; SPOTTI, E.; INCERTI, I. (1980). "influenza della temperatura sulla formazione d'istamina in pesci ad elevato contenuto d'istidina libera". Industria conserve, 55: 114-122.
- BARANOWSKI, J.D. (1984). "Low-temperature production of urocanic acid by spoilage bacteria isolated from mahimahi (*Coryphanea hippurus*). Appl. Environ. Microbiol., 50: 546-547.
- BARANOWSKI, J.D.; BRUST, P.A. (1984). "Nutritional value of protein from fresh and spoiled mahimahi (*Coryphanea hippurus*). Nutrition reports international, 30: 1337-1342.
- BARANOWSKI, J.D.; BRUST, P.A.; FRANK, H.A. (1985). "Growth of *Klebsiella pneumoniae* UH-2 and properties of its histidine decarboxylase system in resting cell". J. Food Biochem., 9: 349-360.
- BARTOLOMEW, B.A.; BERRY, P.R.; RODHOUSE, J.C.; GILBERT, R.J.; MURRAY, C.K. (1987). "Scombrototoxic fish poisoning in Britain: features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986". Epidemiology and infection, 99: 775-782 en LOPEZ-SABATER, 1992.
- BEATTY, S.A.; GIBBONS, E. (1937). "The measurement of spoilage in fish". J. Biol. Bd. can., 3: 77-91.
- BARANOWSKI, J.D.; BRUST, P.A.; FRANK, H.A. (1984). "Growth of *Klebsiella pneumoniae* UH" and properties of its histidine decarboxylase system in resting cells". J. Food Biochem., 9: 349-360.
- BATTAGLIA, R.; FRÓLICH, D. (1978). "HPLC determination of histamine in wine". J. High Resolut. Chromatogr. Commun., 2: 101-110.
- BEHLING, A.R.; TAYLOR, S.L. (1982). "Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation". J. Food Sci., 47: 1312-1314 y 1317.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. (1988). "Química de los alimentos". (Escobar, E. trad.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- BELTAN, A. (1990). "Control de calidad del pescado ahumado". Alimentaria, Marzo: 27-31.
- BENAIGES-BENAIGES, M.A. (1990). Aminas biógenas en sardina en relación con su calidad higienico sanitaria". Tesina Experimental de Licenciatura. Area de Nutrición y Bromatología. Departamento de Ciencias Fisiologicas Humanas y de la Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- BETHEA, S.; HILLING, F. (1965). "Determination of trimethylamine nitrogen in extracts and in volatile fractions of fish". Journal of the AOAC, 48: 731- 735.
- BEUTLING, D.; SCHEIBNER, G. (1986). "Quantitative untersuchungen zur histaminbildung durch lebensmittelhygienisch relevante mikrobien". Mh. Vet.-Med., 41: 668-670.
- BILLON, J. (1978). "Intoxications alimentaires d'origine histaminique. Etiologia, recherche e dosage de l'histamine". R.T.V.A., 17: 112-116.

- BILLON, J.; OLLIEUZ, N.; TAO, S.H. (1979). "Etude d'une nouvelle dosage de l'azote basique volatil total (ABVT)". R.T.V.A., 149: 13-19.
- BINDER, E.; BRANDL, E. (1983). "Ueber das vorkommen und die bedeutung biogener amine in lebensmitteln". Osterreichische Milchwirtschaft, 38: 257-259.
- BITO, M.; YAMADA, K.; MIKUMO, Y.; AMANO, K. (1983). Studies on the rigor mortis of fish. I. Difference on the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified Cutting's method". Bull Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 109: 89
- BLACKWELL, B. (1963). "Tranlylcipromine". Lancet, 2: 414.
- BLACKWELL, B.; MABBIT, L.A. (1965). "Tyramine in cheese related to hipertensive crises after MAO inhivition". Lancet, May 1: 940-944.
- BLONZ, E.R.; OLCOTT, H.S. (1978a). "Effect of histamine, putrescine and ofcanned spoiled tuna on growth in young japanese quail". J. Food Sci., 43: 1390-1392.
- BLONZ, E.R.; OLCOTT, H.S. (1978b). "*Daphnia magna* as a bioassay system for histamine in tuna extracts". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 44: 517-519.
- BOER, G.; FENNEMA, O. (1989). " Effect of mixin and moisture modification on toughening and dymethylamine formation in Alaska pollock mince during frozen storage at -10°C". J. Food Sci., 54: 1524-1529.
- BOLAND, F.E.; PAIGE, D.D. (1971). " Collaborative study of a method for the determination of trimethylamine nitrogen in fish". Journal of the AOAC, 54: 725-727.
- BREMNER, H.A.; OLLEY, J.; STATHAM, J.A.; VAIL, A.M.A. (1988). "Nucleotide catabolism: Influence on the storage life of tropical species of fish from North West shel of Australia". J. Food Sci., 53: 6-11.
- BRIGGS, D.R.; PARGENTER, K.A. (1979). "Tyramine and other vasoactive amines in food". Proc. Nutr. Soc. Aust., 4: 141.
- BROWN, N.D.; KINTZIOS, J.A.; KOETITZ, S.E. (1979). " Determination of hypoxanthine, xanthine, and uric acid in biological fluids by ion-pair High- Performance Liquid Chromatography". J. Chrom., 177: 170-173.
- BRULÉ, D.; SAWARD, G.; SAVOIE, L.(1989). "Effect of method of cooking on free and total purine bases in meat and fish". Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 12: 248-251.
- BURGESS, G.H.O.; CUTTING, C.L.; LOVERNAJA, J.; WATERMAN, J.J. (1979). " El pescado y las industrias derivadas de la pesca". (Lopez-Lorenzo, V.; Barrado, M. Tra). Ed. Acribia, Zaragoza.
- BURNS, B.G.; KE, P.J. (1985). "Liquid chromatographic determination of hypoxanthine content in fish tissue". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68: 444-448.
- BURT, J.R.; SIMMONDS, C.K. (1971) "Hypoxantine as an indicator of freshnes in iced cape hake before freezing and after thawing" en: KREUZER, R. (Ed.) "Fish inspection and quality control". Ed. Fishing New (Books) Limited, London. 290pp
- BUTEAU, C.; DUISCHAEVER, C.L. (1984). "High performance liquid chromatographic detection and quantitation of amines in must and wine". J. Chromatogr., 284: 210-220.

BUTEAU, C.; DITSCHAEVER, C.L.; ASHTON, G.C. (!)(\\$). "A study of the biogenesis of amines in a Villard noir wine". Am. J. Enol. Vitic., 35: 228-236.

CABANIS, J.C. (1985). "L'histamine et sa toxicité". Bulletin de l'O.I.V., : 656-657.

CALARESU, G.; MANCUSO, R.; ALAMANNI, M.C.; DE LUCA, G. (1984). "Stato di freschezza dei prodotti ittici surgelati posti regolarmente in commercio". Boll. Chim. Igien., 35: 51-57.

CARLUCCI, F.V.; KARMAS, E. (1985). "Liquid chromatographic determination of some amines and their amino acid precursor in protein foods". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71: 564-568.

CASTELL, C.H.; BISHOP, D.M.; NEAL, W.E. (1968). "Production of trimethylamine in frozen cod muscle". J. Fish. Res. Bd. Canada, 25: 921-933.

CASTELL, C.H.; NEAL, W.; SMITH, B. (1970). "Formation of dimethylamine instored frozen sea fish". J. Fish. Res. Bd. Canada, 27. 1685-1690.

CASTELL, C.H.; SMITH, B.; NEAL, W. (1971). "Production of dimethylamine in muscle of several species of gadoid fish during frozen storage, especially in relation to presence of dark muscle". J. Fish. Res. Bd. Canada, 28: 1-5.

CASTELL, C.H.; BISHOP, D.M.; NEAL, W. (1973). "Effects of formaldehyde on salt extractable proteins od gadoid muscle". J. Fish. Res. Bd. Canadá, 25: 921-933.

CASTRO_CELS, M.; GASCON-FLORA, S.; PUJOL-FORN, M.; SANS-ROCA, J.M.; VICENTE-PLA, LL. (1989). Validación de métodos analíticos. 96 pp. Monografía de la AEFI (Comisión de Normas de Buena Fabricación y Calidad). Editado bajo el patrocinio de Hewlett Packard, Barcelona.

CATTANEO, P.; d'AUBERT, S.; CANTONI, C.; GAMARASCHI, V.; BERSANI, C. (1984). "Istamine e batteri istaminoproduttori nelle carni di pesce". Industria alimentare, guigno: 510-515.

CENTRO DE INSPECCION Y COMERCIO EXTERIOR. (1986). "Bases volátiles totales: método de Lücke y Geidel, modificado por Antonacopoulos". Cursillo de Inspección de Pescado. Vigo, Marzo 1986: 37-38.

CHAMBERS, T.L.; STARUSZKIEWITCZ, W.F. (1978). "Fluorometric determination of histamine in cheese". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61: 1092-1097.

CHANDER, H.; BATISH, V.K.; BABU, S; SISGH, R.S. (1989). "Factors affecting amina production by selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*". J. Food Sci., 54: 940-942.

CHANG, O.; CHEUK, W.L.; NICKELSON, R.; MARTIN, R.; FINNE, G. (1983). "Indole in shrimp: effect of fresh storage temperature freezing and boiling". J. Food Sci., 48: 813-816.

CHANG, S.F.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.E. (1985). "Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophane". J. Dairy Sci., 68: 2840-2846.

CHANG, C.M.; OHSHIMA, T.; WADA, S. (1989). "Influences of freeze-thawing process on the quality of mackerel during storage at -1°C". Nippon Suisan Gakkaishi, 55: 2129-2135.

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H. (1980). "Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos (I)". (López Capont, F. tra.). 65-97 pp. Ed. Acribia, Zaragoza.

CHEN, C.M.; WEI, C.I.; KOBURGER, W.S.; OTWELL, W.S.; MARHALL, M.R. (1989). "Comparison of four agar medis for detection of histamine producing bacteria in tuna". J. foof Protec., 52: 808-813 en LÓPEZ-SABATER

CHIOU, T.K.; KONUSU, S. (1988). "Changes in extractive components during processing of dried mullet roe". Nippon Suisan Gakkaishi, **54**: 307-313.

CHIOU, T.K.; MATSUI, T.; KONUSU, S. (1989). "Comparison of extractive components between raw and salted Alaska pollack roe (Tarako)". Nippon Suisan Gakkaishi, **55**: 515-519.

CHIOU, T.K.; SHIAU, C.Y.; CHAI, T.J. (1990). "Extractive nitrogenous components of cultured milkfish and tilapia". Nippon Suisan Gakkaishi, **56**: 1313-1317.

CHU, C.H.; BJELDANES, L.F. (1981). "Effect of diamines, poliamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro". J. Food Sci., **47**: 79-80 y 88.

CLIFFORD, M.N.; WALKER, R.; WRIGHT, J.; HARDY, R.; MURRAY, C.K. (1989). "Studies with volunteers on the role of histamine in suspected scombrototoxicosis". J. Sci. Food Agric., **47**: 365-375.

CLIFFORD, M.N.; WALKER, R.; IJOMAH, P.; WRIGHT, MURRAY, C.K.; HARDY, R. (1991). "Is there a role for amines other than histamines in the aetiology of scombrototoxicosis?". foods additi and contaminants, **8**: 641-652.

COGUL-ARDEVOL, B. (1988). "Tiramina en pescados: contenidos y relación con el deterioro". Tesina de licenciatura. Dpto. de Ciencias Fisiológicas humanas y de la Nutrición. Area de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

CONNEL, J.J. SHEWAN, J.M. (1980). "Sensory and non-sensory assessment of fish". CONNELL, J. J. (ed). "Advances in fish science and technology". Paper presented at the Jubilee Conference of the Torry Research Station Aberdeen, Scotland, 23-27 July 1979. Ed. Fishing News (books) Ltd, Suney, England. 511 pp.

CONNEL, J.J. Control of fish quality. Ed. Fishing New (Books) Ltd, Surrey, Reino Unido.

COMMITTEE ON FOOD PROTECTION. FOOD AND NUTRITION BOARD. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1985). "An evaluation of the role of microbiological criteria for food evaluation and food ingredients": 7, 8, 21, 25, 77, 92-103, 119, 127-131, 149, 163, 249-254. Ed. National Academy Press, Washington, D.C.

CROOK, m. (1981). "Migraine: a biochemical headache". Biochemical Society transactions, **9**: 351-357.

CRUICKSHANK, J.G.; WILLIAMS, H.R.(1978). "Scombrototoxic fish poisoning". British Medical Journal, **2**: 739-740.

CURRIE, R.W.; SPORNS, P. ; WOLFE, F.H. (1982). "A method for the analysis of ATP metabolites in beef skeletal muscle by HPLC". J. Food Sci., **47**: 1226-1228 y 1234.

DEL PRETE, U.; AMODIO, R.; MONTARO, D. (1979). "Sul contenuto in istamina di alcuni prodotti alimentari". Revista della Società Italiana di Scienza dell' Alimentazione, **8**:281-285.

DERRACHE, R. (Ed.). Toxicología y seguridad de los alimentos". (Boix, E, Trad). Ed. Omega, Barcelona.

DOEGLAS, H.; HUISMAN, J.; NATER, J. (1967). "Histamine intoxication after cheese". Lancet, **December 23**: 1361-1362.

DOLLERY, C.T.; BROWN, M.J.; DAVIES, D.S.; LEWIS, P.J.; STROLIN-BENEDETTI, M. (1983). "Oral adsorption and concentration effect relationship of tyramine with and without cimoxatone, a tipe-A specific inhibitor of monoamine oxidase". Clin. Pharmacol. ther., **34**:651-661.

DONDERO, M.L.; CLAVERIA, N.; FERNANDEZ, M.V. (1982). Rev. Agroquím. Technol. Aliment., 22: 257 en FLETCHER y col, 1990.

DOWDEN, H.C. (1938). "The determination of small amounts of dimethylamine in biological fluids". Biochemical Journal, 32: 455-459.

DUNN, S.R.; SIMENHOFF, M.L., WESSON, L.G. (1976). "Gas chromatographic determination of free mono-, di-, and trimethylamines in biological fluids". Anal. Chem., 48: 41-44.

DYER, W.J. (1945). "Amines in fish muscle. I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt". J. Fish. Res. Bd. Canada, 6: 351-358.

DYER, W.J.; MOUNSEY, Y. (1945). "Amines in fish muscle II. Development of trimethylamine and other amines". J. Fish. Res. Bd. Canada, 6: 359-367.

DYER, W.J. (1959). "Report on trimethylamine in fish". Journal of de AOAC, 42: 292-294.

DYER, W.J.; DINGLE, J.R. (1961). "Fish proteins with special reference to freezing" en cap. 9 de : BOSTROM, G., Fish as Food I.

DYER, W.J. (1962). Amines in fish muscle. VI. Trimethylamine oxide of fish and marine invertebrates. J. Fish. Res. Bd. Ca., 8: 314-324.

EASTER, M.C.; GIBSON, D.M.; WARD, F.B. (1983). "The induction and location of trimethylamine-N-oxide reductase in *Alteromonas* sp. NCMB 400". J. Gen. Microbiol., 129: 3689-3696.

EDMUND, W.J.; EITENMILLER, R.R. (1975). "Effect of storage time and temperature on histamine content and histidine decarboxylase activity of aquatic species". J. Food Sci., 40: 616-519.

EDWARDS, S.T.; SANDINE, W.E. (1981). "Public health significance of amines in cheese". J. Dairy Sci., 64: 2431-2438.

EGAN, H.; KIRK, R.S.; SAWER, R. (1987). "Análisis químico de los alimentos de Pearson". (Hidalgo Mondragón, M.C., trad.). Ed. Acribia, Zaragoza.

EHIRA, S.; UCHIYAMA, H. (1973). "Formation of inosine and hypoxanthine in fish muscle during ice storage". Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 75: 63-73.

EHIRA, S. (1976). "A biochemical study on the freshness of fish". Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 88 (12): 1-13.

EHIRA, S.; UCHIYAMA, H. (1985). "Determination of fish freshness using K value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness". en Seafood quality determination. Proceedings of an international Symposium Coordinated by the University of Alaska. Ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

EHRENBERG, A.S.C.; SHEWAN, J.M. (1953). "The objective approach to sensory test of food". J. Food Agri., 4: 482-490.

EITENMILLER, R.R.; WALLIS, J.W.; ORR, J.H.; PHILLIPS, R.D. (1981). "Production of histidine decarboxylase and histamine by *Pruteus morganii*". J. Food Protec., 44: 815-820.

EITENMILLER, R.R.; De SOUZA, S.C. (1984). "Enzymatic mechanisms for amine formation in fish". A. ACS Symposium series., 262, Seafood Toxins: 432-442. American Chemical Society, EEUU.

FAO/WHO (1968). "Method for the determination of total volatile basic nitrogen (TVB) in fish muscle.

Presented to Codex Committee on Fish and Fishery Products, 3rd session, Bergen, 7-11 October, as Codex Fish 1/7, 9pp.

FAO (1969). "The FAO Technology Congress on fish Inspection and Quality Control". Halifax, Canadá, July 1969. FAO Fisheries Reports, 8:15-25.

FARDIAZ, D.; MARKAKIS, P. (1979). "Amines in fermented fish paste". J. Food Sci., 44: 1562-1563.

FARRERAS, P.; ROZMAN, C. (1978). Medicina interna. Ed. Marín, Barcelona.

FERNANDEZ-SALGUERO, J.; MACKIE, I.M. (1979). "Histidine metabolism in mackerel (*Scomber scombrus*). Studies on histidine decarboxylase activity and histamine formation during storage of flesh and liver under sterile and non-sterile conditions". J. Food Technol., 14: 131-139.

FERNANDEZ-SALGUERO, J.; MACKIE, J.M. (1987). "Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and herring (*Clupea arengus*) as determined by the formation of non-volatile and volatile amines". Internat. J. Food Sci. Technol., 22: 385-390.

FIDDLER, W.; DOERR, R.C.; GATES, A.R. (1991). "Gas chromatographic method for determination of dimethylamine, trimethylamine, and trimethylamine oxide in fish-meat frankfurters". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 74: 400-403.

FINE, D.H. (1977). I.A.R.C. Publicaciones en DERACHE, 1990.

FLETCHER, G.C.; BREMNER, H.A.; OLLEY, J.; STATHAM, J.A. (1990). "Umami revisited: the relationship between inosine monophosphate, hypoxanthine and smiley scales for fish flavor". Food Reviews International, 6: 489-503.

FLETCHER, G.C.; HODGSON, J.A. (1988). "Self-life of sterile snapper (*Chrysophrys auratus*)". J. Food Sci., 53: 1327-1332.

FLETCHER, G.C.; STATHAM, J.A. (1988). "Shelf-life of sterile yellow-eyed mullet (*Aldricheta fosteri*)". J. Food Sci., 53: 1030-1053.

FLETCHER, G.C.; STATHAM, J.A. (1988b). "Deterioration of sterile chill-stored and frozen trumpeter fish (*Latridopsis fosteri*)". J. Food Sci., 53: 1336-1339.

FLORES, H.E. (1983). Tesis Doctoral. Yale University, USA.

FLOREZ, J.A.; MEDIAVILLA, A. (1987). Farmacología Humana. Tomo I. Ed. Eunsa, Pamplona.

FOO, L.Y. (1976). "Scombroid poisoning. Isolation and identification of "saurine"". J. Sci. Food Agric., 27: 807-810.

FOO, L.Y. (1977). "Simple and rapid paper chromatographic method for the simultaneous determination of histidine and histamine in fish samples". Journal of the A.O.A.C., 60: 183-185.

FORSYTHE, W.I.; REDMONS, A. (1974). "Histamine formation in tuna". En ACS Symposium Series n° 262. Seafood Toxins: 443-451. American Chemical Society.

FRANK, H.A.; YOSHINAGA, D.H.; NIP, W.K. (1981). "Histamine formation and honeycombing during decomposition of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, at elevated temperatures". Marine fisheries review, 43: 9-14.

FRANK, H. A.; YOSHINAGA, D.H. (1984). "Histamine formation in tuna". ACS Symposium series, 262: Seafood toxins. 443-451.

FRANK, H.A. (1985). "Histamine forming bacteria in tuna and other marine fish". En (PAN, B.S.; JAMES, D. ed.) Histamine in marine products: production of bacteria, measurement and prediction formation. FAO Fish. Tech. Pap., 252pp.

FRANK, H.A.; BARANOWSKI, J.D.; CHONGSIRIWATA, M; BRUST, P.A.; PREMARATNE, R.J. (1985). "Identification and decarboxylase activities of bacteria isolated from decomposed mahimahi (*Coryphaena hippurus*) after incubation at 10°C and 23°C". International J. Food Microbiol., 2: 331-340.

FRASER, D.I.; PITTS, D.P.; DYER, W.J. (1968). "Nucleotide degradation and organoleptic quality in fresh and thawed mackerel muscle held at above ice temperature ". J. Fish. Res. Bd. Canada, 25: 239-253.

FRITSCH, P.; De SAINT BLANQUANT, G. (1985). "Nitrates, nitrites et nitrosamines dans l'alimentation". La Recherche, 16: 1106-1115.

FRÖLICH, D.; BATTAGLIA, R. (1980). "HPLC. Analyse von biogenen aminen in wein". Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 712: 38-44.

FUJII, T.; KITAI, T. (1987). "Determination of trace levels of trimethylamine in air by gas chromatography/surface ionization organic mass spectrometry". Anal. Chem., 59: 379-382.

FUKE, S.; WATANABE, K.; SAKAI, H.; KONUSU, S. (1989). "Extractive components of dried skipjack (*Katsuoobushi*)". Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 36: 67-70.

GALLARDO, J.M.; LOPEZ-BENITO, M.; PASTORIZA, L.; GONZALEZ, P. (1979). "Determinación de bases volátiles en productos pesqueros" Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesqu., 65: 1-17.

GALLARDO, J.M.; MONTEMAYOR, M. (1982). "Métodos generales de analisis utilizados en el examen del pescado y de los productos pesqueros". Inf. Tecn. Inst. Pesqu., 95.

GALLARDO, J.M.; MONTEMAYOR, M.I.; PÉREZ-MARTÍN, R. (1983). "Determinación de histidina e histamina por cromatografía bidimensional en capa fina y densitometría". Rev. Agroquím. Tecnol. Alimen., 23: 132-136.

GALLARDO, J.M.; MONTEMAYOR, M.I.; PÉREZ-MARTÍN, R. (1983). "Formación de histamina en caballa (*Scomber scombrus*) y listado (*Katsuwonus pelamis*), especies de alto contenido en histidina libre". Rev. Agroquím. Tecnol. Alimen., 23: 269-275.

GALLARDO, J.M.; PÉREZ-MARTÍN, R.; FRANCO, J.M.; AUBOURG, S. (1984). "Chemical composition and evolution of nitrogen compounds during the processing and storage of canned albacore (*Thunnus albacora*)". Proc. M.O.C.C.A., 1: 51-58.

GALLARDO, J.M.; PÉREZ-MARTÍN, R.; SOTELO, C.G.; AUBOURG, S.; BANGA, J.R. (1991) "Evolución de aminas volátiles en dos tipos de merluza (*Merluccius australis* y *Merluccius capensis*) y en rosada (*Xiphiurus capensis*) durante el almacenamiento a -18°C". Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 31: 103-110.

GARCIA-MORENO, M.C. (1981). "Serotonina en alimentos: métodos de análisis y distribución en alimentos naturales y manufacturados". Tesis Doctoral. Departamento de Bomatología y Toxicología. facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

GILL, T.A.; THOMPSON, S.W. (1984). "Rapid, automated analysis of amines in seafood by ion-moderate partition HPLC". J. Food Sci., 49: 603-606.

GILL, T.A.; THOMPSON, J.W.; GOULDS, S.; SHERWOOD, D. (1987). "Characterization of quality deterioration in yellowfin tuna". J. Food Sci., 52: 580-583.

GLORIA, M.B.A.; SOARES, V.F.M. (1992). "Histamine level in fish commercialized in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil". IFT Annual Meeting, New Orleans, USA.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; BELTRÁN, A.; MORAL, A. (1992). "El valor K como índice de calidad del pescado. II. Métodos de determinación". Alimentaria, Abril: 29-34.

GÓMEZ, M.C.; CAÑADA, J.; MORAL, A. (1990) "El valor K como índice de calidad del pescado. I. Fundamentos y factores que lo modifican". Alimentaria, 216: 37-45.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; BELTRÁN, A.; MORAL, A. (1992) "El valor K como índice de calidad del pescado. II. Métodos de determinación". Alimentaria, Abril: 29-34.

GONSALVES, A.; STEWART, J.E. (1977). "Possible mechanisms of action of β -phenylethylamine in migraine". J. Pharm., 29: 246.

GOODMAN GILMAN, A.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. (eds)(1986). "Goodman y Hilman. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana, México.

GOUYGOU, J.P.; SINQUIN, C.; DURAND, P. (1987). "High pressure liquid chromatography determination of histamine in fish". J. Food Sci., 52: 925-927.

GREENE, D.H.; BABBIT, J.K.; REPPOND, K.D. (1990) " Patterns of nucleotide catabolism as freshness indicator in flat fish from the gulf of Alaska". J. Food Sci., 55: 1236-1238.

GREENE, D.H.; BERNATT-BYRNE, E.I. (1990) " Adenosin triphosphate catabolites as flavor compounds and freshness indicators in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and pollock (*Theragra chalcogramma*)". J. Food Sci., 55: 257-258.

GROSGROVE, M.D.(1978). "A rapid method for estimating ethanol in canned salmon". J. Food Sci., 43: 641 y 643.

GRUGER, E.H. (1972). "Chromatographic analysis of volatile amines in marine fish". J. Agric. Food Chem., 20: 781-785.

HAALAND, H.; NJAA, L.R. (1988). " Ammonia (NH₃)and total volatile nitrogen (TVN) in preserved and unpreserved stored, whole fish". J. Sci. Food Agric., 44: 335-342

HAN, T.J.; LISTON, J. (1987). "Lipid peroxidation and phospholipid hydrolysis in fish muscle microsomes and frozen fish". J. Food Sci., 52: 294-299.

HANINGTON, E. (1967). "Preliminary report on tyramine headache". Brit. Med. J., 2: 550-551.

HARDY, R.; SMITH, J.G.M. (1976). "The storage of Mackerel (*Scomber scombrus*). Development of histamine and rancidity". J. Sci. Food Agric., 27: 595-599.

HARMSSEN, E.; DE TOMBE, P.; DE JONG, J.W. (1982). "Simultaneous determination of myocardial adenine nucleotides and creatine phosphate by high-performance liquid chromatography". J. Chrom., 230: 131-136. (Biomedical applications...?)

HASHIMOTO, K. (1974). en WATANABE y col. (1987).

HASHIMOTO, K. (1988). "ATP and creatine phosphate breakdown inspired plaici muscle during storage, and activities of some enzymes involved". J. Food Sci., 53: 1662-1665.

HENION, J.K.; NOSANCHUK, J.S.; BILDER, B.M. (1981). "Capillary gas chromatographic-mass spectrofotometric determination of histamine in tuna fish causing scombroid poisoning". J. Chrom., 213: 475-480.

HENRY, M. (1960) "Dosage biologique de l'Histamine dans les aliments". Ann. Fals. Exp. Chim., 1960: 24-33.

HILDRUM, K.I.; SCANLAN, R.A.; LIBBEY, L.M. (1975). "Identification of gamma- butenil -(β -propenil) nitrosamine, the principal volatile nitrosamine formed in the nitrosation of spermidine or spermine." J. Agric. Food Chem., 23: 34-37.

HILDRUM, K.I.; SCANLAN, R.A. (1977). " Factors influencing the rate of formation of volatile N-nitrosamines during the nitrosation of spermidine". J. Agric. Food Chem., 25: 255-257.

HILDRUM, K.I.; SCANLAN, R.A.; LIBBEY, L.M. (1977). " Formation of volatile, hydroxylated, and chlorinated N-nitrosamines during the nitrosation of spermidine 3-hydrochloride". J. Agric. Food Chem, 25: 252-255.

HILLING, F. (1956). "Volatile acids, succinic acid, and histamine as indices of decomposition in tuna". Journal of the A.O.A.C., 39: 773-800.

HILLING, F.L.R.; SHELTON, J.H.; LOUGHREY, J.H.; EISNER, J. (1958). "Chemical indices of decomposition in cod". Journal od the AOAC,43: 763-776.

HILTZ, D.F.; DYER, W.J.; NOWLAN, S.; DINGLE, J.R. (1971) en KREUZER, R. "Fish inspection and quality control". Ed. Fishing New (Books) Limited, London. 290 pp

HIRANO, T.; SUZUKI, T.; SUYAMA, M. (1987). " Changes in extractive components of bigeye tuna and pacific halibut meats by thermal processing at high temperature of F_0 values of 8 to 21". Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 1457-1461.

HOLLINGWORTH, T.A.; THROM, H.R. (1983). " A headspace gas chromatographic method for the rapid analysis of athanol in canned salmon". J. Food Sci., 48: 290-291.

HOLLINGWORTH, T.A.; THROM, H.R.; WECKELL, M.M. (1986a). "Determination of ethanol in canned salmon". Proceedings of an Internatinal Symposium coordinated by the University of Alaska. Sea Grant College Program, Anchorage, Alaska, USA, 10-14 November. Ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

HOLLINGWORTH, T.A.; THROM, H.R.; WECKELL, M.M.; TRAGER, W.F.; O'DONNEL, M.W.(1986b). "Headspace gas chromatographic method for determination of ethanol in canned salmon. Collaborativa studi". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69: 324-326

HORWITZ, W. (1982). "Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs". Analytical Chamistry, 54: 67A-76A.

HOTCHKISS, J.H.; SCANLAN, R.A.; LIBBEY, L.M. (1977). "Formation of bis (Hydroxyalkil)-N-nitrosamines as products of the nitrosation of spermidine". J. Agric. Food Chem., 25: 1183-1189.

HOWGATE, P. (1986). "Fish inspection and quality control in Europe". Proceedings of an International Symposium coordinated by the University of Alaska. Sea Grant College Program, Anchorage Alaska USA. 10-14 of November 1986.

- HUGHES, R.B. (1959). J. Sci Food Agric, **10**: 431-441 en LUNDSTRON y RACICOT, 1983.
- HUI, J.Y.; TAYLOR, S.L. (1983). "High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods". J. Assoc. Off. Anal. Chem., **66**: 853-857.
- HUIDOBRO, A.; TEJADA, M. (1990). "Determinación analítica de los compuestos nitrogenados no proteicos en le músculo de pescado. Aplicación al control de calidad". Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., **30**: 293-302.
- HULTIN, H.O. (1982). "Caracteres del tejido muscular". capítulo 13 de FENNEMA, O.H. "Introducción a la ciencia de los alimentos". (De La Torre, M.C., trad.). Ed. Reverter, Barcelona.
- HUMAN, J.; KHAYAT, A. (1981). "quality evaluation of raw tuna by gas chromatography and sensory methods". J. Food Sci., **46**: 868-873.
- HURTS, W.J.; TOOMEY, P.B. (1981). "High- Performance liquid chromatographic determination of four biogenic amines in chocolate". Analyst, **106**. 394-402.
- HURTS, W.J. (1990). "A review of HPLC methods for the determination of selected biogenic amines in foods". J. Liq. Chromat., **14**: 1-23.
- HUSS, H. H. (1988) El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Manual de capacitación preparado por el Programa de Capacitación FAO/DANINA en Tecnología Pesquera y Control de Calidad. Colección FAO pesca n° 29. Ed. Sangraf, Napolés. 132pp.
- IENESTEVA, C. (1973). "Bacterial production and destruction of histamine in foods and food poisoning caused by histamine". Die Nahrung, **15**: 109-113 en LÓPEZ-SABATER, 1992.
- IIDA, H.; TOKUNAGA, T.; NAKAMURA, K. (1981). "Usefulness of ethanol as quality index of fish and fish products-I. The relationship between the sensory judgement of canned albacore and it's ethanol content". Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., **104**: 77-82.
- IIDA, H.; TOKUNAGA, T.; NAKAMURA, K.; OOTA, Y.(1981b). "Usefulness of ethanol as quality index of fish and fish products-II. Changes in ethanol contents in raw fish during storage. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., **104**: 83-90.
- IIDA, H.; NAKAMURA, K.; TOKONAGA, T.; SATO, K.; HOSHINO, C.; TERANO, S.; FURUKAWA, T. (1982). "Study on the several chemical test fos estimating the quality of canned products-II. On the canned sardine and masu-salmon". Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., **107**: 11-23.
- IKEDA, S. (1980) " Other organic and inorganic components". en: CONNELL, J. J. (ed). "Advances in fish science and technology". Paper presented at the Jubilee Conference of the Torry Research Station Aberdeen, Scotland. 23-27 July 1979. Ed. Fishing News (books) Ltd, Suney, England. 511 pp.
- INGLES, D.L.; TINDALE, R.; GALLIMORE, D (1978) "Recovery of biogenic amines in chocolate" Chemistry and Industry, **June**: 432-433.
- INGLES, D.L.; TINDALE, R.; GALLIMORE, D (1980) "Absorption of biogenic amines by food constituents and some related substances" Chemistry and Industry, **May**: 415-416.
- INGLES, D.L.; BACK, J.F.; GALLIMORE, D; TINDALI, R; SHAW, K.J. (1985). "Estimation of biogenic amines in foods". J. Sci. Food Agric., **36**: 402-406.
- IWAMOTO, M.; YAMANAKA, H.; WATABE, S.; HASHIMOTO, K. (1987). "Effect of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice *Paralichthys olivaceus* muscle". J. Food Sci.

52: 1514-1517.

IWAMOTO, M.; YAMANAKA, H.; ABE, H.; USHIO, H.; WATABE, S.; KANEHISA, H. (1988). "ATP and Creatine phosphate break-down in spiked plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved". J. Food Sci., **53**: 1662-1665

IZQUIERDO-PULIDO, M.L. (1991). "Análisis, formación y evolución de aminos biógenas en cervezas". Tesis Doctoral. Area de Nutrició y Bramatologia. Departament de Ciéncies Fisiològiques Humanes y de la Nutrició. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

JANZ, V.I.; SCHEIBNER, G.; BEUTLING, D. (1983). Die lebensmittelhygienische bedeutung von histamin und tyramin" Mh. Vet.- Med., **38**: 701-709.

JANZ, I. (1985). "Untersuchungen zum histaminabbau durch lebensmittelhygienisch bedeutsame mikroben" Arch expert. Vet. med. Leipzig, **39**: 37-41.

JANZ, I. (1985b). "Studies on the effects of temperature, pH, glucose and NaCl on degradation of Histamina by (*Pseudomonas aeruginosa*)". Arch. Expert. Vet. Med. Leipzig, **39**: 121-127.

JELLEFF CARR, C. (1985). "Food and drug interaction" en FINLEY, J.W., SCHWASS, D.E. (eds) ACS Symposium Series, n°277, Xenobiotic Metabilism: Nutritional Effects : 221-228. Ed. American Chemical Society, washington D.C., USA.

JEONG, H.K.; PARK, Y.H. (1983). "Condition of processing and change of chemical composition on the salted-dried sardine durind storage". Bull. Korean Fish. Soc., **16**: 231-238.

JHAVERI, S.P.; LEU, S.S.; CONSTANTINIDES, S.M. (1982). "Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*, L.): Shelf life in ice". J. Food Sci., **47**: 1808-1810

JIANG, S.T.; HWANG, B.S.; TSAO, C.Y. (1987). " Protein denaturation and changes in nucleotides of fish muscle during frozen storage". J. Agric. Food Chem., **35**: 22-27.

JIANG, S.T.; HWANG, B.S.; TSAO, C.Y. (1987b). Effect of adenosine-nucleotides and their derivatives on the denaturation of myofibrillas proteins *in vitro*during frozen storage at - 20°C". J. Food Sci, **52**: 117-123.

JIMENEZ-COLMENERO, F.; TEJADA, M.; BORDERIAS, A.J. 91988). " Effect os seasonal variations on protein funtional properties of fish during frozen storage". J. Food Biochem., **12**: 159-170.

JO, K.L.; KIM, T.S.; SHIN, D.H. (1988). " Effect of packaging method on the storage stability of filleted mackerel products". Korean J. Food Sci. Technol., **20**: 1-6.

JO, K.L.; KIM, T.S.; SHIN, D.H. (1988b). " Effect of packaging method on the storage stability of hair tail products". Korean J. Food Sci. Technol., **20**. 45-51

JONES, N.R. (1960). "Separation and determination of free purines, pyrimidines and nucleoside in cod muscle". Biochem. J., **85**: 111-115.

JONES, N.R. (1961) ."Proc. Flavor Chem. Symp." Cambell Soup Co. Camden, New Jersey en FLETCHER y col. (1990).

JONES, N.R.; MURRAY, J. (1962). "Degradation of adenine and hypoxanthine nucleotide in the muscle of chill-stored trwled cod (*Gadus callarias*)". J. Sci. Food Agric., **13**: 475-480.

JONES, N.R.; MURRAY, J.; LIVINGSTON, E.I.; MURRAY, C.K. (1964). "Rapid estimation of

hypoxanthine concentrations as indices of the freshness of chill-stored fish". J. Sci. Fd. Agric., **15**: 763-778.

JÓOKEL, J.; KIRSCHFELD, R.; DIKERTMANN, D. (1986). "Vakuumverpacketer räucherfisch - mikrobiologischer status von handelsproben und technologische modellversuche zur histaminbildung bei makerelefilets". Archiv für Lebensmittelhygiene, **37**: 109-128.

JOORTEN, H.M.L.J.; OLIEMAN, C. (1986). "Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high performance liquid chromatography in combination with thermo-sensitized reaction detection". J. Chromatogr., **356**: 311-319.

JOOSTEN, H.M.L.J.; NORTHOLT, M.D. (1987). "Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 2. Decarboxylative properties of starter bacteria". Neth. Milk. Dairy J., **41**: 259-280.

JOOSTEN, H.M.L.J.; STADHOUDERS, J. (1987). "Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 1. Decarboxylative properties of starter bacteria". Neth. Milk. Dairy J., **42**: 247-258.

JOOSTEN, H.M.L.J. (1988). "The biogenic amine contents of Dutch Cheese and their toxicological significance". Neth. Milk Dairy J., **42**: 25-42.

JØRGENSEN, B.R.; GIBSON, D.M.; HUSS, H.H. (1988). "Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish". Internat. J. Food Microbiol., **6**: 295-307

JØRGENSEN, B.R.; HUSS, H.H. (1989). "Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish". Internat. J. Food Microbiol., **9**: 51-62.

JOSEPHSON, D.B.; LINDSAY, R.C.; STUIBER, D.A. (1987). "Enzymic hidroperoxide initiated effects in fresh fish". J. Food Sci., **52**: 596-600.

KARNOP, G. (1976). "Local distribution of total volatile bases in tissues of whole fish during storage in ice". Archiv. für Fischereiwiss., **27**: 159-169.

KARNOP, G. (1988) "Histamine in salzsardellen". Archiv für Lebensmittelhygiene, **38**: 57-84,

KARNOP, G. (1988b). "Vesded von salzsardellen durch histaminbildende Pediokokken" Informationen für die Fischwirtschaft, **35**: 28-31.

KAROLUS, H.J.; LEBLANC, D.H.; MARSH, A.J.; MSHAR, R.; FURGALACK, T.H. (1985). "Presence of histamine in the bluefish, (*Pomatomus saltatrix*)". J. Food Protec., **48**: 166-168.

KARUBE, I.; MATSUOKA, H.; SUZUKI, S.; WATANABE, E.; TOYAMA, K. (1984). "Determination of fish freshness with an enzyme sensor system". J. Agric. Food Chem., **32**: 314-318.

KATO, T.; KIKUGAWA, K. (1992). "Proteins and amino acids as scavengers of nitrite: inhibitory effect on the formation of nitrosodimethylamine and diazoquinone". Fd. Chem. Toxic., **30**: 617-626.

KAUFMAN, H.S. (1988). "Cefalea por vino tinto". Lancet, **13**: 210.

KAWABATA, T.; OHSHIMA, H.; INO, M. (1978) "Occurrence of methylguanidine and agmatine, nitrosable guanidino compounds, in food". Agric. Food Chem., **26**: 334-338.

KEAY, J.; HARDY, R. (1972). "The separation of aliphatic amines in dilute aqueous solution by gas chromatography and application of this technique to the quantitative analysis of tri- and dimethylamine in fish". J. Sci. Fd. Agric., **23**: 9-19.

KENNISH, J.M.; KRAMER, D.E. (1986). "A review of High-Pressure Liquid Chromatographic methods

for measuring nucleotide degradation in fish muscle". en KRAMER D.E.; LISTON, J. (eds) Seafood quality determination. Ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda.

KHAYAT, A. (1979). "Correlation of off-odor scores of canned tuna with gas chromatographic data". J. Food Sci., 44: 37-42

KHO, K.H., PARK, Y.H. (1982). "Studies on the histamine contents in the canned dark-fleshed fishes". Bull. Korean Fish. Soc., 15: 191-198.

KIETZMANN, H.J.; WEGNER, H.J.; PRIEBE, K.; RAKOW, D. (1964) "Frischetest durch refraktrometrische messungen der augenflüssigkeit und des muskellwasers bei fischen". Zbl. Veterinärmed. B, 11: 511-560.

KIM, I.S.; BJELDANES, L.F. (1979). "Amina content of toxic and wholesome canned tuna fish". J. Food Sci., 44: 922-923.

KLAUSEN, N.K.; LUND, E. (1986) "Formation of biogenic amines in herring and mackerell". Z. Lebensm. Under. Forsch., 182: 459-463.

KLAUSEN, N.K.; HUSS, H.H. (1987). "Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions". Int. J. food. Microbiol., 5: 147-156 en LÓPEZ-SABATER, 1992

KNEZEVIC, M.; MATIC, S.; BRNETIC, p.; HERCIG, V.; VUKUSIC, J. (1986). "Quality Indices of Adriatic sardine". Ptbrek, 24: 109-114.

KOEHLER, P.E.; EITENMILLER, R.R. (1978). "High pressure liquid chromatographic analysis of tyramine, phenylethylamine and triptamine in sausage, cheese and chocolate". J. Food Sci., 43: 1245-1247.

KOIZUMI, C.; CHANG, C.M.; OHSHIMA, T.; WADA, S. (1988). "Influences of freeze-thawing process on the quality of sardine and horse mackerel during refrigerated storage". Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 2203-2210.

KORHONEN, R.W.; LANIER, T.C.; GIESBRECHT, F. (1990). "An evaluation of simple methods for following rigor development in fish". J. Food Sci., 55: 346-348 y 368.

KRAMER, D.E.; NORDIN, D.M.A. (1977). "A comparison of the quality changes of alaska pollock and pacific cod during frozen storage at -28°C". Fisheries and Marine Service Technical Report N° 735. Vancouver Technological research Laboratory, Vancouver, Canada.

KRUEGER, D.H.; FENNEMA, O.W. (1989). "Effect of chemical additives on toughening of fillets of frozen alaska pollack (*Theragra chalcogramma*)". J. Food Sci., 54: 1101-1106.

KRUSE, R.; STOECKEMER, J. (1989). "Einsatzmöglichkeiten der dampfraum-gaschromatographie bei der untersuchung von fischen und garnelen: bestmimmung von mono-, di- und trimethylamin". Archiv für Lebensmittelhygiene, 40: 87-89.

KRZYMIEN, M.E; ELIAS, L. (1990). "Feasibility study on the determination of fish freshness by trimethylamine head space analysis". J. Food Sci., 55: 1228-1232.

KUCHIBA, M., KAIZAKI, S.; MATOBA, T.; HASEGAWA, K. (1990). "Deperssing effect of salts on thermal degradation of inosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-monophosphate in aqueous solution". J. Agric. Food Chem., 38: 593-598.

KUWATA, K.; YAMAZAKI, Y.; UEBORI, M. (1980) "Determination of traces of low aliphatic amines by gas chromatography". Anal. Chem., 52: 1980-1982.

KUWATA, K.; AKIYAMA, E.; YAMAZAKI, H.; KUGE, Y.; KISO, Y. (1983). "Trace determination of low molecular weight aliphatic amines in air by gas chromatography". Anal. Chem., 55: 2199-2201.

LAFONT-LAFOURCADE, S. (1975). "L'histamine des vins". Connaissance de la vigne et du vin, 9: 103-115.

LANG, H.R.M.; RIZZI, A. (1986). "Separation of purine bases, nucleosides and nucleotides by a column-switching technique combining reversed-phase and anion-exchange High-Performance Liquid Chromatography". J. Chrom.,

LEBLANC, E.L.; LEBLANC, R.J.; GILL, T.A. (1987). "Effects of pressure processing on frozen stored muscle proteins of atlantic cod (*Gadus morhua*) fillets". J. Food Process. Preserv., 11: 209-253.

LEBLANC, E.L.; LEBLANC, R.J.; BLUM, I.E. (1988). " Prediction of quality in frozen cod (*Gadus morhua*) fillets". J. food Sci., 53: 328-340.

LEBLANC, E.L.; LEBLANC, R.J.; ERVIN, D.M. (1988). " Comparison of three methods of formaldehyde determination on frozen sole, pollock, haddock and cod fillets". J. food Biochem., 12: 79-95.

LEE, E.H.; AHN, C.B.; KIM, J.S.; LIM, C.W.; LEE, S.W.; CHOI, Y.A. (1988). " Porcessing and taste compounds of fish sauces from filefish scrap". J. Korean Soc. Food Nutr., 17: 326-335.

LEE, C.M.; TOLEDO, R.T. (1984). "Comparison of self life and quality of mullet stored at zero and subzero temperature". J Food Sci., 49: 317-322 y 344.

LEE, E.H.; AHN, C.B.; KIM, J.S.; LEE, K.H.; KIM, M.C.; CHUNG, B.K.; PARK, H.Y. (1989). " Keeping quality and taste compounds in the extracts from rapid fermented anchovy sauce". J. Korean Soc. Food Nutr., 18: 131-142.

LEITAO, M.F.F.; BALDINI, V.L.S.; SALES , a.M. (1983). " Histamina em pescado e alimentos industrializados". Col. ITAL, Campinas, 13: 123-130.

LEITAO, M.F.F.; BALDINI, V.L.S.; UBOLDI EIROA, M.N.; DESTRO, M.T. (1983). " Bacterias productoras de histamina em pescado de origem marinha". Col. ITAL, Campinas, 13: 83-98.

LERKE, P.A.; BELL, L.D. (1976). " A rapid fluorometric method for the determnation of histamine in canned tuna". J. Foos Sci., 41: 1282-1284.

LERKE, P.A.; WERNER, S.B.; TAYLOR, S.L.; GUTHERTZ, L.S. (1978). "Scombroid poisoning. Repord of an outbreak". The Western Journal of Medicine, 129: 381-386.

LERKE, P.A.; PORCUNA, M.N.; CHIN, H.Y. (1983). " Screening test fos histamine in fish". J. Food Sci., 48 : 155-157.

LICCIARDELLO, J.J.; RAVESI, E.M.; D'ENTREMONT, D.L. (1986). "Irradiation and potassium sorbate compared as preservation treatments fot Atlantiv cod *Gadus morhua*". Marine Fish. Rev., 48: 38-41

LIEBER, E.R.; TAYLOR, S.L. (1978). "Thin-layer chromatographic screening methods for histamine in tuna fish". J. Chrom., 153: 143-152.

LIN, J.S.; BARANOWSKI, J.D.; OLCOTT, H.S. (1077). " Rapid thin-layer chromatographic - densitometric determnation of histamine in tuna". J. Chrom., 130: 426-430.

LINDNER, E. (1980). "Toxicologia de los alimentos". (Pérez Torromé, A, trad.). Ed. Acribia, Zaragoza.

138 pp.

- LISTON, J (1990). "Microbial hazards of seafood consumption". Food Technol., December: 56-62.
- LITTLEWOOD, J.T.; GIBB, C.; GLOVER, V.; SANDLER, M. DAVIES, P.T.G.; CLIFFORD, F (1988). "Red wine as a cause of migraine". Lancet, 1: 558-559.
- LOHS, P.; KÁMPKE, G. (1980). " Beitrag zur histaminproblematik bei fischen und fischerzeugnissen unter besonderer berücksichtigung weniger bekannter fischarte". Die Nahrung, 24: 255-264.
- LÖNBERG, A.E. (1984). "Histamin in fisk". Vår Föda, 36: 218-226.
- LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. (1983). "Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition". Analytical Chemistry, 55: 712A-724A.
- LÓPEZ-SABATER, E.I. (1991). "Flora microbiana con actividad aminocido - descarboxilasa presente en peces de la familia *Scombridae*: Evolución e identificación." Tesis Doctoral. Area de Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. universidad Autónoma de Barcelona.
- LOWENGER, D.W.; OUGH, C.S.; LEPKOVSKY, S; FURUTA, F.F. (1981). "The effect of ethanol and wine on the plasma histamine level of chickens and man". Am. J. Enol. Vitic., 23: 128-131.
- LUDORFF, W.; MEYER, V. (1978) "El pescado y los productos de la pesca". (Esaín-Escobar, J. trad.). Ed. Acribía, Zaragoza.
- LÜCKE, F.; GEIDEL, W.(1935). "Bestimmung des flüchtigen basischen sticstoffs in fischen als Masstabb für ihren frischezustand". Z. Untersuch. Lebensm., 70: 441-458.
- LUMDSTROM, R.C.; CORREIA, F.F.; WILHELM, K.A: (1982) " Enzymatic dimethylamine and formaldehyde production in minced american plaice and blackblack flounder mixed with a red haka TMAO-ase active action". J. Food Sci., 47: 1305-1310.
- LUNDSTROM, R.C.; RACICOT, L.D. (1983) "Gas chromatographic determination of dimethylamine and trimethylamine in seafoods". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66: 1158-1163.
- LUONG, J.H.T.; MALE, K.B.; MASSON, C.; NGUYEN, A.L.(1992). "Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes". J. Food Sci., 57: 77-81.
- LUTEN, J.B. (1981). " An automated fluorimetric method for the determination of histamine in canned fish products". J. Food Sci., 46: 958-959.
- LUTEN, J.B.; BRÜNNER, K.K.; RIEWEL-BOOY, G.; BURGRAAF, M.M.; SEUREN, L.A. J. (1988). "Kwaliteitsaspecten van tong". VMT, 1: 28-32.
- LUTEN, J. B.; BOUQUET, W. (1992). "A European intercomparison exercise on the determination of biogenic amines in herring and tuna by 35 laboratoris". **International Conference Upgrading and Utilization of Fishery Products**, 12-14 May , the Netherlands.
- LÚTHY, J.; SCHLATTER, C. (1983). "Biogenen amine in lebensmitteln: zur wirkung von histamin, thyramin und phenylethylamin auf den meschen". Z. Lebensm. Unters. Forsch., 177: 439-443.
- MACKIE, I.M.; FERNANDEZ-SALGUERO, J. (1977). "Histidine metabolism in fish. urocanic acid in mackerel (*Scomber scombrus*)" J. Sci. Fd. Agric., 28: 935-940.
- MACKIE, I.M.; THOMSON, B.W. (1974). "Decomposition of trimethylamine oxide during iced and frozen-

storage of whole and comminuted tissue of fish". Proc. IV Int. Congress Food Sci. and Technol., Vol I: 243-250.

MALLE, P.; BILLON, J. (1983). "Qualité hygiénique des préparations de poissons salés et fumés". R.T.V.A., 187: 29-37.

MALLE, P.; TAO, S.H. (1987). "Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation". J. Food Protec., 50: 756-760.

MALLE, P.; POUWEROL, M. (1989) "A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). J. Food Protec., 52: 419-423.

MANTHEY, M. (1988). "Gaschromatographische bestimmung von dimethylamin in fisch und fischerzeugnissen" Infn. Fischw., 35: 131-135.

*MANTHEY, M.; KARNOP, G.; REHBEIN, H. (1988). "Quality changes of european catfish (*Silurus glanis*) from warm-water aquaculture during storage in ice". International J. Food Sci. Technol., 23: 1-9

MARINÉ, A. (1978). "Alimento - Medicamento: interacciones. Tercera parte." Circ. Farm., 35: 43-61.

MARQUARDT, J.R.; WERRINGLOER, H.W.J. (1965). "Toxicity of wine". Food Cosmet. Toxicol., 3: 803-810.

MATCHES, J.R.; ABEYTA, C. (1983). "Indicators organism in fish and shellfish". Food Technol., June: 114-117.

MATOBA, T.; KUCHIBA, M.; KIMURA, M.; HASEGAMA, K. (1988). "Thermal degradation of flavor enhancers, inosine - 5'- monophosphate, and guanosine 5'-monophosphate in aqueous solution". J. Food Sci., 53: 1156-1159 y 1170.

MATTHEY, E. (1979). "Histamine dans le vin". Service Fédéral de l'Hygiène publique. Circulaire 21 (Communication personal).

MAYER, K.; PAUSE, G. (1984). "Bestimmung von biogenen aminen in wein mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie". Zeitschrift für Obst- und Weinbau, 123: 303-309.

MCCABE, B.J. (1986). "Dietary tyramine and other pressor amines in IMAO regimens: a review". J. Am. Dietet. Assoc., 86: 1059-1064.

MERSON, M.H.; BAINE, W.B.; GANGARORA, E.J.; SWANSON, R.C. (1974). " Scombroid fish poisoning. Outbreak traced to commercially canned tuna fish". JAMA, 288: 1268-1269.

MIDDLEBROOKS, B.L.; TOOM, P.M.; DOUGLAS, W.L.; HARRISON, R.E.; McDOWELL, S. (1988). " Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in spanish mackerell (*Scomberomus maculatus*)" J. Food Sci., 53: 1024-1029.

MIETZ, J.L.; KARMAS, E. (1977). "Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography". J. Food Sci., 42: 155-158.

MIETZ, J.L.; KARMAS, E. (1978). "Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition". Journal of the A.O.A.C., 61: 139-145.

MILLER, A. SCANLAN, R.A.; LEE, J.S.; LIBBEY, L.M. (1972). "Quantitative and selective gas chromatographic analysis of dimethyl and trimethylamine in fish". J. agric. Food Chem., 20: 709-711.

- MIN, O.R.; SHIN, M.S.; JHON, D.Y.; HONG, Y.H. (1988). "Changes in amines, formaldehydes and fat distribution during *Gulbi* processing". Korean J. Food Sci. Technol., 20: 125-132.
- MONRO, J.; BROSTOFF, J.; CARINI, C.; ZILKHA, k. (1980). " Food allergy in migraine". Lancet, 2: 1-4.
- MORROW J.D.; MARGOLIES, G.R.; ROWLAND, J.; ROBERTS, L.J. (1991). " Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning". New England Journal of Medicine, 324: 716-720.
- MOWER, H.F.; BHAGAVAN, N.V.; PONTIUS, E.B.; McDERMOTT, J.F. (1989). "tyramine content of Asian and Pacific Foods determined by high performance liquid chromatography". Food Chem., 31: 251-257.
- MUÑOZ LEYVA, J.A.; NARANJO RODRIGUEZ, I.; HIDALGO HIDAAGO de CISNEROS, J.L. (1992). " Revisión de los métodos analíticos para la determinación de histamine en alimentos" Alimentaria, Abril: 23-28.
- MURATA, M.; SAKAGUCHI, M. (1986). " Storage of yollowtail (*Seriola quinqueradiata*) white and dark muscles in ice: changes in content of adenine nucleotide and related compounds". J. Food Sci., 51: 321-326.
- MURATA, M.; SAKAGUCHI, M. (1988) " Changes in free amino acids and adenine nucleotides in bioled muscle extract of yollowtail (*Seriola quinqueradiata*) stored in ice". J. Agric. Food Chem., 36: 595-599.
- MURATA, M.; SAKAGUCHI, M. (1989). " Rapid degradatoin of inosine 5'-monophosphate during heating the muscle of very fresh yollowtail". Nippon Suisan Gakkaishi, 55: 823-828.
- MURRAY, C.K.; MURRAY, J. (1981). "Automatic determinations and some new ideas on scombrototoxicity". The 11th annual meeting of Wester European fish technologists' Association. August, 1981, Copenhage, Denmark.
- MURRAY, C.K.; HOBBS, G; GILBERT, R.J. (1982). "Scombrototoxin - like poisoning from canned fish". J. Hig. Camb., 88: 215-220.
- MURRAY, J.; THOMPSON, A.B.; GILL, A.S. (1984). "Estimation of nucleotides and related compounds in fish by reverse phase ion pair HPLC". en Proceedings of North of England Branch Symposium. Developments in applications of High-Performance Liquid Chromatography to the analisis of foods. Setember 1984.
- MUTLUER, B.; ERSER, S.; KAYA, B.; AKIN, S.; ÖSTASIRAN, I. (1989). "Einflus von gammastrahlen auf histaminbildund in makrellenfilets". Fleischwirtsch., 69: 112-114.
- NAGAYAMA T.; TAMURA, Y.; MAKI, T.; KAN, K; NAOI, Y.; NISHIMA, T. (1985). "Non-volatile amines formation and decomposition in abusively stored fishes and shellfishes". Eisei Kagaku, 31: 362-370.
- NAKAMURA, K.; FUJII, Y; ISHIKAWA, S. (1978). " Studies on salted and dried sardine.I. Changes of the chemical components in sardine mat during salting, drying and storage". Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 95: 75-84.
- NAKAMURA, M.; WADA, y. SAWAYA, H.; KAWABATA, Y. (1979). "Polyamine content in fresh and processed pork". J. Food Sci., 44: 515-517 y 523.
- NAKANURA, K.; ISHIKAWA, S. (1980). "Stuies on salted sardina II. Changes of chemical components in different portions during storage". Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 102: 67-76.

NAKAMURA, k.; ISHIKAWA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI, Y.; SUGIYAMA, T.; SUMIYA, I, YAMANO, G. (1980). "Studies on salted and dried sardine III. Influence of freshness and frozen storage temperature of raw fish on the quality of salted and dried sardine". Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 102: 77-84.

NAKASHIMA, K.; MURAKI, K.; NAKATSUJI, S.; AKIYAMA, S.; KANEDA, T.; MISUMI, S. (1989). "Coloration reaction of a crowned 2,4-dinitrophenylazophenol-Barium (II) complex with amines and its application to flow injection spectrophotometry". Analyst, 114: 501-504.

NEGISHI, S.; KARUBE, I. (1986). "An enzymatic assay method for IMP determination using IMP dehydrogenase and an application of the principle to a test paper method". Bull. Tokai Res. Fish. Lab., 55: 1591-1597.

NIVEN, C.F.; JEFFREY, M.B.; CORLETT, D.A. (1981). "Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria". Appl. Environ. Microbiol., Jan: 321-322.

NONAKA, j.; MITANI, H.; KOIZUMI, C. (1967). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 33. 753-757 en LUNDTROM y RACICOT (1983).

NONTRADIP, A.; WADA, S.; YAMANAKA, I. (1991). "Changes in polyamines and amino acids in ascidian *Halocynthia roretzi* muscle during storage". Nippon Suisa Gakkaishi, 58: 315-322.

OBATAKE, A.; DOI, T.; ITOH, Y. (1988). "Purification and properties of acis phosphomonoesterase from the dark muscle of common mackerel". Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 463-468.

OBATAKE, A.; DOI, T.; ONO, T. (1988). "Post-mortem degradation of inosinic acid and related enzyme activity in the dark muscle of fish". Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 283-288.

OBATAKE, A.; TOMITA, K. (1988). "Effect of dark muscle on the degradation of inosinic acid in the white muscle of common mackerel". Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 289-292.

OH, K.S.; CHUNG, B.K.; KIM, M.C.; SUNG, N.J.; LEE, E.H. (1988). "Processing of smoked dried and powdered sardine for instant soup". J. Korean Soc. Food Nutr., 17: 149-157.

OH, K.S.; LEE, E.H. (1988). "Studies on the processing of powdered katsuobushi and its flavor constituents. 1. Processing conditions of powdered and its flavor compounds". Bull. Korean Fish. Soc., 21: 21-29.

OH, K.S.; RO, R.H.; LEE, E.H.; PARK, H.Y. (1989). "Processing of the intermediate product (frozen seasoned anchovy meat) derived from anchovy". Korean J. Food Sci. Technol., 21: 498-505.

OH, K.S.; LEE, E.H. (1989). "Studies on the processing of powdered katsuobushi and its flavor constituents. 4. Extractive conditions and sensory evaluation of the taste compounds of powdered katsuobushi". Bull. Korean Fish. Soc., 22: 228-232.

OHASHI, E.; OKAMOTO, M.; OZAWA, A.; FUJITA, T. (1991) "Characterization of common squid using several freshness indicators". J. Food Sci., 56: 161-163 y 174.

OKA, S.; NISHIZAWA, Y.; TAKAMA, K. (1989). "Putrefactive profiles of fish-fillets packed in plastic container under modified atmosphere". Bull. Faculty Fish Hokkaido University, 40: 138-146.

OKUZUMI, M.; OKUMA, S.; AWANO, M. (1981). "A new type of histamine forming bacteria. I. Isolation of psychrophilic and halophilic histamine forming bacteria from *Scomber scombrus*". Bull. Japan. Soc. Sci. Fisher., 49: 1285-1291.

OKUZUMI, M.; YAMANAKA, H.; KUBOZUKA, T.; OZAKI, H.; MATSUBARA, K. (1984). "Changes in number of histamine-forming bacteria on/in common mackerel stored at various temperatures". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50: 653-657.

OKUZUMI, M.; AWANO, M.; OHKI, Y. (1984b). "Effects of temperature, pH value and NaCl concentration on histamine formation of N-group bacteria (Psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria)". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50: 1757-1762.

OLAFSEN, J. A.; REFSNES, K.H.; LARSEN, H. (1971) Postmortale forandringer i fisk. 5. Kinetiske studier over bakterielle omsaetninger i sildeekstrakt. Noruega en HUSS (1988).

OMURA, Y.; PRICE, R.J.; OLCOTT, H.S. (1978). "Histamine-forming bacteria isolated from spoiled skipjack mackerel". J. food Sci., 43: 1779-1781.

OUGH, C.S. (1971). "Measurement of histamine in California wines". J. Agric. Food Chem., 19: 241-244.

OUHG, C.S.; CROWELL, E.A.; KUNKEE, R.E.; VILAS, M-R.; LAGIER, S. (1987). "A study of histamine production by various wine bacteria in model solutions and wine". J. Food Processing and Preservation, 12: 63-70.

OUTINEN, K.; VUORELA, H.; HINKKANEN, R.; HILTUNEN, R. (1990). "Prisma" model in the optimization of HPLC analysis of biogenicamines in fish feed". Acta Pharmaceutica Fennica, 99: 99-108.

OWUSU-ANSAH, Y.J.; HULTIN, H.O. (1984). "Trimethylamine oxide prevents insolubilization of red hake proteins during frozen storage". J. Agric. Food Chem., 32: 1032-1035.

OWUSU-ANSAH, Y.J.; HULTIN, H.O. (1987). "Effect of in situ formaldehyde on solubility and cross-linking of proteins of minced red hake muscle during frozen storage". J. Food Biochem, 11: 17-39.

PAIK JUNG, H.Y.; BJELDANES, L.F. (1979). "Effects of cadaverine on histamine transport and metabolism in isolated gut sections of the guinea-pig". Fd Cosmet. Toxicol., 17: 629-632.

PAN, B.S.; JAMES, D. (Eds) (1985). "Histamine in marine products: production of bacteria measurement and prediction of formation". FAO Fish. Tech. pap. (252): 62pp.

PALANKA, J.D.; PABLOS, M.B. (1987). "Bonito del norte (*Thunnus Alalunga*): grado de frescura y pH". Alimentaria, Mayo: 45-48.

PALLER, F.M. (1988). "Origine de l'histamine et des amines biogenes dans les aliments". 3^e Cours International de Toxicologie Alimentaire. 6-7-8 Juin, Lion.

PALMERO-BECARES, M.L. (1986). "migraña, alimentos y aditivos". Med. Clin. (Barc.), 87: 87-89.

PARK, H.Y.; OH, K.S.; LEE, E.H. (1989). "Frozen storage stability of frozen seasoned anchovy meat products". Korean J. Food Sci. Technol., 21: 536-541.

PARKIN, K.L.; HULTIN, H. O. (1982). "Some factors influencing the production of dimethylamine and formaldehyde in minced and intact red hake muscle". J Food Process. Preserv., 6: 73-97.

PAULOS, M.A.; TESSEL, R.E. (1982). "Excretion of β -phenylethylamine is elevated in human after profound stress". Science, 215: 1127-1129.

- PAVELKA, J. (1982). "The physical and chemical effects underlying the reduction of histamine levels in the meat of mackerels and related fishes and possibilities of using these factors in the production of food from fish". Vet. Med. Praha., 27: 237-246.
- PEARSON y MUSLEMUDDIN (1968) en PEARSON, D. (1986). "Técnicas de laboratorio para análisis de alimentos". (Romero, C.; Miranda, J.L.; Suso, J.L. trad.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- PEARSON, D. (1986). "Técnicas de laboratorio para análisis de alimentos". (Romero, C.; Miranda, J.L.; Suso, J.L. trad.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- PECHANÉK, U; WOJDICH, H; PFANNHAUSER, W.; BLANCHER, G. (1980). "Untersuchung ueber das vorkommen von biogenen aminen in lebensmitteln". Ernährung/Nutrition, 4: 58-61.
- PECHANÉK, U; ; PFANNHAUSER, W.; WOJDICH, H. (1983). "Histamingehalte von fischen im lichte gesetzlicher und empfohlener grenzwerte". Ernährung/Nutrition, 7: 683-687.
- PEMBERTON, C.; GASTINEAU, C (eds) (1984). Manual de Dietética de la Clínica Mayo". Departamento de Dietética de la Clínica Mayo. Hospital Metodista de Rocherter (Costa, m., Farreras, A. trads): 255-257. Ed. Midici, Barcelona.
- PEREZ-VILLARREAL, B.; HOWGATE, P. (1987). " Spoilage of european hake (*Merluccius merluccius*) in ice". J. Sci. Food Agric., 41: 35-350.
- PLANAS, M.E. (1986). "Terapéutica de los transtornos de la afectividad". El Farmacéutico, 24: 156.162.
- PLOL, M.C. (1982). "Puesta a punto de un método de determinación de histamina en vinos por cromatografía líquida de alta eficacia". Informe del Consejo Superior de investigaciones Científicas. Instituto de fermentaciones Industriales. Ref.: 309-1084.
- PONTO, L.B.; PERRY, P.J.; LISKOW, B.I.; SEABA, H.H. (1977). "Drug therapy reviews: tricyclic antidepressant". Am. J. Hosp. Pharm., 34: 954-961.
- POZO, R.G.; SAIJUA, E.S. (1988). " Determinación de histamina en pescados y us productos derivados por HPLC con detección fluorimétrica". Alimentaria, Octubre: 27-29
- POZO-LORA, R. (1991). "Los sensores bioactivos y el control de la frescura enzimática del pescado". Alimentaria, enero-febrero: 75-80.
- PRIEBE, K. (1979). " Brauchbarkeit der Dünnschicht-Elektrophorese für die histaminbestimmung in fischen und fischerzeugnissen". Die Fleischwirtschaft, 59: 1658-1661.
- PRIEBE, K. (1984). "Beitrag zur Eignung des histamingehaltes als maßstab der verderbnis von fischen". Archiv für Lebensmittelhygiene, 34: 122-128
- QUEVAUVILLER, A.; MAZIERE, M.A. (1969). "Recherce et dosage biologique de l'histamine dans les vins". Ann. Pharmac. Fr., 27: 411-414.
- RAGNARSON, K.; REGENSTEIN, J.M. (1989). "Changes in electrophoretic patterns of gadoid and non-gadoid fish muscle during frozen storage". J. Food Sci., 54: 819-823.
- RAGUENES, N. (1988). "Les amines biògenes". Microbiologie Alimentaire. Volumen I. Aspect Microbiologique de la seguridad et de la Qualité Alimentaires. 137-147. Ed. Lavoisier-Apri, Paris.
- RAMANTANIS, S. (1984). " Histamin, thyramin, und tryptamin in lebensmitteln". Arch. Lebensmittelhyg., 35: 73-79.

RAYNER, E.T.; DUPUY, H.P.; LEGENDRE, M.G.; GRODNER, R.O.; COOK, J.A.; NOVAK, A.F.; TOLODAY, D.J. (1981). "Instrumental analysis of seafood composition". J. Food Sci., 47: 76-78.

REBHEIN, H. (1988). "Relevance of trimethylamine oxide demethylase activity and haemoglobin content to formaldehyde production and texture deterioration in frozen stored minced fish muscle". J. Sci. Food Agric., 43: 261-276.

REILLY, A.; SANTOS, R.G. (1984). "Histamine formation by bacteria isolated from bullet mackerel". Fish. Res. J. Philipp., 9: 19-23.

RENON, P.; CANTONI, C. (1979). "Ricerca di amine nelle carni di tonno fresco, refrigerato e inscatolato". Industrie Alimentari, Maggio: 365-367.

REUVERS, B.A.; MARTIN de POZUELO, M.; RAMOS, M.; JIMENEZ, R. (1986). "A rapid ion-pair HPLC procedure for the determination of tyramine in dairy products". J. Food Sci., 51: 84-86.

RICE, S.L.; EITENMILLER, R.R.; KOHELER, P.E. (1976). "Biologically active amines in food: a review". J. Milk Food Technol., 39: 353-358.

RICE, S.L.; KOHELER, P.E. (1976). "Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* species and the production of tyramine in fermented sausages". J. Milk Food Technol., 39: 116-119.

RINGØ, E.; STEMBERG, E.; STRØM, A.R. (1984). "Amino acid and lactate catabolism in trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735". App. Environ. Microbiol., 47: 1084-1089.

RITCHIE, A.H.; MACKIE, I.M. (1980). "The formation of diamines and polyamines during storage of mackerel (*Scomber scombrus*)". En Advances in Fish Science and Technology. Paper presented at the Jubilee Conference of the Torry Station Aberdeen, Scotland. Ed. Fishing News (Books) Ltd, Surrey, England.

RITSKES, M.T. (1975). "The gas chromatographic determination of trimethylamine and dimethylamine in fish, fishery products and other foodstuff". J. Food Technol., 10: 221-228.

RIVAS-GONZALO, J.C. (1981). Tiramina en vinos: análisis y evolución durante la vinificación. Tesis Doctoral. departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico. facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

RIVAS, J.; MARINÉ, A. (1983). "Migras de origen alimentario: aspectos relacionados con la tiramina". Cisc. Farm., 278: 1-6.

RODRIGUEZ, C.F.; VELASCO, F.; BESTEIRO, I.; RODRIGUEZ, S.; QUINTANA, R.; PASCUAL, M.C. (1991). "Evaluación sensorial y química de la sardina (*Sardina pilchardus*, Walb.)". Alimentaria, Enero-Febrero: 87-92.

RODRIGUEZ-JEREZ, J.J. (1991). Evolución de la flora microbiana formadora de histamina y otras aminas biógenas en la "Anxova de l'Escala". Tesis Doctoral. Area de Nutrición y Bromatología. facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

ROE, D.A. (1989). "Drug-induced reactions to alcohol and food". en Diet and drug interactions: 59-64. Ed. AVI (Van Nostrand Reinhold), New York, EEUU.

RONCALÉS, P.; BELTRÁN, J.A.; JAIME, I.; LÓPEZ-LORENZO, P. (1989). "A simple method for following post-mortem ATP depletion in lamb muscle". J. Food Sci., 54: 1365-1366.

ROSIER, J; VAN PETEGHEM, C. (1988). " A screening method for the simultaneous determination of putrescine, cadaverine, histamine, spermidine and spermine in fish by means of high pressure liquid chromatography of their 5-dimethylaminonaphthalene-1- sulfonyl derivatives". Z. Lebensm. Unter Forsch, 186: 25-28.

RUBACH, K; OFFIZORZ, P.; BREYER, C. (1981). "Bestimmung von histamin in fish und fischkonserven mittels capillar-isotachophorese". Z. Lebensm Unter Forsch, 172: 351-354.

RUIZ-MARTINEZ, E; RAMOS-MARÍN, M; SANTILLANA-LÓPEZ, I.; MARTIN DE POZUELO ROMAY, M. (1988). " Estudio de los parámetros formaldehído y dimetilamina en merlizas congeladas y pescadillas frescas y congeladas". alimentaria, Mayo: 25-30.

RYDER, J.M.; BUISSON, D.H.; SCOTT, D.N.; FLETCHER, G.C. (1984). "Storage of New Zeland jack mackerel (*Trachurus novaezelandiae*) in ice: chemical, microbiological and sensory assessment". J. Food Sci., 49: 1453-1456 y 1477.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H.; TAYLOR, S.L. (1984). " Histamine production by psychrotrophic pseudomonads isolated from tuna fish". J. Food Protec., 47: 378-380.

SAITO, T.; ARAI, K.; MATSUYOSHI, M. (1959). "A new method for stimating the frehness of fish". Bull. Japan. Soc. sci. Fish., 24: 749-750.

SAKAGUCHI, M.; KAN, N.; KAWAI, A. (1980). "Induced Synthesis of membrane - bound c-type cytochromes and trimethylamine oxide reductesa in *E. coli*" en CONNELL, J. J. (Ed) "Advances in fish science and technology". Paper presented at the Jubilee Conference of the Torry Station Research, Aberdeen, Scotland, 23-27 July, 1979. Ed. Fishing News (Books) LTD. Farham, England.

SANCHEZ, S.; PLANAS, M.E. (1985). "Interacciones farmacológicas de medicamentos que actúan sobre el sistema nervioso central (I)2. El Farmaceutico, 18: 35-60.

SANDLER, M.; YODIM, M.B.H.; SOUTHGATE, J.; HANINGTON, E. (1970). " The role of tyramine in migraine: some possible biochemical mecanisms". En Background to Migraine. Third Migraine Symposium:101-112. Ed. A.L. Cochrane, Heinemann, London, Inglaterra.

SANDLER, M. (1972). "Migraine: a pulmonary disease?". Lancet, 1:618-619.

SANTOS, E. M.M.; REGENSTEIN, J.M. (1990). " Effects of vacuum packaging, glazing, and erythorbic acid on the shel-life of frozen withe hake and mackerel". J' food Sci., 55: 64-70.

SANTOS-BUELGA C.; NOGALES-ALARCO, A; MARINÉ-FONT, A. (1981). " A method for the analysis of tyramine in meat products: its contents in some spanish samples". J. Food Sci., 46: 1794-1795.

SANTOS-BUELGA, C. (1984). Tiramina en productos de origen animal: análisis y relación con procesos de maduración y deterioro. Tesis Doctoral. Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico. facultad de Farmácia. Universidad de Salamanca.

SANTOS-BUELGA, C; MARINÉ-FONT, A; RIVAS-GONZALO, J. (1986). " Changes of tyramine during storage and spoilage of anchovies". J. Food Sci., 51: 512-513 y 515.

SARWAR, G.; SHAH, B.G.; MONGEAU, R.; HOPNER, K. (1985). "Nucleic acid, fiber nutrient composition of inactive dried food yeast products". J. Food. Sci., 50: 353-357.

SAKASGUCHI, M.; KAN, K.; KAWAI, A. (1980). "Induced synthesis of membrane-bound c-type cytochromes and trimathylamine oxide reductase in *Escherichia coli* ". En: Advances in fish science and

technology, (472-476) Ed. Fishing News (Books) Ltd, Surrey, Reino Unido.

SCANLAN (1975). CRC Critical Reviews in food technology, 5: 357-402 en DERRACUE 1990.

SCHENEYDER, J. (1973). "Histamine et substances similaires dans le vins. Causes de leur formation. Méthodes de leur élimination du vin". Bull. de l'O.I.V., 511: 821-831.

SCHNEIBNER, G.; BERGANN, T. (1987). "Untersuchungen zur bildung biogener amine durch anaerobe sporenbildner". Mh. Vet. Med., 42 : 521-524.

SCHULLER, D.L.; OKHUIZEN, T.; WERRINGLOER, J.; MARQUARDT, P. (1967). "Aflatoxin B₁ and histamine in wine". Arzneim. Forsch., 17: 888-890.

SCHULZE, K.; ZIMMERMANN, Th. (1982). " Untersuchungen zum einfluß verschiedener lagerungsbedingungen auf die entwicklung biogener amine in thunfisch- und mackerelenfleisch". Fleischwirtschaft, 62: 1-5.

SCHULZE, K.; ZIMMERMANN, Th. (1983). " Untersuchungen an Räucherfischen unter besonderer berücksichtigung von makrelen". Archiv für Lebensmittelhygiene, 34: 67-70.

SCHUTZ, D.; CHANG, G.; BJELDANES, L. (1976). " Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products". J Assoc Off. Anal. Chem., 59: 1224-1225.

SCOTT, D.N.; FLETCHER, G.C.; HOGG, M.G.; RYDER, J.M. (1986). "Comparison of whole with headed and gutted orange roughy stored in ice: Sensory, Microbiology and chemical assessment". J. Food Sci., 51: 79-83 y 86.

SEIDLER, T. (1987). "Effect of additives and thermal treatment on the content of nitrogen compounds and the nutritive value of hake meat". Die Nahrung, 31: 959-970.

SEILER, N.; KNOGEN, B.; (1985). " Determination of polyamines and related compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography: improved separation systems". J. Chromatogr., 339: 45-57.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J.; DUNAJSKI, E.; CHONG, X. (1993). "Nonprotein nitrogen compounds in harp seal (*Phoca groenlandica*) meat". Food Chem., 46: 407-413.

SHAMSHAD, S.I.; NISA, K.; RIAZ, M.; ZUBERI, R.; QADRI, R.B. (1990) "Shelf life of shrimp (*Penaeus merlangiense*) stored at different temperatures". J. Food Sci., 55: 1201-1205 y 1242.

SHAULD, O.; SPORNS, P. (1987). " Hydrolytic stability at intermediate pHs of the common purine nucleotides in food, inosine 5'-monophosphate, guanosine 5'-monophosphate and adenosine 5, monophosphate". J. Food Sci., 52: 810-812.

SHEWAN, J. M. (1961). The microbiology of sea-water. Capitulo 14 en: Fish as Food Ed. Academic Press, New York 487-561.

SHEWAN, J.M.; JONES, N.R. (1957). "Chemical changes occurring in cod muscle during chill storage and their possible use as objective indices of quality". J. Sci. Food Agri., 8: 491-498.

SHIRAI, T.; FUKE, S.; YAMAGUCHI, K.; KONUSU, S. (1988). "Nucleotides, quaternary ammonium bases, and related compounds in the raw and heated muscles of salmon". Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 1199-1207.

SHEWAN, J.M.; EHRENBERG, S.C. (1957). "Volatile bases as quality indices of iced north sea cod". J.

Sci. Food Agric., 8: 227-231.

SIEBER, R.; LAVANDRY, P. (1989). "Biogenic amines in dairy products and cheese". Mittellungen aus dem gebiete der lebensmittel-untersuchung und hygiene, 81: 82-105.

SIMIDU, W. (1961). Nonprotein nitrogen compounds. Cap 11. En "Fish as Food". Ed. Academic Press, New York.

SIMPSON, M.V.; HAARD, N.F. (1987). "Temperature acclimatation of atlantic cod (*Gadus morhua*) and its influence on freezing point and biochemical damage of post-mortem muscle during storage at 0° and -3°C". J. Food Biochem., 11:69-93.

SIMS, G.G.; FARN, G.; YORK, R.K.; (1992). "Quality indices for canned tuna: Correlation of sensory attributes with chemical indices". J. Food Sci., 57: 1112-1115.

SINNHUBER, R.D.; YU, T.C. (1977). "The 2-thiobarbituric acid reaction. An objective measure of the oxidative deterioration occurring in fats and oils". Yukugaku, 26: 259-267.

SMITH, I; KELLOW, A.H.; HANINGTON, E. (1970). "A clinical and biochemical correlation between tyramine and migraine headache". Headache, 10: 43-52.

SMITH, T.A. (1980-81). "Amines in Food". Food Chem., 6: 169-200.

SMITH, J.G.M.; HARDY, R.; McDONALD, I.; TEMPLETON, J. (1980). "The storage of Herring (*Clupea harengus*) in ice, refrigerated sea water and ambient temperature. Chemical and sensory assessment". J. Food Sci. Agric., 31: 375-385

SMITH, A.M.; HAYDEN, M.A.; McCAY, S.G.; ZAPATKA, F.A.; HAMDY, M.K. (1982). "Detection and confirmation of histamine - producing bacteria". Bull. Environm. Contam. Toxicol., 29: 618-623.

SMILJANIC, D.; TEODOROVIC, V. (1990). "Presence and detection of histamine in meat and meat products". Tehnologija Mesa, 31: 218.221.

SOLOMON, M.B. (1987). "Comparison of methods used for measuring pH in muscle tissue". J. Food. Sci., 52: 1428-1429.

SPINELLI, J.; KUORY, B. (1979). "Non-enzimic formation of dimethylamine in dried fishery products". J. Agr. Food Chem., 27: 1104-1108.

SPINELLI, J. (1966). J. Food Sci., 30: 1063 en FLETCHER y col. (1990).

STANSBY, M.E.; OLCOTT, H.S. (1963). Composition of fish. Cap 26. En "Industrial fishery technology". Ed. Reinhold Pub., New York.

STANIER, R.Y.; ADELBERG, E.A.; INGRAHAM, J.L. (1984). Microbiologia. Ed. Reverté, Barcelona. 836 pp.

STARUSZKIEWICZ, W.F. (1977). "Fluorometric determination of histamine in tuna: collaborative study". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60: 1131-1136.

STARUSZKIEWICZ, W.F.; WALDROM, E.M.; BOND, J.F. (1977). "Fluorometric determination of histamine in tuna: development of method". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60: 1125-1130.

STARUSZKIEWICZ, W.F. ; BOND, J.F. (1981). "Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine, and histamine in food". J. Assoc. Off Anal. Chem., 64: 584-591.

STARUSZKIEWICZ, W.F. (1992). " The development of rapid methods to detect the precursors involved in scombroid intoxication". IFT Annual Meeting, 1992, New Orleans, USA.

STEDE, M.; STOCKEMER, J. (1981). " Bildung von histamin in fischen heringen und makrelen". Fleischwirtschaft, 61: 1746-1749.

STEDE, M.; STOCKEMER, J. (1986). " Biogene amine in seefischen". Lebensm. -Wiss. u. -Technol., 19: 283-287.

STENBERG, E.; STYRVOLD, O.B.; STRØM, A.R. (1982). "Trimethylamine oxide respiration in *Proteus* sp. strain NTHC153: Electron transfer-dependent phosphorylation and l-serine transport". J. Bacteriol., 149: 22-28

STEMBERG, E.; RINGØ, E.; STRØM, A.R. (1984) "Trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735: Na⁺ - stimulated anaerobic transport in cells and membrane vesicles". App. Environ. Microbiol., 47: 1090-1095.

STEVANATO, R.; MONDOVI, B.; SABATINI, S.; RIGO, A. (1990). " Spectrophotometric assay for total polyamines by immobilized amine oxidases". Analitica Chimica Acta, 237: 391-397.

STOCKEMER, J. (1982). " Bestimmung der aminosäuren und biogenen amine in der dunklen und hellen des thunfisches mittels aminosäureanalysator und hochdruckflüssigkeitschromatographie". Z. Lebensm. Unters. Forsch., 174: 108-115.

STOCKLEY, i.H. (1981). "Monoamine oxidase inhibitor drug interactions". En Drug Interactions: 357-373. Ed. Blackwell Scientific publications, Oxford, Inlaterra.

STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. (1991). " Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review". J. Food Protec., 54: 640-670.

SUBDEN, R.E.; DUISCHAEVER, C.; KAISER, K.; NOBLE, C. (1979). "Histamine content of canadian wines determined by reversed phase high performance liquid chromatography". Am. J. Enol. Vitic., 30: 19-21.

SUMNER, s.S.; SPECKHARD, m.W.; SOMERS, E.B.; TAYLOR, S.L. (1985). "Isolation of histamine - producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak". Appl. Environ. Microbiol., 50: 1094-1096.

SUMMER, S.S.; TAYLOR, S.L. (1989). " Detection method for histamine - producing, dayry - related bacteria using diamine oxidase and lueococrystal violet". J. Food Protec., 52: 105-108.

SUZUKI, T.; HIRANO, T.; SUYAMA, M. (1987). "Changes in extractive components of withe and dark meats of bigeye tuna by thermal processing at high temperature of F₀ Value of 4". Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 1633-1636.

SUZUKI, S; NODA, J; TAKANA, K. (1990). "Growth and polyamine production by *Alteromonas spp.* in fish meat extracts under modified atmosphere". Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 41: 213-220.

SUZUKI, S.; KOBAYASHI, K.; NODA, J; SUZUKI, T.; TAKAMA, K. (1990). "Simultaneous determination of biogenic amines by reversed - phase hidh - performance liquid chromatography". J. Chrom., 508: 225-228.

TAMASE, K.; KITADA, Y.; MIZOBUCHI, M.; SASAKI, M. (1984). "Simultaneous determination of histidine and histamine in fish by high performance liquid chromatography". J. Food Hyg. Soc. Japan., 25: 525-529.

- TARJAN, V.; JANOSSY, G. (1978). "The role of biogenic amines in food". Die Nahrung, 22: 285-289.
- TAYLOR, S.L.; LEATHERWOOD, M.; LIEBER, E.R. (1978). "A simplified method for histamine analysis of foods". J. Food Sci., 43: 1030-1032.
- TAYLOR, S.L.; GUTHERTZ, L.S.; LEATHERWOOD, M.; TILLMAN, F.; LIEBER, E.R. (1978). "Histamine production by food-borne bacterial species". J. Food Safety, 1: 173-187 en LÓPEZ-SABATER, 1992.
- TAYLOR, S.L.; GUTHERTZ, L.S.; LEATHERWOOD, M.; LIEBER, E.R. (1979). "Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning". Appl. Environm. Microbiol., 37: 274-278.
- TAYLOR, S.L.; LIEBER, E.R. (1979). "In vitro inhibition of rat intestinal metabolisms enzymes". Food and Cosmética Toxicology, 17: 237-240.
- TAYLOR, S.L. (1983). "Monograph on histamine poisoning". FAO Codex Alimentarius Commission CX/FH83/11 Roma.
- TAYLOR, S.L.; SPECHARD, M.W. (1983). "Inhibition of bacterial histamine production by sorbate and other antimicrobial agents". J. Food Protec., 47: 508-511.
- TAYLOR, S.L.; HUI, Y.I.; LYONS, D.E. (1984). "Toxicology of scombroid poisoning". American Chemical Society. Symposium series n°262: 417-430 en LÓPEZ-SABATER, 1992.
- TAYLOR, S.L. (1985). "Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods". Monografia (VPH/FOS/85.1): 47pp. W.O.H., Geneva, Suiza.
- TAYLOR, S.L. (1986). "Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects". CRC Critical reviews in Toxicology, 17: 91-128.
- TAYLOR, S.L.; SUMNER, S.S. (1986). "Determination of histamine, putrescine and cadaverine". KRAMER, D.E.; LISTON, J (eds). Seafood Quality Determination. Proceedings of an International Symposium. 253-245.
- TAYLOR, S.L. (1988). "Marine toxins of microbial origin". Food Technol., March: 94-98. En Advances in Fish Science and Technology. Paper presented at the Jubilee Conference of the Torry Station Aberdeen, Scotland. Ed. Fishing News (Books) Ltd, Surrey, England.
- TEJADA, M. (1979). "Estudios sobre la desnaturalización proteica de pasta de jurel (*Trachurus trachurus*) congelados y conservados en estado congelado". Alimentaria, 108: 39 (1979); 109: 115-163 (1979); 110: 25-60 (1980)
- TEJADA, M; CARECHE, M. (1988). "Efecto de la temperatura de conservación (-12 y -18°C) sobre la estabilidad de músculo de merluza picado". Rev. Agroquím. Technol. Aliment., 28: 109-114.
- TESKEREDZIC, Z.; PFEIFER, K. (1987). "Determination the degree of freshness of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) cultured in brackish water". J. Food Sci., 52: 11011102
- THOMPSON, A.B.; MCGILL, A.S.; MURRAY, J.; HARDY, R.; HOWGATE, P.F. (1980). "The analysis of a range of non-volatile constituents of cooked haddock (*Gadus aeglefinus*) and the influence on these on flavor" en: CONNELL, J. J. (ed). "Advances in fish science and technology". Paper presented at the Jubilee Conference of the Torry Research Station Aberdeen, Scotland. 23-27 July 1979. Ed. Fishing News (books) Ltd, Suney, England. 511 pp.

TIECCO, G.; TANTILLO, G.; FRANCIOSO, E.; DE NATALE, G. (1986). "Presence of histamine and other polyamines in mackerel and sardine preserved at different temperatures." Ind. Alimen., 23: 1-8.

TILLER, J.W.G.; MAGUIRE, K.P.; DAVIES, B.M. (1986). "Tyramine pressor response with moclobemide. A reversible Monoamine Oxidase Inhibitor". Psychiatry Research, 22: 213-220.

TONOGAI, Y.; ITO, Y.; HARADA, M. (1984). "A separative determination of putrefactive non-volatile amines in raw fish and fish products by high performance liquid chromatography with fluorescence detection". J. Food Hyg. Soc. Japan, 25: 41-46.

TOKUNAGA, T.; IIDA, H.; MIWA, K. (1977). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 43: 219-227 en LUNDSTROM y RACICOT (1983).

TOKUNAGA, T.; IIDA, H.; NAKAMURA, K.; TERANO, S.; FURUKAWA, T.; SATO, K.; HOSHINO, C. (1982). "Study on the several chemical test for estimating the quality of canned products-I. On canned mackerel". Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 107: 1-10.

TOZAWA, H.; ENOKIHARA, K.; AMANO, K. (1971). "Proposed modification of Dyer's Method for trimethylamine in cod fish". en KREUZER, R. (Ed). Fish Inspection and quality control. ed. Fishing News (books) Ltd, London, UK, 187-190 pp.

TRANCHANT, M. (1972) "Manual práctico de cromatografía en fase gaseosa" (De La TORRE-BORONAT, M.C. y MARINE-FONT, A. trad.). Ed. Torray-Masson S.A., Barcelona.

TRETHEMIE, E.R.; KALED, L. (1972). "Wine and migranous neuralgia". Br. Med., 53: 290.

TRINIDAD, L.M.; REILLY, A. (1922). "Production of smoked spanish mackerel".

UDAGAWA, M.; ISHIKAWA S.; NAKAMURA, K.; KARAYAMA, M.; KUDO, S. (1989). "The change of K value during processing and storing of fish and fish products". Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 127: 89-92.

UNZETA, M.; GOMEZ, N.; Balsa, D.; HEREDERO, J.L. (1989). "La MonoaminoOxidasa: un enzima implicado en el metabolismo de las aminas biógenas". El Farmaceutico, 62: 61-67.

VAN SPREEKENS, K.J.A. (1986). "Histamine production by psychrophilic flora" en KRAMER, D.E. y LISTON (Eds). Seafood quality determination. Proceedings of an International Symposium Coordinated by the University of Alaska, Sea Grant College Program, Anchorage, Alaska, USA, 10-14 November 1986. Ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

VANDERDERCKHOVE, P.; DEMEYER, D. (1976). "Amines in dry fermented sausage". En Proceedings 22nd European Meeting of Meat Research Workers, Volumen II, G: 3-6 Agosto Septiembre, Malmö.

VECCHIO, A.; FINOLI, C.; CERRUTTI, G.; MÓLLER, F. (1989). "Ammine biogene in vini italiani". Vignevinu, 16: 57-59.

VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINÉ-FONT, A (1989). "Histamine and tyramine in preserved and semi-preserved fish products". J. Food Sci., 54: 1653-1655.

VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINÉ-FONT, A (1990). "Histamine and tyramine during storage and spoilage of anchovie, *Engraulis encrasicolus*: relationships with other fish spoilage indicators". J. Food Sci., 55: 1192-1193 y 1195.

VIDAL-CAROU, M.C. (1987). Aminas biogenas en vinos: Histamina y tiramina. Análisis, contenidos y evolución. Tesis Doctoral. Area de Nutrición y Bromatología. Departamento de Ciencias Fisiológicas Humanas y de la Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

VIDAL-CAROU, M.C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; MARINÉ-FONT, A. (1989). "Spectrofluorometric determination of histamine in wines and other alcoholic beverages". J. Asso. Off. Anal. Chem., **72**: 412-415.

VIDAL-CAROU, M.C.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; MARINÉ-FONT, A. (1990). "Spectrofluorometric determination of histamine in fish and meat products". J. Asso. Off. Anal. Chem., **73**: 656-667.

VOIG, M.N.; EITENMILLER, R.R. (1977). "An evaluation of extraction and thin layer chromatographic procedures for the quantitation of biogenic amines in food". Lebensm. -wis. u. -Technol., **10**: 263-276.

WADA, S.; TAKADA, M.; KOIZUMI, C. (1982). Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **48**: 1657-1661.

WADA, S.; KOIZUMI, C. (1986). "Changes in histamine contents during the processing of reci-bran pickles of sardine". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **52**: 1035-1038.

WAGENER, W.W.D. (1984). "Biogenic amines in fresh and spoiled fish: High performance liquid chromatography of the dansil derivatives". F.I.R.I. Am. Report, **38**: 48-50.

WALTERS, M.J. (1984). "Determination of histamine in fish by liquid chromatography with post-column reaction and fluorometric detection". J. Assoc. Off. Anal. Chem., **67**: 1040-1043.

WATABE, S.; KAMAL, M.; HASHIMOTO, K. (1991). "Post-mortem changes in ATP, creatine phosphate, and lactate in sardine muscle". J. Food Sci., **56**: 151-153.

WATANABE, A.; TOYAMA, K.; KARUBE, I.; MATSUOKA, H.; SUZUKI, S. (1984). "Determination of inosine-5'-monophosphate in fish tissue with an enzyme sensor". J. Food Sci., **49**: 114-116.

WATANABE, A.; TAKAI, R.; TANAKA, M. (1987). "Quality of yellowtail meat stores at 3°C ~ -3°C". Nippon Suisan Gakkaishi, **53**: 165.

WATANABE, A.; TSUNESISHI, E.; TAKIMOTO, Y. (1989). "Analysis of ATP and its breakdown products in beef by reverse-phase HPLC". J. Food Sci., **54**: 1169-1172.

WATERS CHROMATOGRAPHY DIVISION (Ed). (1988). "Analysis of polyamines in food". Notes: Food and beverages, **2**: 5-7.

WATTS, D.A.; BROWN, W.D. (1982). "Histamine formation in abisibely stored pacific mackerel: Effect of CO₂ - modified atmosphere". J. Food Sci., **47**: 1386-1387.

WEI, C.I.; KOBURGER, J.A.; OTWELL, W.S.; MARSHALL, M.R. (1990). "Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna". J. Food Sci., **55**: 59-63.

WEKELL, M.C. (1991). "Seafood Products". Report presented at the 104th AOAC International Meeting, September 9-13, 1990, New Orleans, LA. J. Assoc. Off. Anal. Chem., **74**: 136-137.

WEKELL, J.C.; BARNETT, H. (1991). "New method for analysis of trimethylamine oxide using ferrous sulfate and EDTA". J. Food Sci., **56**: 132-135 y 138.

WHEATLEY, A.M.; TRIPTOL, K.F. (1987). "Determination of tyramine in alcoholic and non-alcoholic beers by HPLC with electrochemical detection". J. Food Biochem., **11**: 133-142.

WILLIAMS, D.W. (1954). "Report on chemical indices of decomposition in fish (histamine)". Journal of the A.O.A.C., **37**: 576-572.

WILLIAMS, D.W. (1960). "Histamine as a chemical index of decomposition in fish". Journal of the A.O.A.C., **43**: 431-438.

WITTFOGEL, H. (1959). " Die messung postmortaler augenlinsentrübung in dienste objektiver frischezustandsbeurteilung von seefischen". Arch. Lebensmittelhyg., 10: 49-53

WITTFOGEL, H.; SCHELEGEL, H.J. (1965). "Die Brauchbarkeit des "Intelectron Fish-Tester V" bei der täglichen qualitätskontrolle und klassifizierung von seefischanlandungen". Z. Lebensmittel-Un-ter. u. Forsch., 127: 85-92.

WONG, K.; GILL, T.A. (1987). " Enzymatic determination of trimethylamine and its relationship to fish quality". J Food Sci., 52: 1-3 y 6.

WONG, K.; BARTLLET, F.; GILL, T.A. (1988) " A diagnostic test strip for the semiquantitative determination of trimethylamine in fish". J. Food Sci., 53:1653-1655.

WORTBERG, B.; WOLLER, R. (1981). "Zur qualität und frische von fleish und Fleischwaren in hinblick auf ihren gehalt an biogenen aminen". Fleischwirtschaft., 62: 1-5.

YAMAMOTO, S.; ITANO, H.; KATAOKA, H.; MAKITA, M. (1982). "Gas - chromatographic method for analysis of di- and polyamines in food". J. Agric. Food Chem., 30: 435-439.

YAMAMOTO, Y.; NAKAHARA, F; HASHIGUCHI, R.; KUSHIMA, H. (1991). "Distribution on *Morganella morganii* in raw fish and fish products on the market and the effects of temperature and concentration of sodium chloride on histamine formation by *Morganella morganii*". Jpn. J. Food Microbiol., 7: 159-165.

YAMANAKA, H.; SHIOMI, K.; NAITO, M.; KIKUCHI, T. (1980). "Histamine content in the canned red meat fish". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 46: 905-907.

YAMANAKA, H.; SHIOMI, K.; KIKUCHI, T; OKUZUMI, M. (1982). " A pungent compound produced in the meat of frozen yellowfin tuna and marlin". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 48: 685-689.

YAMANAKA, H.; SHIOMI, k.; KIKUCHI, t.; OKUZUMI, M. (1984). " Changes in histamine contents in red meat fish during storage at different temperatures". Bull. Japan. Soc. sci. Fish., 50: 695-701.

YAMANAKA, H.; SHIKAMURA, K.; SHIOMI, K; KIKUCHI, T. (1986). " Changes in non - volatile amine content of meat of sardine and saury pike during storage". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52: 127-130.

YAMANAKA, H.; SHIMAKURA, K.; SHIOMI, K.; KIKUCHI, T.; IIDA, H.; NAKAMURA, K. (1987). "Concentrations of polyamines in fresh - water fishes". Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 2041-2044.

YAMANAKA, H.; SHIMAKURA, K.; SHIOMI, K.; KIKUCHI, T.; OKUZUMI, M. (1987b). " Occurrence of allergy-like food poisoning caused by "Mirin" seasoned meat of dorado (*Coryphaena hippurus*)". J. Food Hyg. Soc. Japan., 28: 354-358.

YAMANAKA, h.; SHIOMI, K.; KIKUCHI, T. (1987c). " Agmatine as a potential index for freshness of common squis (*Todarodes pacificus*)". J. Food Sci., 52: 936-938.

YAMANAKA, H. (1989). " Changes in polyamines and amino acids in scallop adductor muscle during storage". J. food Sci., 54: 1133-1135.

YAMANAKA, H.; MATSUMOTO, M. (1989). " Simultaneous determination of polyamines in red meat fishes by high performance liquid chromatography and evaluation of freshness". J. Food Hyg. Soc. Japan., 30: 396-400.

YAMANAKA, H.; SHIOMI, K.; KIKUCHI, T. (1989). " Cadaverine as a potential index for decomposition

of salmonoid fishes". J. Food Hyg. Soc. Japan, 30: 170-174.

YEN, G.C.; HSIEN, C.L. (1991). "Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC". J. Food Sci., 56: 158-160.

YEN, G.C. (1992). "Effects of heat treatment and storage temperature on the biogenic amine contents of straw mushroom (*Volvariella volvacea*)". J. Sci. Food Agric., 58: 59-61.

YOGUCHI, R.; OKUZUMI, M.; FUJII, t. (1990). "Seasonal variation in number of mesophilic and halophilic histamine-forming bacteria in Inshore of Tokyo Bay and Sagami Bay". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 56: 1467-1472 en LÓPEZ-SABATER, 1991.

YOSHIDA, A.; NAKAMURA, A. (1982). "Quantitation of histamine in fishes and fishes products by High performance liquid chromatography". J. Food Hyg Soc. Japan, 23: 339-343.

YOSHINAGA, D.H. FRANK, H.A. (1982). "Histamine producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*)". Appl. Environ. Microbiol., 44: 447-452.

YODIM, M.B.H.; BONHAM, S.; SANDLER, M.; HANINGTON, E.; WILKINSON, M. (1971). "Conjugation defect in tyramine sensitive migraine". Nature, 238: 127-128.

ZEE, J.A.; SIMART, R.E.; L'HEREUX, I. (1983). "Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat". J. Food Protec., 46: 1044-1049.

VIII. ANEXOS