

Arrieta, Marina Patricia

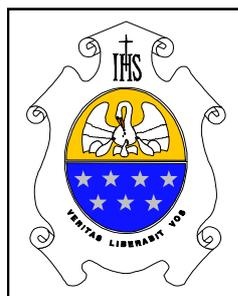
Determinación simultánea de aminoácidos libres y aminos biogénicas por HPLC mediante detección fluorimétrica: puesta a punto y aplicación del método en muestras de vino con denominación de origen de Alicante

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Magister en en Tecnología de los Alimentos**

Directora: Prats Moya, María Soledad

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.





UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Químicas

**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AMINOÁCIDOS LIBRES Y
AMINAS BIOGÉNICAS POR HPLC MEDIANTE DETECCIÓN
FLUORIMÉTRICA: PUESTA A PUNTO Y APLICACIÓN DEL METODO
EN MUESTRAS DE VINO CON DENOMINACION DE ORIGEN DE
ALICANTE.**

**Trabajo Final de la Facultad de Ciencias Químicas
de la Universidad Católica de Córdoba conforme
a los requisitos para obtener el título de
Magíster en Tecnología de los Alimentos**

Por
Licenciada en Bioquímica
MARINA PATRICIA ARRIETA

Córdoba, Argentina
2010

Director del Trabajo Final

Dra. María Soledad Prats Moya.
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Universidad de Alicante, España.

Comisión de Trabajo Final

Dra. Valeria Nepote
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Mag. Gabriela Demmel
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba, Argentina.

Mag. Fabiana Maldonado
Laboratorio de Alimentos Físicoquímico, Subsecretaría CEPROCOR
Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Argentina.

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

Título: "SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FREE AMINO ACIDS AND BIOGENIC AMINES BY HPLC WITH FLUORIMETRIC DETECTION IN WINE SAMPLES"

Autores: Arrieta, M.; Terol, A.; Paredes, E.; Maestre, S.E.; Todolí, J.L.; Prats, M.S.

Tipo de participación: POSTER

Congreso: Second SAFE Consortium International Congress on Food Safety. Girona, España, 27 al 29 de Abril de 2009.

DEDICATORIA

A Mamá, Papá, Gaby, Pablo y Rocío.

A Manu.

Por todo su apoyo y confianza.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. María Soledad Prats Moya, directora del presente trabajo por su apoyo tanto profesional como personal.
- Al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante, quienes financiaron y permitieron el desarrollo del presente trabajo.
- Al Ministerio de Asuntos Exteriores de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, específicamente al programa de Becas MAE-AECID 2008-2009 Tipo II A, quienes me otorgaron una beca que financió mi estadía en España.
- Al Consejo Regulador de Denominación de Origen de Alicante, quienes facilitaron las muestras de vino para poder llevar a cabo la aplicación de la metodología desarrollada.
- A la Universidad Católica de Córdoba, por brindarme la formación para continuar mi desarrollo profesional.
- A Anita y Gabriel quienes me iniciaron en la investigación y a su equipo de trabajo, especialmente a Gonzalo Aleu.
- A mis padres por apoyarme siempre a que continúe estudiando, y por enseñarme los valores de la vida.
- A mis hermanos por siempre estar a mi lado y aconsejarme con el corazón.
- A Manuel por la paciencia.
- A mi cuñada por ser una amiga.
- A mis amigos por confiar en mí y apoyarme.
- A mis amigos españoles por brindarme su amistad e integración.

PRÓLOGO

La realización del presente trabajo me ha enriquecido ampliamente tanto en mi formación profesional como en el ámbito personal.

El trabajo desarrollado me permitió profundizar mi formación profesional, dentro del área de Tecnología de Alimentos y Química Analítica, constituyendo una herramienta científica dentro de la actividad laboral y educativa en la que actualmente me desempeño. Ha ampliado mis conocimientos, mejorado mi riqueza conceptual, me ha permitido adquirir práctica en la aplicación de la metodología científica y me ha iniciado en el hermoso terreno de la investigación y desarrollo.

A su vez; como el desarrollo de la parte experimental del trabajo la he realizado fuera de mi país, mediante una beca que he obtenido de investigación pre doctoral en España, ha sido una experiencia muy positiva que me ha permitido crecer en el ámbito personal.

Es de gran importancia para las industrias de los alimentos el control de calidad de los mismos. El conocimiento de la presencia de aminos biogénicos en los alimentos es muy antiguo, pero el interés por las determinaciones analíticas de aminos biogénicos en alimentos como control de calidad para garantizar el consumo de alimentos inocuos y para investigación y desarrollo ha surgido en los últimos años, prueba de ello es el incremento del número de publicaciones referidas a la presencia de aminos biogénicos en vinos.

La estandarización de metodologías analíticas para su determinación permitirá un mayor control de los distintos procesos de elaboración de alimentos fermentados y consecuentemente su mejora, como también una mayor satisfacción por parte de los consumidores.

A través del trabajo desarrollado se pretende que, se pueda contribuir a la mejora del control de calidad de los alimentos fermentados mediante la aplicación de la metodología analítica desarrollada, especialmente en vinos en los cuales se ha aplicado exitosamente tal metodología.

Desde el punto de vista social debe tenerse en cuenta que el proceso de elaboración de algunos vinos es muchas veces semiartesanal y está basada en tradiciones o conocimientos empíricos heredados de los antepasados. El aporte de información científica que permita la cuantificación de aminas biogénicas en vinos, permitirá optimizar el control de proceso de elaboración. Así, un mayor control del proceso permite la comercialización de productos inocuos, de calidad y mayor valor comercial.

A través de la realización del presente estudio se consiguió obtener una metodología que permite la separación simultánea de varios aminoácidos y aminas biogénicas, y cómo se vieron afectados algunos vinos de variedad Monastrell con Denominación de origen de Alicante.

El interés por la determinación de aminas biogénicas en la elaboración de vinos no se circunscribe a la investigación básica, si no que, a nivel industrial, existen ya en la actualidad varios países en los cuales se implementan límites de aminas biogénicas para la comercialización e importación de vinos. Se prevé tenga el mayor éxito en control de calidad, porque la inocuidad es una de las características más importante por la cual se juzga, en la actualidad, la calidad de un alimento.

El trabajo está organizado en siete capítulos en el primero se aborda una introducción del tema referente al estado actual del conocimiento de la presencia de aminas biogénicas en alimentos y su determinación. En el segundo capítulo se desarrollan los aspectos relacionados a los antecedentes de tema. En el tercer capítulo se plantean tanto el objetivo general como los objetivos específicos. En el cuarto se comentan los materiales y métodos empleados para el desarrollo del trabajo. En el quinto capítulo se desarrollan los resultados obtenidos, así como también se presentan las discusiones y en el sexto se detallan las conclusiones del trabajo. Por último, el séptimo capítulo presenta la bibliografía consultada.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-------------|
| Índice general | IX |
| Índice abreviaturas | XII |
| Índice de figuras | XV |
| Índice de tablas | XVII |
| RESÚMEN | XIX |
| SUMARY | XXI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. AMINOÁCIDOS | 1 |
| 1.1.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS AMINOÁCIDOS. 2 | |
| 1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS | 4 |
| 1.1.3. FUNCION DE LOS AMINOÁCIDOS LIBRES EN LOS ALIMENTOS..... | 7 |
| 1.2. AMINAS BIOGÉNICAS | 8 |
| 1.2.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS AMINAS BIOGÉNICAS | 9 |
| 1.2.2. FUNCIÓN Y EFECTO DE LAS AMINAS BIOGÉNICAS..... | 13 |
| 1.2.3. AMINAS BIOGÉNICAS EN DIFERENTES ALIMENTOS..... | 16 |
| 1.3. IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS EN VINOS | 18 |
| 1.4. VINOS DE LA PROVINCIA DE ALICANTE..... | 19 |
| 2. ANTECEDENTES | 23 |
| 2.1. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS.. | 23 |
| 2.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA | 24 |
| 2.1.2. DERIVATIZACIÓN | 24 |
| 2.1.3. AGENTES DERIVATIZANTES..... | 25 |
| 2.1.4. TIPOS DE DERIVATIZACIÓN | 28 |
| 2.2. ANTECEDENTES DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS. 29 | |
| 3. OBJETIVOS | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1. OBJETIVO GENERAL..... | 31 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 4. MATERIALES Y METODOS..... | 32 |
| 4.1. EQUIPOS..... | 32 |
| 4.1.1. CROMATÓGRAFO..... | 32 |
| 4.1.2. DETECTOR..... | 34 |
| 4.1.3. HORNO | 34 |
| 4.1.4. COLUMNA CROMATOGRÁFICA..... | 35 |
| 4.1.5. PRE COLUMNA CROMATOGRÁFICA..... | 35 |
| 4.1.6. SOFTWARE..... | 35 |
| 4.2. REACTIVOS..... | 36 |
| 4.3. AMINAS BIOGÉNICAS Y AMINOÁCIDOS DETERMINADOS | 38 |
| 4.4. SOLUCIONES..... | 38 |
| 4.4.1. TAMPÓN FOSFATO | 38 |
| 4.4.2. TAMPÓN BORATO..... | 38 |
| 4.4.3. REACTIVO DE DERIVATIZACIÓN | 39 |
| 4.4.4. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES | 39 |
| 4.4.5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA SU POSTERIOR ANÁLISIS..... | 40 |
| 4.5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS..... | 41 |
| 4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS | 42 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 43 |
| 5.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA SEPARACIÓN SIMULTÁNEA DE AMINOÁCIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS | 43 |
| 5.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL pH DE LA FASE MÓVIL | 46 |
| 5.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA | 48 |
| 5.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL | 49 |
| 5.1.4. OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE GRADIENTE | 50 |
| 5.1.5. INCORPORACIÓN DE PATRÓN INTERNO | 52 |
| 5.2. CONDICIONES DE TRABAJO SELECCIONADAS | 53 |
| 5.3. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3.1. RECTAS DE CALIBRADO | 55 |
| 5.4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS MUESTRAS DE VINO ANALIZADAS..... | 59 |
| 5.5. DIFERENCIACIÓN DE VINOS MONASTRELL DE ACUERDO AL PERFIL DE AMINOÁCIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS | 71 |
| 6. CONCLUSIONES | 79 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 81 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2-MCE: 2-mercaptoetanol

5-HT: Serotonina

A.O.A.C.: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales

AQC: 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil Carbamato

AGM: Agmatina

Ala: Alanina

Arg: Arginina

Asn: Asparragina

Asp: Ácido Aspártico

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CAD: Cadaverina

CCF: Cromatografía en Capa Fina

CG: Cromatografía de gases

Cl-Dns: Cloruro de Dansilo

Cys: Cisteína

DAD: haz de diodos

DAO: Diamooxidasas

DH: 1,7-Diaminoheptano

DOPA: Dopamina

D.O: Denominación de Origen

EC: Electroforésis capilar

EM: Espectrofotometría de Masas

ESP: Espermina

ESPD: Espermidina

ETA: Etanolamina

ETIA: Etilamina

FITC: Fenilisotiacianato

FLD: Fluorimétricos

CFMO: Cloroformato de fluorenilmetilo

fmol: femto mol

GABA: Ácido γ -aminobutírico

Gln: Glutamina

Glu: Acido Glutámico

Gly: Glicina

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HIM: Histamina

Hys: Histidina

Ile: Isoleucina

ISOM: Isoamilamina

ISOP: Isopentilamina

L: Litro

Leu: Leusina

Lis: Lisina

LOD: Límite de Detección

MAO: Monoamino oxidasa

Max: Máximo

Met: Metionina

METIA: Metilamina

mg: miligramo

Min: mínimo

ml: mili litro

n: Número de repeticiones de la muestra o patrón

NinH: Ninhidrina

nm: nanometro

Nor: Norvalina

OIV: Oficina Internacional de la Viña y el Vino

OPA: o-Ftaldialdehido

PEA: Feniletilamina

Phe: Fenilalanina

pmol: pico mol

Pro: Prolina

PUT: Putrescina

R: cadena lateral de aminoácidos o aminas biogénicas

RP-HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Inversa

Ser: Serina

SNC: Sistema Nervioso Central

S_{ruido}: Señal de Ruido de Fondo

Tau: Taurina

Thr: Treonina

Trp: Triptófano

TRIM: Triptamina

TIM: Tiramina

Tyr: Tirosina

UV: Ultra Violeta

Val: Valina

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Estructura genérica de un α-aminoácido: su forma de anión, catión y de switterion. | 3 |
| Figura 2. Reacción de decarboxilación..... | 9 |
| Figura 3. Aminoácidos precursores de algunas aminas biogénicas..... | 10 |
| Figura 4. Síntomas mediados por Histamina..... | 15 |
| Figura 5. Cultivo de vid de la provincia de Alicante..... | 22 |
| Figura 6. Cromatógrafo Waters multisolvent, bomba de doble pistón, controlador de gradiente y flujo de eluyente Waters 600E, válvula Rheodyne modelo 7125 y detector Waters 474. | 33 |
| Figura 7. Detector de fluorescencia Waters 474. | 34 |
| Figura 8. Columna Waters AccQ.Tag C18 3,9 x 150 mm..... | 35 |
| Figura 9. Filtro de Nylon Albet con diámetro de poro 0,45 μm. | 41 |
| Figura 10. Cromatograma típico obtenido cuando un patrón de aminoácidos es inyectado en el sistema cromatográfico | 44 |
| Figura 11. Cromatograma obtenido cuando un patrón conjunto de aminoácidos y aminas biogénicas es inyectado en el sistema cromatográfico. | 45 |
| Figura 12. Cromatograma de histamina en dos estados de ionización (Tampón Fosfato pH=6,4) | 46 |
| Figura 13. Ionización de la molécula de Histamina a pH= 6,4. | 47 |
| Figura 14. Cromatograma de histamina en un estado de ionización (Tampón Fosfato pH=7,3) | 47 |
| Figura 15. a) Cromatograma de histamina cuando la columna se encontraba a Temperatura ambiente. | 48 |
| Figura 15. b) Cromatograma de histamina cuando la columna se mantuvo a 35 $^{\circ}$C. | 48 |
| Figura 16. Fragmento de cromatograma donde se pueden observar los picos correspondientes a Met, Val, HIM, Phe, METIA y ETIA..... | 52 |
| Figura 17. Fragmento de cromatograma donde se puede observar un pico correspondiente DH a concentración de 50 ppm..... | 53 |
| Figura 18. Ejemplo de un cromatograma típico, obtenido cuando un patrón es inyectado en el sistema cromatográfico. | 55 |
| Figura 19. Ecuación general de la recta de calibrado. | 56 |
| Figura 20. Recta de calibrado de Met..... | 56 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 21. Ecuación para el cálculo del límite de detección | 58 |
| Figura 22. Contenido total (mg/L) en aminas biogénicas en los vinos jóvenes. | 63 |
| Figura 23. Contenido total (mg/L) en aminoácidos libres en vinos jóvenes..... | 63 |
| Figura 24. Contenido total (mg/L) en aminoácidos libres en vinos de crianza. | 64 |
| Figura 25. Contenido total (mg/L) en aminas biogénicas en los vinos Crianza. | 66 |
| Figura 26. Contenido total (mg/L) en aminas biogénicas en vinos Fondillón.... | 68 |
| Figura 27. Contenido total (mg/L) en aminoácidos libres en vinos Fondillón. .. | 68 |
| Figura 28. Comparación de contenidos de aminas biogénicas (mg/L) de vinos jóvenes y de crianza con vinos añejos (Fondillón)..... | 72 |
| Figura 29. Comparación de contenidos en algunos aminoácidos libres (mg/L) de vinos jóvenes y de crianza con vinos Fondillón..... | 73 |
| Figura 30. Comparación de contenidos en algunos aminoácidos libres (mg/L) de vinos jóvenes y crianza con vinos Fondillón. | 74 |
| Figura 31. Dendrograma obtenido utilizando los contenidos totales de aminas biogénicas y los aminoácidos libres..... | 75 |
| Figura 32. Dendrograma obtenido utilizando únicamente las aminas biogénicas. | 77 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla I. Características químicas y propiedades de los aminoácidos. | 4 |
| Tabla II. Sabores aportados por los aminoácidos a los alimentos..... | 7 |
| Tabla III. Sabor de algunos aminoácidos en sus formas isoméricas..... | 8 |
| Tabla IV. Propiedades de algunas aminas biogénicas..... | 12 |
| Tabla V. Aminas biogénicas y sus efectos farmacológicos | 14 |
| Tabla VI. Características de agentes derivatizantes | 27 |
| Tabla VII. Antecedentes de análisis de aminoácidos y/o aminas biogénicas | 29 |
| Tabla VIII. Reactivos utilizados..... | 36 |
| Tabla IX. Condiciones cromatográficas..... | 41 |
| Tabla X. Composición de la fase móvil. | 43 |
| Tabla XI. Programa de gradiente 1. | 43 |
| Tabla XII. Composición de la fase móvil prueba 1 | 49 |
| Tabla XIII. Composición de la fase móvil prueba 2..... | 50 |
| Tabla XIV. Composición de la fase móvil utilizada para la separación de aminoácidos y aminas biogénicas..... | 50 |
| Tabla XV. Programa de gradiente utilizado..... | 51 |
| Tabla XVI. Condiciones cromatográficas utilizadas..... | 54 |
| Tabla XVII. Rectas de calibrado, índice de correlación y límite de detección para los aminoácidos estudiados..... | 57 |
| Tabla XVIII. Rectas de calibrado, índice de correlación y límite de detección obtenidos para las aminas | 58 |
| Tabla XIX. Muestras de vino analizadas y el pH de las mismas (n=3)..... | 59 |
| Tabla XX (a). Contenidos en aminoácidos libres y aminas biogénicas (mg/L) y la desviación estándar relativa (n=3) en vinos jóvenes. | 60 |
| Tabla XX (b). Contenidos en aminoácidos libres y aminas biogénicas (mg/L) y la desviación estándar relativa (n=3) en vinos jóvenes. | 61 |
| Tabla XXI. Contenidos en aminoácidos libres y aminas biogénicas (mg/L) y la desviación estándar relativa (n=3) en vinos de crianza. | 65 |
| Tabla XXII. Contenidos en aminoácidos libres y aminas biogénicas (mg/L) y la desviación estándar relativa (n=3) en vinos Fondillón. | 67 |

| | |
|---|-----------|
| Tabla XXIII. Comparación de contenidos (mg/l) máximos y mínimos en aminoácidos libres de las muestras analizadas en el presente trabajo y muestras de la variedad Tempranillo..... | 70 |
| Tabla XXIV. Contenido (Min-Max) en aminos biogénicas (mg/L) encontrados en algunos vinos y por diferentes autores..... | 71 |

RESUMEN

Las aminas biogénicas se pueden encontrar en una gran variedad de alimentos, especialmente en los que son ricos en proteínas. Son producidas por descarboxilación de los aminoácidos mediada por microorganismos presentes en los alimentos. Su presencia en los alimentos es de gran interés debido a su posible toxicidad en los seres humanos. Así, la determinación de aminas biogénicas y la fracción de aminoácidos libres puede proporcionar información interesante relacionada con parámetros de frescura o deterioro de los alimentos.

En este estudio, se ha desarrollado una metodología por RP-HPLC para la determinación simultánea de 26 compuestos. El método consiste en una derivatización pre-columna de los analitos con o-ftaldialdehído (OPA) en presencia de 2-mercaptoetanol (2-MCE) y la posterior separación de los compuestos en una columna C18 detectados por fluorescencia.

Los aminoácidos estudiados fueron: ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, serina, histidina, glicina, treonina, arginina, alanina, ácido γ -aminobutírico, tirosina, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina. Entretanto, las aminas fueron: histamina, etanolamina, metilamina, etilamina, tiramina, triptamina, putrescina y cadaverina.

Algunas variables del proceso cromatográfico fueron optimizadas con la finalidad de obtener una buena separación de los compuestos. Las mejores condiciones, para obtener una buena selectividad entre los picos, se obtuvieron a 35° C, con un caudal de 1 ml/min y utilizando un gradiente de dos solventes que contenía metanol, tampón fosfato y tetrahidrofurano. Como estándar interno se seleccionó 1,7-Diaminoheptano.

La metodología desarrollada se aplicó para el análisis de vinos Monastrell con Denominación de Origen de Alicante. De los resultados

obtenidos se puede concluir que las muestras de vino analizadas presentaron niveles de histamina por debajo de 20 mg/l, por encima del cual pueden ocurrir algunos efectos fisiológicos no deseados. Además, los niveles de triptamina en vinos jóvenes y crianza fueron menores al límite de detección. En ninguna de las muestras se encontraron cantidades cuantificables de cadaverina o metilamina; mostrando que no hay síntomas de deterioro de las propiedades sensoriales de los vinos e indicando que las uvas utilizadas para la elaboración de los vinos se encontraban en buen estado de conservación.

Palabras clave: aminas biogénicas, aminoácidos, OPA, HPLC, fluorescencia, Monastrell.

SUMMARY

Biogenic amines can be found in a variety of foods, especially in protein-rich ones. These compounds are produced by decarboxilation of free amino acids from foods mediated by microorganisms present in them. The determination of biogenic amines in foods is of great interest due to their possible toxicity in humans. Hence, the determination of biogenic amines and free amino acid fraction can provide interesting information related to parameters to assess the freshness or spoilage of foods.

In this study a RP-HPLC methodology has been developed for the simultaneous determination of 26 compounds. The method involves a pre-column derivatization of the analytes with o-phthaldialdehyde (OPA) in the presence of 2-mercaptoethanol (2-MCE) and subsequent separation of the compounds in a C18 column with fluorescence detection.

Amino acids included in the study were: aspartic acid, glutamic acid, asparagine, serine, histidine, glycine, threonine, arginine, alanine, γ -aminobutyric acid, tyrosine, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine, and lysine. Meanwhile, the amines were: ethanolamine, histamine, methylamine, ethylamine, tyramine, tryptamine, putrescine and cadaverine.

In order to obtain a good separation of all the compounds, some variables of the chromatographic process were optimized. The best conditions to obtain a good selectivity among the entire peaks were obtained working at 35° C, with a flow rate of 1 ml/min and using a gradient of two solvents which contained methanol, phosphate buffer and tetrahydrofuran. 1,7-Diaminheptane was selected as internal standard.

The developed methodology was applied for analysis of Monastrell wines with Designation of Origin Alicante. From the results obtained it can be concluded that none of the wine samples analyzed had histamine levels above 20 mg/l, above which some undesirable physiological effects may occur. Moreover, tryptamine levels in young and aging wines were less than the detection limit. In none of the samples were found measurable

amounts of cadaverine or methylamine, showing no spoilage symptoms of sensory properties of the wines and indicating that the grapes used for winemaking were in good condition.

Key words: Biogenic amines, aminoacids, OPA, HPLC, fluorescence, Monastrell.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día es una prioridad dentro del control de calidad de los alimentos el garantizar su inocuidad, por ello es importante desarrollar los métodos de análisis pertinentes que permitan cuantificar la cantidad en la que están presentes algunos compuestos en los alimentos y, de esta forma conocer, si son aptos para el consumo o no. Dentro de los compuestos que pueden presentar toxicidad para los seres humanos se encuentran las aminas biogénicas.

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios centrados en determinar el contenido de aminas biogénicas en algunos alimentos, sobre todo, en los fermentados, no obstante, falta todavía trabajo por hacer para tratar de mejorar estos métodos permitiendo alcanzar sensibilidades mayores y determinar un mayor número de compuestos de forma simultánea.

1.1. AMINOACIDOS

La inmensa mayoría de los alimentos contienen aminoácidos, ya sea como aminoácidos libres o en forma de proteínas (parcialmente hidrolizadas o intactas)¹. Las proteínas son polímeros, en los cuales los α -aminoácidos son los monómeros que se combinan para formarlas mediante enlaces peptídicos². El consumo de proteínas es fundamental para los humanos. No obstante, desde el punto de vista nutricional las necesidades reales no son de proteínas sino de aminoácidos, que el hombre y otros animales usan para la biosíntesis de enzimas, proteínas estructurales y compuestos con nitrógeno no proteico como los ácidos nucleicos¹. La principal fuente de aminoácidos de la dieta humana son las proteínas, las cuales son digeridas enzimáticamente para liberar sus aminoácidos constituyentes¹. Por lo tanto, la composición en aminoácidos

de las proteínas de la dieta es extremadamente importante ya que ello determina la calidad de cada una de las proteínas. Existen ocho aminoácidos esenciales para la nutrición adecuada de los adultos: triptófano (Trp), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), treonina (Thr), metionina (Met), leucina (Leu), isoleucina (Ile) y valina (Val)^{2,3}. Estos ocho aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano entonces deben ser provistos con la dieta para mantener el balance de nitrógeno¹. Además, arginina (Arg) e histidina (Hys) son aminoácidos esenciales para los niños. Finalmente, tirosina (Tyr) y cisteína (Cys) también se clasifican como aminoácidos esenciales puesto que no pueden ser sintetizados en cantidades adecuadas cuando la dieta es deficiente en Phe o Met, respectivamente².

1.1.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS AMINOÁCIDOS

Un aminoácido es una molécula orgánica con un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$). Todos los aminoácidos componentes de las proteínas son α -aminoácidos, lo que indica que el grupo amino está unido al carbono alfa, es decir, al carbono contiguo al grupo carboxilo. Por lo tanto, están formados por un carbono alfa unido a un grupo carboxilo, a un grupo amino, a un hidrógeno y a una cadena (habitualmente denominada R) de estructura variable, que determina la identidad (Figura 1) y las propiedades de los diferentes aminoácidos. Existen cientos de cadenas R por lo que se conocen cientos de aminoácidos diferentes, pero son sólo 20 los que forman mayoritariamente parte de las proteínas.

En los medios biológicos los aminoácidos se presentan en sus formas ionizadas. Las diferentes formas iónicas en que puede encontrarse un aminoácido son muy dependientes del pH del medio en el que se encuentran, debido a la presencia de un grupo ácido (carboxílico) y también de un grupo básico (amino). El pKa de los grupos carboxilos y

amino de los α -aminoácidos es aproximadamente 2 y 10 respectivamente; por ende, en la proximidad del pH neutro, el grupo carboxilato habrá perdido un protón y el grupo amino habrá captado un protón, para dar la forma de *switterion*². La estructura o estructuras generales de un α -aminoácido dependiendo del pH es la que se muestra en la Figura 1.

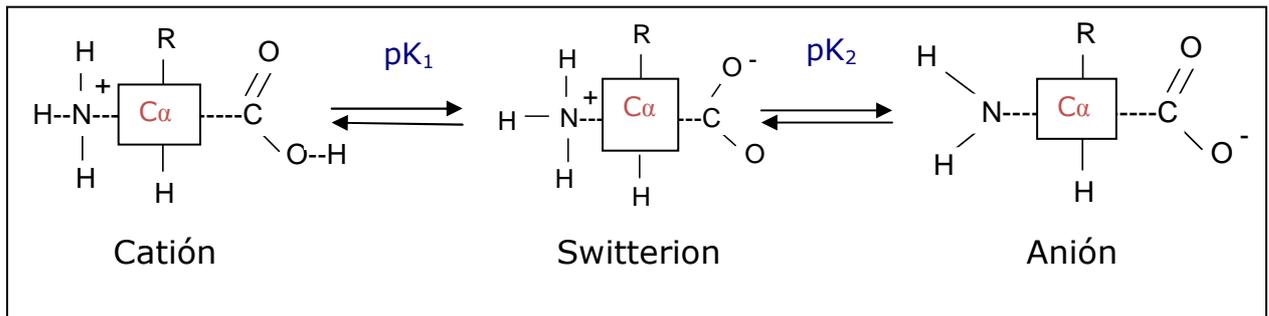


Figura 1. Estructura genérica de un α -aminoácido: su forma de anión, catión y de switterion.

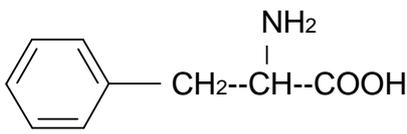
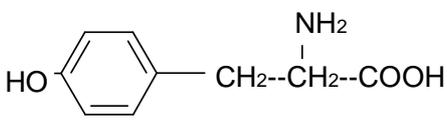
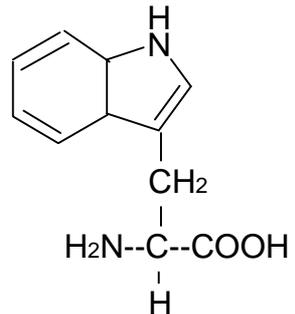
Todos los aminoácidos, excepto la glicina (Gly), pueden existir en la forma D y L, ya que en todos los casos el carbono α es quiral. La única excepción es la Gly, dado que dos de los grupos unidos al carbono α son iguales (hidrogeno), con lo que se elimina la quiralidad². En la naturaleza, el carbono α está casi siempre sustituido para dar el estereoisómero L¹. De hecho, los aminoácidos D existen en la naturaleza, y algunos desempeñan funciones bioquímicas importantes, pero nunca se hallan formando las proteínas de los alimentos².

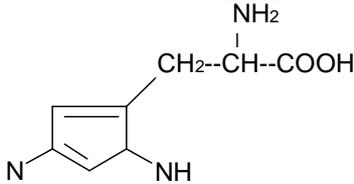
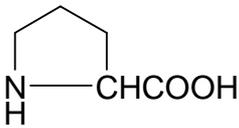
1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

Existen aminoácidos con propiedades diferentes según el tipo y características de la cadena lateral que posean (-R). Estas características incluyen el carácter hidrófobo o hidrófilo, la naturaleza polar o no polar, y la presencia o ausencia de grupos ionizables². En la Tabla I se puede observar algunas propiedades de los aminoácidos que se encuentran más frecuentemente constituyendo las proteínas de los alimentos o bien como aminoácidos libres en los mismos.

Tabla I. Características químicas y propiedades de los aminoácidos.

| Nombre | Abreviatura | PM | pK ² | Estructura Química |
|--|-------------|-------|--|---|
| Aminoácidos con cadenas laterales alifáticas | | | | |
| Glicina | Gly | 75,1 | pK ₁ =2,3 pK ₂ =9,6 | $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ |
| Alanina | Ala | 89,1 | pK ₁ =2,3 pK ₂ =9,7 | $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ |
| Valina | Val | 117,1 | pK ₁ =2,3 pK ₂ =9,6 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ |
| Leucina | Leu | 131,2 | pK ₁ =2,4 pK ₂ =9,6 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ |
| Isoleucina | Ile | 131,2 | pK ₁ =2,4 pK ₂ =9,7 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ |

| Aminoácidos con cadenas laterales que contienen hidroxilo | | | | |
|---|-----|-------|---------------------------|---|
| Serina | Ser | 105,1 | $pK_1=2,2$ $pK_2=9,2$ | $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ |
| Treonina | Thr | 119,1 | $pK_1=2,6$ $pK_2=10,4$ | $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ |
| Aminoácidos con cadenas laterales azufradas | | | | |
| Cisteína | Cys | 121 | $pK_1=1,8$ $pK_2=10,8$ | $\begin{array}{c} \text{SH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ |
| Metionina | Met | 149,2 | $pK_1=2,3$ $pK_2=9,2$ | $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ |
| Aminoácidos aromáticos | | | | |
| Fenilalanina | Phe | 165,2 | $pK_1=1,8$ $pK_2=9,1$ |  |
| Tirosina | Tyr | 181,2 | $pK_1=2,2$ $pK_2=9,1$ |  |
| Triptófano | Trp | 204 | $pK_1=2,4$ $pK_2=9,4$ |  |

| Aminoácidos básicos | | | | |
|---------------------------------|------|-------|---------------------------|---|
| Histidina | Hys | 155,2 | $pK_1=1,8$ $pK_2=9,2$ |  |
| Lisina | Lys | 146,2 | $pK_1=2,2$ $pK_2=9,0$ | $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ |
| Arginina | Arg | 174,2 | $pK_1=2,2$ $pK_2=9,0$ | $H_2N-C(=NH)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ |
| Aminoácidos ácidos y sus amidas | | | | |
| Ácido Aspártico | Asp | 133,1 | $pK_1=2,1$ $pK_2=9,8$ | $HO-C(=O)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ |
| Ácido Glutámico | Glu | 141,1 | $pK_1=2,2$ $pK_2=9,7$ | $HO-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ |
| Asparragina | Asn | 132,1 | $pK_1=2,0$ $pK_2=8,8$ | $H_2N-C(=O)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ |
| Glutamina | Gln | 146,1 | $pK_1=2,2$ $pK_2=9,1$ | $H_2N-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ |
| Aminoácido cíclico | | | | |
| Prolina | Pro | 115 | $pK_1=2,0$ $pK_2=10,6$ |  |
| Aminoácido no proteico | | | | |
| Ácido γ -aminobutírico | GABA | 103,1 | $pK_1=2,29$ | $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$ |

1.1.3. FUNCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS LIBRES EN LOS ALIMENTOS

Los aminoácidos libres, es decir los que no se encuentran formando proteínas, son importantes por su contribución al sabor de los alimentos (Tabla II y III) y, por ser precursores de componentes aromáticos y de sustancias coloreadas que se forman mediante reacciones térmicas y/o enzimáticas que se producen durante la obtención, preparación y almacenamiento de los alimentos⁴. Por ejemplo, en presencia de un azúcar reductor se produce la reacción de Maillard. Esta reacción pese a ser muy compleja permite obtener como productos finales de la misma moléculas volátiles responsables de algunos de los aromas característicos de los alimentos. La formación de uno u otros aromas dependerá de muchas variables entre otras los aminoácidos y los azúcares reductores que reaccionen⁵.

Tabla II. Sabores aportados por los aminoácidos a los alimentos⁶

| Umami y ácido | Dulce | Amargo |
|----------------------|-------------------------------|--|
| Glutamato, Asp | Gly, Ala, Thr, Pro, Ser, Gln. | Phe, Tyr, Arg, Leu, Ile, Val, Met, Hys |

Tabla III. Sabor de algunos aminoácidos en sus formas isoméricas⁷.

| Aminoácido | L-Isómero | D-Isómero |
|-------------------|------------------|--------------------------|
| Glu | Único | Sin sabor |
| Asn | Insípido | Dulce |
| Phe | Ligero amargo | Dulce con resabio amargo |
| Hys | Sin sabor-amargo | Dulce |
| Ile | Muy amargo | Dulce |
| Leu | Ligero amargo | Muy dulce |
| Met | Sin sabor | Dulce |
| Ser | Ligero dulce | Muy dulce |
| Val | Ligero dulce | Muy dulce |

Los aminoácidos libres pueden proceder de la degradación proteica o existir de forma natural en los alimentos. Respecto a la proteólisis hay que considerar dos situaciones: por una parte, la producida por una proliferación microbiana no controlada; la formación de aminas por esta vía no constituye un riesgo importante de intoxicación, ya que en este estado los alimentos son descartados del consumo, debido a sus defectos organolépticos; por otra parte, los aminoácidos libres que aparecen como consecuencia de procesos de fermentación durante la fabricación⁸, aparecen con frecuencia en alimentos fermentados (vinos, quesos, salchichas etc.) y tienen efectos negativos sobre la salud humana y la calidad de estos alimentos^{9,10}.

1.2. AMINAS BIOGÉNICAS

Las aminas biogénicas son compuestos orgánicos que están presentes en materias primas y en alimentos procesados. Se pueden formar y también degradar dentro de las reacciones metabólicas normales que se producen en animales y plantas. En general, la presencia de

aminas biogénicas se asocia a un mecanismo de defensa que desarrollan los microorganismos para protegerse de ambientes ácidos¹⁰.

1.2.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS AMINAS BIOGÉNICAS

Las aminas son compuestos ampliamente descritos en la naturaleza, que contienen uno o varios sustituyentes unidos a un átomo de nitrógeno. Son compuestos endógenos de las plantas que también pueden encontrarse en frutas frescas y verduras. Sin embargo, en los alimentos, las aminas se forman fundamentalmente en los procesos fermentativos, y durante el envejecimiento y la conservación, a partir de la descarboxilación microbiana (Figura 2) de los correspondientes aminoácidos precursores¹⁰, por ello se denominan "biogénicas".

En el campo alimentario, el termino aminas biogénicas se utiliza, sobre todo, para designar el grupo de aminas no volátiles⁸.



Figura 2. Reacción de descarboxilación.

Las aminas biogénicas no se producen en los alimentos de forma sistemática, ni siquiera cuando están muy contaminados. Se deben dar varias circunstancias simultáneas como son:

- Presencia de bacterias lácticas con actividad decarboxilasa positiva.
- Condiciones ambientales favorables
- Moléculas precursoras (aminoácidos)^{10,11}.

En la Figura 3 se muestran los aminoácidos precursores de algunas de las principales aminas biogénicas y sus correspondientes aminas biogénicas.

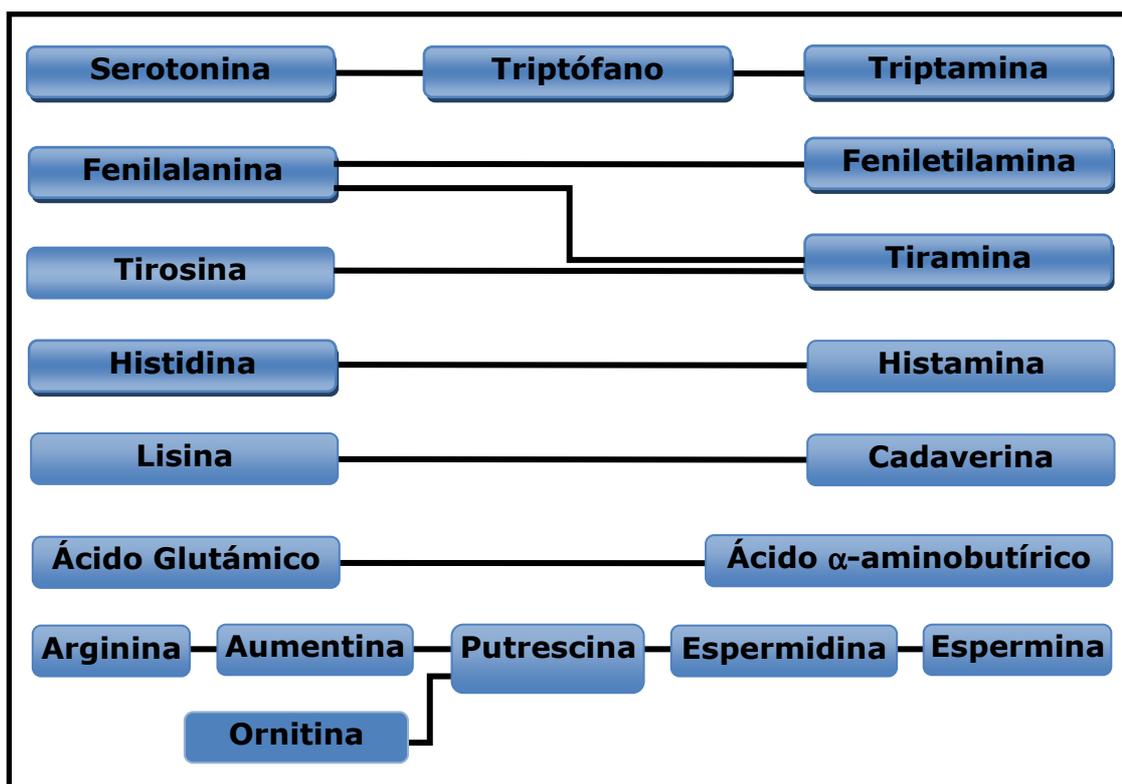


Figura 3. Aminoácidos precursores de algunas aminas biogénicas^{12,13}.

Se conoce una gran variedad de aminas biogénicas con propiedades químicas bastante diferentes. Teniendo en cuenta esto, se pueden clasificar según la naturaleza de la cadena lateral que poseen en:

a) Aminas alifáticas

- a. Poliaminas: agmatina (AGM), espermidina (ESPD), espermina (ESP).
- b. Diaminas: Putrescina (PUT) y cadaverina (CAD).
- c. Monoaminas: metilamina (METIA), etilamina (ETIA), isopropilamina, isobultamina, hexilamina, etanolamina (ETA), etc.

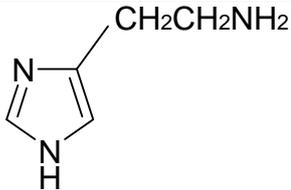
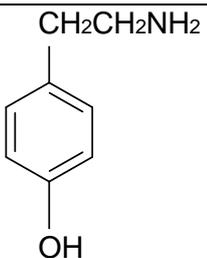
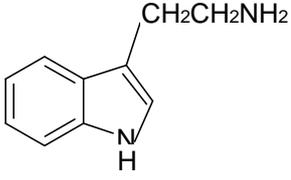
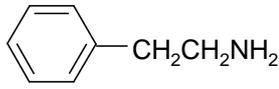
b) Aminas aromáticas:

- a. Con núcleo bencénico: tiramina (TIM), feniletilamina (PEA)
- b. Con núcleo heterocíclico: histamina (HIM), triptamina (TRIM)^{12,13}.

En general, a las aminas alifáticas se las relaciona con condiciones higiénicas deficientes en la elaboración de alimentos y con las propiedades sensoriales. Por otro lado, las aminas aromáticas y heterocíclicas están más vinculadas a efectos tóxicológicos¹⁰.

En la Tabla IV se muestran algunas propiedades químicas de las aminas biogénicas.

Tabla IV. Propiedades de algunas aminas biogénicas.

| Nombre | Abreviatura | PM | pK ^{14, 2} | Estructura Química |
|----------------|-------------|-------|---|--|
| Etanolamina | ETA | 61,1 | pK ₁ =9,5 | $\begin{array}{c} \text{HO} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}--\text{CH}_2 \end{array}$ |
| Histamina | HIM | 111,1 | pK ₁ =9,8 |  |
| Metilamina | METIA | 31 | pK ₁ =10,63 | CH ₃ —NH ₂ |
| Etilamina | ETIA | 45,1 | pK ₁ =10,7 | CH ₃ --CH ₂ --NH ₂ |
| Tiramina | TIM | 137,2 | pK ₁ =9,6 |  |
| Triptamina | TRIM | 160,2 | pK=10,2 |  |
| Feniletilamina | PEA | 121,2 | pK=10,0 |  |
| Putrescina | PUT | 88,2 | pK ₁ =10,8 pK ₂ =9,4 | H ₂ N--C ₄ H ₈ --NH ₂ |
| Cadaverina | CAD | 202,2 | pK ₁ =11,0 pK ₂ =9,9 | H ₂ N--C ₅ H ₁₀ --NH ₂ |
| Isopentilamina | ISOP | 87,1 | pK=10,6 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3--\text{CH}--\text{CH}_2--\text{CH}_2--\text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ |

1.2.2. FUNCIÓN Y EFECTO DE LAS AMINAS BIOGÉNICAS

Las funciones biológicas de las aminas son muy diversas, pudiendo tener efectos beneficiosos o perjudiciales en los seres humanos¹⁵. Así, en pequeñas concentraciones las aminas biogénicas son esenciales para muchas funciones fisiológicas del organismo como la regulación de la temperatura corporal, el pH del estómago, la actividad cerebral, etc¹⁰. Más en concreto, se sabe que las poliaminas son componentes indispensables de las células vivas y, son importantes en la regulación de la función del ácido nucleico y la síntesis de proteínas, y probablemente también en la estabilización de membranas¹⁶. Por otro lado, también se sabe que algunas aminas aromáticas como TIM, TRIM, y PEA muestran acción vasoconstrictora; mientras que otras, HIM y serotonina (5-HT), presentan efecto vasodilatador. Al mismo tiempo, la HIM y TIM también actúan como mediadores hormonales en los seres humanos y animales. Las aminas psicoactivas, tales como la dopamina (DOPA) y la 5-HT, son neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC)¹².

Sin embargo, cuando la ingesta de estas aminas sobrepasa unos niveles estas pueden tener unos efectos adversos sobre la salud.

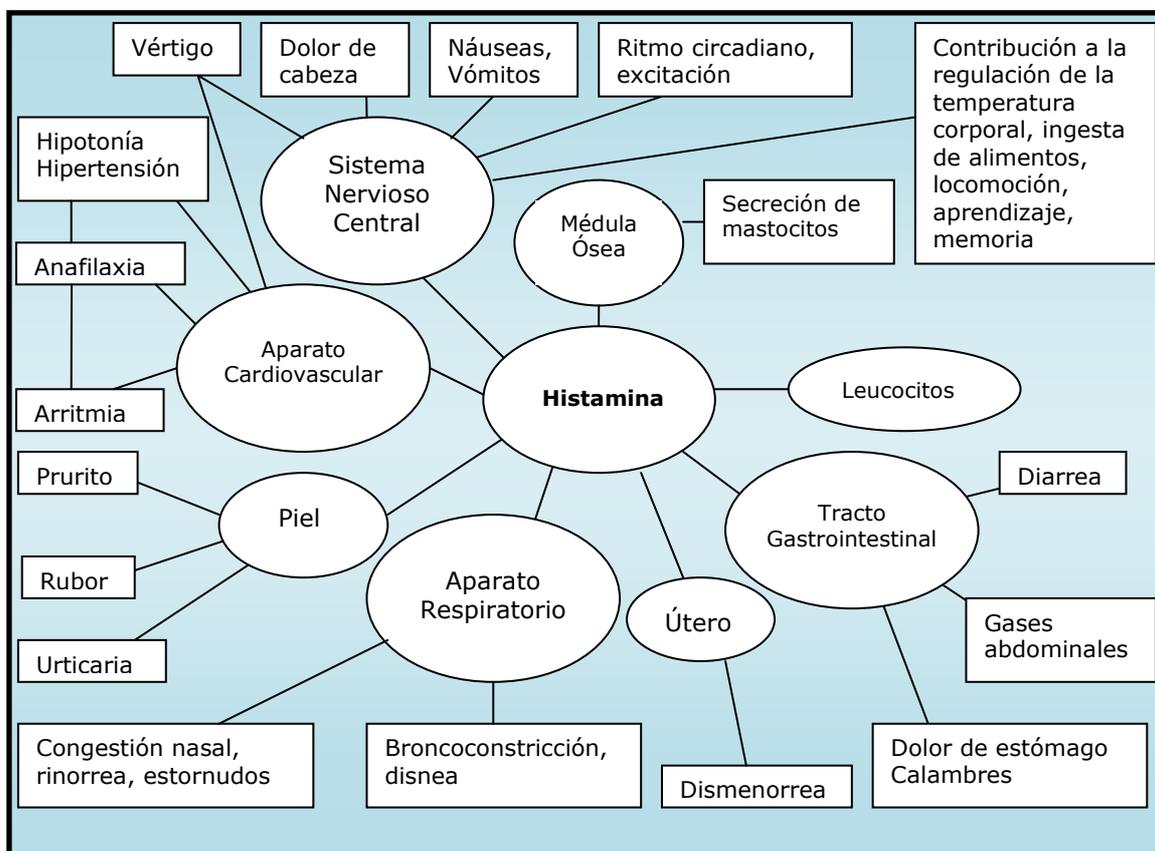
El organismo humano tolera fácilmente concentraciones bajas de aminas biógenas, ya que éstas son eficientemente degradadas por las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y diamino oxidasas (DAO) en el tracto intestinal^{10,17,18}. Aunque existen diferentes susceptibilidades individuales a la intoxicación por aminas biógenas, se considera que tras la ingestión de cantidades excesivas de las mismas, se pueden iniciar varias reacciones farmacológicas (Tabla V).

Tabla V. Aminas biogénicas y sus efectos farmacológicos¹⁰

| Aminas Biogénicas | Efectos farmacológicos |
|-------------------------|--|
| Histamina | Libera adrenalina y noradrenalina. Excita los músculos lisos del útero, el intestino y el tracto respiratorio. Estimula tanto las neuronas motoras y sensoriales. Controles de la secreción ácida gástrica |
| Tiramina | Vasoconstricción periférica. Aumenta el gasto cardíaco. Provoca lagrimeo y salivación. Aumenta la respiración. Aumenta el nivel de glucosa en sangre. Libera noradrenalina desde el sistema nervioso simpático. Causa migraña. |
| Putrescina y Cadaverina | Hipotensión, Bradicardia, Tétano, Paresia de las extremidades, Potenciar la toxicidad de otras aminas, |
| Feniletilamina | Libera noradrenalina al sistema nervioso simpático, Aumenta la presión arterial, Causa migraña. |
| Triptamina | Aumenta la presión arterial. |

La mayoría de las intolerancias alimentarias provocadas por aminas biogénicas se producen por un consumo elevado de HIM, seguido en importancia por PEA y TIM. El resto de aminas se considera que puede contribuir a reforzar la acción de las anteriores. Los síntomas (Figura 4) que por ser tan diversos, son difíciles de diagnosticar para los médicos, se

manifiestan a partir de media hora después de la ingesta del alimento y van remitiendo al cabo de unas horas¹⁰.



Las aminas biogénicas pueden causar, directa o indirectamente toxicidad cuando sus niveles de concentración son elevados. Por esta razón, varios países han establecido normas para su contenido en la ingesta de diferentes tipos de alimentos¹⁹.

1.2.3. AMINAS BIOGÉNICAS EN DIFERENTES ALIMENTOS

Se puede esperar presencia de aminas biogénicas en casi todos los alimentos que contienen proteínas o aminoácidos libres y están sujetos a condiciones que permiten la actividad microbiana o bioquímica. La cantidad total de las diferentes aminas formadas depende en gran medida de la naturaleza de los alimentos y los microorganismos presentes^{16,20,21}.

Las aminas biogénicas derivadas de la mayor parte de los aminoácidos pueden encontrarse en una amplia variedad de alimentos, pero las presentes en el queso, chocolate y, en particular, en pescados contaminados del tipo de los escómbridos pueden representar un riesgo para la salud¹. Normalmente, estas intoxicaciones son debidas a la presencia de cantidades inusualmente elevadas de HIM en los alimentos y pueden afectar a todos los individuos que consumen el alimento implicado. Actualmente se conoce otro problema derivado de la presencia de HIM en los alimentos, la *intolerancia a la histamina* y que se considera que ocurre debido a una capacidad reducida para metabolizar la HIM exógena (de los alimentos). Esta capacidad reducida para metabolizar la HIM puede tener un componente genético (actividad DAO reducida), patológico (enfermedades inflamatorias intestinales, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, por ejemplo)^{17,22}, o bien puede ser transitoria, a causa del tratamiento con fármacos que tienen reconocida la capacidad de inhibir la DAO¹⁷. Igualmente, se sabe que una ingesta elevada de alcohol y otras aminas biógenas, debido a una competencia para los sistemas de metabolización, pueden favorecer la aparición de los síntomas característicos de la acumulación plasmática de la HIM.

La intoxicación por HIM (escombrototoxicosis) se considera una de las formas más comunes de intoxicación alimentaria^{1,12,16,17}. La HIM ha sido la amina biogénica más estrechamente relacionada con el pescado en descomposición, también se puede encontrar TIM¹³. Además, otras

aminas biogénicas como PUT, CAD, TIM, ESP, ESPD se han detectado en el pescado como la caballa, el arenque, el atún, la sardina¹⁶.

Después del pescado, el queso es el alimento más comúnmente implicado en intoxicaciones por HIM¹⁷. Los quesos hechos de leche pasteurizada y presurizadas tienen menos probabilidad de contener aminas biogénicas^{13,14} aunque la calidad inicial de la leche podría ser aun más responsable de la acumulación de aminas biogénicas en quesos madurados más que el tipo de tratamiento aplicado a la leche¹⁴. Los alimentos envejecidos, especialmente quesos madurados, por lo general contienen de moderado a altos niveles de aminas biogénicas. Los quesos del tipo fresco (por ejemplo, cottage, ricota) y los quesos blandos y procesados (por ejemplo, el queso americano, y queso de untar) por lo general tienen niveles bajos o no detectables de TIM. Otros productos lácteos como yogur y kéfir tienen poco o niveles no detectables de TIM si son elaborados a partir de leche pasteurizada¹³.

También, se pueden encontrar aminas biogénicas en productos cárnicos fermentados como consecuencia de la actividad microbiana relacionada con la fermentación, pero sólo suelen encontrarse en productos hechos a partir de materia prima de baja calidad a través de contaminación microbiológica¹⁷. Así, a partir del uso de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y de la carne fresca de alta calidad se reduce considerablemente el riesgo de formación de aminas biogénicas en productos cárnicos transformados¹³. Las BPM para productos cárnicos utilizando cultivos starter de aminoácido descarboxilasa negativa, disminuyen el riesgo de formación de aminas biogénicas¹⁷.

Por último, los productos que han sufrido fermentación alcohólica como vinos, cervezas, etc. son susceptibles de contener ciertas aminas biogénicas. En esta línea en los últimos años se han publicado diversos artículos, algunos de ellos enfocados a hacer una selección de los microorganismos que se utilizan para provocar la fermentación.

En el caso de las bebidas alcohólicas el problema toxicológico que pueden causar estas aminas, sobre todo HIM, se incrementa al estar

combinado con alcohol, de ahí el interés que ha despertado su estudio en la actualidad.

1.3. IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS EN VINOS

La determinación de aminas biogénicas en bebidas fermentadas como el vino es muy importante ya que son productos que pueden tener un elevado contenido en estos compuestos. El origen de esas aminas biogénicas puede deberse a:

- a) que estuvieran presentes en la uva o en el mosto de la misma,
- b) que se hayan formado por acción de las levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica de la uva²³, o
- c) por acción de las bacterias en la fermentación maloláctica^{10,24}.

Por otro lado, los aminoácidos actúan como fuente de nitrógeno (30-40%) para la levadura durante la fermentación alcohólica, interactuando en la composición aromática de los vinos²⁵.

En la uva cruda se han encontrado cantidades variables de PUT y de ESPD, mientras que otras aminas como HIM, TIM, AGM, ESP, CAD apenas aparecen o se encuentran en cantidades trazas²⁶. Tras la fermentación alcohólica del mosto no se producen grandes cantidades de estos compuestos pero en algún trabajo se ha constatado la formación de HIM, TIM, PEA e isoamilamina (ISOM). Por último, en la fermentación maloláctica es donde mayor cantidad de aminas se forman sobre todo HIM. Este aumento en contenido en HIM en los vinos es tanto mayor cuanto mayor es el pH final del vino²⁷.

Los efectos negativos sobre la salud, calidad del vino y exportación plantean un gran interés en el estudio de estos compuestos nitrogenados con la finalidad de disminuir la concentración de todas las aminas en el

vino y, en especial la HIM⁹. Los orígenes tan diferentes de las aminas biogénicas pueden explicar la gran variabilidad en cuanto a contenidos en estos compuestos que presentan los vinos ya que son dependientes del pH, de la presencia de oxígeno, y otras variables de vinificación.

Con objeto de llevar un control del contenido de estos compuestos en vinos hay algunos países que han legislado como límite máximo de contenido en aminas biogénicas en vino unos 50 mg/L, aunque es muy difícil llegar a un acuerdo al respecto. Como la HIM parece ser la amina que más intolerancia causa en humanos, varios países han dictado unas recomendaciones en cuanto a contenido máximo admisible, este es el caso de Alemania 2 mg/L, de Bélgica de 5-6 mg/L, Francia 8 mg/L²⁸ y 10 mg/L en Suiza^{27,29}. Estos límites son por el momento sólo recomendaciones pero puede que en un futuro, no muy lejano, se conviertan en valores máximos legalmente establecidos. Además, la toxicidad de la HIM estudiada experimentalmente como sustancia aislada posee un valor muy relativo con respecto a la toxicidad cuando es vehiculizada por los alimentos, ya que el efecto de la "matriz" es muy importante. Prácticamente nunca se encuentra HIM sola en los alimentos, sino que la acompañan otras aminas biógenas (TIM, CAD, PUT, PEA, 5-HT, entre otras), las cuales pueden potenciar significativamente la toxicidad.

Es por ello, que el realizar estudios de composición en aminoácidos y aminas biogénicas en vinos de la provincia de Alicante, tiene una gran importancia de cara a conocer cual es el contenido en los mismos y, si es necesario tomar medidas en los procesos de producción y maduración para reducir el contenido en aminas biogénicas.

1.4. VINOS DE LA PROVINCIA DE ALICANTE³⁰

Alicante, es una provincia de España, situada geográficamente entre la Meseta y el Mediterráneo, y con un clima luminoso y cálido, posee las condiciones naturales para el cultivo de la vid y la elaboración de vinos.

Las tierras alicantinas ofrecen los más sugestivos vinos, blancos, rosados o tintos, sean jóvenes o con crianza. Los vinos jóvenes, gracias a los métodos de elaboración y a la selección de uvas, destacan por su frescura, su carácter afrutado y sus aromas florales. Los vinos crianzas y reservas, elaborados a partir de variedades tradicionales o de coupage con mejorantes foráneas, dan lugar a vinos con un marcado carácter mediterráneo donde los matices de madera adquiridos se unen en armonioso equilibrio con los sabores primarios de la fruta.

Los vinos de Alicante cuentan con las variedades autóctonas: monastrell y moscatel. La monastrell ha demostrado que sometida a vendimias tempranas y a buenas elaboraciones se comporta de modo menos oxidativa y corregida con pequeñas cantidades de tempranillo o cabernet-sauvignon puede convertirse en un espléndido vino crianza o reserva. Por otro lado, el moscatel sometido a vinificaciones correctas es capaz de ofrecer, además de moscateles dulces, unos vinos blancos secos de aromas encantadores.

Finalmente, cabe destacar entre los vinos con Denominación de Origen (D.O) de la provincia de Alicante, el afamado Fondillón. El Fondillón es un vino rancio dulce elaborado en la provincia de Alicante exclusivamente con uvas de la variedad Monastrell. Se caracteriza por una alta graduación alcohólica, de unos 18° que, a diferencia de los vinos fortificados, toda procede del azúcar existente en la uva. Este vino tuvo una gran fama desde el siglo XV, aunque por diversas circunstancias a principio de siglo estuvo a punto de desaparecer, actualmente está recuperando gran parte de su prestigio. Pese a ese prestigio hay muy pocos datos de composición química de este vino, por ello, parece interesante estudiar el contenido en aminos biogénicos puesto que son vinos con una crianza de al menos 10 años, aspecto este no muy corriente en los vinos que se comercializan normalmente.

El papel que juega el clima mediterráneo en el desarrollo de la vid es decisivo. Factores como la elevada temperatura media (entre 13 °C y 18°C, alcanzando en verano máximas entre 30°C y 40°C), la escasez de lluvias (entre 300 y 500 mm/año), el alto número de horas de insolación

(2.500 hs de sol despejado al año), y la menor altitud sobre el nivel del mar determinan la diferenciación de los vinos de Alicante.

En la Figura 5 se puede observar una fotografía típica de un cultivo de vid en la provincia de Alicante.



Figura 5. Cultivo de vid de la provincia de Alicante.

2. ANTECEDENTES

2.1. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS

Para el análisis de aminas biogénicas se utilizan los mismos métodos analíticos desarrollados para la determinación analítica de sus precursores, los aminoácidos.

Varias técnicas analíticas son las que pueden utilizarse para la determinación de aminas biogénicas: cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases (CG), electroforesis capilar (EC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)¹². Estos métodos implican detección espectrofotométrica o fluorimétrica (FLD) y/o separación con espectrofotometría de masas (EM). No obstante, en los últimos años la tendencia en la investigación se centra en el desarrollo de métodos analíticos rápidos, directos, y miniaturizados en los cuales se involucran métodos enzimáticos, de inmunoanálisis y procesos de reacción en cadena de la polimerasa¹⁰. Estos métodos son normalmente específicos para la determinación de una amina biogénica en concreto, generalmente HIM³¹. Pese a ello, en la actualidad, la técnica de HPLC sigue siendo la más utilizada debido a la gran versatilidad que presenta y, en consecuencia, es la técnica, hasta el momento, reconocida como oficial para el análisis de HIM en alimentos por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC)¹⁰.

Atendiendo al modo cromatográfico se pueden distinguir dos tipos de cromatografía en función de la columna que se utilice: la cromatografía de fase normal que se caracteriza por separar sus compuestos en base a su polaridad, donde la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, y cromatografía de fase inversa (RP), donde la fase móvil es más polar que la fase estacionaria¹. La mayoría de los métodos analíticos utilizados para determinar aminas biogénicas se basan de la utilización de RP-HPLC²³.

El análisis de aminoácidos depende de varios factores como la naturaleza de la matriz de la muestra, la concentración de aminoácidos en la muestra, el nivel de sensibilidad necesaria y el tipo de análisis. El perfil de aminoácidos puede variar, dependiendo de si están en la forma libre (perfil de aminoácidos libres) o después de la hidrólisis de las proteínas (perfil de aminoácidos totales que incluye aminoácidos libres y aminoácidos originariamente vinculados a las proteínas). En ambos casos el análisis incluye dos pasos consecutivos importantes, la preparación de la muestra y el análisis de la muestra³².

2.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El tratamiento de la muestra difiere, dependiendo del propósito analítico. En el caso de aminoácidos libres y de aminas biogénicas es necesario extraer, limpiar la muestra y derivatizar antes o después de la separación de aminoácidos. En el caso de aminoácidos totales se requiere adicionalmente una hidrólisis proteica. Una vez que esta etapa se ha realizado, los aminoácidos pueden ser separados y cuantificados³².

2.1.2. DERIVATIZACIÓN

Una vez que los aminoácidos u aminas biogénicas se han extraído, el paso posterior es la separación y análisis por HPLC seguido de su detección. Sin embargo, como los aminoácidos y aminas biogénicas absorben a bajas longitudes de onda, en el ultra violeta (UV), región en donde muchas sustancias pueden interferir¹⁰, se suelen derivatizar dichos compuestos para transformarlos en otros que puedan detectarse a longitudes de onda superiores o bien utilizando otras técnicas de detección

como es la FLD. De ésta forma también se consigue aumentar el límite de detección del método lo que también es importante en estos compuestos que suelen encontrarse en cantidades bastante pequeñas en los alimentos³³. Mediante la elección de esta opción, la molécula formada no solo mejora la sensibilidad y la selectividad en la detección, sino también que el agente derivatizante confiere hidrofobicidad a las moléculas de aminoácidos y aminas biogénicas haciéndolas adecuadas para la separación por cromatografía de fase inversa³². Este proceso de derivatización puede realizarse, antes o después de la separación de los compuestos¹⁰ dependiendo del equipo que se disponga³².

2.1.3. AGENTES DERIVATIZANTES

La selección del agente derivatizante debe realizarse en base a los siguientes criterios:

- a) que sea capaz de reaccionar con aminoácidos primarios y secundarios,
- b) que brinde una reacción cuantitativa y reproducible,
- c) que la reacción de derivatización sea sencilla,
- d) la posibilidad de la automatización,
- e) la estabilidad de los productos de derivatización, y que no genere agentes interferentes³².

Las características espectroquímicas (absorción ultravioleta (UV) o propiedades de fluorescencia) o electroquímicas de los derivatizantes afectará a la sensibilidad y la selectividad de la detección. Por lo tanto, es importante elegir el derivatizante más adecuado³².

Los agentes de derivatización mas utilizados en RP-HPLC para la determinación de aminoácidos son: Cloruro de dansilo (Cl-Dns) y análogos, Fenilisotiacianato (FITC), Cloroformato de fluorenilmétilo (CFMO), o-ftaldialdehído (OPA)^{4,25} y 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil Carbamato (AQC)^{23,34}. En la Tabla VI se pueden observar algunas características de estos agentes.

Tabla VI. Características de agentes derivatizantes (aa= aminoácidos, AB= aminas biogénicas, ex: excitación, em: emisión)

| Reactivo | Detección | Sensibilidad/ Pre o post columna | aa y AB 1º | aa y AB 2º | Ventajas | Desventajas |
|---------------|---|--|------------------|------------------|---|---|
| CI-Dns | FLD (ex 360-385nm, em 460-495nm) UV (254nm) | pmol/ Pre columna | Si | Si | Buena estabilidad del derivado. | Múltiples productos, separación difícil, tiempo largo de reacción, el reactivo interfiere. |
| FITC | UV (254nm) | 1 pmol/ Pre columna | Si | Si | Estabilidad razonable del derivado, reacción rápida, reactivo no interfiere. | Algunas sales interfieren con los derivados. |
| CFMO | FLD (ex 265nm, em 320nm) UV (265nm) | 1 pmol/ Pre columna | Si | Si | Buena estabilidad del derivado, reacción rápida. | Múltiples derivados, el reactivo interfiere en el cromatograma |
| OPA | FLD (ex 340nm, em 455nm) UV (265nm) | 50 fmol/ Pre o Post columna | Si | No | El reactivo no interfiere, reacción rápida, alta sensibilidad y buena reproducibilidad | Estabilidad pobre del derivado, necesita automatización completa de la reacción |
| AQC | FLD (ex 245nm, em 395 nm) UV (245nm) | 160 fmol/ Pre columna | Si | Si | Buena estabilidad del derivado, buena separación del reactivo, reacción rápida | Si el NH ₄ ⁺ no se derivatiza bien interfiere con Arg y Thr. |

2.1.4. TIPOS DE DERIVATIZACIÓN

Por otro lado, la reacción de derivatización puede realizarse de dos formas:

- Pre columna: se derivatizan los compuestos previamente a la inyección en la columna.
- Post columna: los compuestos se derivatizan después de su separación en la columna cromatográfica.

La derivatización postcolumna ofrece algunas ventajas respecto a la derivatización pre columna: (a) simplifica la preparación necesaria de la muestra; (b) aprovecha al máximo las diferencias cromatográficas de varios aminoácidos en su forma nativa¹. Obviamente, la principal desventaja en este tipo de método de derivatización es el equipamiento adicional necesario como una bomba para introducir el reactivo y mezclas; y, algunas veces dispositivos de calentamiento. Otra desventaja es el ensanchamiento de los picos producido por el volumen muerto introducido detrás de la columna³².

Por otro lado la derivatización precolumna presenta la ventaja de su mayor simplicidad. Como desventaja reside la necesidad de garantizar la completa reacción del reactivo derivatizante y la posibilidad de interferencia con la separación por exceso de reactivo, el medio de reacción o la producción de diferentes derivados de un componente. Además, la estabilidad del derivado puede ser un factor importante durante la derivatización pre-columna, la demora entre la derivatización y la inyección llega a ser fundamental para los resultados obtenidos.

2.2. ANTECEDENTES DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS POR RP-HPLC

En los últimos años han proliferado la publicación de artículos en los cuales se analizan aminas biogénicas en vinos. Casi todos ellos están basados en la separación mediante RP-HPLC. En donde hay más dispersión es en la elección del agente derivatizante empleado. Un resumen de algunos de estos trabajos, junto con los componentes determinados se puede consultar en la Tabla VII.

Tabla VII. Antecedentes de análisis de aminoácidos y/o aminas biogénicas.

| Métodos de análisis empleado | Aminoácidos libres determinados | Aminas Biogénicas determinadas | Vinos analizados (característica y origen) |
|--|--|--|--|
| RP-HPLC OPA/MCE pre-columna FLD | Asp, Glu, Asn, Ser, Gln, Hys, Gly, Thr, Arg, Ala, GABA, Tyr, Met, Trp, Val, Phe, Iso, Leu, Lys | HIM, TIM, TRIM, PEA, ISOP, CAD | Malvasia, Tinta Negra Mole y Sercial de Canarias (España) y Medeira (Portugal) ²⁵ . |
| RP-HPLC OPA pre-columna FLD | - | HIM, TIM, PUT, PEA, CAD, TRIM | Tempranillo con D.O de La Rioja, Tarragona y Utiel- Requena (España) ²⁷ . |
| RP-HPLC Cl-Dns pre-columna DAD | - | TRIM, PUT, HIM, PEA, TIM, CAD, ESPD, SPD, AGM. | Tinto de Turquía ³⁵ . |
| RP-HPLC OPA post-olumna FLD | - | PUT, SPD, ESPD, AGM, CAD, SRT, TIM, TRIM, PEA | Cabernet Sauvignon, Cavernet Fanc y Merlot de Brasil ²⁶ . |

| | | | |
|--|---|--|--|
| CG HFBA (Anhídrido heptafluoro butírico) EM | - | PEA, TYR, PUT, CAD, ESPD, SPD | Oporto de Portugal ³⁶ . |
| HPLC PDA | Asp, Glu, Asn, Ser, Pro, Gln, Hys, Gly, Thr, Ala, Arg, GABA, Ile, Trp, Ornitina, Leu, Lys, Phe, Tyr, Val, Met, Cys | PUT, HIM, TIM, CAD, ESPD, AGM, TRIM, PEA, ISOM | Tempranillo de Castilla la Mancha (España) ³⁷ . |
| RP-HPLC Cl-Dns UV | - | HIM, TIM, PEA, TRIM, CAD, PUT, ESPD, ESP. | Tinto de España ³⁸ . |
| RP-HPLC 1,2- naphthoquinon e-4-sulfonate with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry | | HIM, PUT, CAD, TRIM, PEA, TIM, y 5-HT | Vinos españoles de cuatro zonas diferentes ³⁹ |

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es optimizar una metodología para la determinación simultánea de aminoácidos y aminas biogénicas por RP-HPLC- FLD y aplicarla para la diferenciación de vinos Monastrell con D.O. de Alicante.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos del presente trabajo están centrados en optimizar las distintas variables del sistema cromatográfico:

- Ajustar el pH de la fase móvil teniendo en cuenta los pKa de los analitos.
- Evaluar la influencia de la temperatura sobre el tiempo de retención.
- Alcanzar la composición de la fase móvil óptima que permita resolver simultáneamente aminoácidos y aminas biogénicas.
- Mejorar la separación de los distintos analitos a través del programa de gradiente.
- Comprobar la eficacia de la metodología optimizada, aplicándola para el análisis de vinos con D.O Alicante.
- Estudiar si es posible diferenciar, de acuerdo al perfil de aminoácidos y aminas biogénicas, entre vinos Monastrell jóvenes y de crianza con los Fondillón (añejos).

4. MATERIALES Y METODOS

Dentro de éste apartado se van a definir los aparatos, reactivos, métodos y procedimientos utilizados.

Para el desarrollo del presente trabajo se eligió realizar una derivatización pre columna utilizando OPA como agente derivatizante basándose en los siguientes motivos:

1. La Oficina Internacional de la Viña y el Vino (OIV) aún no ha propuesto un método oficial de análisis para aminas biogénicas en vinos. Sin embargo, el método más utilizado y el único que ha sido validado para este tipo de análisis es el método que utiliza derivatización pre-columna con OPA²³,
2. Para reducir el ensanchamiento de los picos (producido por el volumen muerto introducido en la columna),
3. Para evitar el uso de equipamiento adicional,
4. Buena resolución y sensibilidad,
5. Inactividad del exceso de reactivo y la ausencia de productos secundarios interferentes.

4.1. EQUIPOS

4.1.1. CROMATÓGRAFO

Para el análisis cromatográfico de aminoácidos y aminas biogénicas se utilizó un cromatógrafo "Waters multisolvent" (Figura 6), equipado con una bomba de doble pistón, un controlador de gradiente y flujo de eluyente Waters 600E y válvula Rheodyne modelo 7125 con un bucle de 10µl, con inyección manual.

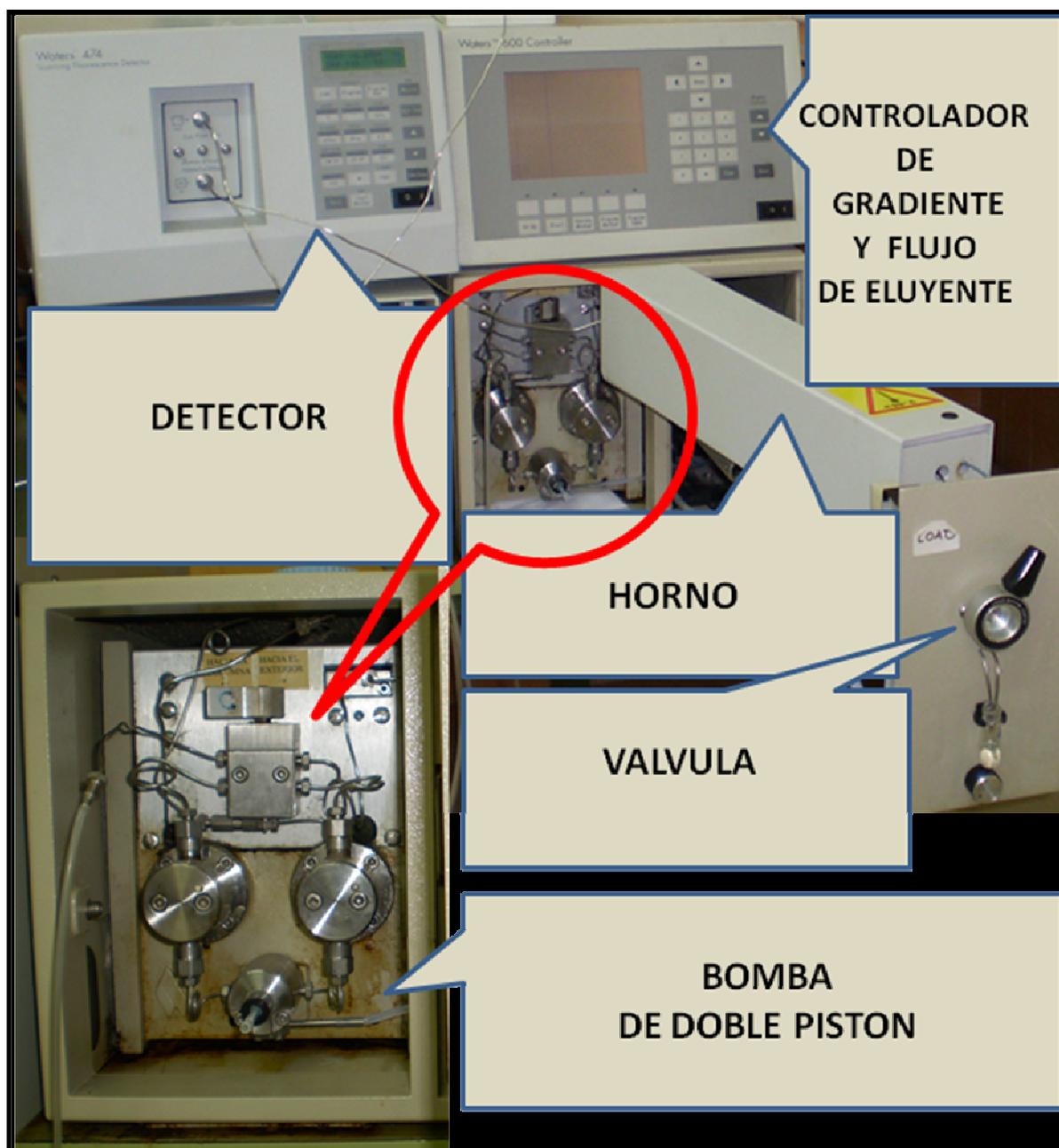


Figura 6. Cromatógrafo Waters multisolvent, bomba de doble pistón, controlador de gradiente y flujo de eluyente Waters 600E, válvula Rheodyne modelo 7125 y detector Waters 474.

4.1.2. DETECTOR

Para la detección se utilizó un detector de fluorescencia "Waters 474" (Figura 7) equipado con una celda de flujo de 5 μ l. Las medidas de fluorescencia de los derivados de aminoácidos y aminos biogénicas se realizaron a una longitud de onda de excitación de 340 nm y longitud de onda de emisión de 425 nm.

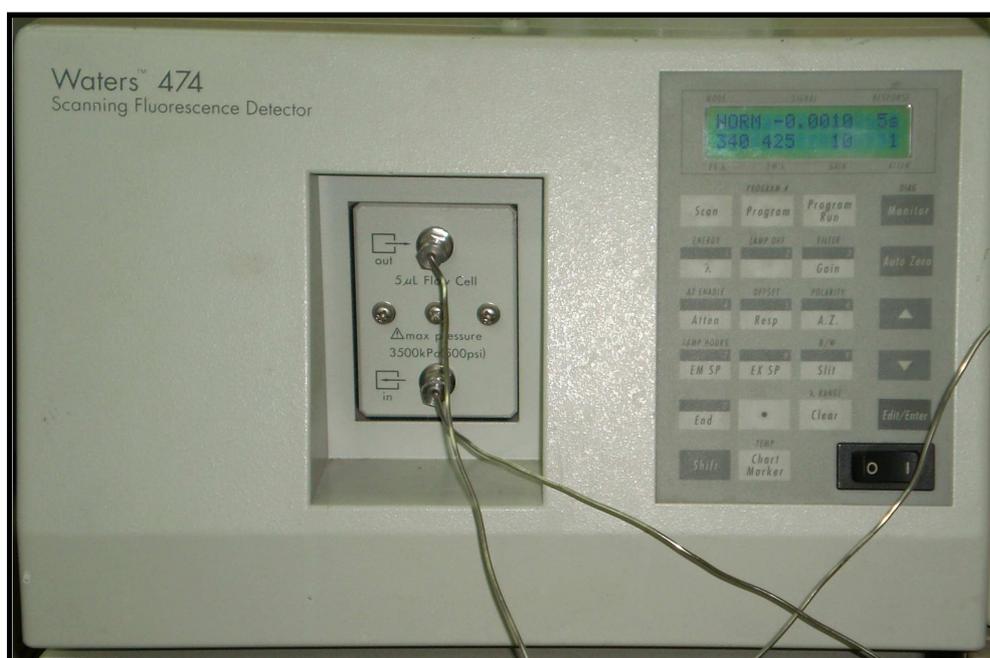


Figura 7. Detector de fluorescencia Waters 474.

4.1.3. HORNO

Para mantener la temperatura constante, la columna cromatográfica fue calentada por un horno.

4.1.4. COLUMNA CROMATOGRÁFICA

La columna cromatográfica empleada fue una Waters AccQ.Tag C18, 3,9 x 150 mm (Figura 8).



Figura 8. Columna Waters AccQ.Tag C18 3,9 x 150 mm.

4.1.5. PRE COLUMNA CROMATOGRÁFICA

La columna fue provista de una precolumna Phenomenex Cartridges C18, 4x2 mm.

4.1.6. SOFTWARE

Para el procesamiento de los datos se utilizó el software "Millennium 2010 Version 2.15" de Waters.

4.2. REACTIVOS

Los reactivos utilizados para el desarrollo del presente trabajo se detallan en la tabla VIII.

Tabla VIII. Reactivos utilizados.

| Reactivo | Observaciones |
|--|---|
| Agua ultrapura | Obtenida mediante un equipo Millipore "Waters" |
| Hidrógeno fosfato de potasio (K_2HPO_4) y dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4). | Para la preparación del tampón fosfato. Marca: Panreac |
| Hidróxido de sodio (NaOH) | Marca: Panreac |
| Hidróxido de potasio (KOH) | Marca: Panreac |
| Ácido Clorhídrico (HCl) | Para la conservación de las soluciones patrones. Marca: Scharlau |
| Ácido bórico | Para la preparación del tampón borato. Marca: Merck |
| Etanol | Para la dilución de Etanolamina Marca: Scharlau |
| Metanol grado HPLC | Para la preparación de la fase móvil. Marca: Panreac |
| Tetrahidrofurano | Para la preparación de la fase móvil. Marca: Sigma-Aldrich |
| Acetonitrilo | Para la preparación de la fase móvil. Marca: Sigma-Aldrich |
| 2-mercaptoetanol (2-MCE) | Reactivo reductor. Marca: Sigma |

| | | |
|--|--|--------------------------------------|
| Patrones de aminoácidos | L-Ácido Aspártico (Asp) | Marca: Sigma |
| | L-Ácido Glutámico (Glu) | Marca: Fluka |
| | L-Asparragina (Asp) | Marca: Fluka |
| | L-Serina (Ser) | Marca: Sigma |
| | L-Histidina (Hys) | Marca: Sigma |
| | Glicina (Gly) | Marca: Fluka |
| | L-Treonina (Thr) | Marca: Sigma |
| | L-Arginina (Arg) | Marca: Sigma |
| | L-Alanina (Ala) | Marca: Sigma |
| | Ácido γ -aminobutírico (GABA) | Marca: Sigma |
| | L-Tirosina (Tyr) | Marca: Fluka |
| | L-Metionina (Met) | Marca: Fluka |
| | L-Valina (Val) | Marca: Sigma |
| | L-Fenilalanina (Phe) | Marca: Sigma |
| | L-Isoleucina (Ile) | Marca: Sigma |
| | L-Leucina (Leu) | Marca: Fluka |
| | L-Lisina monohidroclorada (Lys) | Marca: Fluka |
| | Norvalina (Nor) | Marca: Sigma |
| Taurina (Tau) | Marca: Sigma | |
| Patrones de aminas biogénicas | Etanolamina (ETA) | Marca: Alfa Aesar |
| | Histamina dihidroclorada (HIM) | Marca: Sigma |
| | Metilamina (METIA) | Marca: Sigma |
| | Etilamina (ETIA) | Marca: Alfa Aesar |
| | Tiramina hidroclorada (TIM) | Marca: Alfa Aesar |
| | Triptamina (TRIM) | Marca: Alfa Aesar |
| | 1,4-Diaminobutano dihidroclorado (PUT) | Patrón de Putrescina Marca: Fluka |
| | Cadaverina dihidroclorada (CAD) | Marca: Sigma |
| 1,7-Diaminoheptano dihidroclorado (DH) | Patrón interno de aminoácidos y aminas biogénicas. Marca: Aldrich | |
| O-phtaldehido (OPA) | Reactivo derivatizante Marca: Sigma | |

4.3. AMINAS BIOGÉNICAS Y AMINOÁCIDOS DETERMINADOS

Se consiguió determinar diversos aminoácidos: Asp, Glu, Asn, Ser, Hys, Gly, Thr, Arg, Ala, GABA, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu y Lys; y algunas aminas biogénicas: ETA, HIM, METIA, ETIA, TIM, TRIM, PUT y CAD. Utilizando como patrón interno DH.

4.4. SOLUCIONES

Todas las soluciones antes de ser utilizadas en el sistema cromatográfico fueron filtradas con filtro de poliamida con un diámetro de poro de 0,45 μ m (Scheleicher & Schuell).

4.4.1. TAMPÓN FOSFATO

Las soluciones de tampón fosfato concentración 0,02M, tanto a pH=6,4 (condiciones iniciales) como a pH=7,3 (condiciones finales), se prepararon a partir de una mezcla de sales K_2HPO_4 y KH_2PO_4 diluyéndola con agua ultrapura en proporciones adecuadas.

4.4.2. TAMPÓN BORATO

La solución de tampón borato pH=9,5 concentración 0,5M se preparó a partir de ácido bórico y se ajustó el pH utilizando una solución de hidróxido de potasio 0,1M.

4.4.3. REACTIVO DE DERIVATIZACIÓN

Se pesaron 50mg de OPA al que se le añadieron 4,5ml de Metanol, una vez disuelto el OPA, 50µl de 2-MCE, que es el reactivo que actúa como reductor en la reacción, por último se añadieron 0,5 ml de tampón borato pH= 9,5 a concentración 0,5M⁴⁰.

El reactivo derivatizante una vez preparado, se mantuvo refrigerado a temperatura inferior a 4 °C y en oscuridad, para evitar al máximo la descomposición del mismo por acción de la luz o el calor, además nunca se conservó mas de una semana⁴.

4.4.4. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES

Las soluciones patrones madres de aminoácidos y aminas biogénicas, de concentraciones entre 2000 y 6000 ppm, fueron preparadas en soluciones de HCl 0,1M; a excepción de la solución de TRIM, que es insoluble en agua, la cual fue preparada en una solución de etanol al 75%. Las mismas se mantuvieron refrigeradas a temperatura inferior a 4 °C. A partir de estas soluciones patrones madres se realizaron soluciones diluidas, a la concentración necesaria, utilizando agua ultrapura con la finalidad que sea más fácil tamponar las soluciones para ser inyectadas al sistema cromatográfico. Las soluciones patrones obtenidas, de concentraciones entre 0,5 y 7,5 ppm; fueron las inyectadas al sistema cromatográfico, estos patrones no se conservaron mas de una semana.

4.4.5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA SU POSTERIOR ANÁLISIS

Es difícil determinar aminoácidos y aminos biogénicas en vinos, porque la matriz es muy compleja¹⁰. Entonces, las operaciones previas a la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico constituyen un paso muy importante.

Para la metodología desarrollada, la preparación de la muestra consistió en una dilución directa de las muestras de vino (o vino diluido 1/3 con agua ultrapura) en tampón borato usando la técnica del patrón interno, para la cual se eligió DH. Se pesó en un tubo Ependorf, para cada muestra: 0,1g de muestra; 0,1g de patrón interno (concentración 5 ppm) y se completó hasta llegar a 1g con tampón borato (pH=9,5 a concentración 0,5 M). Luego se realizó una derivatización precolumna. Se controló rigurosamente que a partir de éste momento el tiempo transcurrido hasta la inyección en el sistema cromatográfico fuera siempre el mismo para todas las muestras (dos minutos en total) con la finalidad de evitar cometer errores provocados por la fluorescencia emitida por los derivados con el tiempo. Se agregaron 50µl del reactivo derivatizante; se homogenizó la mezcla con agitación seguida de una filtración, utilizando un filtro de nylon con un diámetro de poro de 0,45 µm (Albet) (Figura 9) y luego se dejó transcurrir un minuto para alcanzar la máxima estabilidad de los derivados de aminoácidos y aminos biogénicas⁴.



Figura 9. Filtro de Nylon Albet con diámetro de poro 0,45 µm.

4.5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

En la tabla IX se puede observar las condiciones cromatográficas elegidas.

Tabla IX. Condiciones cromatográficas

| | | |
|-------------------------------------|---|--|
| FLUJO | 1 ml/min | |
| VOLUMEN DE INYECCION | 10µl | |
| COLUMNA | Waters AccQ.Tag C18 3.9 x 150 mm | |
| PRECOLUMNA | Phenomenex Cartridges C18 4x2 mm | |
| TEMPERATURA | Ambiente (condiciones iniciales) 35 °C (condiciones finales) | |
| DETECTOR | Espectrómetro de fluorescencia (Excitación: 340nm y Emisión. 425 nm) | |
| COMPONENTES DE LA FASE MOVIL | <p>Eluyente A</p> <p>Condiciones iniciales: Tampón fosfato y tetrahidrofurano.</p> <p>Condiciones finales: Tampón fosfato, metanol y tetrahidrofurano.</p> | <p>Eluyente B</p> <p>Condiciones iniciales: Tampón fosfato, metanol y acetonitrilo.</p> <p>Condiciones finales: Tampón fosfato y metanol.</p> |

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se realizaron tablas con los valores de aminoácidos y aminos biogénicas obtenidos en las muestras de vinos jóvenes, crianza y Fondillón con D.O Alicante, consignando en todos los casos: media muestral, número de vinos en la muestra (n) y desvío estándar relativo (%RSD).

Con la finalidad de encontrar algunas características comunes o bien diferenciadoras entre los vinos elaborados con uva Monastrell jóvenes y de crianza, con los vinos Monastrell Fondillón se elaboraron gráficas conteniendo diagramas de cajas para cada una de las variables estudiadas.

Con objeto de distinguir si era posible establecer una clasificación de los vinos según si eran vinos jóvenes y/o de crianza; o bien vinos Fondillón se realizó el análisis de conglomerados, técnica de análisis multivariante no supervisado. Para obtener el dendrograma, al aplicar el análisis de conglomerados a los datos, se utilizó como criterio de distancia la distancia Euclidia al cuadrado y como método de aglomeración el método de Ward⁴¹.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA SEPARACIÓN SIMULTÁNEA DE AMINOÁCIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS

Con el objetivo de conseguir las condiciones mas favorables de separación simultanea de aminoácidos y aminas biogénicas, se seleccionaron como punto de partida condiciones de trabajo encontradas en la bibliografía para la determinación de aminoácidos, que proporcionan buenos resultados⁴⁰. Así, se comenzó trabajando con tampón fosfato a pH=6,4, a temperatura ambiente, utilizando como fase móvil las indicadas en la tabla X y con el programa de gradiente 1 (Tabla XI).

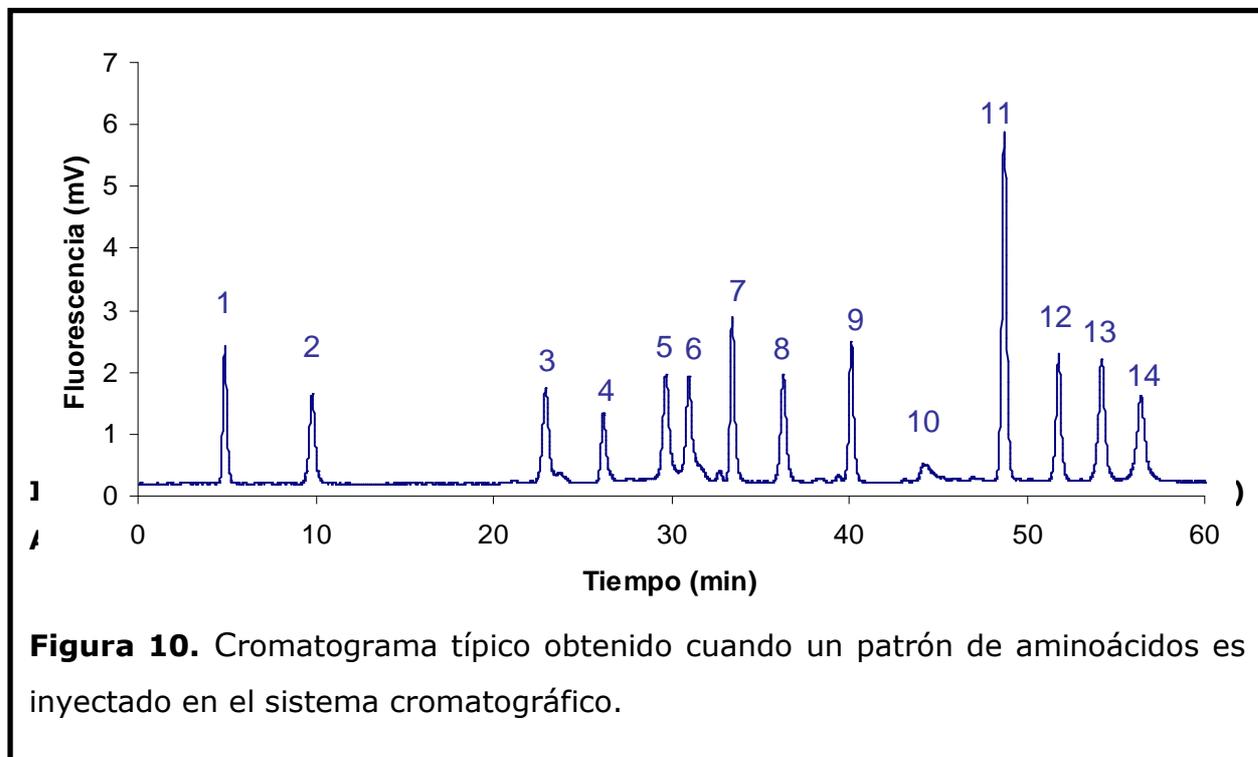
Tabla X. Composición de la fase móvil.

| Eluyente A | Eluyente B |
|--|--|
| Tampón Fosfato (pH: 6,4 0,02M) y Tetrahidrofurano (99: 1). | Tampón Fosfato (pH: 6,4 0,02M); Metanol y Acetonitrilo (50: 35: 15). |

Tabla XI. Programa de gradiente 1.

| Tiempo (min) | Eluyente A (%) | Eluyente B (%) | Curva |
|--------------|----------------|----------------|-------|
| 0 | 95 | 5 | 6 |
| 2 | 90 | 10 | 6 |
| 10 | 90 | 10 | 6 |
| 40 | 20 | 80 | 6 |
| 43 | 0 | 100 | 6 |
| 90 | 0 | 100 | 6 |
| 100 | 95 | 5 | 6 |

En la Figura 10 se muestra el cromatograma obtenido al introducir al sistema cromatográfico un patrón de aminoácidos.



Como en el presente trabajo se pretende estudiar la separación simultánea de aminoácidos y aminas biogénicas, se inyectó al sistema cromatográfico un patrón conteniendo algunos aminoácidos y algunas aminas biogénicas (Asp, Glu, Ser, Hys, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu, HIM, METIA, ETIA, PUT y CAD), encontrándose que la separación de los picos no era apropiada. En la Figura 11 se puede observar que a tiempos de retención entre 48 y 53 minutos se produjo un solapamiento entre picos lo que dificultaba tanto la identificación como la cuantificación de los analitos. Se inyectó al sistema cromatográfico cada patrón por separado, comprobando así que Val e HIM salían al mismo tiempo de retención. Inmediatamente después del pico de HIM se observa un pequeño pico que también corresponde a HIM, lo que indica que la misma se encontraba en más de un estado de ionización. Entre el segundo pico

de HIM y el correspondiente a Phe se puede observar la presencia de otros picos que se encuentran solapados (METIA y ETIA).

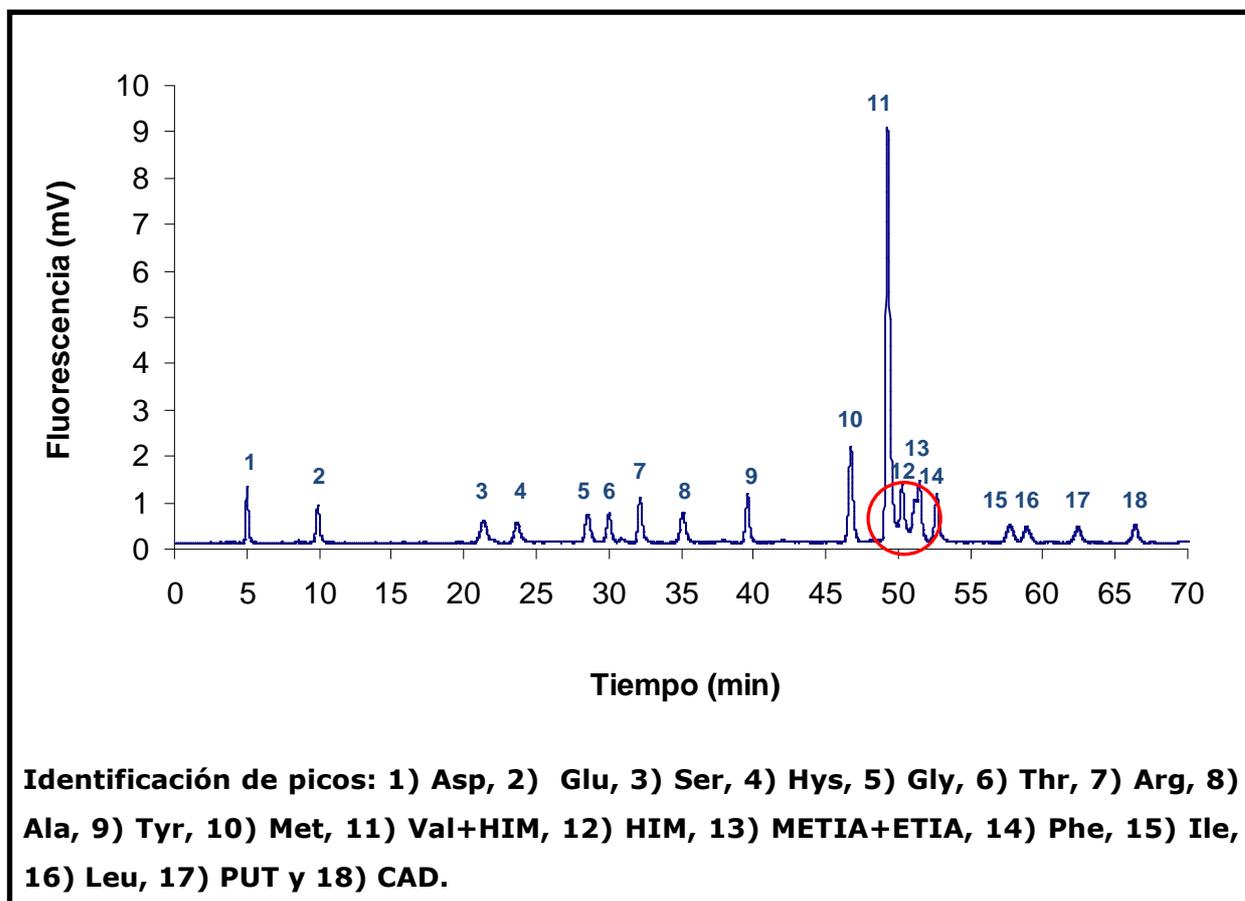


Figura 11. Cromatograma obtenido cuando un patrón conjunto de aminoácidos y aminas biogénicas es inyectado en el sistema cromatográfico.

Por lo tanto se fueron realizando optimizaciones teniendo en cuenta las distintas variables del sistema cromatográfico, como pH de la fase móvil, temperatura de la columna, desgasificación del sistema, programa de gradiente, componentes y proporciones de la fase móvil.

5.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL pH DE LA FASE MÓVIL

Como se mencionó anteriormente, al utilizar para la fase móvil tampón fosfato pH=6,4 a temperatura ambiente y un programa de gradiente se pudo observar que algunos analitos, como HIM, presentaban dos picos en el cromatograma (Figura 12) ya que a éste pH las moléculas se encontraban en mas de un estado de ionización (Figura 13) lo cual dificultaba la cuantificación de los mismos.

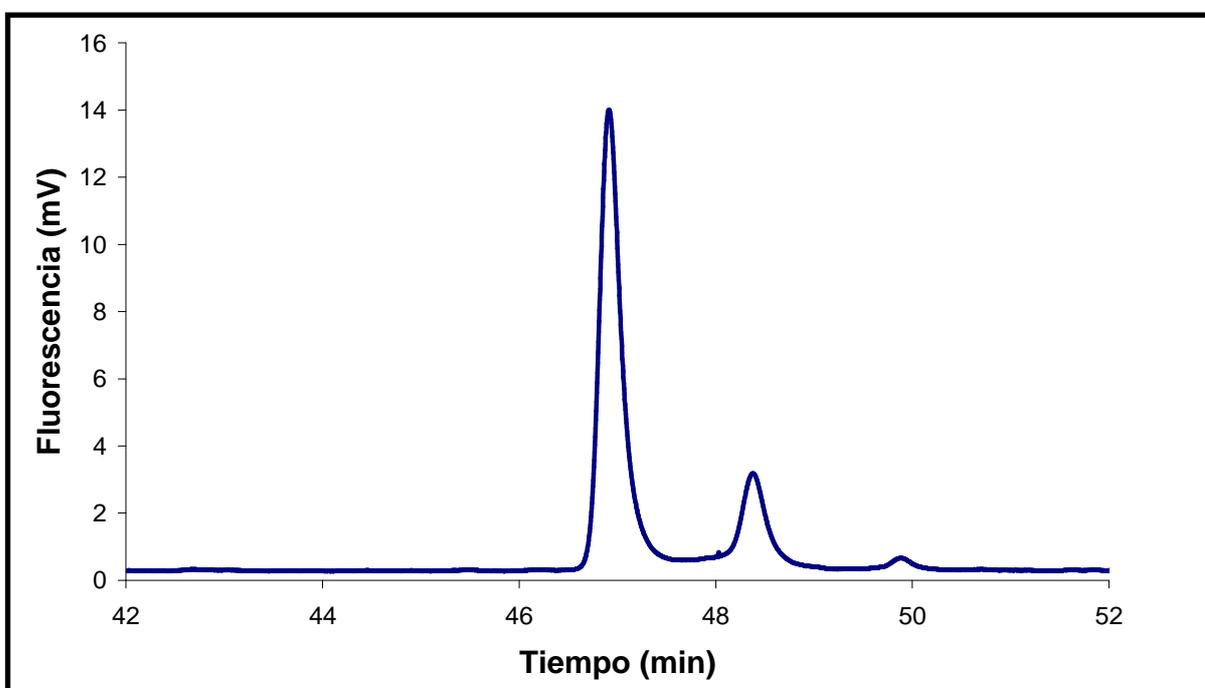


Figura 12. Cromatograma de histamina en dos estados de ionización (Tampón Fosfato pH=6,4)

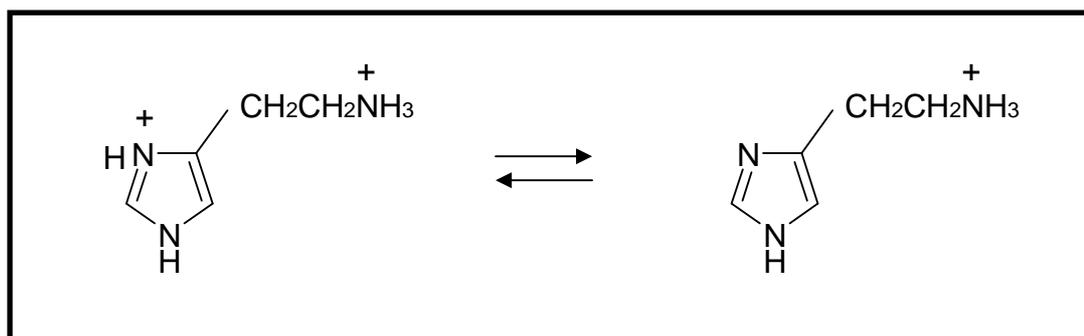


Figura 13. Ionización de la molécula de Histamina a pH= 6,4.

Con la finalidad de desplazar la reacción que se muestra en la figura 13 hacia la derecha, se modificó el pH de la fase móvil. Teniendo en cuenta que el pK de HIM es 9,8; se alcalinizó la solución tampón fosfato, preparando una solución de tampón a pH=7,3. En estas condiciones se obtuvo un cromatograma como el que se muestra en la Figura 14.

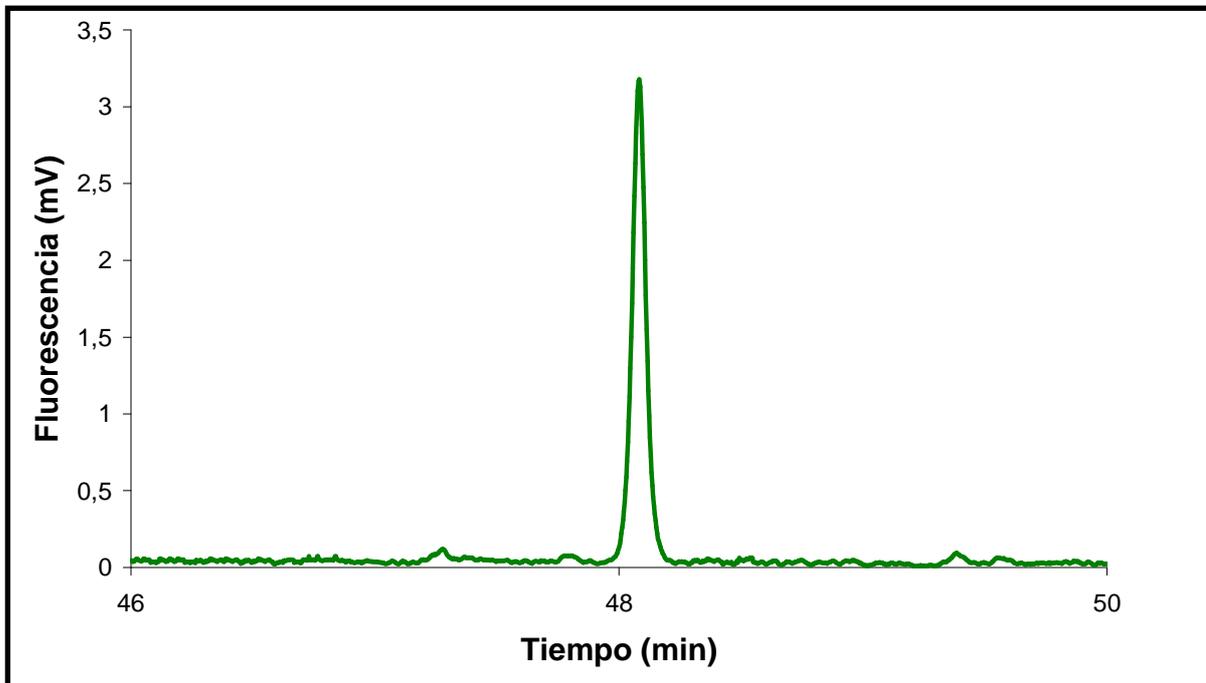


Figura 14. Cromatograma de histamina en un estado de ionización (Tampón Fosfato pH=7,3)

5.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA

Con el objetivo de disminuir los tiempos de retención se aumentó la temperatura de la columna cromatográfica, colocándola dentro de un horno a temperatura constante de 35 °C, obteniendo una disminución en los tiempos de retención como se puede observar en los cromatogramas de la Figura 15.

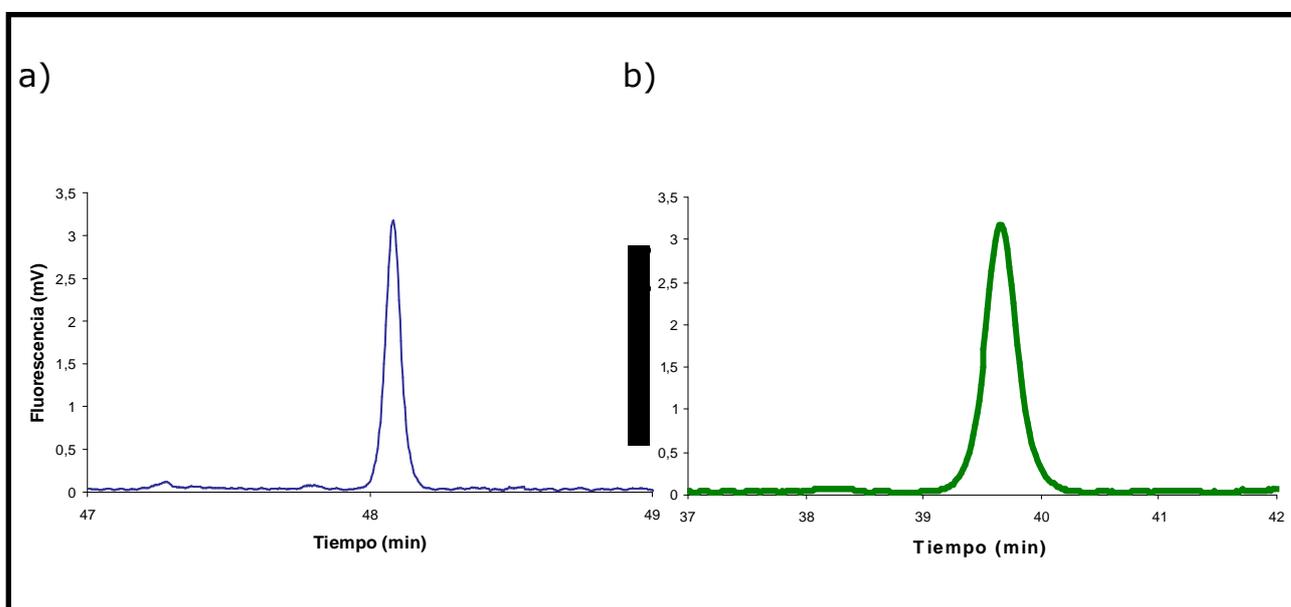


Figura 15. a) Cromatograma de histamina cuando la columna se encontraba a Temperatura ambiente. b) Cromatograma de histamina cuando la columna se mantuvo a 35 °C.

Además, se pudo observar que el mantenimiento de la columna a temperatura constante mejoró ligeramente la estabilidad del sistema y la resolución de los picos, comparado a cuando ésta se encontraba a temperatura ambiente.

5.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL

Con la finalidad de mejorar la resolución de los picos y de conseguir separar los aminoácidos y aminos biogénicas entre si; se probaron alternativas en la composición de la fase móvil, fundamentalmente centrada en resolver los analitos que eluían a tiempos de retención similares. Para ello se hicieron una serie de ensayos tendientes a aumentar la proporción de metanol de la fase móvil, con la finalidad de variar el tiempo de retención de algunas aminos biogénicas, que al ser menos polares que los aminoácidos, eluirían antes dada su mayor afinidad por la fase orgánica.

Se intentó trabajar con un 100% de metanol en el eluyente B (Tabla XII), lo cual proporcionó demasiada inestabilidad en el sistema generando un aumento brusco de presión al aumentar la proporción de eluyente B en el medio según el programa de gradiente elegido (Programa de gradiente 1).

Tabla XII. Composición de la fase móvil prueba 1.

| Eluyente A | Eluyente B |
|--|----------------|
| Tampón Fosfato (pH: 7,3 0,02M) y Tetrahidrofurano (99: 1). | Metanol (100). |

Con la finalidad de evitar los problemas de presión mencionados, se adicionó metanol al eluyente A (Tabla XIII), para que la mezcla no sea tan exotérmica. Observándose, que de esta manera a medida que progresaba el grandiente e iba aumentando la proporción de eluyente B, mejoraba la estabilidad del sistema.

Tabla XIII. Composición de la fase móvil prueba 2.

| Eluyente A | Eluyente B |
|---|--|
| Tampón Fosfato (pH: 7,3 0,02M), Metanol y Tetrahidrofurano (91,5: 8:0,5). | Tampón Fosfato (pH: 7,3 0,02M); Metanol y Acetonitrilo (50: 35: 15). |

Inicialmente el acetonitrilo estaba incorporado en el eluyente B, debido que al tener menor viscosidad que el metanol producía menor aumento de presión en el sistema. Una vez incorporado el metanol en el eluyente A y observándose que de esta manera el sistema permanecía estable, se intentó aumentar la proporción de metanol en el eluyente B. Se probaron distintas proporciones siempre con la finalidad de variar el tiempo de retención de los aminoácidos y las aminas biogénicas y de esta forma conseguir separar los distintos picos. Finalmente, la composición de la fase móvil elegida se muestra en la Tabla XIV.

Además, para conseguir mayor estabilidad del sistema se desgasificó la fase móvil con helio comprimido (100 ml/min).

Tabla XIV. Composición de la fase móvil utilizada para la separación de aminoácidos y aminas biogénicas.

| Eluyente A | Eluyente B |
|---|---|
| Tampón Fosfato (pH: 7,3 0,02M), Metanol y Tetrahidrofurano (91,5: 8:0,5). | Tampón Fosfato (pH: 7,3 0,02M); Metanol (20: 80). |

5.1.4. OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE GRADIENTE

Por último, se llevó a cabo una optimización del programa de gradiente con objeto de separar los analitos entre si, fundamentalmente

centrada en resolver adecuadamente los analitos: Met, Val, HIM, Phe, y METIA.

Se probaron distintos gradientes de concentración para la fase móvil obteniéndose la mayor separación para el gradiente que se muestra en la Tabla XV.

En la Figura 16 se puede observar como con estas condiciones de gradiente se obtiene una adecuada separación de los picos que anteriormente se encontraban solapados.

Tabla XV. Programa de gradiente utilizado.

| Tiempo (min) | Eluyente A (%) | Eluyente B (%) | Curva |
|--------------|----------------|----------------|-------|
| 0 | 96 | 4 | 6 |
| 2 | 96 | 4 | 6 |
| 10 | 91 | 9 | 6 |
| 40 | 34 | 66 | 6 |
| 43 | 21 | 79 | 6 |
| 60 | 8 | 92 | 6 |
| 65 | 96 | 4 | 6 |
| 70 | 96 | 4 | 6 |

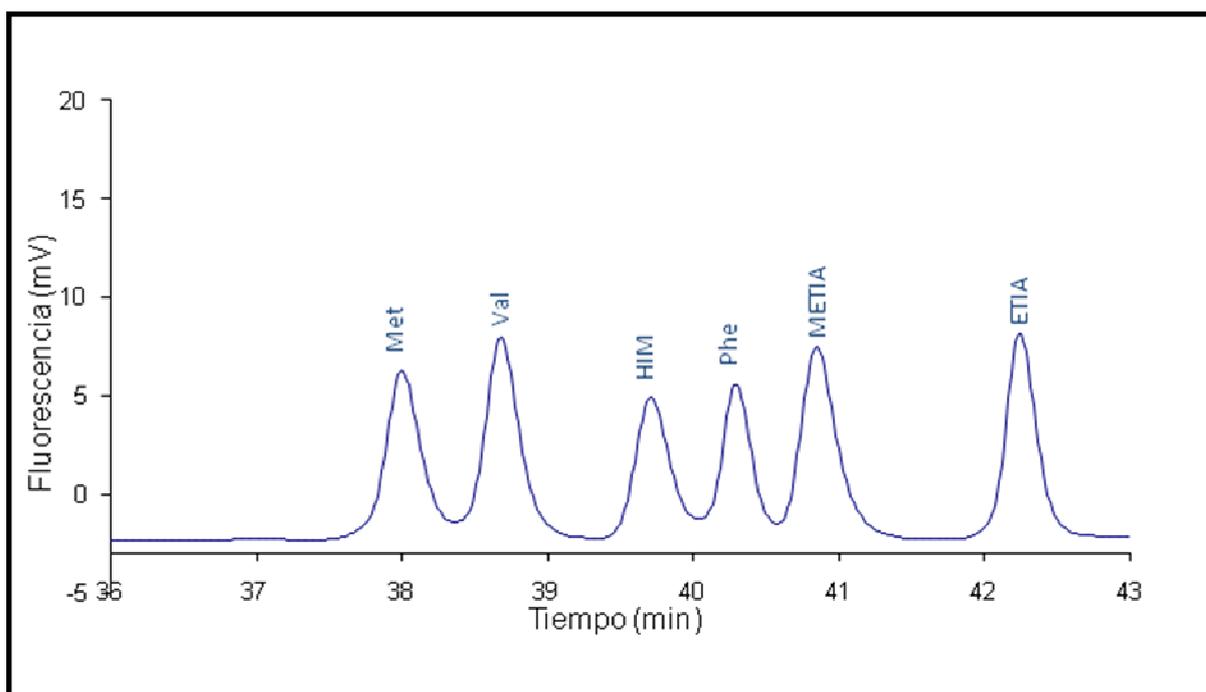


Figura 16. Fragmento de cromatograma donde se pueden observar los picos correspondientes a Met, Val, HIM, Phe, METIA y ETIA.

5.1.5. INCORPORACIÓN DE PATRÓN INTERNO

Como en la separación de los distintos aminoácidos y aminor biogénicas se encontró que influyen numerosos factores difíciles de controlar, se incorporó un patrón interno, para compensar algunas variaciones al utilizar las medidas relativas sobre un patrón. Se seleccionó en un principio algunos posibles patrones internos como Tau, Nor⁴⁰, y DH. Finalmente, se eligió DH, ya que se comprobó cromatográficamente que tanto Tau como Nor eluían a tiempos de retención interfiriendo otros de los analitos en estudio. DH demostró la característica de aparecer a tiempo de retención mucho posterior (61,5 min) que cualquiera de los analitos determinados (Figura 17) y por lo tanto no presentó solapamiento con ninguno de los aminoácidos ni aminor biogénicas ensayados.

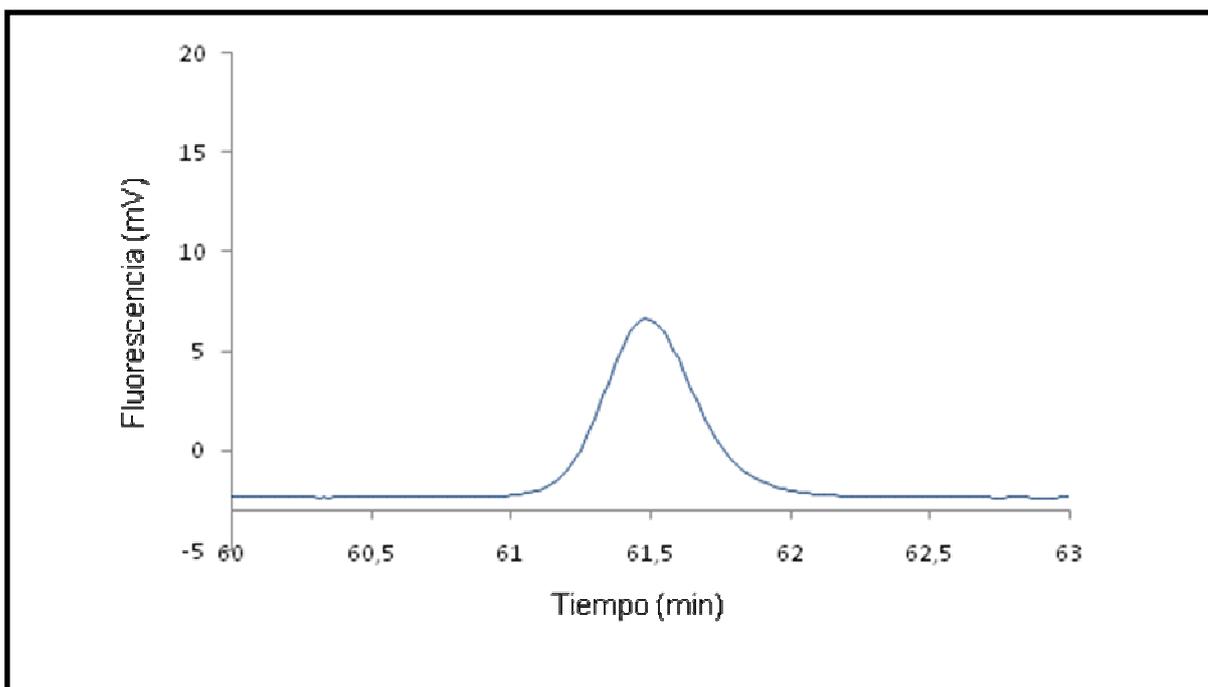


Figura 17. Fragmento de cromatograma donde se puede observar un pico correspondiente DH a concentración de 50 ppm.

5.2. CONDICIONES DE TRABAJO SELECCIONADAS

Las condiciones finales de trabajo que fueron seleccionadas, luego de realizar las optimizaciones de las distintas variables del sistema mencionadas, se muestran en la Tabla XVI.

Tabla XVI. Condiciones cromatográficas utilizadas

| | | | | |
|---|--|-----------------------|--|--------------|
| FLUJO | 1 ml/min | | | |
| VOLUMEN DE INYECCION | 10µl | | | |
| COLUMNA | Waters AccQ.Tag C18 3.9 x 150 mm | | | |
| PRECOLUMNA | Phenomenex Cartridges C18 4x2 mm | | | |
| TEMPERATURA | 35 °C | | | |
| DETECTOR | Espectrómetro de fluorescencia (Excitación: 340nm y Emisión. 425 nm) | | | |
| FASE MOVIL | Eluyente A | | Eluyente B | |
| | Tampón fosfato (pH: 7,3 0,02M); Metanol y Tetrahidrofurano (91,5: 8: 0,5). | | Tampón fosfato (pH: 7,3 0,02M) y Metanol (20: 80). | |
| DESGASIFICACION DE LA FASE MOVIL | Helio 100ml/min. | | | |
| PROGRAMA DE GRADIENTE | Tiempo (min) | Eluyente A (%) | Eluyente B (%) | Curva |
| | 0 | 96 | 4 | 6 |
| | 2 | 96 | 4 | 6 |
| | 10 | 91 | 9 | 6 |
| | 40 | 34 | 66 | 6 |
| | 43 | 21 | 79 | 6 |
| | 60 | 8 | 92 | 6 |
| | 65 | 96 | 4 | 6 |
| 70 | 96 | 4 | 6 | |

Aplicando estas condiciones cromatográficas se consiguió identificar diversos aminoácidos (Asp, Glu, Asp, Ser, Hys, Gly, Thr, Arg, Ala, GABA, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu y Lys) y aminas biogénicas (ETA, HIM, METIA, ETIA, TIM, TRIM, PUT y CAD); y además, el patrón interno DH, obteniendo una adecuada separación de los picos tal como puede observarse en el cromatograma de la Figura 18.

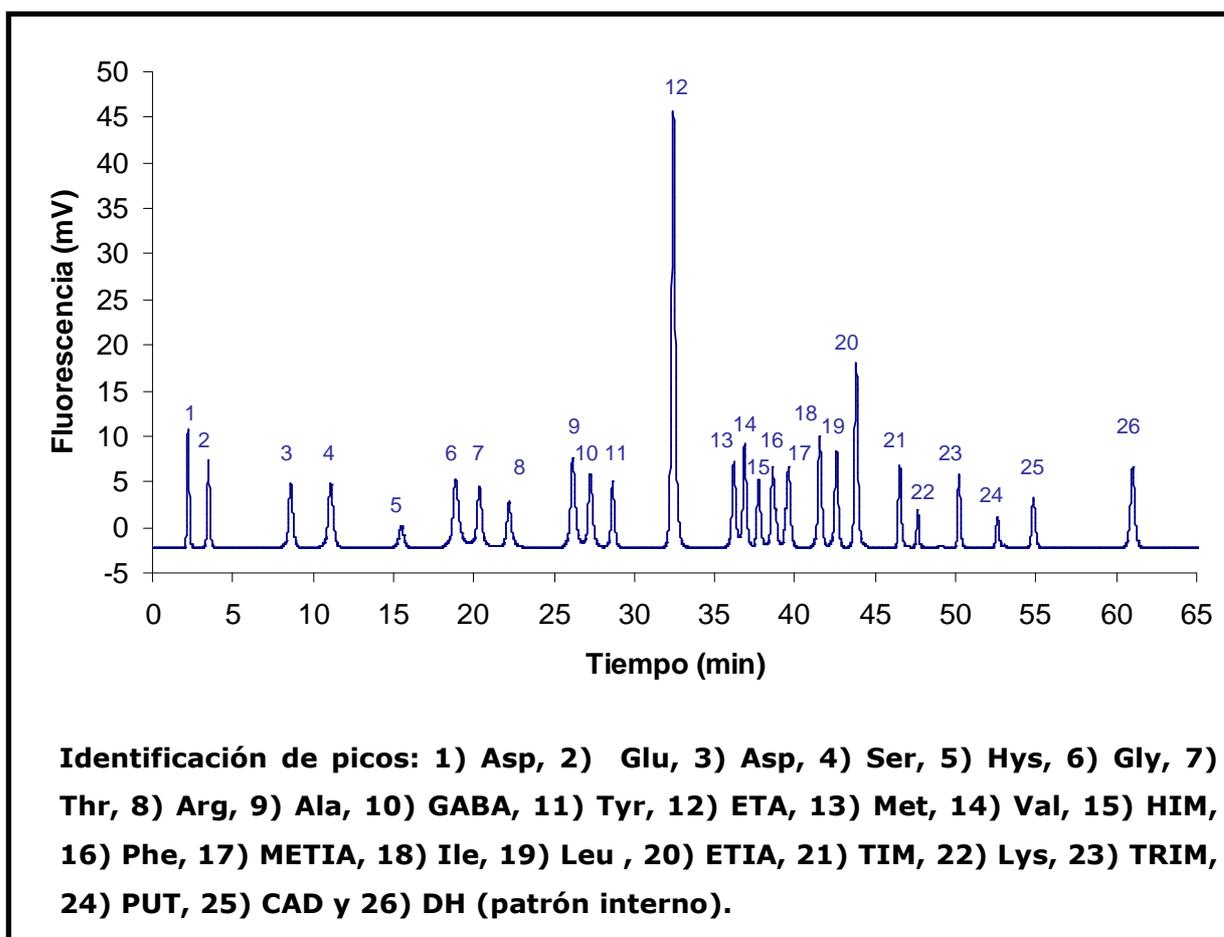


Figura 18. Ejemplo de un cromatograma típico, obtenido cuando un patrón es inyectado en el sistema cromatográfico.

5.3. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

5.3.1. RECTAS DE CALIBRADO

Para calcular la concentración de cada uno de los aminoácidos libres, se han empleado rectas de calibrado, para los cuales se utilizaron patrones de aminoácidos y aminas biogénicas de concentraciones entre 0,5 y 7,5 ppm (Tablas XVII y XVIII), ya que este era el intervalo de concentraciones en el que se encontraban los aminoácidos y aminas biogénicas en las muestras de vinos preparadas.

Como se empleó el método del patrón interno, cada patrón fue inyectado en el sistema cromatográfico con 0,05g de solución de DH concentración 20 ppm en las condiciones óptimas. Las rectas de calibrado fueron expresadas como la medida del área de cada aminoácido u amina biogénica sobre la medida del área del patrón interno versus la cantidad de analito sobre la cantidad de patrón interno, expresada en μg . A partir de los datos obtenidos se calcularon las rectas de calibrado para cada analito según la Figura 19.

$$A/A_i = \mathbf{a} (\mu\text{g}/\mu\text{g}_i) + \mathbf{b}$$

Figura 19. Ecuación general de la recta de calibrado.

Donde A es el área de pico del analito, A_i es el área de patrón interno, **a** es la pendiente de la recta y **b** la ordenada al origen.

A modo de ejemplo, en la Figura 20 se muestra la recta de calibrado obtenida para Met.

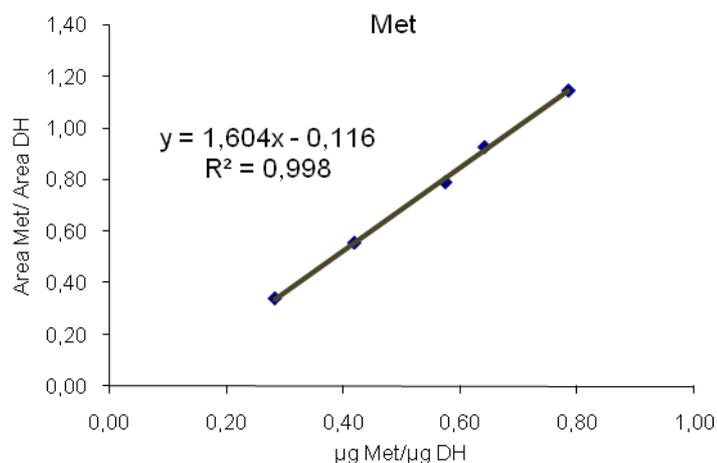


Figura 20. Recta de calibrado de Met.

En la Tabla XVII se muestran las rectas de calibrado, el coeficiente de correlación y límite de detección que se han obtenido para cada aminoácido estudiado.

Tabla XVII. Rectas de calibrado, índice de correlación y límite de detección para los aminoácidos estudiados

| Aminoácido | Recta de calibrado | r ² | LOD (mg/L) |
|------------|----------------------|----------------|------------|
| Asp | $y = 1,413x - 0,020$ | 0,999 | 0,047 |
| Glu | $y = 1,213x - 0,024$ | 0,999 | 0,070 |
| Asn | $y = 1,489x - 0,079$ | 0,999 | 0,092 |
| Ser | $y = 1,945x - 0,146$ | 0,999 | 0,090 |
| Hys | $y = 0,617x - 0,090$ | 0,999 | 0,308 |
| Gly | $y = 2,503x - 0,272$ | 0,999 | 0,093 |
| Thr | $y = 1,326x - 0,062$ | 0,997 | 0,113 |
| Arg | $y = 1,133x - 0,069$ | 0,999 | 0,150 |
| Ala | $y = 2,361x - 0,194$ | 0,999 | 0,084 |
| GABA | $y = 1,363x - 0,055$ | 0,999 | 0,092 |
| Tyr | $y = 1,208x - 0,125$ | 0,999 | 0,113 |
| Met | $y = 1,604x - 0,116$ | 0,998 | 0,081 |
| Val | $y = 1,817x - 0,039$ | 0,992 | 0,068 |
| Phe | $y = 1,316x + 0,227$ | 0,993 | 0,082 |
| Ile | $y = 1,797x - 0,017$ | 0,997 | 0,068 |
| Leu | $y = 1,654x - 0,146$ | 0,998 | 0,072 |
| Lys | $y = 0,346x - 0,002$ | 0,999 | 0,168 |

En la Tabla XVIII se muestran las rectas de calibrado, el coeficiente de correlación y límite de detección que se han obtenido para cada amina biogénica estudiada.

Tabla XVIII. Rectas de calibrado, índice de correlación y límite de detección obtenidos para las aminas biogénicas estudiadas.

| Amina Biogénica | Recta de calibrado | r ² | LOD (mg/L) |
|--------------------|-----------------------|----------------|---------------|
| ETA | $y = 2,124x - 0,108$ | 0,997 | 0,043 |
| HIM | $y = 0,885x - 0,125$ | 0,984 | 0,105 |
| METIA | $y = 1,498x + 0,107$ | 1,000 | 0,072 |
| ETIA | $y = 2,018x - 0,081$ | 0,999 | 0,035 |
| TIM | $y = 1,146x - 0,057$ | 0,999 | 0,078 |
| TRIM | $y = 0,845x - 0,074$ | 0,999 | 0,120 |
| PUT | $y = 0,304x + 0,077$ | 0,999 | 0,836 |
| CAD | $y = 0,474x - 0,026$ | 0,999 | 0,256 |

En las tablas XVII y XVIII se observa que los coeficientes de correlación que se obtuvieron para las rectas de regresión lineal fueron aceptables⁴² ya que fueron superiores a 0,995 en casi todos los casos, pese a que se trata de una separación compleja. Las únicas excepciones fueron para Val, Phe y HIM que presentaron coeficientes de correlación de 0,992; 0,993 y 0,984 respectivamente.

El límite de detección (LOD), menor concentración de analito que puede ser detectada, fue calculado como tres veces la desviación estándar que proporcionó la relación señal de ruido de fondo (S_{ruido})⁴³ en los cromatogramas de los patrones. En el presente trabajo para poder expresarlo en términos de concentración se tuvo también en cuenta la sensibilidad del método por el analito, la cual está representada por la pendiente de la recta de calibrado. Por lo tanto la ecuación del límite de detección queda expresada como se muestra a continuación en la Figura 21.

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_{\text{ruido}}}{\text{pendiente}}$$

Figura 21. Ecuación para el cálculo del límite de detección

5.4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS MUESTRAS DE VINO ANALIZADAS

Una vez optimizado el método de trabajo y seleccionadas las condiciones en las que se llevaría a cabo el análisis de aminoácidos libres y aminos biogénicas se aplicó a 14 muestras de vino de la variedad de uva Monastrell con D.O de Alicante. En la tabla XIX se pueden observar dichas muestras con sus correspondientes pH.

Tabla XIX. Muestras de vino analizadas y el pH de las mismas (n=3).

| IDENTIFICACION | MUESTRA DE VINO | pH |
|----------------|--------------------------------------|------|
| M1 | Vino Monastrell Joven la Romana | 3,53 |
| M2 | Vino Monastrell Crianza El Mañan | 3,51 |
| M3 | Vino Monastrell Jóven el Mañan | 3,75 |
| M4 | Vino Monastrell Jóven Villena | 3,55 |
| M5 | Vino Monastrell Jóven Villena | 3,71 |
| M6 | Vino Monastrell Jóven Pinoso | 3,52 |
| M7 | Vino Monastrell Crianza La Romana | 3,48 |
| M8 | Vino Monastrell Crianza Villena | 3,48 |
| M9 | Vino Monastrell Jóven el Monovar | 3,89 |
| M10 | Vino Monastrell Jóven Algueña | 3,66 |
| M11 | Vino Monastrell Fondillón El Mañan | 3,35 |
| M12 | Vino Monastrell Fondillón Villena | 3,18 |
| M13 | Vino Monastrell Fondillón Villena | 3,33 |
| M14 | Vino Monastrell Fondillón La Algueña | 3,62 |

Los resultados obtenidos para los vinos jóvenes se muestran en la Tabla XX (a) y Tabla XX (b). Los datos de composición se expresan en mg/L y son medias obtenidas a partir de tres repeticiones de cada muestra, también se muestra la dispersión de las mismas expresadas como desviación estándar relativa (%RSD).

Tabla XX (a). Contenidos en aminoácidos libres y aminas biogénicas (mg/L) y la desviación estándar relativa (n=3) en vinos jóvenes.

| AMINOACIDO | M1 | | M3 | | M4 | | M5 | |
|------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | Media | %RSD | Media | %RSD | Media | %RSD | Media | %RSD |
| Asp | 24,5 | 8,0 | 10,3 | 4,9 | 31,2 | 4,1 | 22,8 | 3,5 |
| Glu | 48,6 | 7,0 | 20,9 | 11,2 | 95,5 | 3,2 | 51,1 | 2,1 |
| Asn | 18,7 | 3,6 | 10,0 | 2,5 | 22,8 | 3,2 | 21,0 | 7,5 |
| Ser | 11,8 | 0,3 | 4,4 | 8,9 | 10,6 | 5,5 | 14,2 | 10 |
| Hys | 19,2 | 1,1 | 8,1 | 0,8 | 30,5 | 6,0 | 17,2 | 7,8 |
| Gly | 21,1 | 5,3 | 7,9 | 9,8 | 30,2 | 7,9 | 19,5 | 8,6 |
| Thr | 14,1 | 6,0 | 4,5 | 4,5 | 17,5 | 8,3 | 12,7 | 3,1 |
| Arg | 65,7 | 6,0 | 8,0 | 3,2 | 40,5 | 5,2 | 35,3 | 5,2 |
| Ala | 37,4 | 3,9 | 12,2 | 9,2 | 78,2 | 4,3 | 45,3 | 5,1 |
| GABA | 28,6 | 3,7 | 10,0 | 1,9 | 22,5 | 3,7 | 14,6 | 6,9 |
| Tyr | 19,3 | 2,8 | 5,9 | 7,7 | 18,0 | 5,9 | 12,7 | 7,3 |
| Met | 6,6 | 5,0 | 2,5 | 7,3 | 5,3 | 4,5 | 4,9 | 7,6 |
| Val | 12,7 | 0,7 | 2,6 | 14 | 15,8 | 6,6 | 12,5 | 5,9 |
| Phe | <LOD | | <LOD | | <LOD | | | |
| Ile | 7,0 | 0,9 | 2,2 | 14 | 7,1 | 7,1 | 4,4 | 5,2 |
| Leu | 19,8 | 2,7 | 5,7 | 6,6 | 15,0 | 6,0 | 14,2 | 6,4 |
| Lys | 42,9 | 9,2 | 10,8 | 0,2 | 44,2 | 5,7 | 31,0 | 1,2 |
| AMINA BIOGENICA | | | | | | | | |
| ETA | 25,5 | 4,1 | 14,6 | 6,0 | 35,8 | 7,1 | 16,3 | 6,5 |
| HIM | 4,2 | 4,0 | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| METIA | <LOD | | <LOD | | <LOD | | | |
| ETIA | 6,3 | 6,2 | 1,7 | 10 | 7,4 | 3,2 | 3,5 | 3,3 |
| TIM | 4,8 | 4,3 | 1,1 | 3,9 | 3,4 | 3,9 | 4,5 | 1,2 |
| TRIM | <LOD | | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| PUT | 17,4 | 5,5 | 7,8 | 0,1 | 35,7 | 4,6 | 14,9 | 7,8 |
| CAD | <LOD | | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| pH | 3,53 | | 3,75 | | 3,55 | | 3,71 | |

Tabla XX (b). Contenidos en aminoácidos libres y aminos biogénicas (mg/L) y la desviación estándar relativa (n=3) en vinos jóvenes.

| AMINOACIDO | M6 | | M9 | | M10 | |
|------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | Media | %RSD | Media | %RSD | Media | %RSD |
| Asp | 15,6 | 9,0 | 28,5 | 6,7 | 22,5 | 3,5 |
| Glu | 31,1 | 2,4 | 53,7 | 6,6 | 58,3 | 3,8 |
| Asn | 9,8 | 0,4 | 9,8 | 6,3 | 17,7 | 2,3 |
| Ser | 4,5 | 5,1 | 13,2 | 5,1 | 14,9 | 2,3 |
| Hys | 14,6 | 0,6 | 17,9 | 5,3 | 10,9 | 2,9 |
| Gly | 12,4 | 2,4 | 19,3 | 5,6 | 21,4 | 0,4 |
| Thr | 10,7 | 6,9 | 13,1 | 2,4 | 13,7 | 2,8 |
| Arg | 34,1 | 0,4 | 43,5 | 1,1 | 47,0 | 4,4 |
| Ala | 27,3 | 4,7 | 32,2 | 3,5 | 45,1 | 1,4 |
| GABA | 11,2 | 2,5 | 17,0 | 4,4 | 25,5 | 1,7 |
| Tyr | 12,7 | 1,2 | 15,4 | 2,8 | 13,1 | 3,3 |
| Met | 5,2 | 2,3 | 6,0 | 7,5 | 6,7 | 2,7 |
| Val | 9,6 | 6,1 | 13,3 | 3,6 | 14,0 | 1,2 |
| Phe | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| Ile | 5,8 | 1,9 | 6,4 | 2,7 | 6,5 | 0,5 |
| Leu | 14,5 | 3,6 | 16,3 | 5,4 | 16,4 | 2,2 |
| Lys | 26,9 | 1,1 | 28,3 | 4,4 | 44,3 | 3,3 |
| AMINA BIOGENICA | | | | | | |
| ETA | 22,7 | 2,2 | 25,6 | 5,0 | 28,4 | 1,0 |
| HIM | <LOD | | 4,2 | 7,3 | 14,8 | 4,6 |
| METIA | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| ETIA | 3,9 | 2,2 | 5,3 | 3,2 | 8,0 | 1,0 |
| TIM | 4,2 | 3,1 | 3,4 | 0,3 | 9,1 | 1,1 |
| TRIM | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| PUT | 19,7 | 5,5 | 7,6 | 6,5 | 19,8 | 4,5 |
| CAD | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| pH | 3,52 | | 3,89 | | 3,66 | |

Referido a los aminoácidos libres, se encontró una gran variación entre los 7 vinos jóvenes analizados, pese a proceder un una misma variedad de uva. Esto puede deberse al estado de conservación y maduración de la uva; prácticas de cosecha y zona de cultivo; así como también se debe tener en cuenta el proceso de vinificación²⁶. Se observa, que los aminoácidos que se encontraron en mayor cantidad en los vinos jóvenes analizados son Arg, Ala, Asp, Glu y Lys, mientras que Phe es el que se encontró en menor cantidad, por debajo de los LOD de la técnica.

Ninguno de los vinos jóvenes analizados presentaron pH inferior a 3,5; pH por encima del cual los microorganismos responsables de la decarboxilación de los aminoácidos no están desactivados. En

consecuencia, se encontraron algunas de las principales aminas biogénicas que se suelen encontrar en vinos tintos, como HIM, TIM y PUT^{33,44}. ETA y en muchos casos PUT, son las aminas que se encontraron en mayor cantidad. Tener en cuenta que PUT, es constituyente habitual en las uvas^{15,27}. Sin embargo, en ninguna de las muestras se ha detectado presencia de TRIM, CAD ni METIA. Por lo tanto, se puede inferir que el proceso de vinificación se ha realizado en buenas condiciones sanitarias, ya que la presencia de aminas alifáticas (como son CAD y METIA) en elevadas concentraciones están asociadas a malas prácticas de manufactura y están relacionadas con la alteración de propiedades sensoriales del vino⁴⁴. En relación a HIM, se observan dos muestras con contenidos en torno a 4,2 mg/L y sólo una con un contenido algo superior a 10 mg/L, que es el valor límite aceptable establecido en países como Suiza^{27,37}. Sin embargo, en ningún caso se alcanzan valores en HIM superiores a 20 mg/L que es el máximo a partir del cual se considera que puede provocar síntomas a nivel fisiológico³⁷.

Si observamos el contenido total en aminas biogénicas (Figura 22) vemos que se encontró bastante variación; como se comentó anteriormente esto depende de numerosas variables. En cuanto a ellas hubo contenidos igual o menor de 50 mg/L, sin embargo, hay tres en las que los contenidos en aminas biogénicas fueron por encima de estas recomendaciones¹⁰.

Se observó en general que los vinos jóvenes que tienen un mayor contenido de aminoácidos libres (Figura 23) son los que presentaron un mayor contenido en aminas biogénicas (Figura 22).

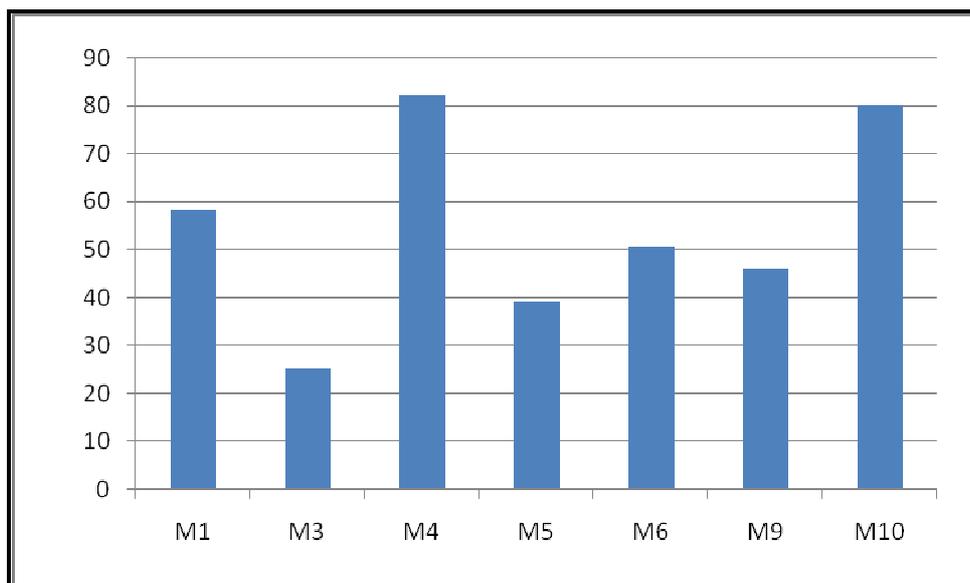


Figura 22. Contenido total (mg/L) en aminos biogénicas en los vinos jóvenes.

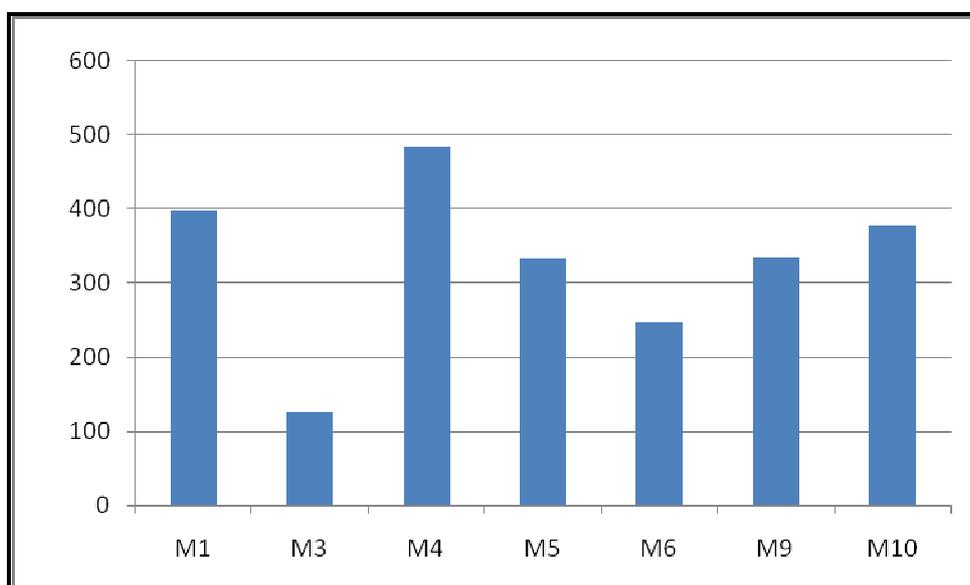


Figura 23. Contenido total (mg/L) en aminoácidos libres en vinos jóvenes.

En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos para el contenido total de aminoácidos libres en los vinos de crianza. Los vinos de crianza mostraron contenidos en aminoácidos libres más bajos que los

vinos jóvenes, probablemente, debido a que en el proceso de crianza algunos de estos aminoácidos intervienen en reacciones de metabolismo del vino.

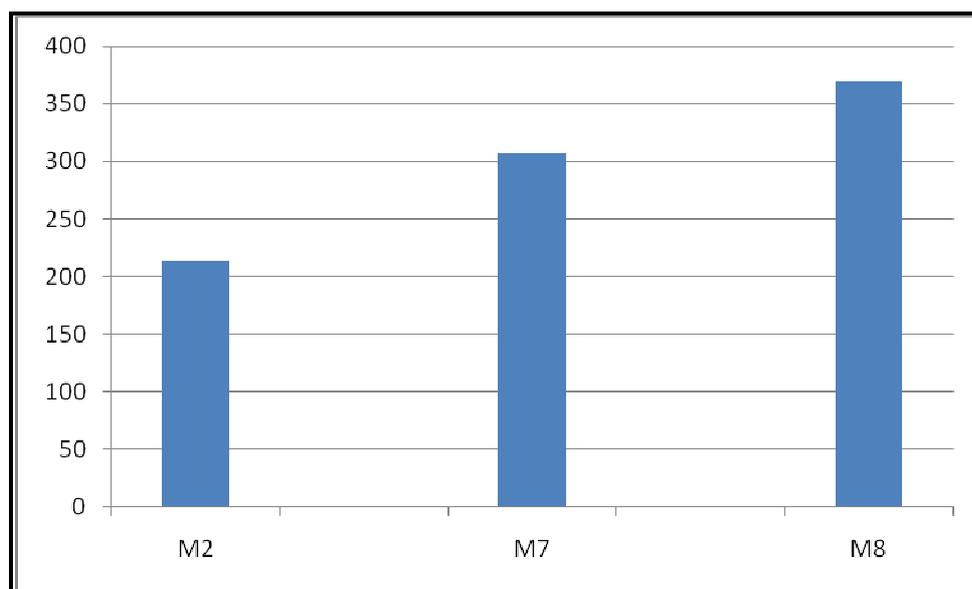


Figura 24. Contenido total (mg/L) en aminoácidos libres en vinos de crianza.

En la Tabla XXI se muestran los resultados obtenidos tanto de aminoácidos libres como de aminos biogénicas para los vinos de crianza.

Tabla XXI. Contenidos en aminoácidos libres y aminos biogénicas (mg/L) y la desviación estándar relativa (n=3) en vinos de crianza.

| AMINOACIDO | M2 | | M7 | | M8 | |
|------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | Media | %RSD | Media | %RSD | Media | %RSD |
| Asp | 17,7 | 0,6 | 30,1 | 4,7 | 36,9 | 6,9 |
| Glu | 24,9 | 4,3 | 36,8 | 0,2 | 66,7 | 7,7 |
| Asn | 7,7 | 1,3 | 12,1 | 2,3 | 16,7 | 3,0 |
| Ser | 10,1 | 8,0 | 15,8 | 7,6 | 13,8 | 32,6 |
| Hys | 12,2 | 3,9 | 11,0 | 2,5 | 18,9 | 5,6 |
| Gly | 14,2 | 2,0 | 21,2 | 7,3 | 20,0 | 3,7 |
| Thr | 9,6 | 10,8 | 13,0 | 2,6 | 12,0 | 1,9 |
| Arg | 27,7 | 6,8 | 16,8 | 1,7 | 32,7 | 2,6 |
| Ala | 21,8 | 5,8 | 33,8 | 2,6 | 41,6 | 2,3 |
| GABA | 12,9 | 6,0 | 26,8 | 0,9 | 21,2 | 2,7 |
| Tyr | 10,1 | 7,9 | 7,7 | 1,0 | 17,5 | 6,1 |
| Met | 4,5 | 2,8 | 6,0 | 2,1 | 5,6 | 5,6 |
| Val | 5,2 | 6,6 | 14,2 | 2,4 | 10,4 | 2,9 |
| Phe | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| Ile | 3,5 | 5,7 | 8,0 | 4,2 | 6,5 | 1,3 |
| Leu | 9,4 | 6,6 | 17,9 | 3,7 | 18,1 | 4,1 |
| Lys | 22,4 | 11,1 | 35,9 | 1,2 | 30,1 | 6,4 |
| AMINA BIOGENICA | | | | | | |
| ETA | 22,0 | 5,4 | 21,4 | 2,1 | 19,1 | 0,6 |
| HIM | <LOD | | 10,8 | 0,7 | 14,2 | 4,8 |
| METIA | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| ETIA | 5,0 | 8,7 | 4,2 | 0,6 | 3,6 | 2,2 |
| TIM | 4,6 | 3,3 | 10,8 | 0,3 | 4,1 | 5,2 |
| TRIM | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| PUT | 7,7 | 9,1 | 28,3 | 1,4 | 10,2 | 3,0 |
| CAD | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| pH | 3,5 | | 3,5 | | 3,5 | |

Mientras que uno de los vinos analizados no presentó contenido detectable en HIM, dos de ellos presentaron contenidos superiores a 10 mg/L, pero siempre inferiores a 20 mg/L.

Por otra parte, no demostraron niveles detectables de CAD, METIA y TRIM. Como se mencionó anteriormente, la presencia de CAD y METIA en elevadas concentraciones pudiera ser indicativa del uso de materias primas de baja calidad y condiciones inapropiadas durante la maduración y almacenamiento del vino. El que estas aminos no estén presentes en cantidades cuantificables en los vinos analizados indica que las uvas con las que se elaboraron los vinos estaban en buen estado de conservación y que las prácticas sanitarias, durante la elaboración, fueron adecuadas.

El contenido total de aminos biogénicas en los vinos crianza se puede observar en la Figura 25.

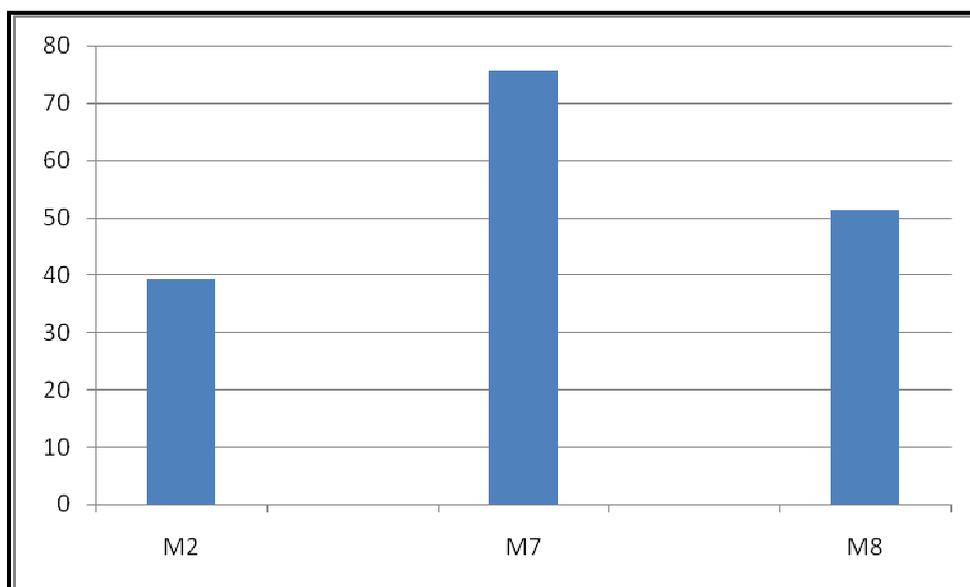


Figura 25. Contenido total (mg/L) en aminos biogénicas en los vinos de crianza.

Para los vinos crianza analizados no se observa correlación directa entre los contenidos de aminoácidos libres y aminos biogénicas como en los vinos jóvenes, pero se debe tener en cuenta que se analizó un número bajo de muestras.

Por último se analizaron los vinos Monastrell Fondillón. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XXII. Los contenidos en HIM se encontraron en torno a 10 mg/L o superiores, una muestra presentó concentración de 18,7 mg/L, lo cual se acerca a 20 mg/L. Los contenidos de PUT se encontraron entre 10 y 20 mg/L. PUT, no es tóxica por si misma, sino que intensifica los efectos adversos junto con el alcohol de HIM y TIM sobre la salud^{9,27,45}, interfiriendo con la enzima que las metaboliza²⁷. Pero esto se da a concentraciones entre 20 y 30 mg/L; además puede causar un decrecimiento importante en la calidad sensorial del vino⁴⁶.

Estos vinos presentaron TRIM, a diferencia de los anteriores (jóvenes y de crianza) que mostraron contenidos no detectables. La TRIM, al igual que PUT, tiene un efecto negativo sobre el aroma y sabor de los vinos⁹.

Tabla XXII. Contenidos en aminoácidos libres y aminas biogénicas (mg/L) y la desviación estándar relativa (n=3) en vinos Fondillón.

| AMINOACIDO | M11 | | M12 | | M13 | | M14 | |
|------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | Media | %RSD | Media | %RSD | Media | %RSD | Media | %RSD |
| Asp | 17,3 | 6,1 | 30,7 | 6,7 | 33,1 | 6,9 | 60,1 | 3,7 |
| Glu | 14,2 | 5,9 | 19,8 | 3,8 | 25,0 | 3,2 | 31,8 | 0,8 |
| Asn | 4,7 | 5,7 | 19,2 | 0,4 | 4,3 | 1,9 | 4,3 | 4,3 |
| Ser | 8,6 | 2,9 | 9,5 | 2,1 | 13,8 | 8,8 | 44,3 | 2,8 |
| Hys | 7,9 | 1,7 | 9,1 | 4,1 | 14,5 | 4,3 | 11,0 | 7,7 |
| Gly | 12,7 | 3,2 | 22,0 | 3,9 | 23,8 | 5,7 | 38,5 | 8,7 |
| Thr | 7,2 | 8,2 | 12,0 | 5,1 | 12,6 | 5,4 | 23,6 | 9,9 |
| Arg | 15,7 | 8,4 | 29,2 | 5,5 | 41,8 | 17,9 | 39,6 | 9,9 |
| Ala | 18,4 | 6,5 | 36,5 | 5,6 | 37,5 | 0,7 | 59,7 | 5,6 |
| GABA | 8,5 | 5,4 | 18,5 | 3,9 | 16,1 | 7,5 | 38,2 | 6,8 |
| Tyr | 7,7 | 4,1 | 9,9 | 5,6 | 11,7 | 5,4 | 15,3 | 4,1 |
| Met | 3,5 | 4,6 | 4,4 | 1,8 | 4,4 | 5,5 | 5,3 | 9,5 |
| Val | 6,3 | 8,3 | 14,4 | 14,6 | 11,8 | 4,1 | 27,0 | 2,0 |
| Phe | <LOD | | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| Ile | 4,6 | 2,7 | 8,7 | 5,0 | 8,1 | 7,1 | 17,2 | 0,6 |
| Leu | 12,0 | 6,3 | 19,2 | 3,9 | 17,3 | 8,8 | 33,1 | 0,6 |
| Lys | 8,6 | 3,8 | 17,1 | 4,3 | 14,9 | 2,3 | 27,2 | 8,3 |
| AMINA BIOGENICA | | | | | | | | |
| ETA | 9,9 | 4,9 | 14,1 | 5,5 | 12,6 | 8,1 | 16,5 | 3,5 |
| HIM | 9,7 | 2,7 | 15,2 | 6,4 | 13,6 | 15,2 | 18,7 | 8,0 |
| METIA | <LOD | | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| ETIA | 3,0 | 7,0 | 5,0 | 1,3 | 5,3 | 6,5 | 5,7 | 3,2 |
| TIM | 6,5 | 4,9 | 8,5 | 2,6 | 6,5 | 7,3 | 17,8 | 4,2 |
| TRIM | 10,1 | 7,0 | 10,6 | 9,8 | 12,0 | 4,8 | 16,2 | 12,2 |
| PUT | 11,6 | 7,0 | 10,6 | 3,5 | 10,3 | 1,1 | 21,9 | 8,6 |
| CAD | <LOD | | <LOD | | <LOD | | <LOD | |
| pH | 3,35 | | 3,18 | | 3,33 | | 3,62 | |

Al igual que en los vinos jóvenes, se observa para los vinos Fondillón que en general presentaron un mayor contenido en aminas biogénicas aquellos que contenían un mayor contenido en aminoácidos libres (Figura 26 y Figura 27).

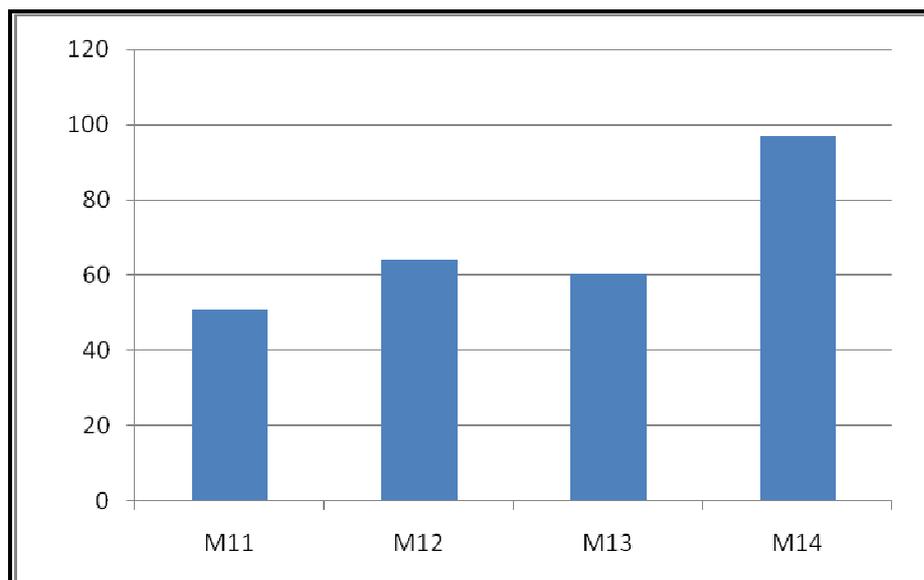


Figura 26. Contenido total (mg/L) en aminas biogénicas en vinos Fondillón.

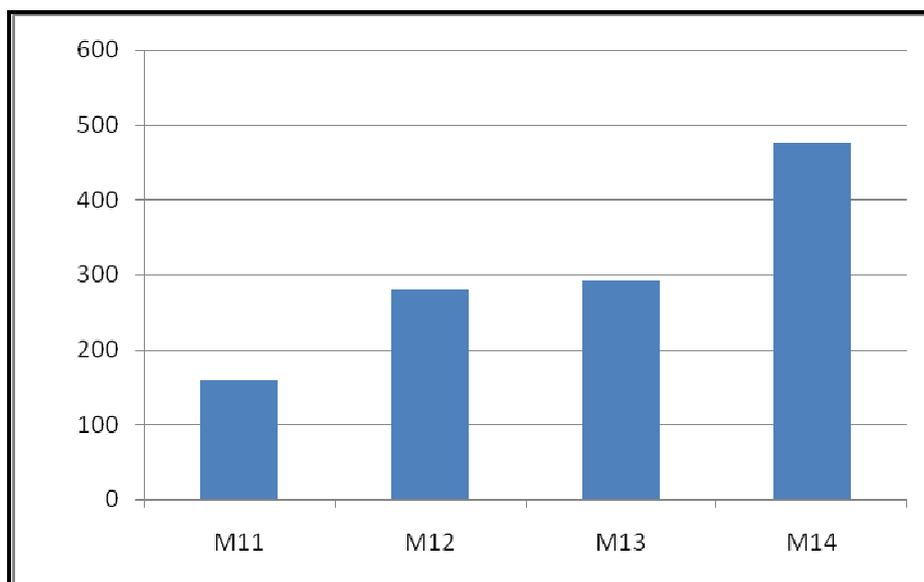


Figura 27. Contenido total (mg/L) en aminoácidos libres en vinos Fondillón.

El contenido en aminoácidos y en aminas biogénicas presenta un gran rango de variabilidad en las muestras analizadas, lo cual puede deberse a la gran cantidad de factores que influyen en la síntesis de aminas biogénicas. Algunos de estos factores son:

- Contenido en aminoácidos libres. Estos a su vez dependen del proceso, del modo en que se prepara el vino, y también de las uvas que se utilizan para su elaboración.
- De los microorganismos con que se inocula la uva para producir la fermentación y los que posee la uva. Las principales responsables de la formación de aminas biogénicas son las bacterias lácticas ya que estas presentan actividad aminodecarboxilasa. En concreto algunas cepas como *Pediococcus* y *Lactobacillus* potencian la formación de HIM y de TIM, respectivamente¹⁰.
- Condiciones ambientales como pH, temperatura, grado alcohólico y azúcares. Se sabe que si los vinos poseen pH inferiores a 3,5 el crecimiento de las bacterias lácticas se encuentra bastante inhibido y, en consecuencia, también la formación de aminas biogénicas.
- Las prácticas enológicas también son importantes; como maceración, tiempo de fermentación, estabilización y la crianza.

De los vinos analizados no se tenían datos del proceso de producción y, tan sólo se conoce la variedad de uva que se ha utilizado para su elaboración y el pH del mismo. En todos los vinos jóvenes y de crianza estudiados, el pH es igual o superior a 3,5 esto podría explicar la presencia de algunas aminas biogénicas en cantidades más o menos importantes.

Se observa, en especial, en vinos jóvenes y crianza contenidos algo elevados de PUT y ETA. Esto coincide con algunos datos de bibliografía en los que se indica que en zonas cálidas puede que estas aminas sean las predominantes. Sin embargo, no se ha encontrado en ninguno de estos vinos contenidos en CAD, por lo menos por encima de los LOD del método desarrollado.

Tabla XXIII. Comparación de contenidos (mg/l) máximos y mínimos en aminoácidos libres de las muestras analizadas en el presente trabajo con muestras de la variedad Tempranillo.

| Aminoácido | Min | Max | Contenido (Min-Max)*³⁷ |
|-------------------|------------|------------|--|
| Asp | 10,3 | 60,1 | 4,20 - 22,10 |
| Glu | 14,2 | 95,5 | 9,85 - 86,80 |
| Asn | 4,3 | 22,8 | 7,07 - 39,10 |
| Ser | 4,4 | 44,3 | 1,97 - 17,50 |
| Hys | 7,9 | 30,5 | 5,89 - 68,30 |
| Gly | 7,9 | 38,5 | 7,23 - 36,50 |
| Thr | 4,5 | 23,6 | 2,71- 30,3 |
| Arg | 8,0 | 65,7 | 5,40 - 151,00 |
| Ala | 12,2 | 78,2 | 12,30 - 96,20 |
| GABA | 8,5 | 38,2 | 8,04 - 125,00 |
| Tyr | 5,9 | 19,3 | 1,60-12,60 |
| Met | 2,5 | 6,7 | 1,35 - 12,20 |
| Val | 2,6 | 27,0 | 1,42-15,20 |
| Phe | 0,0 | 0,0 | 1,50 - 13,10 |
| Ile | 2,2 | 17,2 | 2,38 - 11,20 |
| Leu | 5,7 | 33,1 | 1,47- 21,50 |
| Lys | 8,6 | 44,3 | 1,86 - 19,8 |

* Contenido máximo y mínimo de aminoácidos (mg/L) encontrados en vinos de la variedad Tempranillo por Izquierdo Cañas *et al.*

Se observa que en cuanto a contenido en aminoácidos libres hay bastante variación entre las muestras, no obstante, cuando se comparan los resultados con los valores obtenidos en otros estudios (Tabla XXIII) se aprecia que la mayoría de los máximos y mínimos se encuentran comprendidos en los valores encontrados en bibliografía. Sólo hay pequeñas excepciones, como el caso de Phe y Lys. No parece que el tiempo de crianza del vino afecte significativamente al perfil de aminoácidos libres.

En la Tabla XXIV se encuentran los valores obtenidos para algunas de las aminos biogénicas en vinos encontrados en la literatura. Se comparan con los valores obtenidos en los vinos Monastrell analizados. Se observa que los valores de aminos biogénicas encontrados se asemejan a los rangos de concentraciones encontrados por otros autores, para vinos también tintos. Como excepción se encuentra el alto contenido en TRIM

para los vinos añejos (Fondillón). Sin embargo, en los vinos jóvenes o de crianza esta amina no está presente.

Tabla XXIV. Contenido (Min-Max) en aminas biogénicas (mg/L) encontrados en algunos vinos y por diferentes autores.

| VINO | ETA | HIM | METIA | ETIA | TIM | TRIM | PUT | CAD |
|------------------------------|----------------|---------------------------|-----------------|---------------|---------------|--------------------------|----------------|-----------------|
| Griego ⁴⁶ | - | 0,12- 0,17 | 0,10- 0,18 | 0,10- 0,18 | 0,10- 1,74 | - | 0,95- 9,41 | - |
| Tarragona ¹⁹ | - | 0,60- 3,00 | 0,90- 3,80 | 0,80- 1,90 | - | - | 4,10- 6,10 | - |
| Turco ³⁵ | - | 0,03- 2,80 | - | - | 0,02- 1,00 | 0,40- 8,80 | 0,94- 15,60 | 0,11- 4,00 |
| Brasileño ²⁶ | - | 0,00- 1,73 | - | - | 0,30- 1,07 | - | 0,77- 4,33 | - |
| Tempranillo ³⁷ | - | 0,08- 15,70 | - | - | 0,00- 2,63 | 0,02- 0,08 | 2,45- 23,5 | 0,17- 0,94 |
| Oporto ³⁶ | - | - | - | - | 0,03- 0,31 | - | 0,14- 5,70 | 0,01- 0,98 |
| La Mancha ⁴⁷ | 14,90- 23,0 | <LOD | - | 6,00- 7,80 | 7,00- 23,6 | - | - | - |
| Monastrell con D.O. Alicante | 9,90- 28,40 | <LOD (0,105) -18,70 | <LOD (0,072) | 1,70- 8,00 | 1,10- 17,8 | <LOD (0,120) -16,6 | 7,6- 35,7 | <LOD (0,256) |

5.5. DIFERENCIACIÓN DE VINOS MONASTRELL DE ACUERDO AL PERFIL DE AMINOACIDOS Y AMINAS BIOGÉNICAS

Si bien, en el presente trabajo se ha estudiado un número bajo de muestras de vino, y además se ha realizado con vinos envasados. No obstante, y con objeto de encontrar algunas características comunes o bien diferenciadoras entre los vinos elaborados con uva Monastrell jóvenes, y de crianza con los vinos añejos se han elaborado unas gráficas que contienen los diagramas de cajas para cada una de las variables

estudiadas separados en función de que sea vino joven o de crianza o bien vino Fondillón.

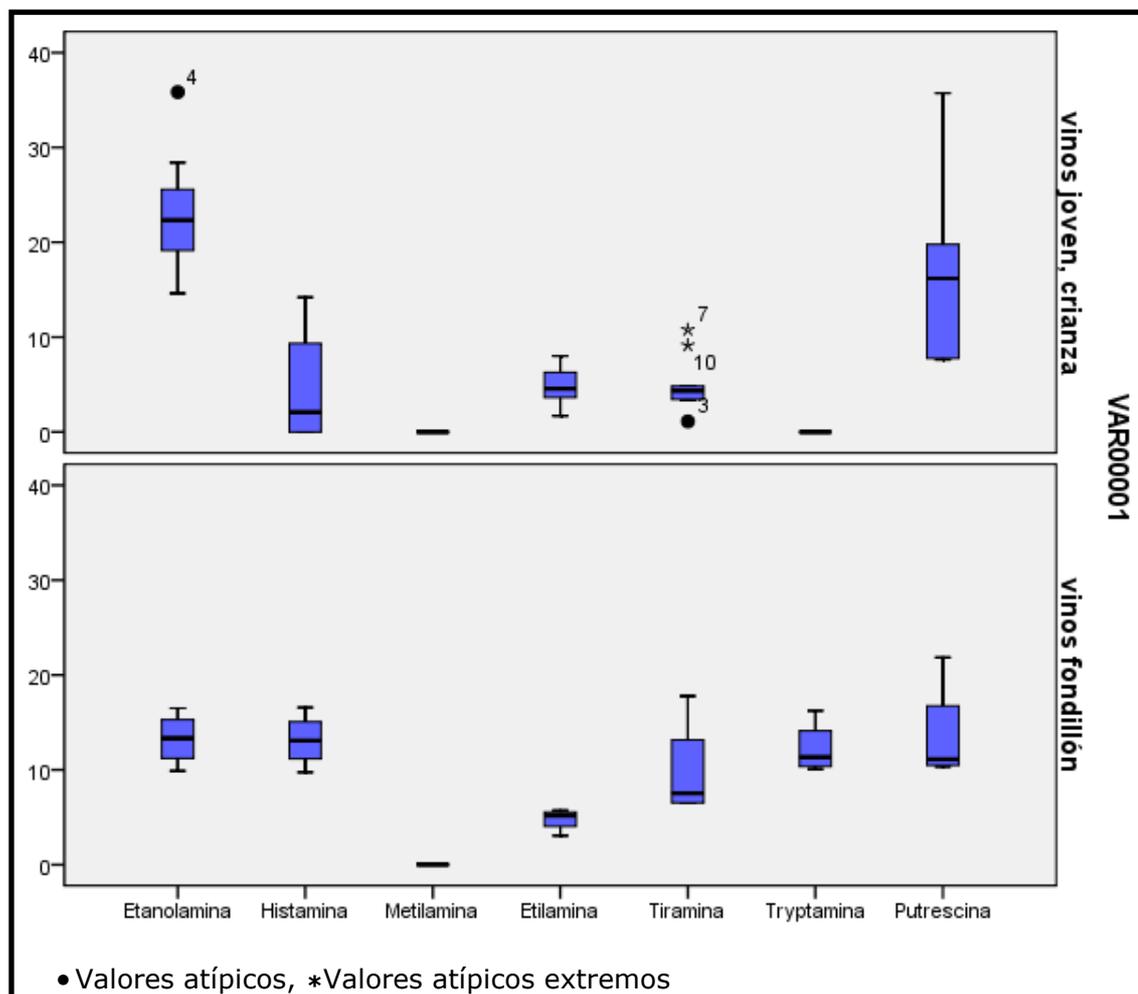


Figura 28. Comparación de contenidos de aminas biogénicas (mg/L) de vinos jóvenes y crianza con vinos añejos (Fondillón).

En la Figura 28 se puede ver que para ETA hay una muestra de vino que presenta un valor anormalmente elevado, esta es la M4, y en el caso de TIM hay tres muestras que presentan valores anómalos (M3, M7 y M10) dentro de los vinos analizados jóvenes y de crianza. De todas formas, los valores de TIM se encuentran entre 1,10-17,8 mg/L, mientras que se reporta que esta amina causa migrañas e hipertensión a concentraciones comprendidas entre 25-40 mg/L⁴⁶.

Se observa también, que el contenido en ETA, es inferior en los vinos añejos, mientras que por el contrario el contenido en TRIM es superior. El contenido en PUT en las muestras de vinos añejos no es superior a los vinos jóvenes o de crianza como se apunta en bibliografía y, además, estos contenidos se mantienen en valores entre 10-20 mg/L. Valores que parece que desde un punto de vista sensorial ayudan a redondear el sabor de un vino tinto. Con respecto al contenido en HIM la mayor parte de los vinos jóvenes y de crianza presentan contenidos menores a 10 mg/L que es lo que países como Suiza establecen como límite máximo admisible²⁹, mientras que los vinos añejos presentan contenidos inferiores a 20 mg/L. Este valor es el que se considera a partir del cual se que puede provocar algún efecto a nivel fisiológico^{37,48}.

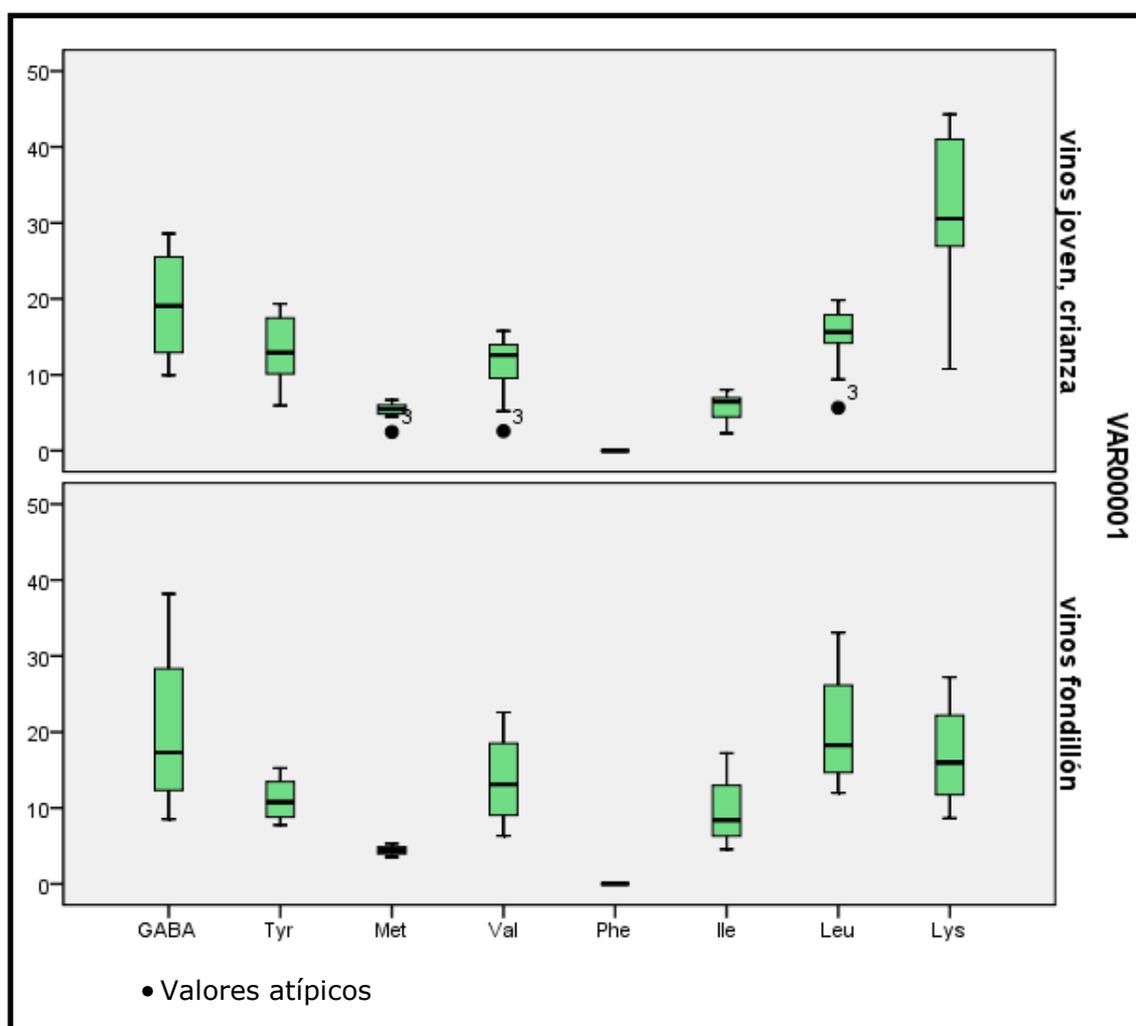


Figura 29. Comparación de contenidos en algunos aminoácidos libres (mg/L) de vinos jóvenes y de crianza con vinos Fondillón.

En cuanto a los contenidos en aminoácidos libres se observa una gran dispersión en los resultados. No obstante, entre los aminoácidos que se muestran en la Figura 29, no hay diferencias significativas en el contenido medio entre los vinos jóvenes-crianza con el vino Fondillón. La excepción es el aminoácido Lys el cual se encuentra en menor cantidad en el vino Fondillón.

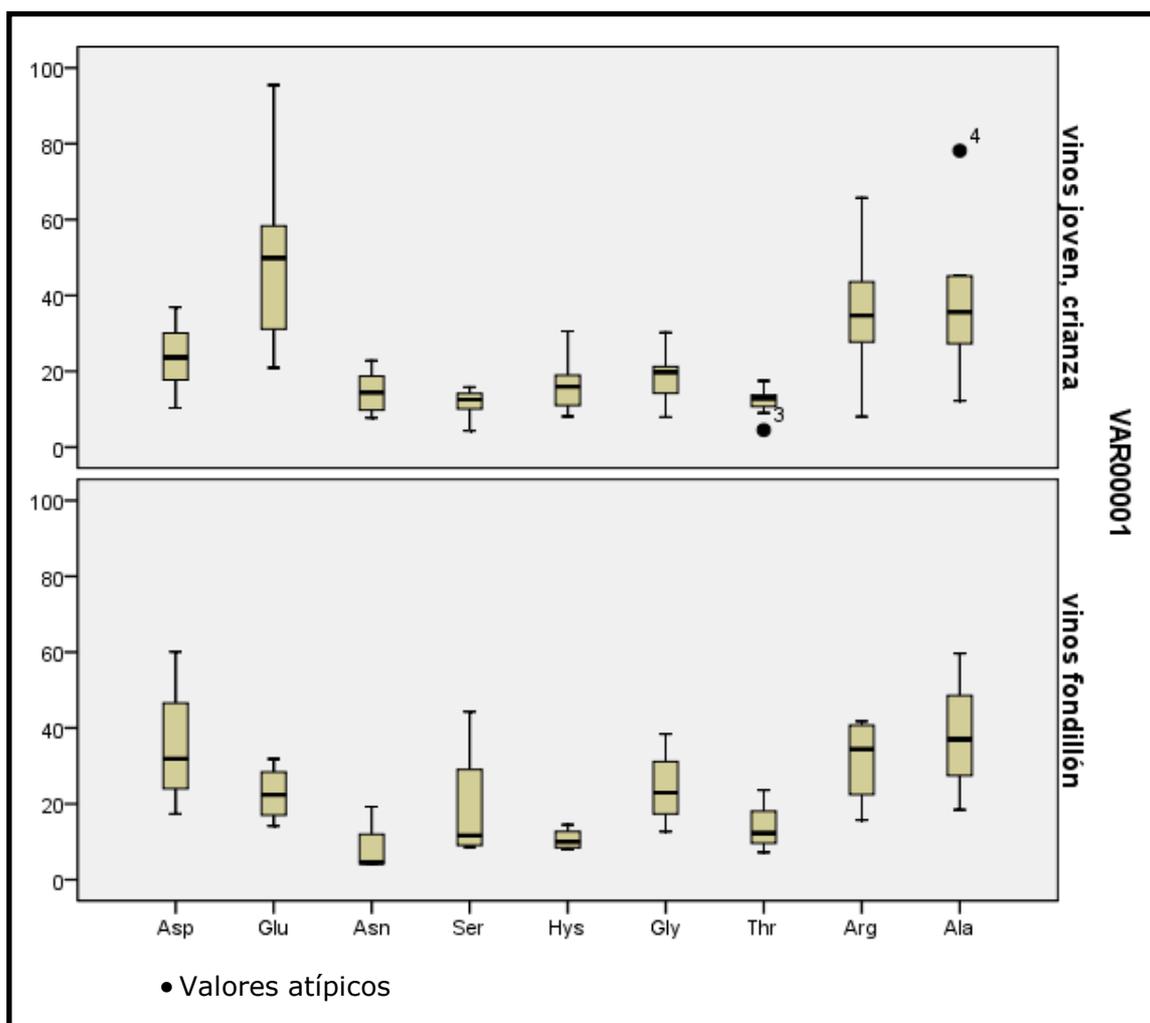


Figura 30. Comparación de contenidos en algunos aminoácidos libres (mg/L) de vinos jóvenes y crianza con vinos Fondillón.

En la Figura 30 se observa que tan sólo el contenido en Glu es significativamente mayor en vinos jóvenes y de crianzas que en vinos Fondillón, el resto de aminoácidos no presenta diferencias significativas.

Después de haber realizado esta comparativa de contenidos globales en aminoácidos y aminos biogénicas, se puede decir, que se observan algunas diferencias entre vinos envejecidos y vinos jóvenes-crianza. El siguiente paso, por tanto, ha sido aplicar una técnica de análisis multivariante no supervisado, como el análisis de conglomerados con objeto de ver si es posible establecer una clasificación de los vinos en base que sean vinos jóvenes-crianza o bien vinos Fondillón o si los contenidos en los parámetros estudiados están influenciados por la zona de procedencia de las uvas. En la Figura 31 se muestra el dendrograma obtenido al aplicar el análisis de conglomerados a los datos de aminoácidos y aminos biogénicas conjuntamente. Para obtener el dendrograma se ha utilizado como criterio de distancia la distancia Euclídea al cuadrado y como método de aglomeración el método de Ward.

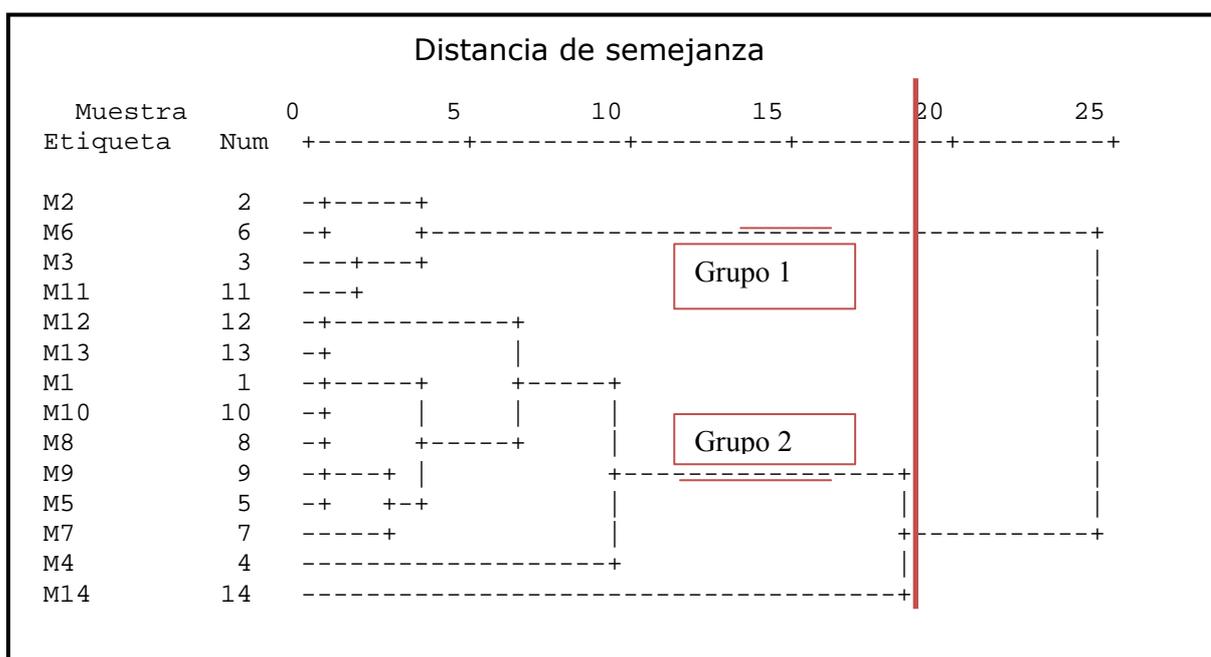


Figura 31. Dendrograma obtenido utilizando los contenidos totales de aminos biogénicas y los aminoácidos libres.

En el dendrograma de la Figura 31 se observa que a una distancia rescalada inferior a 20 se establecen dos grupos en función de la semejanza entre las muestras. En el grupo 1 aparecen dos vinos jóvenes

(M3 y M6), uno crianza (M2) y otro añejo (M11). En el grupo 2 se clasifican el resto de muestras analizadas. Se puede observar que los aminoácidos conjuntamente con las aminos biogénicas no permiten diferenciar a un vino de crianza frente a uno añejo. Sin embargo, se observa con curiosidad que los vinos clasificados en el grupo 1 proceden todos de una misma zona de cultivo mientras que en el grupo 2 se clasifican los vinos de las otras tres procedencias que se introdujeron en el presente estudio. Este hecho puede apoyarse quizás en que a veces se ha utilizado el perfil de aminoácidos libres para clasificar muestras de un alimento según su procedencia, como por ejemplo, mieles²⁵ o almendras⁴. En consecuencia, el siguiente paso, fue aplicar este mismo análisis de conglomerados al contenido en aminoácidos libres de los vinos. Después de hacer esto se confirma que al utilizar los aminoácidos libres de los vinos la clasificación de las muestras analizadas es la misma que la obtenida en la Figura anterior. En consecuencia, el perfil de aminoácidos de los vinos analizados parece no influido por el tipo de vino que se analiza sino que más bien por la zona de cultivo o bien la técnica de vinificación empleada.

Por otra lado, se va a aplicar el análisis cluster al contenido en aminos biogénicas de los vinos. El dendrograma obtenido es el que se muestra en la Figura 32 en ella se puede apreciar una clasificación diferente a la obtenida cuando se introducían los aminoácidos libres. En este caso, a una distancia de semejanza de 15 se forman dos subconjuntos, un formado por los cuatro vinos rancios (Fondillón) y otro que contiene las muestras de los vinos jóvenes y, los de crianza. Esto corrobora el hecho de que el contenido en aminos biogénicas se modifica con la edad del vino y, que esas diferencias podrían servir para diferenciar vinos en función del tiempo de crianza.

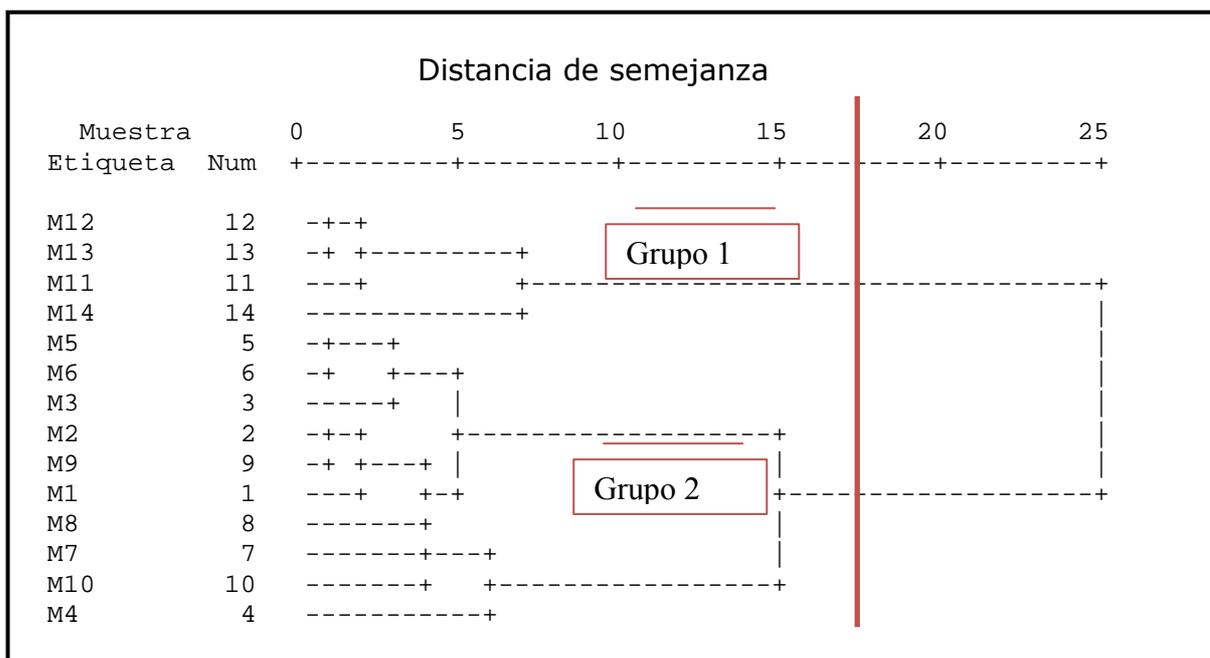


Figura 32. Dendrograma obtenido utilizando únicamente las aminas biogénicas.

Evidentemente, para confirmar este hecho se debería hacer un análisis más exhaustivo y con un mayor número de muestras. No obstante, parece que estos resultados preliminares apuntan a que esto pueda ser así.

6. CONCLUSIONES

Se optimizó una metodología analítica para la separación simultánea de aminoácidos libres y aminos biogénicas por RP-HPLC con detección fluorimétrica con una derivatización precolumna con OPA.

Con la modificación del pH y composición de la fase móvil junto a la optimización del gradiente de elusión del sistema cromatográfico, se logró una correcta separación de todos los analitos estudiados. Así mismo, la incorporación de temperatura constante disminuyó los tiempos de retención de los analitos y contribuyó, junto al agregado de Helio, a la estabilización del sistema.

Por lo tanto, con el método de análisis optimizado se logró determinar simultáneamente el contenido de 17 aminoácidos libres y 8 aminos biogénicas con éxito. La metodología desarrollada fue aplicada en vinos con D.O. Alicante.

El contenido en aminoácidos libres es muy variable de unas muestras a otras ya que depende mucho del origen, y el estado de la uva con que se ha elaborado el vino.

El contenido en aminos biogénicas resultó ser también bastante variables. Hay muestras que presentan contenidos totales en aminos biogénicas inferiores a 50 mg/L que son algunas de las recomendaciones que se dan actualmente para vinos tintos, sin embargo, en otras muestras el contenido total resulta mayor a este valor. Este hecho depende de muchos factores pero pudiera deberse, según se apunta en bibliografía a que los pH de los vinos, los cuales son superiores a 3,5 y también el tipo de fermentos seleccionados para llevar a cabo la fermentación alcohólica y la maloláctica.

El contenido en HIM también varía bastante de unos vinos a otros, aunque en general, se ha observado que es inferior en los vinos jóvenes con una excepción. También cabe destacar que el contenido en HIM no aumenta significativamente en los vinos añejos, sin embargo, el contenido

en TRIM es significativamente superior en vinos añejos comparado con vinos jóvenes. Este podría ser un parámetro diferenciador.

En ninguna de las muestras se han encontrado cantidades cuantificables de CAD o de METIA. Esto indica que las uvas utilizadas para la elaboración de los vinos estaban en buen estado de conservación y eran de buena calidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1- NOLLET, L. Food Analysis by HPLC. Second edition. Marcel Dekker, Inc. United States of America 2000. ISBN: 0-8247-8460-X
- 2- MATHEWS, C.K.; VAN HOLDE, K.E.; AHERN, K.G. Bioquímica, Tercera Edición. Pearson Educación, S.A., Madrid 2002. p 143. ISBN: 84-7829-053-2.
- 3- CURTIS, H.; VARNES, N. Invitación a la Biología. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana, S.A. 1997. p 61. ISBN: 84-7903-199-9.
- 4- PRATS MOYA, M.S. Caracterización Quimiométrica de diez variedades de almendra cultivadas en diferentes localidades. Universidad de Alicante. Tesis Doctoral 2000.
- 5 KAM, H.W.; SURAINI, A.A.; SUHAILA, M. Sensory aroma from Maillard reaction of individual and combinations of amino acids with glucose in acidic conditions. International Journal of Food Science and Technology 2008, 43, p 1512–1519.
- 6- Amino acids are what deliciousness is all about. Food And amino acids (en línea). Disponible en web: <http://www.ajinomoto.com/amino/eng/food.html>
- 7- BADUI, S.D. Química de los alimentos. Cuarta edición. Pearson educación, México 2006. p 449. ISBN: 970-26-0670-5.
- 8- BOURGEOIS, CM; MESCLE, JC; y ZUCCA, J. Microbiología alimentaria. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Primera edición. Editorial Acribia S.A. Vol 1 1994. p 141-143. ISBN: 84-200-0771-4
- 9- LANDETE J.M.; FERRER, S.; POLO, L.; PARDO, I. Análisis y control de aminas biógenas en vino. Tecnología del vino: tratamientos y equipos para viticultura y enología. ISSN 1578-6153, Nº. 22, 2005, p 29-32.
- 10- ANLI, R.E.; MUSTAFA, B. Biogenic Amines in Wines. Food Reviews International, 25: p 86-102, 2009 Taylor & Francis. ISSN: 8755-9129.
- 11- SILLA SANTOS, M.H. Fermentation and food Safety. Aspen Publishers, Inc; Gaithersburg, Maryland 2001. Chapter 6 Toxic Nitrogen Compounds Produced during Processing: Biogenic Amines, Ethyl Carbamides, Nitrosamines. ISBN: 0-8342-1843-7

-
- 12- ARMAGAN, Ö. Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry*, Volume 103, 2006. Issue 4, 2007, p 1475-1486.
- 13- McCABE-SELLERS, B.J.; STAGGS C.G.; BOGLE M.L. Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 19, Supplement 1, 28th US National Nutrient Databank Conference, August 2006, p S58-S65, ISSN 0889-1575, DOI: 10.1016/j.jfca.2005.12.008.
- 14- KVASNICKA, F.; VOLDRICH M. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection, *Journal of Chromatography A*, Volume 1103, Issue 1, 20 January 2006, p 145-149, ISSN 0021-9673, DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.005.
- 15- LANDETE IRANZO, J.M. Estudio y caracterización molecular de aminas biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enológico. Universidad de Valencia. Tesis Doctoral 2005.
- 16- SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 29, Issues 2-3, April 1996, p 213-231, ISSN 0168-1605, DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1.
- 17- MAINTZ, L.; NOVAK N. Histamine and histamine intolerance *Am. J. Clinical Nutrition*, May 2007; 85, p 1185-1196.
- 18- LANDETE, J.M.; DE LAS RIVAS, B.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. Updated Molecular Knowledge about Histamine Biosynthesis by Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48. 2008 p 697-714, ISSN:1040-8398
- 19- BUSTO, O.; MIRACLE, M.; GUASCH, J.; BORRULL, F. Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization, *Journal of Chromatography A*, Volume 757, Issues 1-2, 3 January 1997, p 311-318, ISSN 0021-9673, DOI: 10.1016/S0021-9673(96)00693-0.
- 20- WARTHESEN, J.; SCANLAN, R.; BILLS, D.; LIBBEY, L. Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23; 1975. p 898-902

21- LOUKOU, Z.; ZOTOU, A. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 996, Issues 1-2, 9 May 2003, p 103-113, ISSN 0021-9673, DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00558-2.

22- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science & Technology*, 1995 Vol. 6. p 341-346.

23- MARTINEZ, A.; RIU, J.; BUSTO, O.; GUASCH, J.; RIUS, F.X. Validation of bias in multianalyte determination methods: Application to RP-HPLC derivatizing methodologies, *Analytica Chimica Acta*, Volume 406, Issue 2, 21 February 2000, p 257-278, ISSN 0003-2670, DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00766-7.

24- GARCÍA VILLAR, N.; SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure. *Analytica Chimica Acta* 575 (2006) p 97-105.

25- PEREIRA, V.; PONTES, M.; CAMARA, J.S.; MARQUES, J.C. Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure, *Journal of Chromatography A*, Volume 1189, Issues 1-2, 31st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2 May 2008, p 435-443, ISSN 0021-9673, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.12.014.

26- SOUZA, S.C.; THEODORO, K.H.; SOUZA, E.R.; MOTTA S.; ABREU GLÓRIA, B.M. Bioactive Amines in Brazilian Wines: Types, Levels and Correlation with Physico-Chemical Parameters. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2005, 48 (1), p 53-62.

27- LANDETE, J.M.; FERRER, S.; POLO, L.; PARDO, I. Biogenic amines in wines from three Spanish Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, p 1119-1124.

28- MILLIES, K.D.; ZIMLICH, D. (1988). Histamingehalte von weinen und Schaumweinen. *Weinwirtschaft Technik*, 1, p 21-24.

29- Les autorités fédérales de la Confédération suisse. Ordonnance sur les substrates étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC). Le Département fédéral de l'intérieur. Annexe (art 2, al. 6). 2002; p 1068.

30- Denominación de Origen Alicante (en línea). Disponible en web: <http://www.crdo-alicante.org>

31- SIMON SARKADI, L.; GELENCSEER, E.; VIDA, A. Immunoassay method for detection of histamine in food. *Acta Alimentaria* 32 (2003) p 89.

32- NOLLET, L. Handbook of Food Analysis. Physical Characterization and Nutrient Analysis. Second edition, revised and expanded vol 1. United States of America 2004. Section 5, Amino Acid, p 87-93.

33- MILLÁN, S.; SAMPEDRO, C.; UNCETA, N.; GOICOLEA, A.M., BARRIO, J.R. Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography–electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, 584, p 145–152.

34 - HALPINE, S.M. Amino Acids: HPLC Analysis Advanced Techniques. *Encyclopedia of Chromatography* 2010. Third edition, 1:1, p 73-77. DOI: 10.1081/E-ECHR3-120039875

35- ANLI, R.E.; VURAL, N.; YILMAZ, S.; VURAL, Y.H. The determination of biogenicamines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 2004, 17, p 53–62

36- FERNANDES, J.O.; FERREIRA, M.A. Combined ion-pair extraction and gas chromatography–mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*, 2000, 886, p 183–195.

37- IZQUIERDO CAÑAS, P.M.; GARCÍA ROMERO, E.; GÓMEZ ALONSO, S.; FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, M.; PALOP HERREROS, M.L.L. Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in tempranillo red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 2008 p 731-735.

38- ROMERO, R.; GÁZQUEZ, D.; BAGUR, M.G.; SÁNCHEZ-VINAS, M. Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000, 871, 75–83.

-
- 39- GARCIA VILLAR, N.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 6387–6393.
- 40- MARTÍN CARRATALÁ, M.L.; PRATS MOYA, M.S.; GRANÉ TERUEL, N.; BERENGUER NAVARRO, V. Discriminating Significance of the Free Amino Acid Profile in Almond Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) 50 (23), p 6841-6846
- 41- DI RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; GONZALES, L.A.; TABLADA, E.M.; DIAZ, M.P.; ROBLEDO, C.W. Y BALZARINI, M.G. *Estadística para las Ciencias agropecuarias*. Séptima Edición. Brujas, Córdoba, Argentina (2008). ISBN:978-987-591-112-3
- 42 - MINISTERIO DE SALUD DE COSTA RICA. Guía de validación para métodos analíticos. [Monografía en Internet]. Costa Rica 1998. p 8. (en línea). Disponible en web: <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
- 43- SURESH, W.; RAJENDRA CUMAR S.; BALRAJS, P. Isolation and simultaneous LC analysis of Thiram and Its Less Toxic Transformation Product in DS Formulation. Springer Science + Business Media LLC 2009.
- 44- NAVASCUÉS LOPEZ-CORDON, E. Aminas biógenas en el vino. Estrategias para evitar su generación. *Viticultura/Enología Profesional* N° 97; 2005, p. 29-37.
- 45- ARENA, M.E.; LANDETE, J.M.; MANCA DE NADRA, M.C.; PARDO, I.; FERRER, S. Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X1B isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* 2007. ISSN 1364-5072.
- 46- PRAMATEFTAKI, P.V.; METAFA, M.; KALLITHRAKA S.; LANARIDIS, P. Evolution of malolactic bacteria and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentations in a Greek winery. *Letters in Applied Microbiology* 2006. ISSN 0266-8254
- 47- HLABANGANA, L.; HERNANDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Determination of biogenic amines in wines by ion pair liquid chromatography and post-column derivation with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate. *Journal of Chromatography A* 1130, 2006

48- BAUZA, T.; BLAISE, A.; MESTRES, J.P.; TEISSEDRE, P.L.; CABANIS, J.C.; KANNY, G.; MONERET-VAUTRIN, A. 1995. Les amines biogènes du vin. Métabolisme et toxicité. Bulletin OIV 767-776, p 42-67.