

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

Presencia de aminas biógenas en los alimentos.
Diseño de un laboratorio para su detección y uso en
el control de la calidad alimentaria.



Ana Isabel Díaz González

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Julio 2014



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA



Agradecimientos

En primer lugar quiero dar las gracias a mi tutora, por la dedicación y las horas empleadas en este trabajo, por las ideas compartidas y sobre todo por la confianza depositada en mí.

De igual manera agradecer a mi cotutora todas las facilidades aportadas durante este proyecto, tanto en su realización como en el terreno personal.

Agradecer al Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA) permitirme realizar este proyecto en el centro, así como a todo el personal que de algún modo ha ayudado al desarrollo del mismo.

Mención especial se merece mi familia, por su apoyo incondicional a pesar de mis quebraderos de cabeza, por todo el ánimo y por sacrificar su tiempo para que yo pudiera aprovechar el mío.

A todos vosotros, muchas gracias.

Índice

INTRODUCCIÓN	2
1.1- ¿Qué son las aminos biógenas? Clasificación, síntesis y degradación:	2
1.2- Papel fisiológico	4
1.3- Aminos biógenas en los alimentos:.....	4
1.4- Importancia toxicológica.....	5
1.5- Niveles permitidos	6
1.6- Factores que favorecen la síntesis de AB en alimentos:	7
1.6.1- Microorganismos con actividades aminoácido descarboxilasa:	8
1.6.2- Disponibilidad de sustrato:.....	8
1.6.3- Condiciones ambientales:.....	8
1.7- Métodos de análisis para aminos biógenas:.....	9
OBJETIVO.....	12
2.1- Diseño de un laboratorio de detección de AB y microorganismos productores.	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1- Metodología	13
3.1.1- PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	13
3.1.2- Cromatografía de ultra alta presión (UHPLC)	14
3.2- Medios materiales	16
PRESUPUESTO	17
Ayudas y subvenciones:	17
DISCUSIÓN	19
BIBLIOGRAFIA.....	20
ANEXOS I	24
Tablas y contenidos	24
ANEXOS II	26
Descripcion de las Muestras	26
Resultados de las pruebas.....	26
• Análisis por qPCR:	26
• Análisis por UHPLC:	27

ABSTRACT

Biogenic amines (BA) are defined as low molecular weight organic bases with biological activity. In certain foods, these compounds are mainly produced by the microbial decarboxylation of certain amino acids and are degraded or excreted as part of the normal metabolism of plants, animals and humans. They have important physiological functions as regulation of body temperature, brain activity, the immune response, cell growth and differentiation etc. The most important BA are histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. Of these, histamine has the highest biological activity. BA are present in a wide range of foods and specially they can reach high concentrations in some type of cheeses. After intake, in healthy persons, rapid detoxification by mono- or di-amine oxidases occurs in enterocytes. However, when high concentrations of AB are consumed or when people have reduced detoxification capacity, can cause poisoning toxicological processes such as nausea, headaches, increased cardiac output, migraine, tachycardia. Although there is not a legislation regarding BA content in fermented products, it is generally assumed that the BA content in food should be under regulation. For this reason, the design of a laboratory that allows the rapid detection and quantification of BA and their produced microorganisms is necessary. To reach this objective, molecular methods based on quantitative real time PCR and Ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) are proposed as tools for BA detection in food.

RESUMEN

Las aminas biógenas (AB) se definen como bases nitrogenadas de bajo peso molecular que poseen actividad biológica. En determinados alimentos, estos compuestos se originan principalmente por la descarboxilación de algunos aminoácidos debido a la actividad descarboxilasa de ciertos microorganismos y se degradan o excretan formando parte normal del metabolismo de plantas, animales y humanos. Poseen importantes funciones fisiológicas como la regulación de la temperatura corporal, la actividad cerebral, la respuesta inmune o el crecimiento y la diferenciación celular. Las AB más importantes son la histamina, la tiramina, la putrescina y cadaverina. De éstas, la histamina posee la mayor actividad biológica. Están presentes en un amplio rango de alimentos, pudiendo alcanzar altas concentraciones, especialmente en ciertos tipos de quesos. Tras la ingesta, en las personas sanas se produce una detoxificación rápida a través de las monoamino oxidasas y las diamino oxidasas en los enterocitos. Sin embargo, cuando concentraciones altas de AB son consumidas o cuando las personas tienen reducida su capacidad de detoxificación, puede provocar intoxicaciones que desencadenen procesos toxicológicos como náuseas, dolores de cabeza, taquicardia, etc. Aunque todavía no existe una legislación que regule el contenido de AB en alimentos fermentados, se recomienda reducir su presencia en los mismos. Por esta razón, el diseño de un laboratorio que permita la rápida detección y cuantificación tanto de AB como de sus microorganismos productores es necesario. Para alcanzar este objetivo, se proponen como herramientas para la detección de AB en alimentos, la PCR cuantitativa a tiempo real y la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC).

INTRODUCCIÓN

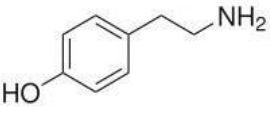
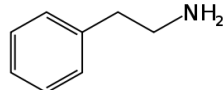
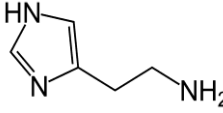
1.1- ¿QUÉ SON LAS AMINAS BIÓGENAS? CLASIFICACIÓN, SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN:


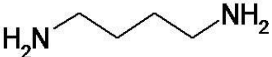
Las aminas biógenas (AB) son compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular que poseen actividad biológica. Son sintetizadas en las células vivas y son necesarias para el crecimiento y funcionamiento celular óptimo.

Atendiendo a su estructura química, pueden agruparse en aminas alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aminas aromáticas (tiramina, feniletilamina) o aminas heterocíclicas (histamina, triptamina) (Silla Santos, 1996). Atendiendo al número de grupos amino se clasifican en monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina y cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina y agmatina).

Se originan por la descarboxilación de un aminoácido precursor, aunque algunas utilizan rutas de síntesis más complejas que además implican reacciones de condensación. Cada reacción de descarboxilación es catalizada por su enzima específico (Tabla 1 y Tabla 2).

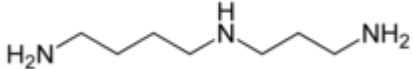
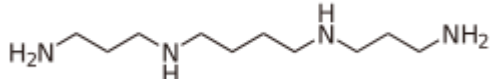
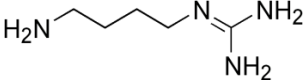
Tabla 1. Estructura química de monoaminas y diaminas. Enzimas implicadas en el proceso de síntesis.

Sustrato inicial	Enzima descarboxilasa	Amina biógena
TIROSINA	Tirosina descarboxilasa	Tiramina 
FENILALANINA	Fenilalanina descarboxilasa	Feniletilamina 
HISTIDINA	Histidina descarboxilasa	Histamina 

LISINA	Lisina descarboxilasa	Cadaverina 
ORNITINA	Ornitina descarboxilasa	Putrescina 

La putrescina se sintetiza por dos rutas alternativas; a partir de ornitina mediante descarboxilación o a partir de arginina, en dos reacciones sucesivas de descarboxilación y desaminación. Espermidina y espermina se sintetizan sucesivamente a partir de putrescina (Pegg, 1988).

Tabla 2. Estructura química de poliaminas. Enzimas implicadas en el proceso de síntesis.

Sustrato inicial	Enzima implicada	Amina biógena
PUTRESCINA	Espermidina sintasa	Espermidina 
ESPERMIDINA	Espermina sintasa	Espermina 
ARGININA	Arginina descarboxilasa	Agmatina 

En cuanto a la degradación de las AB, éstas se oxidan por la acción de dos sistemas enzimáticos, las monoamino oxidasas (MAO) ampliamente distribuidas e implicadas en la oxidación de muchos neurotransmisores monoaminérgicos y las diamino oxidasas (DAO), implicadas en la oxidación de diaminas. Finalmente la poliamino oxidasa (PAO) es la responsable de la oxidación de poliaminas previamente acetiladas.

1.2- PAPEL FISIOLÓGICO

En eucariotas, el papel de las AB es diverso, estando implicadas en múltiples procesos. La tiramina, feniletilamina y la agmatina regulan la actividad cerebral actuando como neurotransmisores, mientras que la histamina actúa como mediador intercelular, desencadenando la respuesta inflamatoria (Tabor CW y Tabor H., 1985).

La putrescina, espermina y espermidina, están implicadas en procesos de crecimiento, diferenciación y división celular, tanto fisiológicos como patológicos, actuando como reguladores del comienzo del ciclo celular y de la síntesis de RNA y proteínas. En este sentido, no es de extrañar que la ornitina descarboxilasa, que cataliza la reacción limitante en la biosíntesis de estas sustancias, sea uno de los enzimas sometidos a un control más estricto en las células eucariotas (Coffino y cols. 2001).

En las células procariotas, se desconoce su función fisiológica. En este caso son las propias reacciones de descarboxilación y no las AB producidas, las que tienen un papel fisiológico, o bien como uno de los mecanismos de resistencia utilizado por las bacterias para mantener el pH intracelular en ambientes ácidos, o para obtener energía (Abe y cols., 1996, Konings y cols., 1995; Koning y cols., 1997).

1.3- AMINAS BIÓGENAS EN LOS ALIMENTOS:

Las aminas se forman como productos de los procesos metabólicos celulares normales de los seres vivos, por ello su presencia en alimentos como frutas, verduras, carnes y pescados es de carácter endógeno apareciendo en bajas concentraciones. Sin embargo, como resultado de las actividades enzimáticas de algunos microorganismos, se producen AB exógenas, que aumentan las concentraciones iniciales y que pueden tener efectos negativos.

En carne y principalmente en pescados, su formación se relaciona con el deterioro de origen microbiano y, por tanto, se convierte en un indicador de la frescura del alimento.

En los alimentos fermentados, la formación de AB puede asociarse a la presencia de microorganismos productores como integrantes de la microbiota natural del producto, de un cultivo iniciador, o de la microbiota secundaria. Por ello, es muy importante seleccionar microorganismos no productores de AB para los cultivos iniciadores.

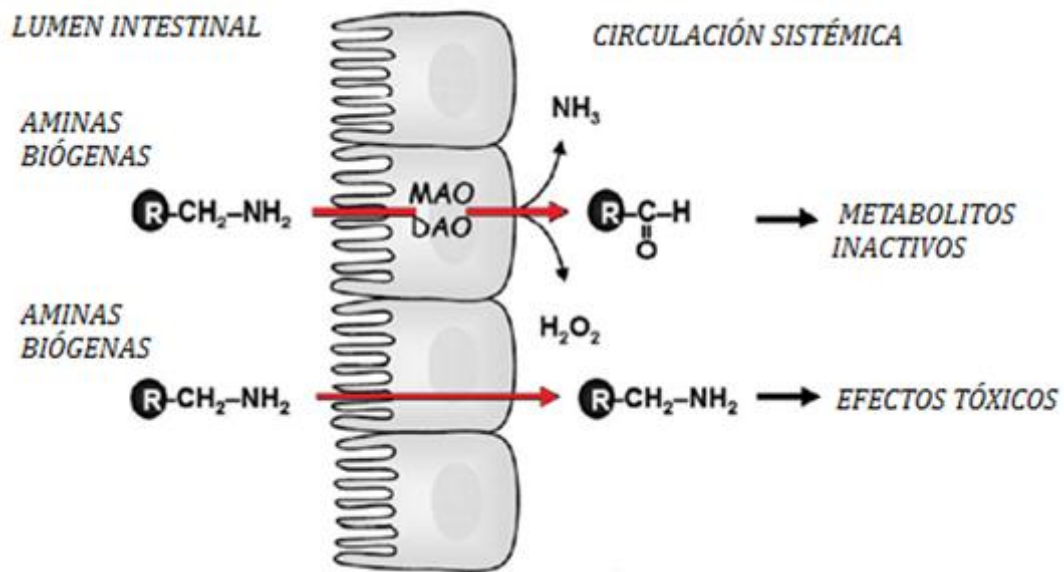


Figura 1. Proceso de detoxificación de AB por amino oxidasas MAO y DAO.

Es importante señalar que los sistemas MAO y DAO, que oxidan a las monoaminas y diaminas generadas de forma natural en las células, juegan un importante papel en la eliminación de las AB de origen exógeno, constituyendo un importante sistema detoxificador. Ahora bien, el exceso de AB ingeridas, o el malfuncionamiento de los enzimas detoxificadores pueden producir el acúmulo de estas sustancias en el organismo. Esta disfuncionalidad puede deberse a problemas genéticos o bien a la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos de carácter antidepresivo, los inhibidores de las monoaminas oxidasas (IMAO).

1.4- IMPORTANCIA TOXICOLÓGICA

Debido a la importancia de las AB en la fisiología celular; la biosíntesis, el catabolismo la absorción y la secreción de estos compuestos están estrictamente reguladas en las células y los tejidos. La ingesta de alimentos con altas concentraciones de AB o el malfuncionamiento de los sistemas detoxificadores pueden alterar este equilibrio, provocando problemas toxicológicos.

De forma general las manifestaciones clínicas que acompañan a las intoxicaciones por estas sustancias son:

- Alteraciones gastrointestinales: náuseas, vómitos, diarrea, dolores abdominales.
- Alteraciones hemodinámicas: hipotensión, hipertensión.
- Alteraciones cutáneas: comezón, urticaria, edema, inflamaciones.

- Alteraciones neurológicas: cefalea, palpitations, cosquilleo, enrojecimiento, estando relacionadas con el establecimiento de las migrañas (migrañas alimenticias).

Las intoxicaciones agudas más frecuentes son las causadas por histamina y por tiramina. La intoxicación por histamina es la más frecuente y se conoce como “intoxicación histamínica” o “intoxicación escombroida” debido a su relación con el consumo de pescados de esta familia como el atún, el bonito o la caballa. No obstante, puede aparecer también tras la ingesta de otros tipos de pescados y de alimentos que no están frescos. Los síntomas por intoxicación escombroida son similares, en parte, a una reacción alérgica con urticaria, edemas e inflamación localizada. Además la intoxicación cursa con náuseas, vómitos, diarrea, hipotensión, palpitations, enrojecimiento y dolor de cabeza (Shalaby., 1996).

La tiramina produce hipertensión, migraña, náuseas, vómitos, taquicardia y aumento en la glucemia. Los síntomas aparecen en un intervalo de pocos minutos a pocas horas tras la ingesta del alimento. La intoxicación por tiramina se conoce como “la reacción del queso”, ya que la primera asociación de la tiramina presente en alimentos con la hipertensión, fue descrita tras la ingesta de queso (Blackwell, 1963).

Aparte de las intoxicaciones agudas mencionadas, es importante recordar que la concentración intracelular de poliaminas y la actividad de los enzimas de sus rutas de síntesis, están estrechamente vinculados a la proliferación celular y a la transformación neoplásica, por lo que actualmente se recomiendan dietas bajas en putrescina en pacientes con poliposis adenomatosa intestinal familiar (Ignatenko y cols., 2006).

Además del efecto directo de las AB, éstas pueden reaccionar con nitritos y generar compuestos más tóxicos con efectos carcinogénicos, mutagénicos o teratogénicos, como las n-nitrosaminas (Zandeisakhani y cols., 2005).

1.5- NIVELES PERMITIDOS

Aunque no hay duda de los riesgos toxicológicos asociados a la ingesta de AB, no existe aún una legislación específica que establezca los niveles máximos de concentración permitidos en los alimentos, con el fin de asegurar la salud de los consumidores. Sólo existe una legislación específica para la histamina, principalmente en pescados. Además, se aprecian ciertas discrepancias en los niveles establecidos por diferentes organismos.

La legislación europea (Directiva 91/439/CEE) establece un límite en los valores de histamina de 100 mg/kg para pescado crudo y 200 mg/kg para pescado salado, mientras que la

agencia de Food and Drug Administration (FDA, Estados Unidos) establece el límite máximo de histamina en 50 mg/kg y considera que niveles superiores a 500 mg/kg son dañinos para la salud, indicando que concentraciones superiores a 1 g/kg pueden resultar mortales para personas sensibles como los casos descritos por Talor y cols., 1983; Rauscher-Gaberning y cols., 2009.

En productos cárnicos, el Instituto Holandés de Investigaciones Lácteas (The Netherlands Institute of Dairy Research) recomienda un máximo de histamina de 200 mg/Kg.

En bebidas alcohólicas, no se han establecido todavía unos límites legales para la concentración de histamina, salvo algunos países, como Eslovaquia donde se admite un máximo tolerable de 20 mg/kg en cerveza (Kantaria y cols., 2011), la Republica de Chequia que estable un límite de 200 mg/kg en vino (Kantaria y cols., 2011), o Suiza, donde se ha establecido un límite de 2 mg/l de histamina, aunque solamente para productos importados (Ladero y cols., 2010).

En lo que se refiere a otras AB, sólo en Eslovaquia se ha puesto límite a la presencia de tiramina, donde no se admite en una concentración superior a 200mg/Kg en el queso. (Kantaria y cols, 2011).

En la Tabla 3 del [Anexo I](#) se muestra el contenido de algunas AB en varios alimentos, pudiendo observarse que en algunos casos llegan a alcanzar concentraciones muy elevadas.

Parece razonable, en base a los conocimientos actuales, establecer unos límites preventivos para la concentración del resto de las AB, sobre lo que todavía hay un vacío legal. Sin embargo, es difícil establecer las concentraciones de AB que pueden resultar nocivas, ya que sus efectos tóxicos dependen del tipo de amina y de la eficiencia de los sistemas detoxificadores de cada individuo. Además la absorción y la toxicidad de una AB puede verse alterada por la presencia de otra amina, produciéndose sinergias que dificulten aun más establecer un límite. Por ello son necesarios más estudios clínicos sobre el peligro para la salud que supone la ingesta de AB.

1.6- FACTORES QUE FAVORECEN LA SÍNTESIS DE AB EN ALIMENTOS:

La acumulación de AB en alimentos requiere la presencia simultánea de tres factores (Karovičova y cols., 2003):

- ✚ Presencia de microorganismos con actividades aminoácido descarboxilasa.

- ✚ Disponibilidad de sustrato.
- ✚ Condiciones ambientales (temperatura, pH, salinidad, existencia de cofactores o de enzimas catabólicas) adecuadas.

1.6.1- Microorganismos con actividades aminoácido descarboxilasa:

Un factor esencial para la formación de AB en los alimentos es la presencia de microorganismos con la capacidad de descarboxilar aminoácidos. Esta característica ha sido descrita en diferentes géneros, especies y cepas bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativas.

En Gram negativos, bacterias del grupo *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Morganella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, han sido descritos como productores de cadaverina, putrescina, histamina y en menor medida tiramina (Shalaby, 1996), considerándose los principales responsables de la formación de AB en pescados. En Gram positivas, destacan las bacterias ácido lácticas (BAL) de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*, responsables de producir principalmente histamina, tiramina y putrescina en alimentos y bebidas fermentadas como queso, embutidos, vino, y sidra.

En la Tabla 4 del [Anexo I](#), se muestran los principales microorganismos productores de AB en alimentos.

1.6.2- Disponibilidad de sustrato:

Para que se produzca la síntesis de AB es necesaria la presencia de aminoácidos que actúe como sustrato inicial.

Durante el proceso de fermentación, la proteólisis desencadena la liberación de los aminoácidos, aumentando la concentración de sustratos. Por este motivo se detecta una mayor concentración de AB en productos con largos periodos de maduración comparados con productos frescos (Linares y cols., 2011).

1.6.3- Condiciones ambientales:

Muchos autores señalan la relación entre las condiciones de elaboración de los alimentos y la génesis de AB, recalcando la importancia del control del proceso de fabricación para disminuir en lo posible la concentración de AB en el producto final. (Silla Santos, 1996). Entre los factores a tener en cuenta están:

-El **pH** ácido. La mayoría de las enzimas descarboxilasas poseen un pH óptimo en torno a pH 5.0 (Moreno-Arribas y cols., 2001). Además en algunos casos el pH ácido activa la

transcripción de los genes que codifican a estas enzimas. En el caso de alimentos fermentados el proceso de fermentación implica un descenso del pH que proporciona las condiciones óptimas para la síntesis y actividad aminoácido descarboxilasa.

- **La concentración de sales** y carbohidratos. Su aumento afecta a la **actividad del agua**, disminuyendo el crecimiento de los microorganismos productores de AB y por tanto la concentración final de las mismas (Ruiz Capillas y cols., 2004).

-**La temperatura de fermentación**. Su incremento favorece el crecimiento de los microorganismos productores y con ello la producción de AB. Una reducción de la concentración final de AB en quesos y vinos debido a la disminución de la temperatura, ha sido descrita por Ferrer y cols., 2007. Parece por tanto, un parámetro muy útil para prevenir la acumulación final de estos compuestos.

-**La concentración de etanol**. Una relación inversa entre la concentración de etanol y la capacidad de los microorganismos para sintetizar AB, ha sido observada por algunos autores (Arena y cols., 2008).

-La presencia de determinados **cofactores** puede también afectar también a la síntesis de AB ya que gran parte de las enzimas descarboxilasas estudiadas hasta el momento son piridoxal-5'-fosfato (PLP) dependientes.

Si bien, existe un amplio debate entre diversos autores sobre la influencia del **tiempo y temperatura de almacenamiento** de los alimentos y la acumulación de AB en los mismos. De modo general se puede afirmar que un aumento del tiempo y la temperatura de almacenamiento, aumenta la concentración de AB en el producto final (Linares y cols., 2012).

No obstante, hay que tener en cuenta que la modificación de alguna de estas condiciones sin afectar a las características organolépticas del producto final no siempre es fácil.

1.7- MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA AMINAS BIÓGENAS:

Para el análisis de AB se pueden seguir dos estrategias la detección y cuantificación de los compuestos, o de los microorganismos productores.

La cromatografía es la técnica más utilizada para la detección de las AB y a medida que estas técnicas se han ido perfeccionando, han ido mejorando los métodos para identificar y cuantificar a estos compuestos. Al principio se empleaba la cromatografía en capa fina (Thin

layer chromatography o TLC) una técnica rápida y sencilla pero que no permite la cuantificación.

Con la finalidad de mejorar la sensibilidad y permitir la cuantificación se desarrollaron una serie de métodos que se basan en la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o ultra alta presión (UHPLC). Estas técnicas se fueron optimizando con el empleo de pre-columnas y agentes de derivatización.

Los métodos tradicionales de HPLC aunque permiten obtener buenos resultados en cuanto a la detección y cuantificación de las AB conllevan tiempos de análisis, entre 20 y 60 minutos por muestra. La cromatografía líquida de ultra alta presión, que utiliza presiones más altas ha permitido reducir notablemente el tiempo de análisis aumentando la resolución y la sensibilidad.

Se han desarrollado ensayos enzimáticos y biosensores que utilizan enzimas amino oxidasas que oxidan AB con O_2 generando un aldehído y H_2O_2 . Estos productos, mediante reacciones acopladas, pueden dar lugar a la aparición de sustancias coloreadas, fácilmente detectables, cuya concentración ha de depender de la concentración inicial de aminas en la muestra. En los biosensores, el cambio en la relación de concentración O_2/H_2O_2 se mide como una señal eléctrica cuya intensidad está relacionada, así mismo, con la concentración inicial de sustrato (Lange y cols., 2002; Kivirand y cols., 2011).

La cromatografía líquida de alta presión es más sensible, tanto cuantitativa como cualitativamente, que los métodos basados en la utilización de amino oxidasas, ya que éstos enzimas suelen actuar sobre más de un sustrato, por lo que ha sido la técnica elegida en este trabajo.

En lo que se refiere a la detección de los microorganismos productores, en un principio, se utilizaron técnicas microbiológicas basadas en el uso de medios de cultivo diferenciales. Hoy en día, se emplean técnicas moleculares independientes de cultivo, como la PCR, basada en la amplificación específica de un fragmento de DNA, que requiere el diseño de cebadores específicos para la secuencia del gen que se quiere amplificar. En el caso de la detección de los productores de AB, se ha utilizado como diana el gen que codifica al enzima descarboxilasa. La PCR, permite la detección específica de los microorganismos productores de forma sencilla y rápida, sin embargo no es cuantitativa. En este contexto destaca la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), que sí permite la cuantificación, ya que durante los primeros ciclos de la reacción se establece una relación lineal entre la fluorescencia emitida por el DNA

que se está amplificando y la concentración inicial del DNA de partida (Martinez y cols., 2011). Ésta técnica ha sido utilizada con éxito para la detección y cuantificación de microorganismos productores de AB en alimentos fermentados (Martínez y cols., 2011).

Además el análisis de muestras por qPCR a lo largo del proceso de fabricación, permite la detección de los puntos más sensibles de contaminación por parte de microorganismos productores de AB, y así establecer medidas de control adecuadas para reducir la concentración de AB en el producto final.

OBJETIVO

2.1- DISEÑO DE UN LABORATORIO DE DETECCIÓN DE AB Y MICROORGANISMOS PRODUCTORES.

El origen microbiano de las AB, y las consecuentes implicaciones sanitarias y tecnológicas, enmarcan estos compuestos de los alimentos en el ámbito de la Seguridad y Calidad alimentarias (Bover-Cid y cols., 2004).

Este TFG propone la ampliación de un laboratorio de análisis de alimentos para incluir en su carta de servicios la detección y cuantificación de AB en productos fermentados y la detección de los microorganismos productores de las mismas. Aunque en la bibliografía se describen diversas técnicas para la detección de AB, proponemos la utilización de cromatografía líquida, concretamente cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC), pues permite la detección y cuantificación de estos compuestos en tan solo 10 minutos, lo que hace posible analizar un gran número de muestras en una jornada de trabajo.

Para la detección de los microorganismos productores se propone emplear qPCR puesto que es un método cuantitativo, sencillo y rápido de gran sensibilidad y especificidad.

Actualmente no hay una ley que regule la presencia de AB en alimentos fermentados, aunque hay suficientes datos que avalan la necesidad de establecer unos límites con el fin de asegurar la salud de los consumidores. A pesar de que todavía son necesarios más estudios clínicos sobre los efectos del consumo elevado de estas sustancias, las autoridades sanitarias estudian la posibilidad de adoptar medidas legales que limiten la presencia de las AB en alimentos fermentados.

La ampliación del laboratorio tiene como objetivo ofrecer las herramientas necesarias que permitan:

- Cuantificar las AB en los alimentos.
- Detectar y cuantificar la presencia de microorganismos productores de AB, en la materia prima, en el cultivo iniciador o a lo largo del proceso de elaboración del alimento, con el fin de reducir la presencia de AB en el producto final.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con la intención de aportar una mejor descripción de los métodos y materiales necesarios para el objetivo propuesto, se ha llevado a cabo el análisis de distintas muestras de productos fermentados en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA). Las muestras analizadas y los resultados obtenidos se describen en el [ANEXO II](#) mientras que los materiales y los protocolos empleados se detallan a continuación:

3.1- METODOLOGÍA

Se utilizaron UHPLC y qPCR para la detección tanto de las AB como de los microorganismos productores. Para UHPLC se siguió el protocolo descrito por Redruello y cols., (2013), mientras que para la qPCR se emplearon los cebadores y las condiciones descritas por Ladero y cols., (2010) para la detección de los microorganismos productores de tiramina y aquellas descritas por Fernández y cols., (2006) para los productores de histamina.

3.1.1- PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La detección y cuantificación de los microorganismos productores de AB implica un homogeneizado inicial de la muestra, la lisis de las bacterias y finalmente la obtención del DNA que se utilizará como templado para la reacción de qPCR.

EXTRACCION DE DNA A PARTIR DE MUESTRAS DE ALIMENTOS:

Se partió de 5 g. de muestra que fueron homogeneizados en 40 ml de Citrato sódico 2% (p/v) durante 3 minutos mediante un Stomacher Lab Blender-400 (Seward Medical, Londres, Reino Unido). Se añadieron 500 µl de pronasa (100 mg/ml) y 100 µl de β-mercaptoetanol. Este homogeneizado, se incubó a 37°C durante 3 horas.

A continuación, se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 2 ml de solución A (20% (p/v) sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, 50 mM NaCl) y se realizaron dos lavados sucesivos en esta solución.

El precipitado obtenido se resuspendió en 500 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM; pH 8). Las células se lisaron utilizando perlas de vidrio (diámetro de 150 a 200 µm; Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia) empleando un equipo Bio101 Fast Prep FP120. Se realizaron 3 tratamientos de 30 segundos a 6000 rpm y con intervalos de 1 minuto en hielo entre cada tratamiento.

El DNA se purificó a partir de la fase superior realizando tres extracciones sucesivas con 300 µl de una mezcla fenol-cloroformo (1:1) y una última extracción con cloroformo. Finalmente el DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol 96% y 50 µl de NaAC 3M. El DNA obtenido se resuspendió en 150 µl de TE.

CONDICIONES DE LA Q-PCR:

La temperatura de anillamiento utilizada en la qPCR dependió de los cebadores empleados, distintos para cada amina, se siguió el método descrito por Fernández y cols., (2006) para histamina y Ladero y cols., (2010) para tiramina.

En ambos casos la qPCR se realizó usando el kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). El volumen de reacción de 20 µl incluyó 1 µl del DNA de la muestra, 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix y 900 nM de cada cebador. Se usaron los primers específicos para detectar los genes responsables de codificar a la histidina descarboxilasa (*hdc*) y la tiramina descarboxilasa respectivamente (*tdc*). Como control positivo se utilizó el DNA de la cepa de *Lb. buchneri* B301 para el gen *hdc* y el DNA de la cepa *E. faecalis* V583 para el gen *tdc*. La amplificación y detección se realizó usando un ABI Prisma rápida 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 min a 50°C, seguido de 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, y 1 min a 58°C. Como paso final se incluyó un paso de disociación con el fin de determinar si se habían producido amplificaciones inespecíficas.

3.1.2- Cromatografía de ultra alta presión (UHPLC)

La cuantificación de las AB mediante cromatografía líquida requirió en primer lugar la extracción de estos compuestos a partir del alimento, la derivatización para poder detectar los compuestos de interés y finalmente la separación y cuantificación de los mismos.

EXTRACCIÓN DE AB:

La extracción se realizó a partir de 1 g. de alimento que se resuspendió en 10ml de HCl/TDPA (0.1 M HCl-0,2% ácido 3,3'-thiodipropionico, TDPA) y se homogenizó durante 2 minutos a 20000 rpm empleando un Ultra-Turrax (OMNI Internacional, Waterbury USA). Al homogeneizado obtenido se añadió una concentración conocida de un patrón interno (250 nmol/ml de ácido L-2-aminoadipico) y se incubó en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos.

Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 5000 g. Se eliminó la grasa de la fase superior y con el fin de eliminar las proteínas de mayor tamaño se desproteinizaron las muestras.

Para la desproteización se siguieron dos protocolos distintos, con el fin de determinar cuál podría ser el más útil:

A) Filtración, se utilizaron filtros Amicon con un tamaño de poro de 3K (0.5 ml 3K Millipore). Antes de desproteizar utilizando estas membranas fue necesario añadir un paso más. Los sobrenadantes obtenidos del paso anterior se filtraron utilizando un filtro de 0,45 μm con el fin de eliminar toda la grasa. 500 μl de este eluido se desproteizaron mediante centrifugación a 3500 g durante 1 hora.

B) Precipitación con ácido tricloroacético (TCA) 12% (v/v). Se añadieron 100 μl de TCA 60% (v/v) a 500 μl de muestra. Se agitó durante una hora a temperatura ambiente, se centrifugó durante 30 minutos a 11.000 g y se incubaron 10 minutos en hielo.

En el caso de muestras líquidas se parte de 1 ml de muestra que se filtra a través de una membrana de 0,45 μm . El diluido se desproteiza como se indicó anteriormente.

DERIVATIZACIÓN DE LA MUESTRA:

La derivatización es la reacción del grupo amino primario del aminoácido o de la amina con el agente derivatizante para formar un derivado coloreado o fluorescente que puede ser fácilmente detectado. En este caso se utilizó como compuesto derivatizante el dietiletoximetilen malonato (DEEMM). El empleo de DEEMM como derivatizante tiene muchas ventajas, por su acoplamiento a grupos amino tanto primarios como secundarios, su unión estable, la sencillez de su uso y la ausencia de subproductos después de la reacción.

La reacción de derivatización se realizó siguiendo las condiciones descritas por Gómez-Alonso y col., con algunas modificaciones. Se mezclaron 100 μl de la muestra obtenida en el apartado anterior, con 175 μl de tampón borato de 1M (pH 9,0), 75 μl de metanol, 2 ml de HCl/TDPA y 3 μl de DEEMM. La mezcla resultante se incubó en un baño de ultrasonidos a 30°C durante 45 minutos y después a 70°C durante 2 horas, con el fin de eliminar el exceso de DEEMM y de productos secundarios. Una vez finalizada la reacción las muestras se guardan a temperatura ambiente para su análisis posterior.

SEPARACIÓN DE LAS MUESTRAS POR CROMATOGRAFÍA:

La última parte del proceso consiste en la separación, detección y cuantificación de los componentes de las muestras, las cuales, antes de ser inyectadas en el UHPLC se deben filtrar utilizando una membrana de 0,22 μm (Pall). Se empleó el equipo de cromatografía H-Class Acquity UPLCTM System (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un detector de fotodiodo. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna Waters Acquity UPLCTM BEH C18 1,7 μm (2,1 mm x 200 mm) a 35°C.

La fase móvil consistió en 25 mM de tampón acetato a un pH 6,7 y azida de sodio 0.02% (eluyente A), metanol (eluyente B) y acetonitrilo (eluyente C). Las muestras se aplicaron a la columna en un volumen de 1 μl y eluyó a un caudal de 0.45 ml/min de acuerdo con el gradiente mostrado en la Tabla 5. La columna volvió a sus condiciones iniciales a los 0,5 minutos y fue equilibrada durante 3 minutos antes de la siguiente inyección.

Tabla 5. Gradiente de elución ternaria para la determinación de AB por UHPLC.
Fuente: Redruello y col., (2013)

Time (min)	0.00	1.20	1.90	2.00	3.02	4.03	4.32	5.70	6.50	10.00	10.50	11.00	14.50
Eluent A (%)	90.0	92.0	92.0	90.0	90.0	83.0	83.0	71.0	78.0	40.0	18.0	-	-
Eluent B (%)	2.0	1.6	1.6	2.0	2.0	3.4	3.4	5.8	-	-	-	20.0	20.0
Eluent C (%)	8.0	6.4	6.4	8.0	8.0	13.6	13.6	23.2	22.0	60.0	82.0	80.0	80.0

3.2- MEDIOS MATERIALES

Para el análisis por UHPLC se utilizó un equipo de cromatografía H-Class Acquity UPLCTM System (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un detector de fotodiodo, así como los reactivos a los que se hizo referencia en el apartado de metodología.

Para la detección de los microorganismos productores mediante qPCR se utilizó un termociclador ABI Prism Fast 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) así como los reactivos indicados en el protocolo. Finalmente se dispuso de todo el material básico de laboratorio: micropipetas, tubos Eppendorf, puntas estériles, agua estéril, microcentrífuga, tubos de ensayo, pipetas, gradillas, balanza, cronómetro, espátulas, etc.

PRESUPUESTO

La ampliación de un laboratorio y el desarrollo de nuevas técnicas analíticas, implica unos gastos económicos tanto en material como en personal técnico adecuado. A continuación se detallan los costes del equipo específico para ambos métodos, de los empleados y de los análisis, incluyendo ya en ese precio el coste de los reactivos:

- Equipo de UHPLC H-Class Acquity UPLCTM System: **68.000 euros**.
- Columna Waters Acquity UPLCTM BEH C18 1,7 µm (2,1 mm x 200 mm): **700 euros**.
Válida para 7000 inyecciones.
- Equipo de qPCR ABI Prism Fast 7500 Sequence Detection System: **8.000 euros**
- Contrato de garantía para los equipos: **3.000 euros anuales**. Incluye revisiones, averías y cambio de piezas.
- Contrato de un titulado superior en Biología: **28.000 euros/año**. Incluye las 14 pagas, en una jornada de trabajo laboral completa.
- Precio de análisis por UHPLC: **80.20 euros**.
- Precio de análisis por qPCR: **2.30 euros**.

Al precio final del análisis de qPCR hay que añadir el coste de extracción del ADN que será variable dependiendo de la muestra a analizar (carne, quesos, bebidas) y del tiempo empleado en la extracción.

Este presupuesto únicamente se ajusta al coste que supone la utilización de estas técnicas en un laboratorio ya existente y por tanto no incluye gastos generales como luz, alquiler del local, agua, calefacción, material básico de laboratorio, seguridad social, etc.

Ayudas y subvenciones:

Existen distintas entidades que a nivel europeo, nacional, autonómico o regional nos facilitan ayudas, préstamos y subvenciones para los primeros pasos de nuestra empresa.

La mayoría de estas ayudas se financian con el Fondo Europeo de Inversiones (FEI) y el Banco Europeo de Inversiones (BEI) y cuentan con el apoyo de la Unión Europea, al amparo del

Instrumento con Riesgo Compartido para Pymes y Empresas de mediana capitalización con orientación a la innovación e investigación (RSI).

A nivel regional el Principado de Asturias a través de la Consejería de Economía y Empleo y la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos, publican en el BOPA subvenciones y ayudas a proyectos de investigación y pequeñas empresas de nueva creación.

También la Fundación para el fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), a través del Programa Jovellanos, concede ayudas a empresas para la incorporación de titulados universitarios a proyectos de I+D+i.

DISCUSIÓN

Las AB se encuentran en una amplia gama de alimentos, tanto de origen animal como de origen vegetal. Estos compuestos tienen importantes funciones fisiológicas en el organismo, y una ingesta elevada puede desencadenar problemas toxicológicos.

La ampliación del laboratorio propuesta por este TFG para la detección y cuantificación de AB en los alimentos no es solamente importante desde un punto de vista toxicológico sino también por su empleo como indicador de calidad, ya que algunos alimentos como el pescado, la presencia de AB se asocia a un estado de deterioro del alimento.

La cuantificación de las AB permitirá identificar aquellos productos que presenten concentraciones de AB que no cumplan la legislación. En este caso el disponer de un método de UHPLC rápido y sensible permitirá analizar un elevado número de muestras. Por su parte, la aplicación de qPCR permite detectar y cuantificar la presencia de microorganismos productores y puede ser aplicado a lo largo del proceso de fabricación. El control de las AB debe abarcar tanto las materias primas como cada uno de los puntos del procesado y del producto final. En algunos alimentos, la formación de AB puede ayudar a valorar los efectos y la eficacia de las normas de higiene aplicadas en la elaboración y la manipulación de los alimentos, así como a determinar las fuentes de contaminación más probables.

La aplicación combinada de ambas técnicas, permitirá ofrecer al consumidor unos productos más seguros.

Asturias tiene sin duda una gran seña de identidad gastronómica. Son múltiples las empresas de esta región que se dedican al sector de la alimentación, tanto en carnes como en quesos, sidra y vino, y cuyos productos pueden ser objeto de estos análisis. Por ello, el desarrollo de un laboratorio de este tipo, tiene gran importancia en la zona, ya que tanto las pequeñas como las grandes empresas podrían beneficiarias de sus servicios.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, K., Hayashi, H., and Maloney, P.C. (1996). *Exchange of aspartate and alanine. Mechanism for development of a proton motive force in bacteria*. J. Biol. Chem, Vol.271, pp.3079-3084.
- Arena, M.E., Landete, J.M., Manca de Nadra, M.C., Pardo, I. and Ferrer, S. (2008). *Factors affecting the production of putrescine from agmatine by Lactobacillus hilgardii XB isolated from wine*. J. Appl. Microbiol. Vol. 105(1), pp. 158-165.
- Blackwell, B. (1963). *Hypertensive crisis due to monoamine-oxidase inhibitors*. Lancet. Vol. 2. Pp. 849-850
- Bover-Cid, S. (2004). *Aminas biógenas en cárnicos fermentados: de un problema de seguridad a una cuestión de confianza*. XIV Congreso de Microbiología de los alimentos. Girona, 19-22 Septiembre.
- Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M.L, Garriga M. and Vidal-Carou M.C. (2005). *Aminas biógenas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control*. Eurocarne. Nº 141, Noviembre.
- Busto, O., Guasch, J. and Borrull, F. (1996). *Biogenic amines in wine: a review of analytical methods*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, Vol.30, Nr.2, pp.85-101.
- Coffino, P. (2001). *Regulation of cellular polyamines by antizyme*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. Vol.2 (3),pp.188-94
- De las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A. V. and Muñoz, R. (2008) *Método molecular para la detección de bacterias productoras de aminas*. Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). *Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods*. EFSA Journal, Vol.9 (10), pp.2393.
- Eliassen, K.A., Reistad, R., Risoen, U. and Ronning, H.F. (2002) *Dietary Polyamines*. Food Chemistry, Vol.78, pp.273-280.
- Fernández, M., Del Río, B., Linares, D.M., Martín, M.C and Álvarez, M.A. (2006). *Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production*. J. Dairy Sci. Vol.89, pp.3763–3769.

- Ferrer, S., Landete, J.M., Polo, L. and Pardo, I. (2007). *Las bacterias y su repercusión sobre las aminas biógenas*. International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine. Food and Drug Administration (FDA) (1990). *Descomposition of histamines: raw, frozen tuna and malu malu, canned tuna, and related species*. Revised compliance policy guide, Availability-Federal Register Vol. 60(149), pp.39574-39756.
- Ignatenko NA, Besselsen DG, Roy UK, Stringer DE, Blohm-Mangone KA, Padilla-Torres JL, Guillen-R JM, Gerner EW. (2006). *Dietary putrescine reduces the intestinal anticarcinogenic activity of sundilac in a murine model of familial adenomatous polyposis*. Nutr Cancer Vol.56, pp.172-81.
- Karoviková, J. and Kohajdová, Z. (2005). *Biogenic amines in food*. Chemistry Paper, Vol. 59 (1), pp. 55-59.
- Kivirand, K. and Rincken, T. (2011). *Biosensors for biogenic amines: the present state of art mini-review*. Analytical Letters. Vol.44, pp.2821-2833.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S. and Poolman, B. (1995). *The generation of metabolic energy by solute transport*. Arch. Microbiology, Vol.164, pp.235-242.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., Van Veen, H.W., Poolman, B. and Driessen, A.J. (1997). *The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance*. Antonie Van Leeuwenhoek, Vol.71, pp. 117-128
- Ladero, V., Cañedo, E., Pérez, M., Martín, M.C., Fernández, M. y Miguel A. Alvarez, M.A. (2012). *Multiplex qPCR for the detection and quantification of putrescine-producing lactic acid bacteria in dairy products*. Food Control Vol.27, pp.307-313.
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández M. and Álvarez, M.A (2010). *Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines*. Current Nutrition & Food Science, Vol.6, pp.145-156.
- Ladero, V., Martínez, N., Martín, M.C., Fernández, M. and Alvarez, M.A. (2010). *Q-PCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products*. Food Research International Vol.43, pp.289–295.
- Landete J.M, De las Rivas, B., Marcobal, A. and Muñoz, R. (2007). *Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods*. International Journal of Food Microbiology, Vol. 117, pp.258–269.
- Lange, J. and Wittmann, C. (2002). *Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples*. Anal Bioanal Chem. Vol.372, pp.276-283.
- Linares, D.M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M.C. and Álvarez, M.A. (2012). *Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products*. Microbiology Vol.3 Art.180.

- Linares, D.M., Martín, M.C., Ladero, V., Álvarez, M.A and Fernández, M. (2011). *Biogenic Amines in Dairy Products*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol.51, pp.691-703.
- Marcobal, A., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M.V., and Muñoz R. (2006). *A multifactorial desing for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria Lactobacillus Brevis CECT 4669 and Enterocococcus Faecium BIFI-58*. Research in Microbiology, Vol.157, pp.417-424.
- Mariné Font, A., Vidal Carou, M. C., Izquierdo Pulido, M., Veciana Nogués, M.T., and Hernández Jover, T. (1995). *Les amines biògenes dans les aliments: leur signification, leur analyse*. Ann. Fals. Exp. Chim. Toxicol., Vol.88, pp.119-140.
- Martínez, N., Martín, M.C., Herrero, A., Fernández, M., Álvarez, M.A. and Ladero, V. (2011). *Q-PCR as a powerful tool for microbial food spoulage quantification: Significance for food Quality*. Trends in Food Science & Technology Vol. 22, pp. 367-376.
- Moreno-Arribas, V and Lonvaud-Funel, A. (2001). *Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of Lactobacillus brevis IOEB 9809 isolated from wine*. FEMS Microbiol Lett. Vol. 195(1), pp.103-7.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P. and Meerdink G. (2010). *Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches*. Journal of Food Science, Vol. 75, Nr.7.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. and Delacroix-Buchet, A. (2002). *Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperatura Gradient Gel Electrophoresis*. Microbiol. Vol.68:8, pp.3691-3701.
- Önal, A. (2007). *A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods*. Food Chemistry, Vol. 103, pp. 1475-1486.
- Pattono, D., Grassi, M. A. and Civera T. (2008). *Production of biogenic amines by some Enterobacteriaceae strains isolated from dairy products*. Italy Journal Food Science, Nr. 3, Vol. 20, pp.441-417.
- Pegg, A.E. (1988). *Polyamyne metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy*. Cancer Res. Vol.48 (4), pp.759-74.
- Prester, L. (2011). *Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review*. Food Additives and Contaminants, Vol. 28, Nr. 11, pp.1547-1560
- Rauscher-Gabernig E, Grossgut R, Bauer F, Paulsen P. (2009). *Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods*. Food Control. Vol.20, pp.423-29

- Redruello, B., Ladero, B., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J. R., Martín, M. C., Fernández, M. and Álvarez M. A. (2013). *A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent*. Food Chemistry, Vol.139, pp.1029-1035.
- Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero J. (2004). *Biogenic Amines in Meat and Meat products*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol.44, pp.489-499.
- Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. (2010). *Aminas biógenas: importancia toxicológica*. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Rev Electron Biomed / Electron J Biomed Vol.3, pp.58-60.
- Shalaby, A.R. (1996). *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. Food Research International, Vol.29, Nr 7, pp.675-690.
- Silla Santos, M.H (1996). *Biogenic amines: their importance in foods*. Food Microbiology, Vol.29, pp.213-231.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernández, M., López, P., De Palencia, P.F., Corbi, A., Trip, H. and Lolkema, J.S. (2010). *Biogenic amines in fermented foods*. European Journal of Clinical Nutrition, Vol.64, pp.S95-S100.
- Tabor, C.W. y Tabor, H. (1985). *Polyamines in microorganisms*. Microbiol. Vol. 49, pp. 81-99
- Talor, S.L. (1983). *Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods*. monograph CX/PH 1983, 83-111
- Wöhrl, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K. and Jarisch, R. (2004). *Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine*. Allergy Asthma Proc Vol.25, pp.305-11.
- Zandeisakhani, R., Hernández Borges, J., Borges Miquel, T., Sánchez Sánchez, M.J and Rodríguez Delgado, M.A. (2005). *Optimización de la determinación de aminas biógenas por cromatografía líquida de alta eficacia*. Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios.

ANEXOS I

TABLAS Y CONTENIDOS

Tabla 3. Concentración de AB en varios alimentos (mg/l o mg/kg). Modificada de Ladero y cols., (2010).

Alimento	Tma	Hma	Put	Cad	β -Fen	Esp
Vegetales fermentados	91	92	549	94	5	-
Atún en conserva	-	2000	200	447	-	-
Vino tinto	18.2	19.6	99.9	1	1.4	2.6
Salchichas	397	149	334	154	34.7	18
Chorizo	282.4	17.5	60.4	20.1	1.2	-
Leche de Cabra	216.3	15.6	217.8	349.7	9.4	-
Queso azul de leche cruda	1051	1041	875.8	756.7	27.4	-
Queso curado de leche cruda	453.7	510.2	176.3	328.4	40.7	-

Tabla 4. Microorganismos productores de AB en alimentos. (Modificada a partir de Ladero y cols., 2010).

AB	Microorganismos productores
PESCADO	
Histamina	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Serratia fonticola</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Citobacter freundii</i> , <i>Clostridium sp</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Aeromonas spp.</i> , <i>Pleisomonas shigelloides</i> , <i>Photobacterium spp</i>
QUESO	
Histamina	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> .
Tiramina	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i>
Putrescina	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i>), <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> .
Cadaverina	<i>Enterobacteriaceae</i>

VINO	
Histamina	<i>Oenococcus oeni, Lactobacillus hilgardii, Pediococcus parvulus</i>
Tiramina	<i>Lactobacillus brevis, Lactobacillus hilgardii, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus plantarum, Enterococcus faecium</i>
Putrescina	<i>Lactobacillus brevis, Lactobacillus hilgardii, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus plantarum, O. Oeni, Lactobacillus zeae</i>
Cadaverina	<i>Enterobacteriaceae</i>
CARNE	
Histamina	<i>Enterobacteriaceae, Staphylococcus capitis</i>
Tiramina	<i>Staphylococcus carnosus, Staphylococcus xylosus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus sakei, Lactobacillus bavaricus, Carnobacterium divergens, Carnobacterium piscicola</i>
Putrescina	<i>Enterobacteriaceae, Morganella morganii, Serratia liquefaciens, Pseudomonas, Lactobacillus curvatus, Enterococcus faecalis</i>
Cadaverina	<i>Enterobacteriaceae</i>

ANEXOS II

DESCRIPCION DE LAS MUESTRAS

Se utilizaron cuatro muestras de queso con distinta textura, uno de pasta prensada tipo manchego, dos quesos de pasta blanda tipo azul (A y B) y un queso rallado. Los quesos habían sido elaborados con leche de vaca, salvo el tipo manchego que se trataba de un queso elaborado con mezcla de leche de vaca y oveja. Solo uno de los quesos azules (B) había sido elaborado con leche cruda, el resto de los quesos habían sido elaborados con leche pasteurizada. El periodo de maduración de todos los quesos utilizados había sido superior a tres meses.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

- **Análisis por qPCR:**

Se estudió la presencia de microorganismos productores de histamina y tiramina en las muestras descritas. Con el fin de asegurar que la cuantificación mediante qPCR es correcta se utilizaron dos concentraciones de DNA como templado por muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 6. Resultados de la qPCR en muestras de queso.

HISTAMINA		TIRAMINA	
Muestra	Ct	Muestra	Ct
Azul (A)	Ud.	Azul (A)	Ud.
Azul (A) 1:10	36,7	Azul (A) 1:10	29,0
Manchego	Ud.	Manchego	29,0
Manchego 1:10	39,0	Manchego 1:10	29,3
Rallado	Ud.	Rallado	Ud.
Rallado 1:10	Ud.	Rallado 1:10	20,6
Azul (B) 1:10	25,5	Azul (B) 1:10	24,3
Azul (B) 1:100	31,5	Azul (B) 1:100	29,5
Lb (+)	13,4	Ent. (+)	8,3
Lb (+) 1:10	17,8	Ent. (+) 1:10	9,7
Lb (+) 1:100	21,2	Ent. (+) 1:100	13,4
Negativo	Ud.	Negativo	Ud.

(A). Queso azul leche pasteurizada

(B). Queso azul leche cruda

Ud.- Under detection

El dato obtenido a partir de qPCR fue el ciclo umbral (C_T) definido como el número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia aumente de forma significativa con respecto al nivel basal de la misma, siendo este valor inversamente proporcional a la concentración inicial en el DNA templado.

El análisis de los datos de qPCR para la detección de microorganismos productores de histamina, revela que solo en la muestra B de queso azul, se encuentran productores dado que en el resto de las muestras analizadas los valores de C_T están por encima de 35. Por tanto, sólo se detectan microorganismos productores en el queso elaborado con leche cruda y no en aquellos que han sido elaborados a partir de leche pasteurizada. La influencia de la pasteurización en la reducción de AB ha sido descrita por varios autores.

A partir de las muestras analizadas, se detectaron cepas productoras de tiramina en todas las muestras, con un rango de valores de C_T entre 20 y 29 que corresponden entre 10^6 - 10^3 microorganismos productores, de acuerdo con los datos obtenidos por Ladero y cols., 2010. Es importante destacar, que los niveles más altos de productores corresponden a un queso elaborado con leche pasteurizada apuntando que en este caso podría tratarse de una contaminación consecuencia del proceso de elaboración.

- **Análisis por UHPLC:**

Se realizó un análisis por UHPLC para conocer la concentración de AB presentes en las muestras descritas. La aplicación de la cromatografía a muestras de queso requiere un proceso de desproteización para el que existen diversas alternativas como se describió en el apartado de metodología.

En base a los resultados obtenidos por la desproteización (Tabla 7), se podría utilizar cualquiera de los dos métodos que se proponen, si bien atendiendo al coste, TCA presenta un coste menor y por tanto es el método de elección, aunque estudio con un mayor número de muestras sería conveniente.

El análisis de los resultados revela que en el queso elaborado con leche cruda (B) se detectan un mayor número de aminas y estas alcanzan concentraciones más altas, siendo la tiramina la AB más abundante, puesto que alcanza los 4 g/kg de muestra. Esto pone de relieve la importancia del análisis del contenido de AB en alimentos fermentados.

En los quesos elaborados con leche pasteurizada, sólo se detecto putrescina y cadaverina en el queso azul (A).

Es interesante destacar que en el queso rallado aunque se habían detectado concentraciones elevadas de microorganismos productores de tiramina, no se detecta tiramina. Si bien, un periodo de almacenamiento largo de este producto podría llevar a un acumulo de este compuesto puesto que se detectaron niveles altos de productores. El análisis conjunto de estos resultados, pone de manifiesto el interés y la aplicabilidad de ambos métodos.

Tabla 7. Concentración de AB en queso azul (A y B), rallado y manchego.

Determinación y cuantificación de aminas biógenas por UHPLC en quesos (mg/Kg)								
Muestra	Tratamiento	Dilución	Histamina	Tiramina	Putrescina	Cadaverina	Triptamina	β - feniletanolamina
AZUL (A)	CARTUCHO	100 μ l	Ud.	Ud.	3,526	29,224	Ud.	Ud.
		50 μ l	Ud.	Ud.	1,058	14,101	Ud.	Ud.
		10 μ l	Ud.	Ud.	-	1,431	Ud.	Ud.
	TCA	100 μ l	Ud.	Ud.	3,262	27,793	Ud.	Ud.
		50 μ l	Ud.	Ud.	0,705	11,853	Ud.	Ud.
		10 μ l	Ud.	Ud.	Ud.	1,022	Ud.	Ud.
RALLADO	CARTUCHO	100 μ l	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.
		50 μ l	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.
		10 μ l	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.
	TCA	100 μ l	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.
		50 μ l	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.
		10 μ l	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	-	Ud.
MANCHEGO	TCA	100 μ l	Ud.	Ud.	1,587	Ud.	Ud.	Ud.
		50 μ l	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.
		10 μ l	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.	Ud.
AZUL (B)	TCA	100 μ l	347,618	4602,389	113,714	648,843	Ud.	Ud.

Ud.- Under detection

(A).- Azul leche pasteurizada

(B).- Azul leche cruda

Ilustración 2. Análisis cromatográfico de una muestra de queso azul (B).

